

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-538916

(P2009-538916A)

(43) 公表日 平成21年11月12日(2009.11.12)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	R	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 1/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 1/00		4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 31/04</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04		
<b>C 0 7 K 16/12</b>	<b>(2006.01)</b>	C 0 7 K 16/12	Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁)

(21) 出願番号	特願2009-513264 (P2009-513264)	(71) 出願人	508333608
(86) (22) 出願日	平成19年5月31日 (2007.5.31)		タリオン ファーマシューティカルズ インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成20年12月17日 (2008.12.17)		カナダ国 ケベック州 モントリオール
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/012797		アレクサンダー フレミング 7 1 5 0
(87) 国際公開番号	W02007/143004	(71) 出願人	501051125
(87) 国際公開日	平成19年12月13日 (2007.12.13)		ザ ヘンリー エム. ジャクソン ファウンデーション フォー ザ アドヴァン
(31) 優先権主張番号	60/809,464		スメント オブ ミリタリー メディシン
(32) 優先日	平成18年5月31日 (2006.5.31)		インコーポレイテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国, メリーランド州, ロックヴィル, ロックヴィル パイク 1
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 志賀毒素関連病状を治療するための方法、組成物、およびキット

## (57) 【要約】

本発明は、キメラ抗志賀毒素1(c Stx1)抗体および抗志賀毒素2(c Stx2)抗体を用いて志賀毒素関連疾病を罹患している対象を治療するための方法、組成物、およびキットを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体の有効量を対象に投与する段階を含む、対象における志賀毒素関連病状の治療の方法であって、

前記キメラ抗体のそれぞれを1mg/kgまたは3mg/kgで投与し、

前記キメラ抗Stx1抗体が、

(a)ヒトIgG1- 免疫グロブリン定常領域と、

(b)SEQ ID NO:1に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

(c)SEQ ID NO:2に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含み、かつ

10

前記キメラ抗Stx2抗体が、

(d)ヒトIgG1- 免疫グロブリン定常領域と、

(e)SEQ ID NO:3に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

(f)SEQ ID NO:4に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含む、方法。

## 【請求項 2】

キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体が同時投与される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 3】

キメラ抗体を、少なくとも30分間にわたる静脈内注入により投与する、請求項1に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

キメラ抗体を、30分間から1時間にわたる静脈内注入により投与する、請求項3に記載の方法。

## 【請求項 5】

対象がヒトである、請求項1に記載の方法。

## 【請求項 6】

ヒトが18歳未満である、請求項5に記載の方法。

## 【請求項 7】

ヒトが生後6ヶ月から3歳である、請求項6に記載の方法。

## 【請求項 8】

ヒトが生後6ヶ月未満である、請求項6に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

キメラ抗体をそれぞれ、1mg/kgの投薬量で投与する、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 10】

キメラ抗体をそれぞれ、3mg/kgの投薬量で投与する、請求項2に記載の方法。

## 【請求項 11】

キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体、ならびにラベルを含む製品であって、

前記ラベルが、前記キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体が志賀毒素関連疾病を治療するためのものでありかつそれぞれ1mg/kgまたは3mg/kgの投薬量で投与されるものであることを示し、

40

前記キメラ抗Stx1抗体が、

(a)ヒトIgG1- 免疫グロブリン定常領域と、

(b)SEQ ID NO:1に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

(c)SEQ ID NO:2に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含み、かつ

前記キメラ抗Stx2抗体が、

(d)ヒトIgG1- 免疫グロブリン定常領域と、

(e)SEQ ID NO:3に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

(f)SEQ ID NO:4に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含む、製品。

50

## 【請求項 1 2】

ラベルが、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体がそれぞれ1mg/kgの投薬量で投与されることを示す、請求項11に記載の製品。

## 【請求項 1 3】

ラベルが、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体がそれぞれ3mg/kgの投薬量で投与されることを示す、請求項11に記載の製品。

## 【請求項 1 4】

キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体、取扱説明書、ならびにラベルを含むキットであって、

前記取扱説明書が、前記キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体を1mg/kgまたは3mg/kgの投薬量で投与するためのものであり、

前記ラベルが、前記キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体が志賀毒素関連疾病を治療するためのものであることを示し、

前記キメラ抗Stx1抗体が、

(a) ヒトIgG1- 免疫グロブリン定常領域と、

(b) SEQ ID NO:1に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

(c) SEQ ID NO:2に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含み、かつ

前記キメラ抗Stx2抗体が、

(d) ヒトIgG1- 免疫グロブリン定常領域と、

(e) SEQ ID NO:3に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域と、

(f) SEQ ID NO:4に記載されるアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域と

を含む、キット。

## 【請求項 1 5】

取扱説明書が、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体を1mg/kgの投薬量で投与するためのものである、請求項14に記載のキット。

## 【請求項 1 6】

取扱説明書が、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体を3mg/kgの投薬量で投与するためのものである、請求項14に記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【背景技術】

## 【0001】

発明の背景

概して、本発明は、志賀毒素関連疾病の治療および予防の分野に関する。

## 【0002】

米国では、志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin(Stx)-producing *Escherichia coli*:STEC)の感染は、年間、約110,000件に上る。腸管出血性大腸菌(EHEC)、特に血清型O157:H7は、Stx媒介疾病を発症することで知られているSTECのサブセットである。Stx産生生物による感染から発症しうる合併症は、溶血性尿毒症症候群(HUS)であり、溶血性貧血、 trombocytopeniaの血小板減少症、および腎不全を特徴とする。HUSを罹患する人の致死率は約5~10%であり、生存者は恒久的な腎障害を有する恐れがある。現在、Stx媒介疾病からの疾患を対処、または予防するためのFDAに認可された療法またはワクチンはないが、今後のいくつかの有望な選択肢には、Stx2に結合し、中和するヒト化モノクローナル抗体と、中和反応を引き起こし、Stx1またはStx2もしくはStx1およびStx2の致死攻撃に対して保護を提供するキメラStxA2/StxB1トキソイドとが挙げられる。

## 【0003】

本来、Stxの2つの主な型は、Stx/Stx1およびStx2である。Stx1およびStx2が大腸菌から産生される一方、Stxは、志賀赤痢菌1型から産生される。StxおよびStx1は、Aサブユニットに1つだけアミノ酸の相違があるが、実質的に同一である。Stx1およびStx2の成熟AおよびBサブユニットはそれぞれ、68%および73%の類似性がある。アミノ酸配列の相違にも

関わらず、StxおよびStx2の結晶構造は、著しく類似している(図1)。これらの毒素は、ポリクローナル抗血清により区別することができ、Stx1に対して生じるポリクローナル抗血清は、Stx2を中和せず、逆もまた同様である。Stx1およびStx2の変形が存在し、それには、Stx1c、Stx1d、Stx2c、Stx2d、活性化可能Stx2d(Stx2-act.)、Stx2e、およびStx2fが含まれる。

#### 【0004】

志賀毒素は、AB<sub>5</sub>構造を有する複合体ホロトキシンである。活性ドメイン(A)は、60Sリボソームサブユニットの28S rRNAを脱プリン化するN-グリコシダーゼを含み、タンパク質合成を停止し、最終的には、細胞死に至らせる。Aサブユニットは、約32kDaであり、トリプシンまたはフューリンによって、単一ジスルフィド結合で結合した約28kDaのA<sub>1</sub>サブユニット、および約5kDaのA<sub>2</sub>ペプチドにタンパク質分解的に切断される。A<sub>1</sub>サブユニットは、活性ドメインを含み、A<sub>2</sub>ペプチドは、活性ドメインを結合ドメインに非共有結合する。結合ドメイン(B)は、A<sub>2</sub>ペプチドのC末端が横断する5量体を形成する5つの同一の約7.7kDaのモノマーからなる。Bサブユニットのそれぞれのモノマーは、それぞれのモノマー内でジスルフィド結合を形成する2つのシステイン残基を有する(図2)。Bの5量体は、真核生物の受容体であるグロボトリアオシルセラミド(Gb<sub>3</sub>)(またはStx2eの場合、Gb<sub>4</sub>)に結合する。

10

#### 【0005】

これらの毒素の暴露の結果についての知識にも関わらず、現在、HUSに対する治療法またはワクチンは知られていない。抗生物質の使用は、細菌から毒素放出の増加によって状況を悪化させる場合がある。従って、志賀毒素により産生されるEHECの合併症を予防または治療するための化合物を必要とする。このような化合物を、感染した対象を治療するため、ならびに中枢神経系、血液、および腎臓に対する毒素の全身的作用を低下するために使用することができる。さらに、毒素を中和することが可能である場合、消化管の細菌を殺すために、抗生物質を与えることが可能である。また、このような化合物を使用して、EHECに感染する前に、バクテリアにさらされた個人、または高いリスクを有する個人を処置することにより、感染合併症を予防することも可能である。このような個人には、EHECによる下痢が認められる保育所の子供または老人ホームの高齢者を含む。これらの個人は、EHECを発症する危険性がより高く、多くの場合、重度の合併症を伴い、これらの環境でのEHECの蔓延は、珍しいことではない。

20

30

#### 【発明の開示】

#### 【0006】

発明の開示

本発明者らは、キメラ抗Stx1およびキメラ抗Stx2は、1mg/kgまたは3mg/kgで投与すると、志賀毒素関連疾病の治療に効果的であることを発見した。

#### 【0007】

一態様において、本発明は、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体の有効量を対象に投与することによる、対象(例えば、ヒト)における志賀毒素関連病状の治療法を特徴とする。キメラ抗体のそれぞれは、1mg/kgまたは3mg/kgで投与される(例えば、15、30、45、60、90、120分間、またはそれ以上にわたる静脈内注入より投与される。好ましい実施形態において、抗体は、30分から1時間で静脈内注入より投与される)。本態様において、キメラ抗Stx1抗体は、ヒトIgG1 免疫グロブリン定常領域、SEQ ID NO:1に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:2に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。キメラ抗Stx2抗体は、ヒトIgG1 免疫グロブリン定常領域、SEQ ID NO:3に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:4に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

40

#### 【0008】

別の態様において、本発明は、製品を特徴とする。本製品は、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体ならびにラベルを含む。本ラベルは、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗

50

Stx2抗体が志賀毒素関連疾病(例えば、18歳未満、生後6ヶ月未満、および生後6ヶ月から3歳のヒトにおける)を治療するためのものであり、それぞれ1mg/kgまたは3mg/kgの投薬量で投与されるものであることを示す。本態様において、キメラ抗Stx1抗体は、ヒトIgG1免疫グロブリン定常領域、SEQ ID NO:1に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:2に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。キメラ抗Stx2抗体は、ヒトIgG1免疫グロブリン定常領域、SEQ ID NO:3に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:4に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0009】

さらに別の態様において、本発明は、キットを特徴とする。本キットは、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体、取扱説明書、ならびにラベルを含む。取扱説明書は、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体を1mg/kgまたは3mg/kgの投薬量で投与するためのものである。本態様において、本ラベルは、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体が志賀毒素関連疾病(例えば、18歳未満、生後6ヶ月未満、および生後6ヶ月から3歳のヒトにおける)を治療するためのものであることを示す。さらに、キメラ抗Stx1抗体は、ヒトIgG1免疫グロブリン定常領域、SEQ ID NO:1に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:2に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。キメラ抗Stx2抗体は、ヒトIgG1免疫グロブリン定常領域、SEQ ID NO:3に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:4に記載されているアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0010】

前述の態様のいずれにおいても、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体を同時投与することができる。さらに、キメラ抗Stx1抗体およびキメラ抗Stx2抗体を投与する対象は、18歳未満(例えば、生後6ヶ月未満、または生後6ヶ月から3歳)であることが可能である。

【0011】

「キメラ抗Stx1」または「c Stx1」とは、Stx1に特異的に結合するヒト化抗体を意味し、IgG1ヒト免疫グロブリン定常領域およびマウス13C4(ATCCアクセッション番号CRL 1794)可変領域を含む。本抗体は、米国特許出願公開第20030170248号に記載され、参照によりその全体が本明細書に含まれる。

【0012】

「キメラ抗Stx2」または「c Stx2」とは、Stx2に特異的に結合するヒト化抗体を意味し、IgG1ヒト免疫グロブリン定常領域およびマウス11E10(ATCCアクセッション番号CRL 1987)可変領域を含む。本抗体は、米国特許出願公開第20030170248号に記載され、参照によりその全体が本明細書に含まれる。

【0013】

「特異的に結合する」という用語は、 $K_d$ 値が100nM~1pMの間で、タンパク質(例えば、Stx1またはStx2)に結合する抗体を意味する。抗体親和性は、表面プラスモン共鳴ベースのアッセイ、酵素免疫測定法(ELISA)、および競合アッセイ(例えば、RIA法)を含むが、これらに限定されない、当技術分野では既知の任意のアッセイを使用して決定してもよい。

【0014】

「同時投与する」とは、2つの抗体の導入を同時に行うことを意味する。一実施形態において、それぞれの抗体は、適切な投薬量で、単一容器(例えば、緩衝液または溶液(例えば、食塩水)を含む容器)に導入される。その後、この混合物は、静脈内注入により対象に投与される。

【0015】

「志賀毒素関連疾病」とは、志賀毒素を発現する病原体から生じる任意の疾病を意味する。「志賀毒素関連疾病」という用語は、溶血性尿毒症症候群、細胞性赤痢、志賀毒素を産生する大腸菌または志賀赤痢菌感染から生じる疾病を含むことを意味する。

【0016】

10

20

30

40

50

「治療」という用語は、治療上の処置および予防的治療または予防措置の双方を意味する。治療を必要としている対象は、病状をすでに示している対象および疾患から予防される対象を含む。

【0017】

「静脈内注入」という用語は、15、30、45、60、90、120分間、またはそれ以上にわたり、対象の静脈に薬物を導入することを意味する。好ましい実施形態において、抗体は、30分から1時間で静脈内注入により投与される。

【0018】

発明の詳細な説明

概して、本発明は、本明細書で定義するように、キメラ抗志賀毒素1(c Stx1)およびキメラ抗志賀毒素2(c Stx2)抗体を使用して、対象において、志賀毒素関連疾病を治療するための方法、組成物、およびキットを特徴とする。

【0019】

I. 効能

本発明の化合物および方法は、志賀毒素関連疾病を罹患する、または発症する危険性がある対象を治療するために有用である。このような対象は、志賀赤痢菌感染またはEHEC(腸管出血性大腸菌)に感染した対象を含む。また、このような対象は、保育所の子供または老人ホームの高齢者を含む。一例において、対象は、EHECによる下痢が認められた保育所または老人ホーム内にいる。本例において、対象は、疾病を発病している可能性もあり、発病していない可能性もある。志賀毒素関連疾病は、志賀毒素を産出する、志賀赤痢菌、またはEHEC、特に血清型O157:H7の感染から生じるものを含む。これらの感染は、多くの場合、溶血性尿毒症症候群(HUS)を生じ、溶血性貧血、トロンビンの血小板減少症、および腎不全を特徴とする。

【0020】

II. キメラ Stx1および STX2抗体

本発明は、志賀毒素関連疾病の治療のためのキメラ Stx1およびキメラ Stx2抗体を含む方法および組成物を特徴とする。これらの抗体は、米国特許出願第09/215,163号および第11/471,420号に記載され、それらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に含まれる。c Stx1およびc Stx2は、志賀毒素1(Stx1)および志賀毒素2(Stx2)にそれぞれ結合するキメラモノクローナルIgG1抗体である。c Stx1は、Stx1のBサブユニットを認識し、c Stx2は、Stx2のAサブユニットを認識する。

【0021】

キメラ抗Stx1抗体は、Stx1に特異的に結合するヒト化抗体であり、IgG1 ヒト免疫グロブリン定常領域、およびマウス13C4(ATCCアクセッション番号CRL 1794)可変領域を含む。一実施形態において、マウス重鎖可変領域は、SEQ ID NO:1に記載されているアミノ酸配列を含み、マウス軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:2に記載されているアミノ酸配列を含む。本抗体は、米国特許出願公開第20030170248号に記載され、参照によりその全体が本明細書に含まれる。

【0022】

キメラ抗Stx2抗体は、Stx2に特異的に結合するヒト化抗体であり、IgG1 ヒト免疫グロブリン定常領域、およびマウス11E10(ATCC アクセッション番号CRL 1987)可変領域を含む。一実施形態において、マウス重鎖可変領域は、SEQ ID NO:3に記載されているアミノ酸配列を含み、マウス軽鎖可変領域は、SEQ ID NO:4に記載されているアミノ酸配列を含む。本抗体は、米国特許出願公開第20030170248号に記載され、参照によりその全体が本明細書に含まれる。

【0023】

III. 製剤の処方

本発明によって使用される抗体の治療製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、任意の薬学的に許容できる担体、賦形剤、または安定剤を備える、望ましい純度を有する抗体を含むことが可能である(Remington:The Science and Practice of Pharmacy 21st edi

10

20

30

40

50

tion, University of the Sciences in Philadelphia Ed. 2005)。静脈内投与のための許容可能な担体、賦形剤、または安定剤は、使用した用量および濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤、保存料(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム塩、塩化ヘキサメトニウム、ベンザルコニウムクロリド、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール、メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールなど)、低分子量(約10残基未満)ポリペプチド、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸、単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖類、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)、および/またはTWEEN(商標)、PLURONICS(商標)、またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン界面活性剤などを含むことが可能である。

10

#### 【0024】

また、本明細書の製剤は、治療される特定の兆候に対し、必要に応じて、1つ以上の活性のある化合物、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有する化合物を含んでもよい。例えば、一製剤において、Stx1またはStx2に結合する抗体(例えば、Stx1またはStx2上の異なるエピトープに結合する抗体)をさらに提供することが、望ましい場合がある。

20

#### 【0025】

また有効成分も、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)またはマクロエマルジョンにおいて、それぞれ例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタシレート)マイクロカプセルといった、例えば液滴形成法または界面重合によって調製されたマイクロカプセルに封入されてもよい。かかる技術は、Remingtonによる、The Science and Practice of Pharmacy 21st edition, University of the Sciences in Philadelphia Ed. 2005に開示されている。

#### 【0026】

生体内投与のために用いられる処方は無菌でなければならない。このことは、除菌ろ過膜を通した、ろ過によって容易に達成される。

30

#### 【0027】

持続放出調製物を調整してもよい。持続放出調製物の適切な例としては、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、このマトリックスは造形品、例えば被膜、またはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル類、ヒドロゲル類(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド類(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸およびL-グルタミン酸 エチルの共重合体、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドからなる注射可能な微小球)などの分解性乳酸-グリコール酸共重合体、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは、100日にわたって分子の放出が可能であるが、あるヒドロゲル類は、より短期間でタンパク質を放出する。カプセル化抗体が長時間体内に残存すると、37℃で湿気に曝された結果として変性または凝縮し、その結果、生物学的活性の欠失および免疫原性に変化が起こる可能性がある。関連するメカニズムに基づいて、安定化のために合理的な戦略を立てることができる。例えば、凝縮メカニズムがチオ-ジスルフィド交換を介した分子間S-S結合形成であることが見出された場合には、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分含量を調節し、適当な添加物を用いて特異的なポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。

40

50

## 【0028】

経口使用用の処方、非毒性の薬学的に許容可能な賦形剤との混合物において、有効成分を含む錠剤を含む。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤または賦形剤(例えば、スクロース、ソルビトール、糖、マンニトール、微結晶性セルロース、ジャガイモでんぷんを含むでんぷん、炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、乳糖、リン酸カルシウム、硫酸カルシウム、またはリン酸ナトリウム)、造粒剤および崩壊剤(例えば、微結晶性セルロースを含むセルロース誘導体、ジャガイモでんぷんを含むでんぷん、クロスカルメロースナトリウム、アルギン酸塩、またはアルギン酸)、結合剤(例えば、スクロース、グルコース、ソルビトール、アカシア、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、でんぷん、アルファー化でんぷん、微結晶性セルロース、ケイ酸アルミニウムマグネシウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ポリビニルピロリドン、またはポリエチレングリコール)、および潤滑剤、流動促進剤、および付着防止剤(例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、硬化植物油またはタルク)であってもよい。他の薬学的に許容可能な賦形剤は、着色剤、着香料、可塑剤、保湿剤、緩衝剤などであり得る。

10

## 【0029】

錠剤は、コーティングされてなくても、また、任意に胃腸管内での分解および吸収を遅延させ、それにより、より長期間にわたり、持続作用を提供するために、既知の技術によりコーティングされたものであってもよい。コーティングは、(例えば、放出制御製剤を達成するために)既定のパターンで、活性原薬を放出するように構成されてもよく、また、胃を通過した後まで活性原薬を放出しないように構成されてもよい(腸溶コーティング)。コーティングは、糖衣、フィルムコーティング(例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース、メチルヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、アクリレートコポリマー、ポリエチレングリコールおよび/またはポリビニルピロリドンに基づく)、または腸溶コーティング(例えば、メタクリル酸コポリマー、酢酸フタルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、酢酸コハク酸ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリ酢酸ビニルフタレート、シェラック、および/またはエチルセルロースに基づく)であってもよい。さらに、例えば、モノステアリン酸グリセリン、またはジステアリン酸グリセリルなどの時間遅延物質を使用することもできる。

20

30

## 【0030】

固体錠剤組成物は、不要な化学変化(例えば、活性原薬の放出前の化学分解)から組成物を保護するために適用されるコーティングを含んでもよい。

## 【0031】

## IV. c Stx1およびc Stx2抗体による治療

本発明によると、c Stx1およびc Stx2抗体は、様々な志賀毒素関連疾病を治療するために使用することができることを意図している。本発明の抗体は、ボラスとしての静脈内投与または一定期間にわたる持続注入、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、直腸、局所、または吸入の経路による、既知の方法に従って、対象(例えば、ヒト患者)に投与される。抗体の静脈内投与が好ましい。さらに、抗体または拮抗薬は、例えば、抗体の用量が徐々に低下する、パルス注入により適切に投与されてもよい。

40

## 【0032】

疾病の予防または治療に対して、c Stx1およびc Stx2抗体の適切な用量は、上記に定義されたように、治療する疾病の型、志賀毒素関連疾病の重症度および経過、抗体が予防のため、あるいは治療目的に投与されるのか、薬歴、患者の病歴および抗体への反応、および主治医の判断などにより異なる。抗体は、1回または一連の治療にわたり、患者に適切に投与される。

## 【0033】

本発明によると、投与計画には、c Stx1およびc Stx2抗体のそれぞれに対して、静脈

50



内注入または皮下注入により送達される1mg/kg、さらに好ましくは3mg/kgの投与を含んでもよい。これらの2つの抗体は、単一製剤または別個の製剤として投与されてもよい。患者が抗体によく耐えられる場合、注入時間を減らしてもよい。

【0034】

この初回投与の後に、静脈内注入、静脈内ボラス注射、皮下注入、固体経口量、または皮下ボラス注射による、後の追加投与が続いてもよい。

【0035】

V. 製品

本発明の別の実施形態において、上記に記載の疾患の治療に有用な材料を含む製品を提供する。本製品は、容器、ラベルおよび添付文書を含む。適切な容器は、例えば、瓶、バイアル、注射器などを含む。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。容器は、病状を治療するために効果的である組成物を保持し、滅菌アクセスポート(例えば、本容器は、静脈注射用の溶液袋または皮下注射針により貫通可能な栓付きのバイアルであってもよい)を有してもよい。組成物内の少なくとも1つの活性剤は、c Stx1抗体またはc Stx2抗体のいずれか、または双方である。容器上のラベル、また容器に付随しているラベルは、選択された病状を治療するために本組成物が使用されることを示す。製品は、リン酸塩緩衝食塩水、リンガー溶液およびデキストロース溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む、第2の容器をさらに含んでもよい。他の緩衝液、賦形剤、フィルター、針、注射器を含む市販用、および利用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。さらに、該製品は、使用のための取扱説明書がある添付文書を含んでもよい。

10

20

【0036】

さらに、本発明のキットは、c Stx1およびc Stx2のうちの1つまたは双方を含んでもよく、好ましくは静脈内投与用に処方されたものを含んでもよい。このようなキットは、志賀毒素関連疾病を罹患する、または発症する危険性がある患者に、1mg/kgまたは3mg/kgのいずれかで抗体を投与するための取扱説明書をさらに含んでもよい。

【0037】

VI. 実施例

実施例1

成人健常者におけるキメラ抗志賀毒素1(c Stx1)および志賀毒素2(c Stx2)の安全性および耐容性  
序

30

現在、志賀毒素産生細菌(STPB)感染およびその合併症に対する原因療法はない。志賀毒素1および志賀毒素2に対するキメラモノクローナル抗体(c Stx1およびc Stx2と称する)は、満たされていない医療ニーズに取り組むために開発された。ヒトSTPBは、志賀毒素のいずれか、または双方を産生することができるため、双方の毒素に対する抗体は、臨床の成功のチャンスを最大限にするために必要とされる。前臨床試験において、2つのモノクローナル抗体のいずれも2種における全身毒性に関連するものが認められなかった。

【0038】

2つの第I相試験から成人健常者における抗毒素c Stx1およびc Stx2の安全性、耐容性および薬物動態学を下記に示す。

40

【0039】

目的

健常成人男性および女性において行われた、2つの第I相臨床試験の主要目的は、単独または同時に投与した抗体の単一静脈内投与後に、キメラモノクローナル抗体の安全性および耐容性、c Stx1およびc Stx2を評価するものであった。

【0040】

試験の第2の目的は、

(i) c Stx1およびc Stx2の薬物動態を評価すること、および

(ii) ヒト抗キメラ抗体(HACA)の成果を評価することである。

50

## 【 0 0 4 1 】

## 方法

それぞれの試験は、第I相、単一部位、非盲検、非無作為化試験であった。主要試験の適格性基準を表1に記載する。すべての試験の参加者は、健常成人男性ボランティアおよび健常成人女性ボランティアであった。

## 【 0 0 4 2 】

## (表1) 主要試験の適格性基準

## 試験対象患者基準：

- 18歳から55歳までの男性または女性(18歳および55歳を含む)
- 19.0kg/m<sup>2</sup>以上および24.9kg/m<sup>2</sup>未満のBMI

## 除外基準：

- 日々の処方薬を必要とする慢性病状
- 糖尿病、癌、心臓病、自己免疫疾患、精神病、中枢神経系障害、発作、呼吸器疾患、または腎機能異常の病歴または存在
- 臨床的に有意と判断された臨床試験の異常
- 肝炎B、C、またはHTVに対するスクリーニングテストで陽性である
- スクリーニングでECGの異常(臨床的に有意)または生体信号の異常がある(最大血圧90未満もしくは140mmHgを超える、最小血圧50未満もしくは90mmHgを超える、または心拍数50/分未満もしくは100/分を超える)。

## 【 0 0 4 3 】

表2に記載される濃度で、単回投与として、キメラ抗体を投与した。試験の処置は、100 mLの生理食塩水で希釈し、専用の静脈ラインを介して、100mL/時間で1時間注入された。

## 【 0 0 4 4 】

## (表2) 試験処置

患者数	caStx1の投与量(mg/kg)	caStx2の投与量(mg/kg)
4	1	-
4	3	-
4	-	1
4	-	3
5	1	1
5	3	3

## 【 0 0 4 5 】

主な試験来診評価を表3に記載する。

## 【 0 0 4 6 】

## (表3) 試験来診評価

評価	スクリーニング日 30日前から1日前	1日前	1日目	2日目	4日目	8日目	15日目	29日目	43日目	57日目 またはET
健康診断	X	X		X	X	X	X	X	X	X
心電図	X		X*	X		X	X			X
安全ラボ	X	X		X	X	X	X	X		X
薬剤 管理試験			X							
PK			X*	X	X	X	X	X	X	X
HACA			X					X	X	X

ET = 早期終了 \* = 複数評価 HACA = ヒト抗キメラ抗体

## 【 0 0 4 7 】

PK血清試料は、以下のような間隔で採取された：投与前、治療薬注入を開始してから、0.25時間、0.5時間、1時間(治療薬注入終了)、1.25時間、1.5時間、2時間、3時間、4時間、5時間、7時間、9時間、12時間、24時間(2日目)、72時間(4日目)、168時間(8日目)、336時間(15日目)、672時間(29日目)、1032時間(43日目)、および1344時間(57日目)。有効なE

LISA法を使用して、c Stx1およびc Stx2の濃度を決定するために、PK血清試料を分析した。PKパラメータ(Cmax、Tmax、AUC(0-t)、AUC(0-inf)、 $\lambda_z$ 、t1/2、CLおよびVz)は、それぞれの抗体に対する標準ノンコンパートメント法で算出した。

#### 【0048】

有効なELISA法を使用して、抗c Stx1抗体および抗c Stx2抗体に対して血清試料を分析した。

#### 【0049】

すべての分析は、記録し、試験薬のいずれかの量を投与した、任意の参加者からなる、安全集団に基づいた。

#### 【0050】

結果

26人の参加者のうち25人が57日目に試験を終了した。混合した1mg/kgのc Stx1および1mg/kgのc Stx2群の1人の参加者が2日目の来診後、続行を停止した。

#### 【0051】

重篤有害事象は観察されず、26人の参加者のうち4人(15%)は、有害事象を認められなかった。報告された最も頻度の高い有害事象を、表4に示し、重症度においては、軽度から中度であった。

#### 【0052】

(表4)最も頻度の高い有害事象

有害事象	AEを有する参加者数/投与群あたりの参加者数						合計
	caStx1 1 mg/kg	caStx1 3 mg/kg	caStx2 1 mg/kg	caStx2 3 mg/kg	caStx1/caStx2 1/1 mg/kg	caStx1/caStx2 3/3 mg/kg	
腹部のけいれん	0/4	0/4	0/4	0/4	1/5	1/5	2/26
背痛	1/4	1/4	1/4	0/4	0/5	0/5	3/26
鼓腸	0/4	0/4	0/4	0/4	0/5	3/5	3/26
風邪の症状	0/4	1/4	0/4	0/4	1/5	0/5	2/26
咳	2/4	0/4	0/4	1/4	0/5	0/5	3/26
下痢	0/4	1/4	0/4	0/4	0/5	2/5	3/26
発熱	1/4	1/4	0/4	0/4	0/5	0/5	2/26
頭痛	2/4	0/4	0/4	0/4	2/5	1/5	5/26
嘔吐	0/4	1/4	0/4	1/4	0/5	1/5	3/26
白血球尿	0/4	0/4	0/4	1/4	0/5	2/5	3/26
採血部位での紅斑	0/4	0/4	0/4	0/4	2/5	0/5	2/26
注入部位での紅斑	0/4	0/4	0/4	0/4	1/5	1/5	2/26
眠気	0/4	0/4	0/4	0/4	4/5	1/5	5/26
喉の痛み	1/4	0/4	1/4	1/4	0/4	0/4	3/26

#### 【0053】

抗体の投与と有害事象を経験した参加者数との明白な関係はなく、概して、異常な検査パラメータは、臨床的に有意ではなかった。表4に報告された発熱を除いては、c Stx1またはc Stx2の用量と、臨床検査異常値の発生との間の傾向は見られず、体重、生体信号、または心電図の測定値(心拍数、PR、QRSおよびQT/QTc)において、臨床的に著しい変化はなかった。

#### 【0054】

単独に抗体を投与した試験参加者におけるc Stx1およびc Stx2の平均血清濃度を、図1に示す。

#### 【0055】

単独抗体投与試験におけるそれぞれの試験参加者に対する薬物動態の結果を表5に示す。混合抗体投与試験に対する薬物動態の結果は、判断を行っている最中である。

#### 【0056】

(表5)c Stx1およびc Stx2の単独投与に対する薬物動態パラメータ

10

20

30

40

参加者番号	投与群	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>inf</sub>	t <sub>1/2</sub> (時間)
001	1 mg/kg caStx1	23155.29	1976510.68	97.701
002	1 mg/kg caStx1	28636.93	N/A	N/A
003	1 mg/kg caStx1	25562.79	2156130.90	85.588
004	1 mg/kg caStx1	21644.56	2293940.55	112.164
005	3 mg/kg caStx1	86707.01	10651193.50	155.691
006	3 mg/kg caStx1	85035.24	18089272.33	184.153
007	3 mg/kg caStx1	112543.33	N/A	N/A
008	3 mg/kg caStx1	86116.34	8114842.87	282.396
009	1 mg/kg caStx2	25086.41	7244993.38	314.921
010	1 mg/kg caStx2	29603.41	7214392.22	430.969
011	1 mg/kg caStx2	28666.08	2477386.00	60.832
012	1 mg/kg caStx2	33610.09	6131600.07	418.828
013	3 mg/kg caStx2	77715.58	18405696.29	251.760
014	3 mg/kg caStx2	104325.34	13362783.90	188.628
015	3 mg/kg caStx2	104839.75	23071589.07	219.575
016	3 mg/kg caStx2	115883.56	17131825.36	211.623

10

## 【 0 0 5 7 】

20

26人の参加者のうち3人は、表6のように、検出限界に近い濃度でヒト抗キメラ抗体(HAC A)の誘発を示した。

## 【 0 0 5 8 】

(表 6 )HACA反応

参加者番号	投与群	試料採取日	抗体濃度 (ng/mL)
016	3 mg/kg caStx2	57日目	56.94
007	3 mg/kg caStx1および 3 mg/kg caStx2	29日目	8.40
		57日目	18.60
008	3 mg/kg caStx1および 3 mg/kg caStx2	29日目	8.19

30

## 【 0 0 5 9 】

標準曲線範囲は、7.81~750ng/mLであった。いずれの試験においても試験したサンプルは、c Stx1に対して結合するための定量限界値(LLoQ)を超える結果を得なかった。

## 【 0 0 6 0 】

結論

試験参加者中、有害事象(AE)または異常所見のため、治療薬注入中断または中止された者はなかった。AEのため、試験を中止する参加者はなく、重篤有害事象(SAE)を体験した者もなく、c Stx1およびc Stx2の単独または混合した抗体投与群の間で体重、生体信号または心電図の測定において、一貫した変化はなかった。

## 【 0 0 6 1 】

40

それぞれの抗体に対する2用量の間のC<sub>max</sub>およびAUCにおいて、予期された約3倍の増加がある。3mg/kgで、c Stx1およびc Stx2の半減期は、約9日である。ヒト抗キメラ抗体(HACA)反応は、最小限であった。

## 【 0 0 6 2 】

それぞれの試験が終了した時点で、独立した医療モニタおよび治験責任医師からなる安全委員会は、すべての試験参加者の検査結果、ECG追跡およびAEを検討し、抗体につき最高3mg/kgまでを単独または同時に投与したc Stx1およびc Stx2が、安全で耐容性良好との結論を下した。全体として、抗体につき最高3mg/kgで単独または同時に静脈内投与した抗毒素c Stx1およびc Stx2は、健常成人男性および健常成人女性において、安全かつ耐容性良好であると判断された。

50

## 【0063】

## 実施例2

マウスおよびマーモセットにおけるc Stx1およびc Stx2の毒性および免疫原性  
序

志賀毒素産生性大腸菌(STEC)は、下痢、出血性大腸炎、および溶血性尿毒症症候群(HUS)を含む臨床スペクトルを有する、潜在的に致死的で、多くの場合流行性の、食品系および水系感染の原因となる人畜病原体である(Karmali MAら、J Infect Dis, 2003:188(1 Dec)1724-1729)。STECは、2つの異なる志賀毒素型である、志賀毒素1および志賀毒素2を産生する(Karmali MAら、J Infect Dis, 2004:189(1 Feb)355-359)。現在、STEC感染に対して特定の治療法はないが、志賀毒素産生細菌(STPB)のため、2つの特定の抗毒素が感染を治療するために開発中である。

10

## 【0064】

2つの動物種において試験した毒性および抗毒素の免疫原性を本実施例に示す。化学の様々な階級の毒性を評価するために、広く用いられているモデルであり、歴史的に大きなデータベースがあることから、マウスを試験した。げっ歯類ではないマーモセット霊長類モデルにおいて、さらに毒性試験を行った。

## 【0065】

## 目的

マウスおよびマーモセットにおいて行われた、非臨床的な試験の目的は、単独または同時に健常な動物に投与した抗体の単一静脈内投与後に、それぞれのキメラモノクローナル抗体、c Stx1、および/またはc Stx2の、潜在的急性毒性および免疫原性を評価するものであった。

20

## 【0066】

## 方法

マウスの試験において、実験的に未使用で約7週齢の167匹の雄および雌のCD1マウスを含んだ。すべてのマウスの体重は、それぞれの性別に対して平均体重 $\pm$ 20%以内であった。動物は、治療群に雄雌別に無作為化された。それぞれの動物は、独自の識別番号を有するマイクロチップを埋め込まれた。マウスは、つるされたステンレス製金網型のケージに保管した。温度は、18~26℃、湿度は、30~70%に維持した。他の明/暗計画を実験的設計により必要としない場合、12時間の明期および12時間の暗期の周期を提供するために自動的に12時間の暗期の周期を制御された。マウスは、任意に飼料(Lab Diet(登録商標) Certified Rodent Diet #5002、PMI Nutrition International, Inc.)および水を与えた。

30

## 【0067】

投薬溶液を投与日に調製した。マウスは、c Stx1、c Stx2、またはc Stx1およびc Stx2の双方を尾静脈を介して単一ボラス注射を表7のように試験の1日目、または1日目および8日目に与えられた。投薬溶液試料を採取し、ピシンコニン酸(BCA)によりタンパク質濃度を分析した。有効なELISA法を使用して、抗c Stx1抗体および抗c Stx2抗体ならびにアイソタイプに対して29日目に採取したマウス血清試料を分析した。

## 【0068】

ケージの外からの観察、ならびに皮膚、毛皮、目、耳、鼻、口腔、胸部、腹部、外性器、肢、足、呼吸器系、循環系、および神経系などの詳細な臨床検査を毎日実施した。

40

## 【0069】

到着の翌日、ランダム化の前(1日前)、および試験中は毎週、すべてのマウスの体重を測定し、記録した。

## 【0070】

表7に定義されるように、臨床病理学および血清抗体評価のために、血液および尿試料を採取した。

## 【0071】

表7における時間に従い、殺処分後、肉眼、顕微鏡、および臓器重量評価を実施した。腫瘍を含む外部の異常についてマウスを肉眼検査した。腹部、胸部および頭蓋腔を異常に

50

ついて検査を行い、臓器は、除去し、検査を行い、固定剤に固定した。予定された剖検で副腎、脳、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、下垂体、睾丸、胸腺、甲状腺(副甲状腺を伴う)、および頸部を伴う子宮における臓器重量をすべての動物に対して記録し、適切な臓器重量比を算出した(体重および脳重量と比較)。表7のように、脳、心臓、注射部位、腎臓、大腸(盲腸、結腸、直腸)、肝臓、肺、リンパ節(鼠径の)、小腸(十二指腸、回腸、空腸)、脾臓、胸腺、および肉眼的病変の固定部分において、顕微鏡検査を行った。

【0072】

(表7)マウスの試験設計

群番号	マウス数		各抗体の投与 (mg/Kg) (静脈内 ボラス)	投与日	臨床的病理学採取日 (血液学、血清生化学、 検尿、および血清抗体評価)	剖検／臓器採取日					微視的病理学		
	計画								実際				
	M	F				M	F	M	F	M	F	M	F
1a	10	10	0 (Fb)	1日目	8日目*	10	10	8日目	10	10	AR	1	2
1b	10	10	0 (Fb)	1、8日目	15日目*	10	10	15日目	10	10	15日目	10	10
1c	10	10	0 (Fb)	1、8日目	29日目**	10	10	29日目	10	10	29日目	10	10
2a	10	10	30	1日目	8日目*	10	10	8日目	10	10	AR	-	2
2b	10	10	30	1日目	29日目**	10	10	29日目	10	10	AR	1	-
3a	10	10	30 x 2	1、8日目	15日目*	10	3*	15日目	10	3	15日目	10	3
3b	10	10	30 x 2	1、8日目	29日目**	10	4*	29日目	10	4	29日目	10	10
4	10	10	caStx1@30	1日目	29日目**	10	10	29日目	10	10	AR	-	-
5	10	10	caStx2@ 30	1日目	29日目**	10	10	29日目	10	10	AR	-	-

Fb = 処方緩衝液、1群 8日目に殺処分した動物を除いて、2 x 6mL/kgの賦形剤を投与(1用量)。

\* : 5個体/性別/群を血液学分析に使用し、かつ5個体/性別/群を臨床化学に使用した。

\* \* : 5個体/性別/群を血液および血清抗体分析に使用し、かつ5個体/性別/群を臨床化学に使用した。

AR : 3群の微視的病理学評価に基づき、必要とされる場合、微視的評価を実施した。

a、b : 生成物の不足のため、1日目に投与した20匹の雌のうち7匹のみが8日目に2回目の投与を受けた(生存したすべての動物)。

a : 3a群で投与した3匹の雌のうち2匹は血液分析に使用され、1匹は臨床化学に使用された。

b : 3b群で投与した4匹の雌のうち2匹は血液および血清抗体分析に使用され、2匹は臨床化学に使用された。

1群の対照マウスと2、3、4、および5群の治療マウスとの間で統計比較を実施した。

【0073】

マーモセット試験において、実験的に未使用で約1歳から5歳の22匹の雄と22匹の雌のマーモセット(合計44匹)(Callithrix jacchus)を9週間の順化後、試験に使用した。試験に使用した雄の体重は、299から372gであり、雌の体重は、313から435gであった。動物は、層別体重に基づいて投与群に無作為に割り当てられた。それぞれの動物に、独自の識別番号を有するマイクロチップを埋め込んだ。マーモセットは、温度と湿度が調整された部屋に雄雌別に別々に保管された。温度は、24~28℃、相対湿度は、30~70%に維持した。12時間の明/暗の周期を維持した。食事の計画に従い、毎日新しく準備した様々な餌を1日2回、それぞれの動物に与えた。また、それぞれの処置/触診後、直ちに褒美の餌を動物に与えた。採尿中を除いて自動水システムまたは瓶を介して、水道水を随意に与えた。

【0074】

投与溶液を投与日に調製した。表8のように、試験の1日目または1日目および8日目にc Stx1、c Stx2またはc Stx1およびc Stx2の双方を雄および雌のマーモセットに投与した。肢または腕の静脈に留置カテーテルを介して30分間にわたり、携帯型薬物注入ポンプにより試験品目を投与した。投薬溶液試料を採取し、ピシンコニン酸(BCA)によりタンパク質濃度を分析した。

## 【0075】

罹患率、死亡、けが、行動、外観、および糞に対する試験の継続を通して1日2回、すべてのマーモセットをケージの外から観察した。投与前、ランダム化の前(1日前)、および試験中は毎週、すべてのマーモセットの体重を測定し、少なくとも1回、記録した。

## 【0076】

投与前の段階中および剖検前に、すべての動物に1回、間接検眼法を実施した。

## 【0077】

投与前の段階中および1日目または8日目に30分間の注入終了直後、心拍数、RR、PR、QRS、QT、およびQTcの間隔を心電図記録法で1回、測定した。

## 【0078】

臨床病理学(血液および化学)および血清抗体評価のための血液試料を表8の試料採取計画に従い、8日目、15日目、または29日目に、指定したマーモセットの大腿静脈/動脈から採取した。16時間にわたり尿検査の試料を表8のように、採尿した。有効なELISA法を使用して、抗c Stx1抗体および抗c Stx2抗体ならびにアイソタイプに対してマーモセット血清試料を分析した。

## 【0079】

表8の時間に従い、肉眼、顕微鏡、および臓器重量評価を死後に実施した。十分な肉眼検査を実施した。予定された剖検で、目および視神経、副睾丸、前立腺、精嚢、および膀胱に加えて、マウス試験で記載されるのと同じ臓器のすべての臓器重量をすべての生存している動物に対して記録し、適切な臓器重量比を算出した(体重および脳重量と比較)。表8のように、目および視神経、皮膚、ならびに胃に加えて、マウス試験で記載される同一の固定部分において、顕微鏡検査を行った。

## 【0080】

(表8)マーモセットの試験設計

群 番号	マーモセット 数		抗体 (30分間の静脈注入)		各Mabの 投与量 (mg/kg)	投与日	抗体ならびに 臨床病理学的 血液および尿の採取回数				剖検／臓器採取回数				微視的病理学		
	計画		αStx1	αStx2			実際				実際				実際		
	M	F					M	F			M	F			M	F	
1a	2	2	-	-	0 (Fb)	1日目	8日目	2	2		8日目	2	2		AR	*	*
1b	2	2	-	-	2 x 0 (Fb)	1、8日目	15日目	2	2		15日目	2	2		実施	2	2
1c	2	2	-	-	2 x 0 (Fb)	1、8日目	29日目	2	2		29日目	2	2		実施	2	2
2a	2	2	実施	実施	30	1日目	8日目	2	2		8日目	2	2		AR	*	*
2b	2	2	実施	実施	30	1日目	29日目	2	2		29日目	2	2		AR	*	*
3a	2	2	実施	実施	2 x 30	1、8日目	15日目	2	2		15日目	2	2		実施	2	2
3b	2	2	実施	実施	2 x 30	1、8日目	29日目	2	2		29日目	2	2		実施	2	2
4a	2	2	実施	-	30	1日目	8日目	2	2		8日目	2	2		AR	*	*
4b	2	2	実施	-	30	1日目	29日目	2	2		29日目	2	2		AR	*	*
5a	2	2	-	実施	30	1日目	8日目	2	2		8日目	2	2		AR	*	*
5b	2	2	-	実施	30	1日目	29日目	2	2		29日目	2	2		AR	*	*

Fb = 処方緩衝液、Mab = モノクローナル抗体

AR: 3群の微視的病理学評価に基づき、必要とされる場合、微視的評価を実施した。

実施: 生存期間後、実施した。すべての動物は生存した。

\*: 3群の病理学評価に基づき、微視的評価を必要としなかった。

## 【0081】

モノクローナル抗体を投与したマーモセットのデータは、対照データと比較された。統計分析は、実施されなかった。

## 【0082】

結果

すべての投薬溶液濃度は、傾き、切片、R2に対して合格判定値内であり、試料値の再現性は、6%以内であった。双方の試験からのすべての動物は、予定された終了まで試験の生存相で生存した。観察した評価項目に対する試験項目関連の変化をマウスおよびマーモセットのそれぞれに対して表9に示す。

## 【0083】

(表9) マウスおよびマーモセットの試験項目に関連する効果

観察した評価項目	試験項目関連の変化	
	マウス	マーモセット
ケージでの観察：		
体重：	なし	なし
飼料消費：	なし	なし
糞：	N/A	なし
間接検眼法：	N/A	なし
心電図記録法：	N/A	なし
詳細な臨床検査：	なし	なし
臨床病理学：		
血液学：	なし	なし
臨床化学：	なし	なし
尿分析：	なし	なし
剖検：		
肉眼観察：	なし	なし
臓器重量：	なし	なし
顕微鏡検査：	なし	なし
比較：		
対照群 対 治療群：	試験項目関連の変化なし	試験項目関連の変化なし
性差：	性差なし	性差なし

10

## 【0084】

マウス試験において、2匹の動物は、29日目にc Stx2への低いマウス抗ヒト抗体(MAHA)反応を示した。c Stx1を受けたマウスは、c Stx1に対して結合するための定量限界値(LLQ)を超える結果を得なかった。陽性反応の濃度およびアイソタイプを表10に示す。試験した44匹のマーモセットサンプルのうち、いずれもLLQを超える抗治療抗体を含むことが認められなかった。

20

## 【0085】

(表10) 抗c Stx2に対して結合するためのマウスの血清抗体濃度の分析

試料ID	性別	投与量	抗体濃度	アイソタイプ
6067	雄	60/60 mg/kg (caStx1/caStx2)	159.25ng/mL	IgG1, IgG2b
6180	雌	30mg/kg (caStx2)	373.80ng/mL	IgG1, IgG2b

30

## 【0086】

結論

抗体につき30mg/kgまたは60mg/kgのそれぞれの単回投与または反復投与で、単独または同時に静脈内投与したc Stx1およびc Stx2は、雄および雌のマウスまたはマーモセットにおいて、耐容性良好であり、一貫した治療関連の副作用を示さなかった。抗治療反応は最小であり、マウスだけに限定された。

## 【0087】

結論として、志賀毒素1および2に対するモノクローナル抗体を所望の臨床的投与を超える最高20倍までの投与で、2種において試験し、いずれの全身毒性と関連しなかった。

40

## 【0088】

実施例3

マウスにおけるc Stx1およびc Stx2の薬物動態  
序

志賀毒素1および2は、志賀毒素産生細菌(STPB)による感染から生じる合併症の原因である毒性因子である(Gavin PJら、J Clin Microbiology, Apr 2004, p.1652-1656)。志賀毒素産生大腸菌(STEC)株は、食物経由の病原体の最も重要な、最近浮上した群を成す(Blanco JEら、J Clin Microbiology, Jan 2004, p.311-319)。STECは、臨床スペクトルが無症候性キャリア、非特異性下痢、出血性下痢、出血性大腸炎および溶血性尿毒症症候群(HUS

50



)を含む潜在的に致死性的食中毒を生じる(Karmali MA, Molecular Biotechnology, Vol. 26, 2004, p.117-122、Klein EJ, et al. J Pediatr, Aug 2002, Vol141, No.2, p.172-177)。志賀毒素1および2に対する2つの特異的モノクローナル抗体は、STPB感染を治療するために開発されている。

#### 【0089】

c Stx1およびc Stx2は、志賀毒素1(Stx1)および志賀毒素2(Stx2)のそれぞれに結合するキメラモノクローナルIgG1抗体である。c Stx1は、Stx1のBサブユニットを認識し、c Stx2は、Stx2のAサブユニットを認識する。

#### 【0090】

マウスにおけるこれらの特異的抗毒素の薬物動態を本実施例に示す。

10

#### 【0091】

目的

本試験の目的は、健常CD-1マウスに単独または同時に投与した抗体c Stx1および/またはc Stx2の単回投与後に、それぞれのモノクローナル抗体の薬物動態の分析結果を評価するものである。

#### 【0092】

方法

130匹の雄および雌のCD1マウスを順化してから1週間後、試験に使用した。試験に使用したすべてのマウスの体重は、それぞれの性別に対して平均体重の $\pm 20\%$ 以内であった。動物は、標準ブロック無作為化の手順を使用して、治療群に雄雌別に無作為化された。それぞれの動物に、独自の識別番号を有するマイクロチップを埋め込んだ。マウスは、つるされたステンレス製金網型のケージに保管した。温度は、 $64 \sim 79^{\circ}\text{F}$ 、湿度は、 $30 \sim 70\%$ に維持した。12時間の暗期の周期を1日あたり約12時間の自動タイマーで提供した。マウスは、随意に飼料(Lab Diet(登録商標) Certified Rodent Diet #5002、PMI Nutrition International, Inc.)および水を与えた。

20

#### 【0093】

投与溶液を投与日に調製した。雄および雌マウスは、c Stx1、c Stx2またはc Stx1およびc Stx2の双方を尾静脈を介して単一ボラス注射を表11のように、試験の1日目に与えられた。血液試料は、表11の試料採取計画に従い、血液試料を第1の指定された時点で頸静脈を介して採取し、最終または指定された時点のみ、麻酔下で心臓採血した。

30

#### 【0094】

(表11)試験設計

表1 試験設計						
群	試験項目	雄の数	雌の数	投与レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	投与後の試料の時間
i	FB	5	5	0	1.0	1 hr
ii	caStx1	5	5	3	1.0	10 min
iii	caStx1	5	5	3	1.0	1 hr, 72 hr, 7日目
iv	caStx1	5	5	3	1.0	24 hr, 14日目, 28日目 <sup>a</sup>
v	caStx1	5	5	3	1.0	48hr, 21日目 <sup>b</sup>
vi	caStx2	5	5	3	1.0	10 min
vii	caStx2	5	5	3	1.0	1 hr, 72 hr, 7日目
viii	caStx2	5	5	3	1.0	24 hr, 14日目, 28日目 <sup>a</sup>
ix	caStx2	5	5	3	1.0	48hr, 21日目 <sup>b</sup>
x	caStx1 / caStx2	5	5	3/3	1.0	10 min
xi	caStx1 / caStx2	5	5	3/3	1.0	1 hr, 72 hr, 7日目
xii	caStx1 / caStx2	5	5	3/3	1.0	24 hr, 14日目, 28日目 <sup>a</sup>
xiii	caStx1 / caStx2	5	5	3/3	1.0	48hr, 21日目 <sup>b</sup>

40

FB = 処方緩衝液

<sup>a</sup> 雌の動物(iv群の3/5、viii群の3/5、xii群の1/5は、22日目に試料を採取した)。

<sup>b</sup> 雌の動物(v群の4/5、ix群の3/5、xiii群の1/5は、16日目に試料を採取した)。

#### 【0095】

50

それぞれの濃度で処方を投与する試料を1日目の投与前後に採取し、ピシンコニン酸(BCA)によりタンパク質濃度を分析した。有効なELISA法を使用して、c Stx1およびc Stx2の濃度を決定するために、血清試料を分析した。予定通りの試料採取時間を薬物動態データ分析に使用した。c Stx1およびc Stx2の血清濃度を時間曲線に対して片対数血清濃度を作成するために使用した。薬物動態パラメータを非コンパートメント法で決定した。定量法の下限値を0として処理した。

#### 【0096】

死亡率、罹患率、けが、ならびに餌および水の可用性の観察をすべての動物に対して2回、実施した。マウスの体重を1日前、1日目、およびその後毎週、測定した。剖検を試験で死亡した動物において実施した。

#### 【0097】

##### 結果

本試験の結果を妨げる可能性のある基礎食または水質汚染物質は、報告されなかった。試験項目に関連した死亡または異常な臨床的観察はなかった。すべての投薬溶液濃度は、傾き、切片、R2に対して合格判定値内であり、試料値の再現性は、6%以内であった。

#### 【0098】

ELISA法により正確に決定することができた血清試料のc Stx1およびc Stx2の最低濃度はそれぞれ、130ng/mLおよび150ng/mLであった。雄マウスにおける単独または併用で投与されたc Stx1およびc Stx2(22.5~37.0g)、ならびに雌(21.6~29.9g)マウスにおける血清濃度を図2および3に示す。

#### 【0099】

0時間から無限大(AUC<sub>0-∞</sub>)の血清濃度-時間曲線下面積、消失半減期( $t_{1/2}$ )、血清クリアランス(CL)および定常状態における分布容積(V<sub>ss</sub>)の薬物動態パラメータを表12に示す。

#### 【0100】

(表12)単独または併用投与したc Stx1およびc Stx2に対する薬物動態パラメータ

	AUC <sub>0-∞</sub> (hr·ng/mL)		CL (mL/kg/min)		t <sub>1/2</sub> (hr)		V <sub>ss</sub> (mL/kg)	
	M	F	M	F	M	F	M	F
caStx1の単独投与	1,760,000	2,310,000	0.0284	0.0216	89.2	159	156	109
caStx2の単独投与	2,570,000	1,880,000	0.0195	0.0266	99.0	113	159	240
caStx1 (caStx2との併用投与)	2,230,000	2,260,000	0.0225	0.0222	90.6	98.1	103	129
caStx2 (caStx1との併用投与)	2,640,000	2,460,000	0.0189	0.0203	117	116	193	211

#### 【0101】

##### 結論

c Stx1およびc Stx2の血清濃度は、単独または併用投与に関わらず、雄および雌のマウスにおいて、類似した。算出した他の薬物動態パラメータにおいて、雄と雌との間で一貫した差異はなかった。CLは、c Stx1およびc Stx2の双方に対して低く、長半減期と合致し、モノクローナル抗体に対して期待されるものであった。また、V<sub>ss</sub>は、c Stx1およびc Stx2の双方に対して低く、抗体が血液容量内で留保されることを示す。c Stx1およびc Stx2の混合投与は、AUC<sub>0-∞</sub>、t<sub>1/2</sub>、CL、またはV<sub>ss</sub>を変化させなかった。

#### 【0102】

PK結果は、抗志賀毒素モノクローナル抗体の構造、および既知の、ヒトまたは動物組織で交差反応の不在と合致する。

#### 【0103】

##### 実施例4

STEC大腸炎を罹患する子供における腎障害

##### 序

溶血性尿毒症症候群(HUS)の定義は、溶血性貧血、血小板減少症および急性腎障害/腎不全を含む。STEC関連(腸疾患性)溶血性尿毒症症候群(eHUS)で生存する子供の25%までは

10

20

30

40

50

、長期の腎臓の異常を発症する。Gargらが指摘するように、急性の、自己限定性の大腸菌 O157:H7 胃腸炎の予後診断は、今までに研究されていない(Gargら、Kidney Int. 2006;70: 807-812)。汚染された飲料水により、約2000人に影響を及ぼしたWalkertonの発生後に開始された最近のコホート制御試験は、発生関連のSTEC(+C. jejuni)下痢をしてから4年後、感染した成人において高血圧症の若干の増加、および腎機能の低下を示した(Gargら、CMAJ. 2005;173:261-268、Gargら、Kidney Int. 2005;67:1476-1482)。これらの研究は、STEC感染時で、ラボ分析を含んでいない。HUSのないSTEC下痢を罹患する子供が疾病関連の腎臓の異常を示すか否かの質問に取り組むために、現在の分析を開始した。

#### 【0104】

##### 目的

急性STEC大腸炎を罹患する子供が尿/腎臓の異常を示すか否かを決定すること。

#### 【0105】

##### 設計

遡及チャートの見直しおよびデータ分析。データは、急性緊急医学部のある単独の専門治療大学付属小児科病院から得られた。前記病院は、総数100万人を超える患者を扱う。

#### 【0106】

##### 方法

1992年から2006年の間でSTEC分離株を有する患者を病院の細菌学のラボ記録から特定した。標準のアンケートを使用して、利用可能な臨床および人口学的情報をカルテ(可能な場合は、紙およびコンピュータ用)から抽出し、モントリオール子供用STEC疾病データベース(Montreal Children's STEC Disease database)に入力した。当該データベースは、現在、培養によって確認されたSTEC O157感染の186人の子供を含む。

#### 【0107】

データを最終診断(STEC下痢、HUS)、人口学的情報について分析した。

#### 【0108】

本試験の目的に関して、表示された疾病の診断基準を以下に示す。血尿、尿RBC(赤血球)は、HPF(高倍率視野)につき5を超える、または尿分析が「微量」より高い。タンパク尿、尿タンパク質は、0.3g/l(30mg/dl)以上、または尿タンパク質について、クレアチニンの比(U p/c)が、0.2g/gより高い。膿尿症、尿WBC(白血球)は、HPFにつき、5を超える、または尿分析が陽性。および、高窒素血症、血清クレアチニンレベルは、年齢および性別に対して参照限界の1.5倍を超える。第1のSTEC感染関連の症状(一般に、下痢または腹部のけいれん)の日をDDO(発病開始日)と称する。

#### 【0109】

##### 結果

照合検尿、血漿クレアチニンおよび血液学的分析結果は、大腸菌O157(主に、O157:H7)分離株を有する186人の患者のうち103人から入手できた。22人の患者がHUSを発症した。陽性の尿分析または高倍率視野(HPF)につき5より高いRBCとして定義される血尿は、発病から6日目に、非HUS大腸炎の14人の患者(16.4%)で記録され(中央値、範囲1~10日)、9人の患者(10.6%)は、6日目(4~15)にタンパク尿が0.3g/lより高かった。反対に、明らかなHUSの発症前に照合ラボ試験を行った6人の患者のうち3人が5日目(3~6)に血尿を示し、HUSの発症前に2日に対応する3日目に6人の患者のうち2人がタンパク尿を示した。年齢調節した血漿クレアチニンレベルは、明らかにHUSを発症した患者を除いて、すべての患者においては正常であった。これらのデータを表13~16に記載する。

#### 【0110】

(表13)

10

20

30

40

診断	N	検尿 <sup>1</sup>	結果	
			血尿	タンパク尿
STEC 大腸炎／下痢のみ	163	85	14 (16.4%)	9 (10.6%)
HUS	22	18	18 (100%)	17 (94.4%)
合計	186	103	32 (31.1%)	25 (24.3%)

【 0 1 1 1 】

(表 1 4)

10

診断	N (陽性の 試験結果)	検尿 <sup>1</sup>	第1の陽性の試験結果 (発症日) <sup>1</sup>	
			血尿	タンパク尿
STEC 大腸炎／下痢のみ	14	平均値 (SD)	6.2 ± 2.6	7.1 ± 3.9
		中央値 (範囲)	6 (1-10)	5.5 (4-15)
HUS	18	平均値 (SD)	7.1 ± 3.4 (n = 18)	7.3 ± 3.0 (n = 17)
		中央値 (範囲)	8 (2-14)	8 (2-14)

20

<sup>1</sup> 発病から15日以内

【 0 1 1 2 】

(表 1 5) STEC感染した患者の検尿結果のスコア<sup>1</sup>

		最も異常な試験結果	
		血尿	タンパク尿
HUSなし	平均値 (SD)	2.1 ± 0.9 (n = 14)	1.8 ± 1.0 (n = 9)
	中央値 (範囲)	2 (0-3)	1 (1-3)
HUS	平均値 (SD)	2.9 ± 0.5 (n = 18)	2.9 ± 0.25 (n = 16)
	中央値 (範囲)	3 (1-3)	3 (2-3)

30

<sup>1</sup> 表16に定義のスコア

【 0 1 1 3 】

(表 1 6) STEC疾病の重症度および経過 (SDSP) 尺度

腎症						
分類	試験項目	0	1	2	3	4
腎機能	血清クレアチニン <sup>1</sup>	正常値の上限の 1.5倍未満	正常値の上限の 1.5倍～2倍	正常値の上限の 2倍～4倍より多い	正常値の上限の 4倍より多い	透析
血尿	RBC [HPFあたり]	? 5	>5-10	>10-30	>30	肉眼の血尿
	尿試験紙分析	陰性または微量	軽度	中度	重度	
タンパク尿	尿試験紙 [g/l] (mg/dl)	<0.3 (30)	0.3 - <1 (30-100)	1 - <3 (100-<300)	?3.0 (?300)	-
	尿タンパク質 /クレアチニン [g/g]	<0.2	0.2 - <1	1 - <3	?3.0	-
膿尿	WBC [HPFあたり]	?6	6-10	>10-50	>50	-
	白血球エステラーゼ (尿試験紙)	陰性	陽性 1+	陽性 2+	陽性 3+	-

40

<sup>1</sup> 年齢および性別に対して

50

## 【0114】

## 結論および考察

微小血管症性溶血性貧血が明らかになる(ヘモグロビンおよび/または血小板の減少または血清クレアチニンの増加)2日以上の前HUS患者の50%が、タンパク尿および/または血尿があることが確認されたのに対して、非HUS STEC大腸炎を罹患する子供の16%がそれを示した。これらの結果は、STECがHUS非依存性の微妙な腎損傷を誘発する場合があることを示し、これは、本物のHUSを罹患する子供の追加試験における見解に酷似する。STEC大腸炎関連の尿の異常の臨床的有意性および病理学的機序があるかどうかは、もしあるとしても、不明確である。類似の論拠は、腎不全の証拠のない「不完全な」HUSを罹患する患者にも適用される。

10

## 【0115】

## 実施例5

## 志賀毒素産生大腸菌感染に対する定量的疾病尺度

## 序

志賀毒素(Stx)産生大腸菌(STEC)による感染は、重度の合併症をもたらし、重大なヒトの罹患率および経済的損失を生じる可能性がある。出血性大腸炎(HC)、溶血、腎症および中枢神経系の関与は、局所(大腸)または体循環への生体内産生志賀毒素の吸収に由来すると考えられる。内皮および他の組織への志賀毒素媒介損傷は、異常な微小血管性反応および炎症反応をもたらすことが証拠をもって示唆されている。

20

## 【0116】

限定された一連の徴候と症状は、臨床的観察、動物実験、および細胞生理学実験に基づいて、Stx損傷した組織障害と関係があることが指摘されてきた。これらのうちのいくつかの推定されるStx媒介事象(STME)は、痙攣性腹痛、出血性下痢、または出血性大腸炎などの腸疾患性溶血性尿毒症症候群(eHUS)の出現に先立つ。他は、血小板減少症、溶血性貧血様々な程度の腎損傷などのHUSの一部であるが、また、HUSの診断基準を満たさない(「不完全」HUS)患者にも認められている。まれに生じる腸管外および腎外の徴候(脳虚血/脳卒中、発作、心筋症、糖尿病)も、Stx効果またはStx誘発効果により生じると考えられる。Stx(またはSTEC感染)は、IL-8、TNF、急性期反応物質および血管作用物質(Tarr PIら、2005;Bitzan M et al. 1998)の誘発に関連する特徴のある炎症反応を与え、これが、末梢好中球数およびC反応性タンパク質の増加がHUSの危険性の増加と正の相関がある理由を説明できる可能性がある。

30

## 【0117】

溶血性尿毒症症候群(HUS)およびHCの臨床診断が容易である一方、STMEおよび他の臨床的徴候の重症度または進行を定義、または治療的処置または予防措置の効果を評価するための基準はない。

## 【0118】

## 目的

STECおよびStx誘発微小血管および組織損傷を示す定量的疾病重症度尺度を生成し、試験し、その結果の疾病尺度を、培養で確認されたSTECに感染した子供の十分に確定されているコホートを使用し、レトロスペクティブ分析において適用すること。

40

## 【0119】

## 方法

- STEC感染および(複雑な)HUSのマーカー/予測の記述に関する文献調査
- HUSを含むSTEC感染の既知の徴候および専門家の意見に基づいて有害事象(CTCAE V.3.0)に対する共通の専門用語の基準の関連項目の選択および改変
- 医学的細菌学検査記録から、利用可能なSTEC分離株を有するすべての患者の同定
- 患者の医療ファイル(紙カルテおよび電子記録)、および関連人口統計の抽出、標準的なアンケートを使用した研究および臨床的情報の検討
- 専用STEC疾病データベースの構築

## 【0120】

50

## 結果

## 患者集団およびデータベース

1992年から2006年の間に診断され、広範なSTEC疾病徴候がある186人の患者の関連した臨床的徴候と症状、一般に入手可能な生物学的マーカーおよび結果(文書化された場合)の存在および発生は、モンリオール子供用STEC疾病(MCSD)データベースを作成するために取得された。患者集団およびデータベースの作成を図4に示す。

## 【0121】

## 疾病重症度評価尺度の作成

一連の疾病関連の臨床的および生物学的パラメータを選択し、有害事象に対する共通の専門用語の基準と同様に、一次関数的な数値を割り当てた。項目は、腸疾患、炎症および血管障害、微小血管症性溶血性貧血および腎症(表17)に加えて、腸外および腎外の器官の関与(図示せず)の4つの病理学的種類に分類された。本手段は、「志賀毒素/STEC疾病重症度および経過」(SDSP)尺度と称する。

## 【0122】

(表17)STEC/志賀毒素の重症度および経過尺度(簡略)

等級	0	1	2	3	4
<b>A 腸疾患</b>					
下痢 (排便回数)	下痢なし (基準)	<5	5 - <10	10 - <15	≥ 15
腹痛または急激な腹痛 年齢適応した疼痛スコア	痛みなし (0)	軽度の疼痛 (1-3)	中度の疼痛 (4-6)	重度の疼痛 (7-9)	耐え難い疼痛 (10)
出血性下痢 (出血)	可視的な出血 なし	血液の時折の わずかな徴候	大便と混合した 出血	明らかな出血 (結腸直腸出血)	処置を必要とする 出血
等級	0	1	2	3	4
<b>B 炎症および血管障害</b>					
2歳未満のWBC [N/n]	<15	-	15 - <18	18 - <22	≥ 22
2～5.9歳	<12	12 - <14	14 - <18	18 - <22	≥ 22
≥ 6歳	< 10.0	10 - <14	14 - <18	18 - <22	≥ 22
脳血管虚血	なし	-	片頭痛	一過性脳虚血発作 (TIA)	脳卒中、神経障害、 または失明
等級	0	1	2	3	4
<b>B 炎症および血管障害</b>					
2歳未満のWBC [N/n]	<15	-	15 - <18	18 - <22	≥ 22
2～5.9歳	<12	12 - <14	14 - <18	18 - <22	≥ 22
≥ 6歳	< 10.0	10 - <14	14 - <18	18 - <22	≥ 22
脳血管虚血	なし	-	片頭痛	一過性脳虚血発作 (TIA)	脳卒中、神経障害、 または失明
等級	0	1	2	3	4
<b>D 腎症</b>					
血尿 (HPFまたは 尿試験紙ごとのRBC)	なし (<6)	少量 (6-10)	中量 (>10-30)	多量 (>30)	-
タンパク尿 ([g/l]または タンパク質/クレアチニン)	<0.3 (<0.2 g/g)	0.3 - <1 (0.2 - <1 g/g)	1 - <3 (1 - <3 g/g)	≥ 3 (≥ 3 g/g)	-
膿尿 (WBC/HPF)	≥ 3	3-10	>10-50	>50	-
血清クレアチニン (年齢、性別に対して)	正常	正常値の上限の 1.5～2倍?	正常値の上限の 2～4倍未満	正常値の上限 の4倍未満	透析
低ナトリウム血症 [μM]	≥ 135	<134-131	<131-127	<127	低ナトリウム血症の発作

## 【0123】

## STEC疾病重症度評価尺度の検証

「尺度」を検証するために、推定されるSTMEのスコアおよび他の臨床的マーカーに関連した結果判定と比較した。例を図5に示す。STME「出血性下痢」は、「入院日数」という結果で相関性があった。出血性下痢に対する高スコアは入院日数の増加として現れることを示す。しかしながら、予想外ではないが、本相関関係は、入院に影響する二次事象のた

10

20

30

40

50

め、HUSを罹患する患者において、失われる(図5において、下部の2つのパネルに比較)。

#### 【0124】

##### STEC疾病重症度評価尺度の有用性

「尺度」は、例えば、本発明研究における、STEC感染の重症度および発生を、数値として、統合的に「測定」するために生み出された。さらなる、新規の適用を図6に示す。疾病の力学を視覚的に表示するために尺度を使用した。本方法を「疾病発現アレイ」と仮に呼んだ。

#### 【0125】

##### 要約および結論

広範なSTEC感染を有する患者において、STMEおよび他の臨床的および検査所見の異常を定量化するためのツールとして、新たな手段である、「志賀毒素 / STEC疾病の重症度および経過」(SDSP)尺度を開発した。

#### 【0126】

##### 実施例6

##### 欧州共同体における志賀毒素産生大腸菌(STEC)感染の疫学的評価

##### 背景

STEC感染の疫学における報文の大部分は、発生および溶血性尿毒症症候群(HUS)に焦点を当てている。特に、ヨーロッパにおける、事故STEC感染率の全体的な疫学的形態を提供する刊行物は乏しい。診断上の困難および報告の偏見は、STEC感染および腸外合併症に対する、一定せず、歪んだ推定をもたらし、結果的に今後の予防または治療方針に対する危険性 / 便益解析を妨げる。

#### 【0127】

##### 目的

様々な公的に利用できるデータソースおよびモデル化法を利用して、欧州共同体におけるSTEC感染の罹患率を確立すること。

#### 【0128】

##### 方法

本発明者らは、以下の3つの異なるアプローチを用いて、文献に基づき、ヨーロッパにおけるSTEC感染の患者数を推定した。

- STEC記録、および報告された文献からの他の推定からSTEC感染の罹患数を外挿する。
- HUSが全STEC感染の15%を占めると仮定して、HUSの罹患の文献評価に基づいてSTEC感染の罹患数を外挿する。感度分析も、STEC感染において5%のHUSがあるとして、実施された。
- いくつかの期待される報告書により報告されるように、それらのうちのある割合は、STECであると仮定して、小児期胃腸炎の文献に報告された罹患率に基づいて、STEC感染数の外挿。

#### 【0129】

##### 結果

3つの異なる手法は異なる推定をもたらす。これは、臨床状況においては、意外な状況ではない。関連する文献が存在しないため、成人および高齢者における本病状の患者数の評価は実行されていない。

#### 【0130】

##### STEC記録からのSTEC感染の罹患数の外挿

##### フィンランドにおけるSTEC

1998年にKeskimäkiにより報告された1990年～1997年の期間における研究では、期間中の第1部分において、STECの患者数は、年間、100,000人あたり0.013であると推定された。その後、STEC感染の大部分は、非O157:H7株によるものと認められた。そこで、罹患率は、100,000人あたり0.73症例であると推定された(Keskimäkiら、J Clin Microbiol 36, 3641-3646(1998))。

#### 【0131】

10

20

30

40

50

## スペインにおけるSTEC感染

Blancoらは、スペインのルゴ病院(Lugo Hospital)から患者の検便サンプルにおける2004年の研究を刊行した。STEC株は、5,054症例のうちの2.5%に検出され、O157:H7は、症例の0.5%を占め、非O157:H7は、それ以外を占めた(Blancoら、J Clin Microbiol 42, 311-319(2004))。

### 【0132】

## デンマークにおけるSTEC感染

Ethelbergは、デンマークにおける1997年1月から2003年5月までの425人のSTEC感染の患者を報告した(Ethelbergら、Emer Infect Dis 10, 842-847(2004))。症例のほとんどは、散発性であった。

### 【0133】

## オランダにおけるSTEC感染

2004年に、Havelaarは、オランダでは、STECの症例数の中央値、年間1250であると評価した(Havelaarら、Epidemiol Infect 132, 467-484(2004))。概算は、試験した798の検便サンプルのうち、4つのサンプルがSTECに対して陽性である(スペインで報告された率に近い)ことを明らかとした、患者対照研究から得た。

### 【0134】

## アイルランドにおけるSTEC感染

GarveyおよびMcKeownは、1999年～2003年までにNational Disease Surveillance Centre(NDSC)から得たデータを2003年に刊行した(Garvey and McKeown, Epidemiology of Verotoxigenic E. coli O157 in Ireland, 2003. NDSC(2003))。調査をO157:H7に限定した(表18)。

### 【0135】

(表18) アイルランドにおけるO157:H7感染の粗罹患率

年	症例数 (非居住者を含む)	人口100,000人あたりの 概算罹患率 (95%信頼区間)
1999	51	1.4 (1.0-1.8)
2000	37(42)	0.9 (0.6-1.3)
2001	50 (52)	1.3 (0.9-1.6)
2002	68 (70)	1.7 (1.3-2.2)
2003	82 (86)	2.1 (1.6-2.6)

### 【0136】

## HUS罹患率に基づくSTEC感染数の外挿

## フランスにおけるHUS罹患率

1998年にHUSの罹患率は、15歳未満の100,000人の子供あたり0.7の症例であった(Haeghebaertら、Eurosurv 5, 68-73 (2000))。15歳未満の人口は、59,630,100人中11,121,100人であり、フランスの人口の18.65%を示す(EC統計局2004)。従って、HUSの罹患率は、総人口の0.131/100,000であると推定される。

### 【0137】

## ドイツおよびオーストリアにおけるHUSの罹患率

1997年から2000年の間に、ドイツおよびオーストリアにおける4年の見込み多施設治験を実施した(Gerberら、J Infect Dis 186, 493-500(2002))。ドイツでは、報告された394の小児科のHUSが100,000人の15歳未満の子供あたり0.71の症例(範囲0.69～0.75)の年度の罹患率になり、オーストリアでは、数は、100,000人あたり0.51の症例があった。

### 【0138】

ドイツでは、16歳未満の人口は、82,536,700人の総人口のうち、12,415,500人であり、15.04%(EC統計局2004)を占め、一般人口のHUSの罹患率は、0.107/100,000となる。

### 【0139】

オーストリアでは、16歳未満の人口は、8,067,300人の総人口のうち、1,335,200人であ

10

20

30

40

50



り、16.55%を占め、一般人口のHUSの罹患率は、0.060/100,000となる。

#### 【0140】

英国およびアイルランドにおけるHUSの罹患率

平均年間罹患率(Lynnら、Emerg Infect Dis 11,590-596(2005))は、以前の cohorts において0.79であったのに比べて、最新の cohorts においては、16歳未満の子供において、0.71/100,000であった。英国では、16歳未満の人口は、59,328,900人の総人口のうち、11,126,200人であり、18.75%を占め、本人口のHUSの罹患率は、0.71/100,000であり、全体の罹患率は、0.133/100,000となる。

#### 【0141】

イタリアにおけるHUS罹患率

Tozziは、13年の観察期間にわたり、イタリアにおける15歳未満の子供のHUSの罹患率は、100,000人あたり0.28であることを2003年に公開した(Tozziら、Emer Infect Dis 9, 106-108(2003))。

#### 【0142】

ヨーロッパにおけるHUSの罹患率に関するデータは、表19に記載されている。

#### 【0143】

(表19)ヨーロッパにおける100,000人あたりのHUSの罹患率

	15歳未満の人口 (千人)	総人口 (千人)	15歳未満の人口の割合	100,000人あたりの 16歳未満の人口 における罹患率	100,000人あたりの 全人口における 罹患率
EU-25	75 415	453 685	16.62%	0.79	0.13132
EU-15	62 666	379 484	16.51%	0.79	0.130456
ユーロ圏	48 915	305 831	15.99%	0.79	0.126354

#### 【0144】

HUSは、STEC感染のうちの約15%の合併症であるが、STEC感染に続くHUS率は、異なる文献報告において、大いに異なる。評価に本変動を取り入れるために、下記の表20に表示されるように、感度分析としての役割を果たすために5%のHUS発生率を使用した。

#### 【0145】

(表20)ヨーロッパにおける100,000人あたりのSTEC感染の罹患率-HUS率由来

	総人口 (千人)	HUS率15%の場合の STECの罹患率 (100,000人あたり)	HUS率5%の場合の STECの罹患率 (100,000人あたり)	HUS率15%の場合の STECの症例の総数	HUS率5%の場合の STECの症例の 総数
EU-25	453 685	0.875466	2.626397	3 972	11 916
EU-15	379 484	0.86971	2.609129	3 300	9 901
ユーロ圏	305 831	0.842357	2.527072	2 576	7 729

#### 【0146】

小児期の胃腸炎の報告される罹患率に基づくSTEC感染数の外挿

2001年にFruhwirthらにより刊行された地域感染型の胃腸炎のプロスペクティブ評価は、ヨーロッパにおける胃腸炎の罹患率に対するプロキシ基準であった(Friiworthら、Arch Dis Child 84, 393-397(2001))。調査対象集団は、見込み、人口に基づく多施設研究において追跡調査された、危険性がある4歳までの6969人の子供を含んだ。急性胃腸炎の罹患率は、年間100人の子供あたり4.67であった。その罹患率を、EC統計局により定義される3つの異なるヨーロッパ人口の15歳未満の年齢群に外挿して、その年齢群で観察される可能性のある胃腸炎の最大数を評価した。地域感染型の胃腸炎におけるSTEC感染率は、STEC感染率が検便用サンプルの2.5%であったBlancoの2004年の報告に基づいた。これらの数字は、オランダにおける798の検便用サンプルシリーズに報告されたSTECの4つの症例に類似している(表21)。

#### 【0147】

(表 2 1) 地域感染型の胃腸炎におけるSTEC率に基づく感度分析

	15歳未満 の人口 (千人)	総人口 (千人)	15歳未満の 人口の割合	100,000人あたりの 胃腸炎の 罹患率	100,000人あたりの 全人口における 推定罹患率	100,000人あたりの STECの罹患率 (STEC率2.5% の場合)	症例数
EU-25	75415	453685	16.62%	4670	776.28	19.41	88,047
EU-15	62666	379484	16.51%	4670	771.18	19.28	73,163
ユーロ圏	48915	305831	15.99%	4670	746.93	18.67	57,108

## 【 0 1 4 8 】

ヨーロッパにおける患者数

ヨーロッパにおけるSTEC罹患率の直接報告書を使用、およびHUS罹患率から得られたSTEC罹患率は、0.09～0.26/10,000症例である。感度分析では、1.94/10,000症例の罹患率である。結論として、全欧州連合内の志賀毒素産生細菌感染の控えめな概算は、10000中2である。

## 【 0 1 4 9 】

類似の法的権限区域の患者数

米国内で報告された疫学データ(Meadら、Emer Infect Dis 5, 607-625(1999))。STEC感染の110～220の症例は、CDCにより推定された年間罹患率であった。国連人口推計は、2006年に米国の人口は、3億人であると推定した。本人口に報告された症例の年間数は、10,000人の居住者に対して3.68の罹患率である。

## 【 0 1 5 0 】

オーストラリアでは、5歳未満の子供のHUSの罹患率(105あたり1.35(95%信頼区間1.06～1.72))は、カナダで報告された率(5歳未満の105人の子供あたり3.11)、およびイギリス諸島(105人の子供あたり3.3)よりも低かった(Elliottら、Arch Dis Child 85, 125-131(2001))。

## 【 0 1 5 1 】

カナダでは、年間のSTEC感染率は、1980年代後半にアルバータ州で1,21/10,000症例(一般人口に対して)であったと報告され(Watersら、Clin Infect Dis. Nov;19(5):834-43(1994))、カナダでは、最高の年間STEC感染率を有すると思われる。他の総合的な疫学的検査は最近刊行されなかった。

## 【 0 1 5 2 】

総合して、非欧州の先進国からのデータは、欧州疫学的データと一致する。

## 【 0 1 5 3 】

要約

1999年～2003年のデータに基づく第1の手法では、100,000人中、0.73～2.1のSTEC感染の罹患率を得た。HUSの頻度(第2の手法)を使用して、STEC感染の罹患率は、100,000人中0.88(15%のHUS率に対して)から2.63(HUS率5%)として算出された。第3の手法を使用して、すべての下痢の症例のうち1～2.5%がSTECであると仮定することにより、100,000人あたり7.8～19.4のSTEC感染率が算出された。

## 【 0 1 5 4 】

結論

本発明者らは、文献分析、記録データおよび小児期の下痢およびHUS罹患率からの外挿に基づいて、STEC感染率において示される相違は、過小報告に起因すること、および、EU-25の人口における最大かつ正確な罹患率は、100,000人あたり19.4であることを提唱する。

## 【 0 1 5 5 】

他の実施形態

本発明の記載方法および組成物の種々の改変および変更は、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者には明白となるであろう。本発明は、特定の望ましい実施形態に関連して記載されているが、請求の範囲に記載される本発明は、そのような特定の実

10

20

30

40

50

施形態に必要以上に限定されるべきではないことを理解すべきである。実際には、本発明を実行するための、医学、免疫学、薬理学、内分泌学の分野、または関連分野における当業者に明白である記載の方法の種々の改変は、本発明の範囲内であることを意図している。

【0156】

すべての特許、特許出願、および本明細書に記載の出版物は、それぞれの独立した出版物が具体的かつ個別に参照することにより組み込まれるのと同程度で、参照することにより本願に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】健康成人ボランティアへの静脈内投与後のc Stx1およびc Stx2の濃度を、時間の関数として示すグラフである。

【図2】c Stx2を同時投与したまたはしていないc Stx1の血清濃度を、時間の関数として示すグラフである。

【図3】c Stx1を同時投与したまたはしていないc Stx2の血清濃度を、時間の関数として示すグラフである。

【図4】調査対象集団およびデータベースを示す図である。

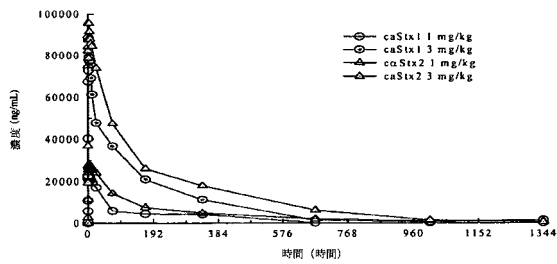
【図5】表示された患者に対するSTEC疾病重症度評価尺度におけるスコアの関数として入院日数を示す一連のグラフである。STME「出血性下痢」は、「入院日数」という結果と相関関係があった(エラーバーは、平均値の標準誤差である)。

【図6】STEC O157:H7感染を生じている4人の子供(2人は初期のHUS(HUS1、2)を、2人は出血性下痢のみ(大腸炎1、2)を有する)を示す疾病発現配列であり、それらは太線で分けられている。各列は、4人の患者のそれぞれに対して同一の順番で、明白な臨床項目または実験項目、およびその時間経過を示す。段は、それぞれの患者に対して、1日目から始めて(=発病開始)、連続日数を示す。症状の重症度または検査所見の異常は、提案されたSTEC疾病重症度および進行尺度において暗さの程度がスコア(0-4)に対応するような、色の濃淡の異なる強度により視覚化される(表17を参照)。空欄は、情報がない日を示す。

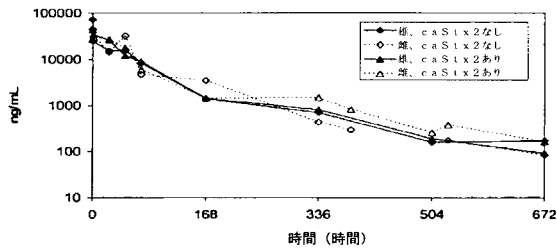
10

20

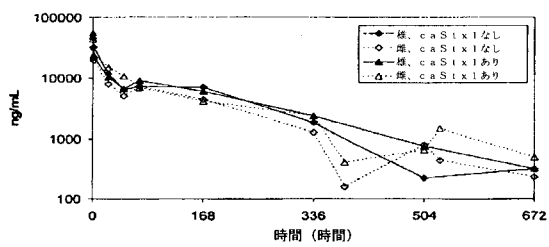
【図 1】



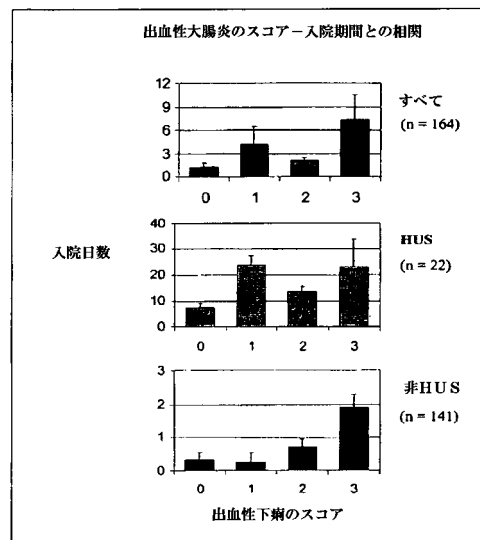
【図 2】



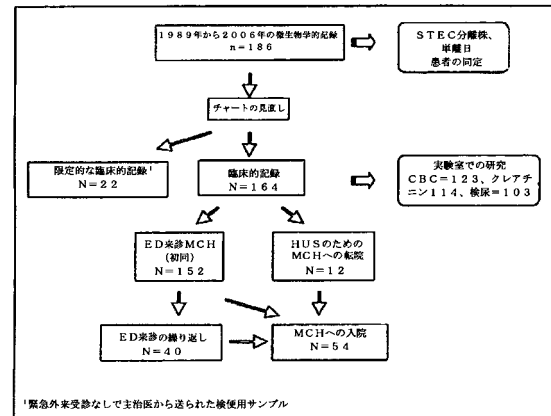
【図 3】



【図 5】

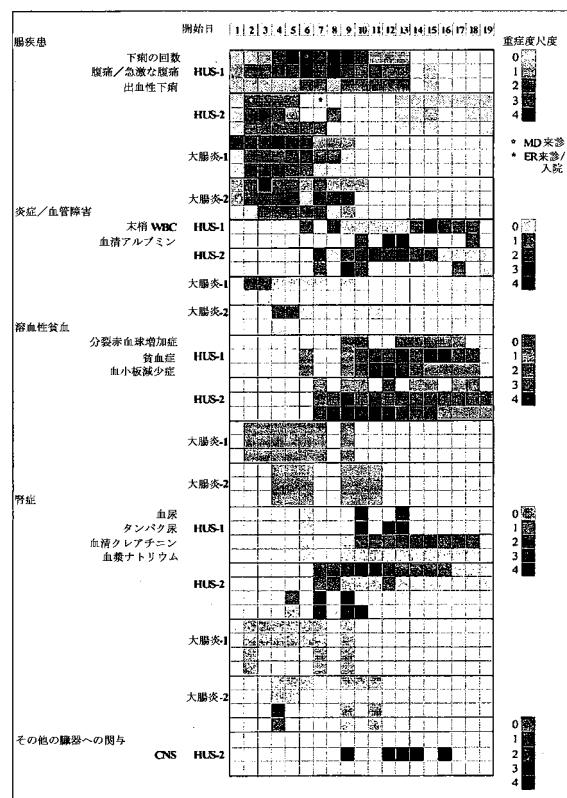


【図 4】



すべての患者は、培養で確認されたSTEC O157感染があった（22人が、本物のHUSを有した）。

【図 6】



【配列表】

2009538916000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 07/12797

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

on paper

☒

in electronic form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in electronic form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 07/12797

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/112, 39/00 (2007.10) USPC - 424/133.1, 139.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/112, 39/00 (2007.10) USPC - 424/133.1, 139.1, 514/2, 12 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWest DB=PGPB,USPT,EPAB,JPAB; PLUR=NO; OP=ADJ, Google Scholar Search Terms: anti-Stx, Stx, antibody, antibodies, hemolytic uremic, treat, shiga, shigella,immunoglobulin, ribosome inactivat		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/0170248 A1 (STINSON et al.) 11 September 2003 (11.09.2003) entire document especially para [0012]-[0013], [0036], [0042], [0044]-[0045] and [0108] and Fig. 10.	1-16
A	WO 1999/32645 A1 (STINSON et al.) 01 July 1999 (01.07.1999) entire document especially Figures 3, 6A and 6B.	1-16
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 03 December 2007 (03.12.2007)		Date of mailing of the international search report <b>10 JAN 2008</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 リビエール マーク

カナダ国 ケベック州 サンランベール ルー パトニー 1 4 0

(72)発明者 メヘラーン マリアム

カナダ国 ケベック州 ブランヴィル ルー デ ツールノワ 2 4

(72)発明者 ロバーソン クレア トゥーニング

アメリカ合衆国 フロリダ州 プランテーション ウェスト トロピカル ウェイ 5 2 1

(72)発明者 オブライエン アリソン

アメリカ合衆国 メリーランド州 ベテスダ チャールコート ロード 5 5 1 4

(72)発明者 メルトン - チェルサー アンゲラ

アメリカ合衆国 ヴァージニア州 スターリング ブランディワイン コート 2 0 5 1 6

(72)発明者 サム - パン ジャニク

カナダ国 ケベック州 ラバル ダメイ 2 9 6 3

F ターム(参考) 4C085 AA16 CC22 CC23 EE03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA11 DA76 EA29 FA74 GA26