(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6469094号
(P6469094)
(45)発行日　平成31年2月13日(2019.2.13)　(24)登録日　平成31年1月25日(2019.1.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08	
A61P 31/04	(2006.01)	A61P	31/04	
A61P 17/00	(2006.01)	A61P	17/00	101

請求項の数 16　(全 183 頁)　最終頁に続く

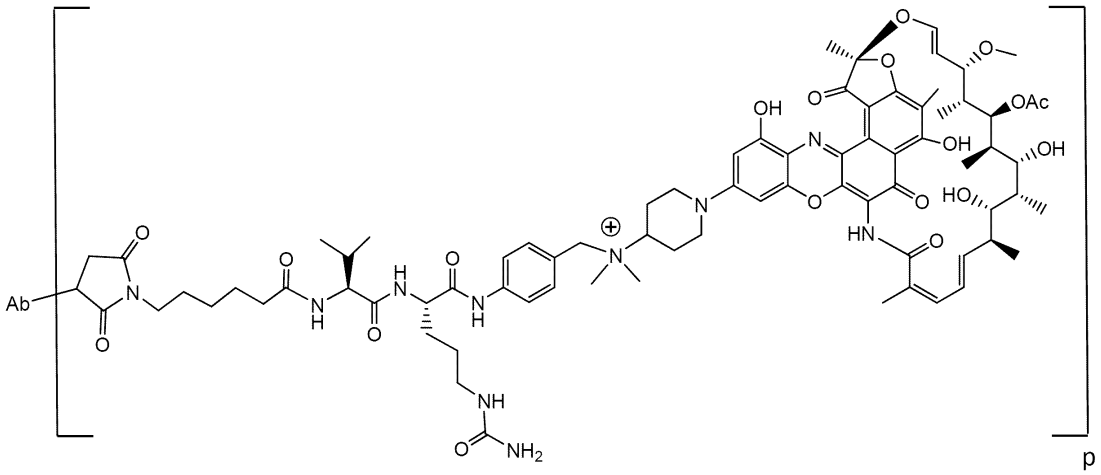
(21)出願番号　特願2016-517056(P2016-517056)
(86)(22)出願日　平成26年5月30日(2014.5.30)
(65)公表番号　特表2016-525343(P2016-525343A)
(43)公表日　平成28年8月25日(2016.8.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/040324
(87)国際公開番号　WO2014/194247
(87)国際公開日　平成26年12月4日(2014.12.4)
審査請求日　平成29年5月30日(2017.5.30)
(31)優先権主張番号　61/829,461
(32)優先日　平成25年5月31日(2013.5.31)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　14/284,609
(32)優先日　平成26年5月22日(2014.5.22)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ブラウン，　エリック
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗細胞壁タイコ酸抗体及びコンジュゲート

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式：



［式中、
Ａｂは、軽（Ｌ）鎖及び重（Ｈ）鎖を含む抗ＷＴＡ（細胞壁タイコ酸）抗体であって、
Ｌ鎖が、ＫＳＳＱＳＩＦＲＴＳＲＮＫＮＬＬＮ（配列番号９９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＴＲＫＳ（配列番号１００）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＦＳＰ

ＰＹＴ（配列番号１０１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖が、ＳＦＷＭＨ（配列番号１０２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧ（配列番号１０３）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＧＥＧＧＬＤＤ（配列番号１１８）又はＧＤＧＧＬＤＤ（配列番号１０４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み；

抗ＷＴＡ（細胞壁タイコ酸）モノクローナル抗体が、黄色ブドウ球菌（ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）と結合し；

ｐは１または２の整数である、抗ＷＴＡ（細胞壁タイコ酸）抗体である］

を有する抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項２】

抗体が軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＬが、配列番号１１９のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項３】

抗体が重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＶＨが、配列番号１５６のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１又は２に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項４】

抗体がＶＬ及びＶＨを含み、ＶＬが、配列番号１１９の配列を含み、ＶＨが、配列番号１５６の配列を含む、請求項１に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項５】

抗体が、配列番号１４５のアミノ酸配列を含む軽鎖（ＬＣ）と、配列番号１５７のアミノ酸配列を含む重鎖（ＨＣ）とを含む、請求項１に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項６】

抗体の重鎖定常領域が、アミノ酸置換Ａ１１８Ｃを含み、かつ／又は抗体の軽鎖定常領域が、アミノ酸置換Ｖ２０５Ｃを含み、番号付けが、ＥＵ番号付けに従う、請求項１に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項７】

ｐが２の整数である、請求項１に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物。

【請求項８】

請求項１から７の何れか一項に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物と、薬学的に許容される担体、流動促進剤、希釈剤又は賦形剤とを含む薬学的組成物。

【請求項９】

リファマイシン型抗生物質を抗ＷＴＡ抗体にコンジュゲートさせることを含む、請求項１から７の何れか一項に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物を作製する方法。

【請求項１０】

請求項１から７の何れか一項に記載の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物を含む、宿主細胞を死滅させることなく黄色ブドウ球菌（ｓｔａｐｈ　ａｕｒｅｕｓ）感染患者の宿主細胞における細胞内黄色ブドウ球菌（ｓｔａｐｈ　ａｕｒｅｕｓ）を死滅させるための医薬。

【請求項１１】

生残菌細菌細胞が死滅させられる、請求項１０に記載の医薬。

【請求項１２】

第２の治療剤がさらに投与される、請求項１０又は１１に記載の医薬。

【請求項１３】

第２の治療剤が、抗生物質である、請求項１２に記載の医薬。

【請求項１４】

抗生物質が、（ｉ）アミノ配糖体、（ｉｉ）ベータラクタム、（ｉｉｉ）マクロライド／環状ペプチド、（ｉｖ）テトラサイクリン、（ｖ）フルオロキノリン／フルオロキノロン、及び（ｖｉ）オキサゾリジノンからなる構造クラスから選択される、請求項１３に記

載の医薬。
【請求項１５】
抗生物質が、クリンダマイシン、ノボビオシン、レタパムリン、ダプトマイシン、ＧＳＫ－２１４０９４４、ＣＧ－４００５４９、シタフロキサシン、テイコプラニン、トリクロサン、ナフチリドン、ラデゾリド、ドキソルビシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタビン、ダルババンシン及びアジスロマイシンからなる群から選択される、請求項１３に記載の医薬。
【請求項１６】
ａ）請求項８に記載の薬学的組成物と、
ｂ）使用説明書と
を含む、細菌感染症を治療するためのキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願とのクロスリファレンス
本出願は、２０１３年５月３１日に出願された米国仮特許出願第６１／８２９，４６１号の３５ＵＳＣ§１１９（ｅ）の下での利益を主張する、３７ＣＦＲ§１．５３（ｂ）の下で２０１４年５月２２日に出願された非仮出願である米国特許出願第１４／２８４，６０９号の優先権の利益を主張し、これらはそれらの全体が出典明示により援用されている。
【０００２】
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの配列表の提出
ＡＳＣＩＩテキストファイルでの以下の提出物の内容は、その全体が出典明示により本明細書に援用されている：配列表（ファイル名：Ｐ４９６０Ｒ２ＷＯ＿ＰＣＴＳｅｑｕｅｎｃｅＬｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ、データ記録日：２０１４年５月３０日、サイズ：１９５，２４０バイト）のコンピュータ読み取り可能な形式（ＣＲＦ）。
【０００３】
本発明は、リファマイシン型抗生物質にコンジュゲートした抗細胞壁タイコ酸（「抗ＷＴＡ」）抗体、及び得られる抗体－抗生物質コンジュゲートの、感染性疾患の治療における使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
病原性細菌は、ヒト及び動物の両方における病気及び死の実質的な原因である。これらのうち顕著なものは、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ、ＳＡ）であり、これは、世界的にヒトの細菌感染の第一の原因である。黄色ブドウ球菌は、軽度の皮膚感染から肺炎、髄膜炎、骨髄炎、心内膜炎、毒素ショック症候群（ＴＳＳ）、菌血症及び敗血症のような命にかかわる疾患まで一連の疾病の原因であり得る。その発生は、皮膚、軟組織、呼吸器、骨、関節、血管内から創傷までの範囲の感染症である。これは、いまだに院内感染の５つの主要な原因の１つであり、頻繁に術後創傷感染症の原因である。毎年、米国の病院で５００，０００余りの患者がブドウ球菌感染症にかかる。
【０００５】
過去数十年にわたって、黄色ブドウ球菌への感染症は主に、全ての既知のベータラクタム抗生物質に対して耐性であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）の出現により、治療するのが困難になってきている（Boucher, H.W.らBad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 48, 1-12 (2009)）。状況は切迫しており、２００５年までにＭＲＳＡへの感染症は単一感染病原体による死亡の第一の原因であり、米国で１５，０００を超える死亡の原因であると報告された（DeLeo, F.R.及びChambers, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant Staphylococcus aureus in the genomics era. The Journal of Clinical Investiga

tion 119:2464-2474 (2009))。バンコマイシン、リネゾリド及びダプトマイシンは、侵襲性ＭＲＳＡ感染症の治療のために選択される抗生物質になっている（Boucher, H., Miller, L.G.及びRazonable, R.R. Serious infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 51補遺2, S183-197 (2010))。しかし、バンコマイシンに対する感受性の低減、並びにリネゾリド及びダプトマイシンに対する交差耐性も、ＭＲＳＡ臨床株において報告されている（Nannini, E., Murray, B.E.及びArias, C.A. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Current opinion in pharmacology 10, 516-521 (2010))。経時的に、耐性を克服するために必要なバンコマイシンの用量は、神経毒性が生じるレベルまで徐々に上昇している。よって、侵襲性ＭＲＳＡ感染症による死亡率及び罹患率は、これらの抗生物質にも関わらず高いままである。

【０００６】

ＳＡは、細胞外病原体であると一般的に考えられているが、少なくとも５０年前までさかのぼる調査は、専門の食細胞及び非食作用性細胞の両方の様々な型の宿主細胞において感染及び生存するその能力を明らかにしている（Gresham, H.D.らSurvival of Staphylococcus aureus inside neutrophils contributes to infection. J Immunol 164, 3713-3722 (2000); Anwar, S., Prince, L.R., Foster, S.J., Whyte, M.K.及びSabroe, I. The rise and rise of Staphylococcus aureus: laughing in the face of granulocytes. Clinical and Experimental Immunology 157, 216-224 (2009); Fraunholz, M.及びSinha, B. Intracellular staphylococcus aureus: Live-in and let die. Frontiers in cellular and infection microbiology 2, 43 (2012); Garzoni, C.及びKelley, W.L. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by Staphylococcus aureus. EMBO molecular medicine 3:115-117 (2011))。この通性の細胞内持続性により、宿主免疫回避、宿主の長期コロニー形成、慢性感染状態の維持が可能になり、この持続性が、従来の抗生物質療法の臨床的失敗及び該療法の後の再発の原因になっている可能性がある。さらに、細胞内細菌を最適以下の濃度の抗生物質に曝露することは、抗生物質耐性株の出現を助長し、よってこの臨床問題をより切迫したものにすることがある。これらの観察結果と一貫して、菌血症又は心内膜炎のような侵襲性ＭＲＳＡ感染症の患者をバンコマイシン又はダプトマイシンで治療することは、５０％より大きい失敗率と関連している（Kullar, R., Davis, S.L., Levine, D.P.及びRybak, M.J. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 52, 975-981 (2011); Fowler, V.G., Jr.らDaptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by Staphylococcus aureus. The New England journal of medicine 355, 653-665 (2006); Yoon, Y.K., Kim, J.Y., Park, D.W., Sohn, J.W.及びKim, M.J. Predictors of persistent methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteraemia in patients treated with vancomycin. The Journal of antimicrobial chemotherapy 65:1015-1018 (2010))。よって、より成功率が高い抗ブドウ球菌療法は、細胞内細菌の消滅を含むべきである。

【０００７】

今日の抗菌剤のほとんどは、化学的に、様々な天然化合物の半合成修飾物である。これらは、例えば、ペニシリン（アオカビ属（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）の真菌により生成される）、セファロスポリン及びカルバペネムを含むベータラクタム抗菌剤を含む。生存生物からまだ単離される抗微生物化合物としては、アミノ配糖体が挙げられるが、他の抗菌剤、例えばスルホンアミド、キノロン及びオキサゾリジノンは、化学合成によってのみ生成される。このことに従って、多くの抗菌化合物は、化学／生合成起源に基づいて天然、半合成及び合成に分類される。別の分類系は、生物活性に基づく。この分類では、抗菌剤は、微生物に対するそれらの生物学的効果に従って、細菌を死滅させる殺菌剤と細菌の成

長を遅延又は失速させる静菌剤の２つの広い群に分けられる。

【０００８】

アンサマイシンは、リファマイシン、リファンピン、リファンピシン、リファブチン、リファペンチン、リファラジル、ＡＢＩ－１６５７及びそれらのアナログを含む抗生物質のクラスであり、これは、細菌ＲＮＡポリメラーゼを阻害し、グラム陽性及び選択的グラム陰性細菌に対して並外れた力価を有する（Rothstein, D.M.ら(2003) Expert Opin. Invest. Drugs 12(2):255-271;ＵＳ７３４２０１１；ＵＳ７２７１１６５）。

【０００９】

黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡを含む）感染症の予防及び治療のために免疫療法が報告されている。ＵＳ２０１１／０２６２４７７は、ＭＲＳＡに対する免疫応答を刺激するためのワクチンとして細菌接着タンパク質Ｅａｐ、Ｅｍｐ及びＡｄｓＡを使用することに関する。国際公開第２０００７１５８５号は、特定の黄色ブドウ球菌単離株に対して反応性である単離モノクローナル抗体について記載している。ＵＳ２０１１００５９０８５Ａ１は、一又は複数のＳＡ莢膜抗原に特異的なＩｇＭ　Ａｂを用いるＡｂベースの方策を示唆しているが、実際の抗体は記載されなかった。

【００１０】

タイコ酸（ＴＡ）は、ＳＡを含むグラム陽性細菌の細胞壁内で見出される細菌多糖類である。細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）は、細胞壁のペプチドグリカン（ＰＤＧ）層と共有結合するものであり、リポタイコ酸（ＬＴＡ）は、細胞膜の脂質と共有結合するものである。Ｘｉａら（２０１０）Ｉｎｔｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．３００：１４８－５４。これらの糖重合体は、不利な条件下での細菌生存及び他の基本的な細胞プロセスにおいて重要な役割を演じる。既知のＷＴＡ構造は、細菌種の間で大きく異なる。黄色ブドウ球菌ＴＡは、リビトールリン酸又はグリセロールリン酸のようなポリオールリン酸サブユニットの反復から構成される。これらの構造多様性及び変動性に鑑みて、ＷＴＡは、抗体のため及びワクチンとしての魅力的な標的であるとされている。同書。

【００１１】

イムノコンジュゲートとしても知られる抗体－薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、効力のある細胞傷害性薬物を抗原発現腫瘍細胞に向けさせることにより（Teicher, B.A. (2009) Curr. Cancer Drug Targets 9:982-1004）、有効性を最大限にしてオフターゲットの毒性を最小限にする（Carter, P.J.及びSenter P.D. (2008) The Cancer J. 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) Acc. Chem. Res. 41:98-107）ことにより治療指数を増進する、抗体及び細胞傷害性薬物の両方の理想的な特性を組み合わせた標的化学療法分子である。ＡＤＣは、リンカー単位を介して細胞傷害性薬物部分と共有結合したターゲティング抗体を含む。イムノコンジュゲートは、腫瘍への薬物部分の標的化送達及びそこでの細胞内蓄積を可能にするが、非コンジュゲート薬物の全身投与は、消滅させようとする腫瘍細胞と共に正常細胞に対する許容できないレベルの毒性をもたらすことがある（Polakis P. (2005) Curr. Opin. Pharmacol. 5:382-387）。所定の標的抗原のための効果的なＡＤＣの開発は、標的抗原発現量、腫瘍へのアクセスしやすさ（Kovtun, Y.V.及びGoldmacher V.S. (2007) Cancer Lett. 255:232-240）、抗体の選択（ＵＳ７９６４５６６）、リンカーの安定性（Ericksonら(2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433; Doroninaら(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124; Alleyら(2008) Bioconjugate Chem. 19:759-765）、細胞傷害性薬物の作用機序及び力価、薬物の負荷量（Hamblettら(2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070）並びに抗体へのリンカー－薬物のコンジュゲーション形態（Lyon, R.ら(2012) Methods in Enzym. 502:123-138; Xieら(2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291; Kovtunら(2006) Cancer Res. 66(6):3214-3121; Lawら(2006) Cancer Res. 66(4):2328-2337; Wuら(2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) Current Opin. in Pharmacol. 5:543-549; Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Trailら(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos及びEpenetos (1999) Anticancer Res. 19:605-614）のようなパラメータの最適化に依存する。

【００１２】
癌療法におけるＡＤＣの概念は、抗菌療法にまでも広がっており、この場合、薬物部分は抗菌剤であり、抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）をもたらす。ＵＳ５５４５７２１及びＵＳ６６６０２６７は、標的細菌の表面に抗生物質を介して結合する非特異的免疫グロブリン－抗生物質コンジュゲートの合成、及び敗血症を治療するためのその使用について記載している。ＵＳ７５６９６７７及び関連特許は、細菌抗原（例えばＳＡ莢膜多糖）に特異的な抗原結合部分を有するが、細菌Ｆｃ結合タンパク質（例えばブドウ球菌プロテインＡ）と反応する定常領域を欠く予言的な抗生物質コンジュゲート抗体を示唆している。

【発明の概要】

【００１３】
本発明は、共有結合により一又は複数のリファマイシン型抗生物質部分にコンジュゲートした抗体を含む、「抗体－抗生物質コンジュゲート又は「ＡＡＣ」と呼ばれる組成物を提供する。

【００１４】
本発明の一態様は、軽鎖及びＨ鎖を含む単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体であって、Ｌ鎖が、ＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３を含み、Ｈ鎖がＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３を含み、ＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３、並びにＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３が、表６Ａ及び６Ｂに示すように、それぞれＡｂ４４６１（配列番号１－６）、４６２４（配列番号７－１２）、４３９９（配列番号１３－１８）及び６２６７（配列番号１９－２４）のそれぞれのＣＤＲのアミノ酸配列を含む、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体である。

【００１５】
一実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、重鎖可変領域（ＶＨ）を含む重鎖可変領域を含み、ＶＨは、それぞれ抗体４４６１、４６２４、４３９９及び６２６７の配列番号２６、配列番号２８、配列番号３０、配列番号３２のＶＨ配列から選択されるＶＨ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する。一実施態様では、この抗体は、Ｌ鎖可変領域（ＶＬ）をさらに含み、ＶＬは、それぞれ抗体４４６１、４６２４、４３９９及び６２６７の配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１のＶＬ配列から選択されるＶＬ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する。別の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、Ｌ鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＬは、それぞれ抗体４４６１、４６２４、４３９９及び６２６７の配列番号２５、配列番号２７、配列番号２９、配列番号３１のＶＬ配列から選択されるＶＬ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する。先行する実施態様の何れでも、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％であってよい。

【００１６】
より具体的な実施態様では、抗体は、
（ｉ）配列番号２５のＶＬ及び配列番号２６のＶＨ、
（ｉｉ）配列番号２７のＶＬ及び配列番号２８のＶＨ、
（ｉｉｉ）配列番号２９のＶＬ及び配列番号３０のＶＨ、又は
（ｉｖ）配列番号３１のＶＬ及び配列番号３２のＶＨ
を含む。

【００１７】
一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡ（細胞壁タイコ酸）モノクローナル抗体は、軽（Ｌ）鎖及び重（Ｈ）鎖を含み、
（ａ）Ｌ鎖は、ＫＳＳＱＳＶＬＳＲＡＮＮＮＹＹＶＡ（配列番号１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＴＲＥＦ（配列番号２）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＹＴＳＲＲＴ（配列番号３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＤＹＹＭＨ（配列番号４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＩＮＰＫＳＧＧＴＮＹＡＱＲＦＱＧ（配列番号５）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＤＣＧＳＧＧＬＲＤＦ（配列番号６）の配列を含むＣＤＲ

Ｈ３とを含み、
（ｂ）Ｌ鎖は、ＲＳＮＱＮＬＬＳＳＳＮＮＮＹＬＡ（配列番号７）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号８）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＹＡＮＰＲＴ（配列番号９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖が、ＤＹＹＩＨ（配列番号１０）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＩＮＰＮＴＧＧＴＹＹＡＱＫＦＲＤ（配列番号１１）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＤＣＧＲＧＧＬＲＤＩ（配列番号１２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｃ）Ｌ鎖は、ＫＳＮＱＮＶＬＡＳＳＮＤＫＮＹＬＡ（配列番号１３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＩＲＥＳ（配列番号１４）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＹＴＮＰＲＴ（配列番号１５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＤＹＹＩＨ（配列番号１６）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＩＮＰＮＴＧＧＴＮＹＡＱＫＦＱＧ（配列番号１７）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＤＣＧＮＡＧＬＲＤＩ（配列番号１８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、又は
（ｄ）Ｌ鎖は、ＫＳＳＱＮＶＬＹＳＳＮＮＫＮＹＬＡ（配列番号１９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＴＲＥＳ（配列番号２０）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＹＴＳＰＰＹＴ（配列番号２１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＹＷＩＧ（配列番号２２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＩＩＨＰＧＤＳＫＴＲＹＳＰＳＦＱＧ（配列番号２３）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＬＹＣＳＧＧＳＣＹＳＤＲＡＦＳＳＬＧＡＧＧＹＹＹＧＭＧＶ（配列番号２４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含む。

【００１８】

先行する実施態様の何れか１つでは、抗体は、Ｆｃ領域を欠く抗原結合断片であってよい。一部の実施態様では、抗体は、Ｆ（ａｂ）又はＦ（ａｂ’）$_2$である。一部の実施態様では、抗体は、重鎖定常領域及び／又は軽鎖定常領域をさらに含み、重鎖定常領域及び／又は軽鎖定常領域は、システイン残基で置換された一又は複数のアミノ酸を含む。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、アミノ酸置換Ａ１１８Ｃ及び／又はＳ４００Ｃを含み、かつ／あるいは軽鎖定常領域は、アミノ酸置換Ｖ２０５Ｃを含み、番号付けは、ＥＵ番号付けに従う。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、配列番号１４９のアミノ酸配列を含み、かつ／又は軽鎖定常領域は、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、配列番号１４９のアミノ酸配列を含み、軽鎖定常領域は、配列番号１５０のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、配列番号１４８のアミノ酸配列を含み、軽鎖定常領域は、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む。

【００１９】

一態様では、先行する実施態様の何れか１つのＡｂは、ＷＴＡアルファと結合する。

【００２０】

別の態様では、本発明は、軽鎖及びＨ鎖を含む単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体であって、Ｌ鎖が、ＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３を含み、かつ／又はＨ鎖が、ＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３を含み、ＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３、並びにＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３が、図１４に示すＡｂのそれぞれの対応するＣＤＲのアミノ酸配列（配列番号３３－１１０）を含む、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体を提供する。別の態様では、本発明は、軽鎖及びＨ鎖を含む単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体であって、Ｌ鎖が、ＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３を含み、かつ／又はＨ鎖が、ＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３を含み、ＣＤＲ　Ｌ１、ＣＤＲ　Ｌ２及びＣＤＲ　Ｌ３、並びにＣＤＲ　Ｈ１、ＣＤＲ　Ｈ２及びＣＤＲ　Ｈ３が、図１５Ａ、１５Ｂ、１６Ａ及び１６Ｂに示すＡｂのそれぞれ（抗体６０７８、６０７８．ｖ２ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ２ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ３ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ３ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＨＣＬＣ－Ｃｙｓ、４４９７、４４９７．ｖ８ＨＣ－Ｃｙｓ、４４９７．ｖ８ＬＣ－Ｃｙｓ及び４４９７．ｖ８ＨＣＬＣ－Ｃｙｓ）の対応するＣＤＲのアミノ酸配列を含む、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体を提供する。具体的な実施態様では、これらのＡｂは、ＷＴＡベータと結合する。

【００２１】
別の態様では、本発明は、Ｌ鎖可変領域（ＶＬ）を含む単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体、具体的には抗ＷＴＡベータモノクローナル抗体であって、ＶＬが、カバット１位－１０７位にて、図１７Ａ－１から１７Ａ－２に示すように、それぞれ抗体６０７８、６２６３、４４５０、６２９７、６２３９、６２３２、６２５９、６２９２、４４６２、６２６５、６２５３、４４９７及び４４８７のそれぞれに対応するＶＬ配列から選択されるＶＬ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体を提供する。さらなる実施態様では、抗体は、重鎖可変領域（ＶＨ）を含む重鎖可変領域をさらに含み、ＶＨは、カバット１位－１１３位にて、図１７Ｂ－１から１７Ｂ－２に示すように、それぞれ抗体６０７８、６２６３、４４５０、６２９７、６２３９、６２３２、６２５９、６２９２、４４６２、６２６５、６２５３、４４９７及び４４８７のそれぞれに対応するＶＨ配列から選択されるＶＨ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する。先行する実施態様の何れでも、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％であってよい。抗体のより具体的な実施態様では、ＶＨは、配列番号１１２の配列を含み、ＶＬは、配列番号１１１を含む。

【００２２】
別の態様では、本発明は、Ｌ鎖可変領域（ＶＬ）を含む単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体、具体的には抗ＷＴＡベータモノクローナル抗体であって、ＶＬが、カバット１位－１０７位にて、図１５Ａ又は１６Ａに示す抗体（抗体６０７８、６０７８．ｖ２ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ２ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ３ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ３ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＨＣＬＣ－Ｃｙｓ、４４９７、４４９７．ｖ８ＨＣ－Ｃｙｓ、４４９７．ｖ８ＬＣ－Ｃｙｓ及び４４９７．ｖ８ＨＣＬＣ－Ｃｙｓ）のそれぞれに対応するＶＬ配列から選択されるＶＬ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体を提供する。さらなる実施態様では、抗体は、重鎖可変領域（ＶＨ）を含む重鎖可変領域をさらに含み、ＶＨは、カバット１位－１１３位にて、図１５Ｂ及び１６Ｂに示す抗体（抗体６０７８、６０７８．ｖ２ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ２ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ３ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ３ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＨＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＬＣ－Ｃｙｓ、６０７８．ｖ４ＨＣＬＣ－Ｃｙｓ、４４９７、４４９７．ｖ８ＨＣ－Ｃｙｓ、４４９７．ｖ８ＬＣ－Ｃｙｓ及び４４９７．ｖ８ＨＣＬＣ－Ｃｙｓ）のそれぞれに対応するＶＨ配列から選択されるＶＨ領域の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する。先行する実施態様の何れでも、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％であってよい。

【００２３】
ある特定の実施態様では、単離抗ＷＴＡベータ抗体は、軽鎖が、配列番号１１５の配列を含み、操作されたシステインを有するＨ鎖が、配列番号１１６の配列を含むものである。別の実施態様では、抗体は、軽鎖が、配列番号１１５の配列を含み、操作されたシステインを有するＨ鎖が、配列番号１１７の配列を含み、Ｘが、Ｍ、Ｉ又はＶであるものである。異なる実施態様では、配列番号１１３の配列を含むＬ鎖は、配列番号１１７のＣｙｓ操作Ｈ鎖変異体とペアリングし、変異体は、Ｘが、Ｍ、Ｉ又はＶであるものである。

【００２４】
本発明により提供される別の単離抗ＷＴＡベータ抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号１２０と少なくとも９５％の配列同一性を有するＶＨを含む。追加の実施態様では、この抗体は、配列番号１１９と少なくとも９５％の配列同一性を有するＶＬをさらに含む。具体的な実施態様では、抗ＷＴＡベータ抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、Ｌ鎖は、配列番号１１９のＶＬ配列を含み、Ｈ鎖は、配列番号１２０のＶＨ配列を含む。さらにより具体的な実施態様では、ＷＴＡベータと結合する単離抗体は、配列番号１２１のＬ鎖及び配列番号１２２のＨ鎖を含む。

【００２５】
抗ＷＴＡベータＣｙｓ操作Ｈ及びＬ鎖変異体は、以下の組み合わせの何れかとペアリン

グして、本発明の抗ＷＴＡ　ＡＡＣを作製するためのリンカーーＡｂｘ中間体にコンジュゲートするための完全長Ａｂを形成できる。一実施態様では、Ｌ鎖は、配列番号１２１の配列を含み、Ｈ鎖は、配列番号１２４の配列を含む。別の実施態様では、単離抗体は、配列番号１２３のＬ鎖及び配列番号１２４又は配列番号１５７の配列を含むＨ鎖を含む。特定の実施態様では、本発明の抗ＷＴＡベータ抗体及び抗ＷＴＡベータＡＡＣは、配列番号１２３のＬ鎖を含む。

【００２６】

さらに別の実施態様は、図１３Ａ及び図１３Ｂの抗ＷＴＡアルファＡｂのそれぞれと同じエピトープと結合する抗体である。図１４、図１５Ａ及び１５Ｂ、図１６Ａ及び１６Ｂ並びに図１７Ａ及び１７Ｂの抗ＷＴＡベータＡｂのそれぞれと同じエピトープと結合する抗体も提供される。

【００２７】

さらなる実施態様では、本発明の抗ＷＴＡベータ及び抗ＷＴＡアルファ抗体は、Ｆｃ領域を欠く抗原結合断片、好ましくはＦ（ａｂ’）$_2$又はＦ（ａｂ）である。よって、本発明は、ＷＴＡ抗体が、Ｆ（ａｂ’）$_2$又はＦ（ａｂ）である、抗体－抗生物質コンジュゲートを提供する。

【００２８】

別の態様では、本発明は、ＷＴＡベータと結合する抗ＷＴＡモノクローナル抗体を提供する。

【００２９】

一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡ（細胞壁タイコ酸）モノクローナル抗体は、軽（Ｌ）鎖及び重（Ｈ）鎖を含み、

（ａ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＴＩＳＧＷＬＡ（配列番号３３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＫＡＳＴＬＥＳ（配列番号３４）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＫＳＹＳＦＮ（配列番号３５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＹＤＩＮ（配列番号３６）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＭＮＡＮＳＧＮＴＧＹＡＱＫＦＱＧ（配列番号３７）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＳＳＩＬＶＲＧＡＬＧＲＹＦＤＬ（配列番号３８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、

（ｂ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＴＩＳＧＷＬＡ（配列番号３９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＫＡＳＴＬＥＳ（配列番号４０）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＫＳＹＳＦＮ（配列番号４１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＹＤＩＮ（配列番号４２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＭＮＡＮＳＧＮＴＧＹＡＱＫＦＱＧ（配列番号４３）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＳＳＩＬＶＲＧＡＬＧＲＹＦＤＬ（配列番号４４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、

（ｃ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＦＶＳＲＴＳＬＡ（配列番号４５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＥＴＳＳＲＡＴ（配列番号４６）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＨＫＹＧＳＧＰＲＴ（配列番号４７）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＮＹＤＦＩ（配列番号４８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＭＮＰＮＳＹＮＴＧＹＧＱＫＦＱＧ（配列番号４９）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＡＶＲＧＱＬＬＳＥＹ（配列番号５０）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、

（ｄ）Ｌ鎖は、＿ＲＡＳＱＳＶＳＳＳＹＬＡ（配列番号５１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＤＡＳＳＲＡＴ（配列番号５２）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＫＹＧＳＴＰＲＰ（配列番号５３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＹＤＩＮ（配列番号５４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＭＮＰＮＳＧＮＴＮＹＡＱＲＦＱＧ（配列番号５５）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＥＲＷＳＫＤＴＧＨＹＹＹＹＧＭＤＶ（配列番号５６）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、

（ｅ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＬＤＩＴＮＨＬＡ（配列番号５７）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＥＡＳＩＬＱＳ（配列番号５８）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＥＫＣＮＳＴＰＲＴ（配列番号５９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＮＹＤＩＮ（配列番号６０）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＷＭＮＰＳＳＧＲＴＧＹＡＰＫＦＲＧ（配列番号６１）の

配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＧＧＧＹＹＤＳＳＧＮＹＨＩＳＧＬＤＶ（配列番号６２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｆ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＳＶＧＡＩＹＬＡ（配列番号６３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＧＶＳＮＲＡＴ（配列番号６４）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＬＹＴＳＳＲＡＬＴ（配列番号６５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＡＹＡＭＮ（配列番号６６）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＳＩＴＫＮＳＤＳＬＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号６７）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＬＡＡＲＩＭＡＴＤＹ（配列番号６８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｇ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＧＩＲＮＧＬＧ（配列番号６９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＰＡＳＴＬＥＳ（配列番号７０）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＬＱＤＨＮＹＰＰＴ（配列番号７１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＹＹＳＭＩ（配列番号７２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＳＩＤＳＳＳＲＹＬＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号７３）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＤＧＤＤＩＬＳＶＹＲＧＳＧＲＰＦＤＹ（配列番号７４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｈ）Ｌ鎖は、＿ＲＡＳＱＧＩＲＮＧＬＧ（配列番号７５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＰＡＳＴＬＥＳ（配列番号７６）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＬＱＤＨＮＹＰＰＳ（配列番号７７）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＹＹＳＭＩ（配列番号７８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＳＩＤＳＳＳＲＹＲＹＹＴＤＳＶＫＧ（配列番号７９）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＤＧＤＤＩＬＳＶＹＱＧＳＧＲＰＦＤＹ（配列番号８０）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｉ）Ｌ鎖は、＿ＲＡＳＱＳＶＲＴＮＶＡ（配列番号８１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＧＡＳＴＲＡＳ（配列番号８２）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＬＱＹＮＴＷＰＲＴ（配列番号８３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＴＮＤＭＳ（配列番号８４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＴＩＩＧＩＤＤＴＴＨＹＡＤＳＶＲＧ（配列番号８５）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＮＳＧＩＹＳＦ（配列番号８６）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｊ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＤＩＧＳＳＬＡ（配列番号８７）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＡＴＳＴＬＱＳ（配列番号８８）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＬＮＮＹＶＨＳ（配列番号８９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＤＹＡＭＧ（配列番号９０）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＶＶＴＧＨＳＹＲＴＨＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号９１）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＲＩＷＳＹＧＤＤＳＦＤＶ（配列番号９２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｋ）Ｌ鎖は、ＲＡＳＱＳＩＧＤＲＬＡ（配列番号９３）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＮＬＥＧ（配列番号９４）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＫＳＱＷＳ（配列番号９５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＹＡＭＮ（配列番号９６）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＹＩＳＳＩＥＴＩＹＹＡＤＳＶＫＧ（配列番号９７）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＤＲＬＶＤＶＰＬＳＳＰＮＳ（配列番号９８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｌ）Ｌ鎖は、ＫＳＳＱＳＩＦＲＴＳＲＮＫＮＬＬＮ（配列番号９９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＴＲＫＳ（配列番号１００）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＦＳＰＰＹＴ（配列番号１０１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＦＷＭＨ（配列番号１０２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧ（配列番号１０３）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＧＤＧＧＬＤＤ（配列番号１０４）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、
（ｍ）Ｌ鎖は、＿ＲＡＳＱＦＴＮＨＹＬＮ（配列番号１０５）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＶＡＳＮＬＱＳ（配列番号１０６）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＳＹＲＴＰＹＴ（配列番号１０７）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＧＹＹＮ（配列番号１０８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＹＩＬＳＧＡＨＴＤＩＫＡＳＬＧＳ（配列番号１０９）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＳＧＶＹＳＫＹＳＬＤＶ（配列番号１１０）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含み、又は

（ｎ）Ｌ鎖は、ＫＳＳＱＳＩＦＲＴＳＲＮＫＮＬＬＮ（配列番号９９）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ１と、ＷＡＳＴＲＫＳ（配列番号１００）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ２と、ＱＱＹＦＳＰＰＹＴ（配列番号１０１）の配列を含むＣＤＲ　Ｌ３とを含み、Ｈ鎖は、ＳＦＷＭＨ（配列番号１０２）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ１と、ＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧ（配列番号１０３）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ２と、ＧＥＧＧＬＤＤ（配列番号１１８）の配列を含むＣＤＲ　Ｈ３とを含む。

【００３０】

一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＶＨは、配列番号１１２のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号１１２の１位のアミノ酸Ｘａａは、Ｑ又はＥであり、配列番号１１２の２位のアミノ酸Ｘａａは、Ｍ、Ｉ又はＶである。一部の実施態様では、抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）をさらに含み、ＶＬは、配列番号１１１のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＬは、配列番号１１１のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。先行する実施態様の何れでも、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％であってよい。一部の実施態様では、抗体のＶＨは、配列番号１１２の配列を含み、抗体のＶＬは、配列番号１１１の配列を含む。

【００３１】

一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＶＨは、配列番号１２０又は配列番号１５６のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）をさらに含み、ＶＬは、配列番号１１９のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＬは、配列番号１１９のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。先行する実施態様の何れでも、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％であってよい。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、ＶＬは、配列番号１１９の配列を含み、ＶＨは、配列番号１２０又は配列番号１５６の配列を含む。

【００３２】

一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＬは、配列番号１５８、配列番号１５９、配列番号１６０、配列番号１６１、配列番号１６２、配列番号１６３、配列番号１６４、配列番号１６５、配列番号１６６、配列番号１６７、及び配列番号１６８のＶＬ配列から選択されるＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する配列を含む。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、配列番号１２７、配列番号１３３、配列番号１３４、配列番号１６９、配列番号１７０、配列番号１７１、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、及び配列番号１７６のＶＨ配列から選択されるＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。先行する実施態様の何れでも、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％であってよい。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、

（ａ）抗体のＶＬは、配列番号１５８のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１６９のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

（ｂ）抗体のＶＬは、配列番号１５９のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７０のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

（ｃ）抗体のＶＬは、配列番号１６０のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配

列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７１のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｄ）抗体のＶＬは、配列番号１６１のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７２のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｅ）抗体のＶＬは、配列番号１６２のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７３のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｆ）抗体のＶＬは、配列番号１６３のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７４のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｇ）抗体のＶＬは、配列番号１６４のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７５のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｈ）抗体のＶＬは、配列番号１６５のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７６のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｉ）抗体のＶＬは、配列番号１６６のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１３３のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
（ｊ）抗体のＶＬは、配列番号１６７のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１３４のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、又は
（ｋ）抗体のＶＬは、配列番号１６８のＶＬ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１２７のＶＨ配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００３３】

一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖可変領域（ＶＬ）及び重鎖可変領域（ＶＨ）を含み、
（ａ）抗体のＶＬは、配列番号１５８のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１６９のＶＨ配列を含み、
（ｂ）抗体のＶＬは、配列番号１５９のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７０のＶＨ配列を含み、
（ｃ）抗体のＶＬは、配列番号１６０のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７１のＶＨ配列を含み、
（ｄ）抗体のＶＬは、配列番号１６１のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７２のＶＨ配列を含み、
（ｅ）抗体のＶＬは、配列番号１６２のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７３のＶＨ配列を含み、
（ｆ）抗体のＶＬは、配列番号１６３のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７４のＶＨ配列を含み、
（ｇ）抗体のＶＬは、配列番号１６４のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７５のＶＨ配列を含み、
（ｈ）抗体のＶＬは、配列番号１６５のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１７６のＶＨ配列を含み、
（ｉ）抗体のＶＬは、配列番号１６６のＶＬ配列を含み、抗体のＶＨは、配列番号１３３のＶＨ配列を含み、
（ｊ）抗体のＶＬは、配列番号１６７のＶＬ配列を含み、ＶＨは、配列番号１３４のＶＨ配列を含み、
（ｋ）抗体のＶＬは、配列番号１６８のＶＬ配列を含み、ＶＨは、配列番号１２７のＶＨ

配列を含み、
（ｌ）抗体のＶＬは、配列番号１１３のＶＬ配列を含み、ＶＨは、配列番号１１４のＶＨ配列を含み、又は
（ｍ）抗体のＶＬは、配列番号１２１のＶＬ配列を含み、ＶＨは、配列番号１３８のＶＨ配列を含む。
【００３４】
上記の抗体の一部の実施態様では、抗体は、Ｆｃ領域を欠く抗原結合断片である。一部の実施態様では、抗体は、Ｆ（ａｂ）又はＦ（ａｂ’）$_2$である。一部の実施態様では、抗体は、重鎖定常領域及び／又は軽鎖定常領域をさらに含み、重鎖定常領域及び／又は軽鎖定常領域は、システイン残基で置換された一又は複数のアミノ酸を含む。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、アミノ酸置換Ａ１１８Ｃ又はＳ４００Ｃを含み、かつ／あるいは軽鎖定常領域は、アミノ酸置換Ｖ２０５Ｃを含み、番号付けは、ＥＵ番号付けに従う。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、配列番号１４９のアミノ酸配列を含み、かつ／又は軽鎖定常領域は、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、配列番号１４９のアミノ酸配列を含み、軽鎖定常領域は、配列番号１５０のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、重鎖定常領域は、配列番号１４８のアミノ酸配列を含み、軽鎖定常領域は、配列番号１５１のアミノ酸配列を含む。
【００３５】
一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、抗体の重鎖は、配列番号１１４、配列番号１１６又は配列番号１１７の配列を含み、抗体の軽鎖は、配列番号１１３の配列を含み、配列番号１１６又は配列番号１１７の２位のアミノ酸Ｘａａは、Ｍ、Ｉ又はＶである。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、抗体の重鎖は、配列番号１１４、配列番号１１６又は配列番号１１７の配列を含み、抗体の軽鎖は、配列番号１１５の配列を含み、配列番号１１６又は配列番号１１７の２位のアミノ酸Ｘａａは、Ｍ、Ｉ又はＶである。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、抗体の重鎖は、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３及び配列番号１４４からなる群から選択される配列を含み、抗体の軽鎖は、配列番号１１３の配列を含む。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、抗体の重鎖は、配列番号１３９、配列番号１４０、配列番号１４１、配列番号１４２、配列番号１４３及び配列番号１４４からなる群から選択される配列を含み、抗体の軽鎖は、配列番号１１５の配列を含む。
【００３６】
一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号１４６、配列番号１４７、配列番号１５７又は配列番号１２４の配列を含み、軽鎖は、配列番号１２１の配列を含む。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号１４６、配列番号１４７、配列番号１５７又は配列番号１２４の配列を含み、軽鎖は、配列番号１２３の配列を含む。一部の実施態様では、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号１４６、配列番号１４７、配列番号１５７又は配列番号１２４の配列を含み、軽鎖は、配列番号１４５の配列を含む。
【００３７】
上記の抗体の何れかの一部の実施態様では、抗体は、ＩｇＭアイソタイプでない。上記の抗体の何れかの一部の実施態様では、抗体は、ＩｇＧ（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４）、ＩｇＥ、ＩｇＤ又はＩｇＡ（例えばＩｇＡ１又はＩｇＡ２）アイソタイプである。上記の抗体の何れかの一部の実施態様では、抗体は、細胞培養において宿主細胞により生成される。一部の実施態様では、宿主細胞は、非ヒト細胞である。一部の実施態様では、宿主細胞は、原核生物又は真核生物である。一部の実施態様では、宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えばヒト又は非ヒト哺乳動物細胞）である。一部の実施態様では、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞である。

【００３８】
本発明の別の態様は、本明細書で開示する何れかの抗体と、薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。
【００３９】
さらに別の態様では、本発明は、本明細書で開示する抗体の何れかをコードする単離核酸も提供する。まだ別の態様では、本発明は、本明細書で開示する抗体の何れかをコードする核酸を含むベクターを提供する。さらなる実施態様では、ベクターは、発現ベクターである。
【００４０】
本発明は、本明細書で開示する抗体の何れかをコードする核酸を含む宿主細胞も提供する。さらなる実施態様では、宿主細胞は、原核生物又は真核生物である。一部の実施態様では、宿主細胞は、哺乳動物細胞（例えばヒト又は非ヒト哺乳動物細胞）である。一部の実施態様では、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞である。
【００４１】
本発明は、本明細書で開示する抗体の何れかをコードする核酸を含む宿主細胞を、核酸の発現に適切な条件下で培養することと、細胞により生成される抗体を回収することとを含む、抗体を生成する方法をさらに提供する。一部の実施態様では、方法は、抗体を精製することをさらに含む。
【００４２】
本発明の別の態様は、ペプチドリンカーによりリファマイシン型抗生物質と共有結合した本発明の抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体を含む抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）化合物である。本明細書で開示する抗体－抗生物質コンジュゲートの一部の実施態様では、抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体は、黄色ブドウ球菌と結合する。一部の実施態様では、抗細胞壁タイコ酸抗体は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡ）と結合する。
【００４３】
本明細書で開示する抗体－抗生物質コンジュゲートの一部の実施態様では、抗体は、ｉ）配列番号９９－１０４のＬ鎖及びＨ鎖ＣＤＲ、若しくは配列番号３３－３８のＬ鎖及びＨ鎖ＣＤＲ、又はｉｉ）配列番号１２０若しくは配列番号１５６のＶＨとペアリングした配列番号１１９若しくは配列番号１２３のＶＬ、又はｉｉｉ）配列番号１１２のＶＨとペアリングした配列番号１１１のＶＬを含む。
【００４４】
一部の実施態様では、リファマイシン型抗生物質は、リファラジル型抗生物質である。一部の実施態様では、リファマイシン型抗生物質は、ペプチドリンカーと結合した第四級アミンを含む。一部の実施態様では、抗生物質は、抗ＷＴＡ抗体の操作されたシステインと結合しているペプチドリンカーを介して抗体と結合している。操作されたシステインは、修飾された抗体のＬ又はＨ鎖にあってよい。一部の実施態様では、システイン残基は、Ｌ鎖にある。一部の実施態様では、システイン残基は、Ｈ鎖にある。
【００４５】
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、黄色ブドウ球菌システインプロテアーゼにより切断可能なリンカーであるペプチドリンカーを含み得る。このようなリンカーは、スタホパインＢ又はスタホパインＡにより切断可能なリンカーを含む。一実施態様では、黄色ブドウ球菌プロテアーゼは、エンドペプチダーゼである。別の実施態様では、リンカーは、宿主プロテアーゼにより切断可能なリンカー、好ましくはヒトプロテアーゼカテプシンＢにより切断可能なリンカー（例えばｖａｌ－ｃｉｔジペプチドリンカー）である。
【００４６】
抗体－抗生物質コンジュゲート化合物の例示的な実施態様は、式：
$Ab-(L-abx)_p$
（式中、

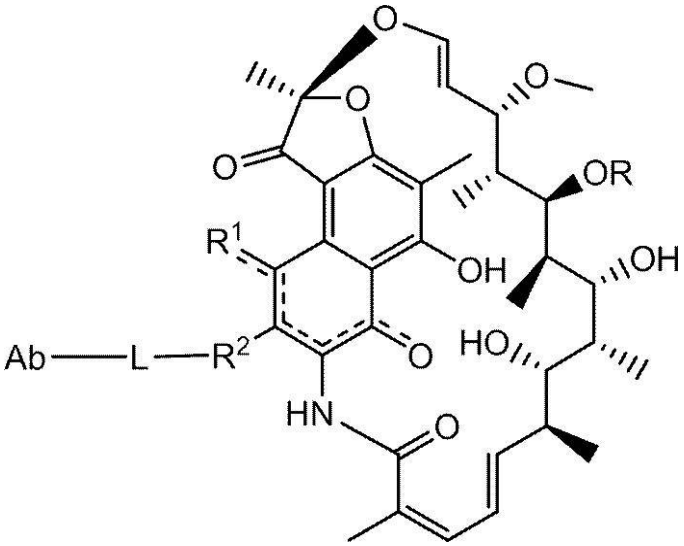
Ａｂは、抗細胞壁タイコ酸抗体であり、
Ｌは、式：
－Ｓｔｒ－Ｐｅｐ－Ｙ－
（式中、Ｓｔｒは、ストレッチャー単位であり、Ｐｅｐは、２から１２アミノ酸残基のペプチドであり、Ｙは、スペーサー単位である）
を有するペプチドリンカーであり、
ａｂｘは、リファマイシン型抗生物質であり、
ｐは、１から８の整数である）
を有する。

【００４７】

一実施態様では、先行する何れかの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、２又は４の抗生物質抗体比（ＡＡＲ）を有する。

【００４８】

一部の実施態様では、抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式Ｉ：

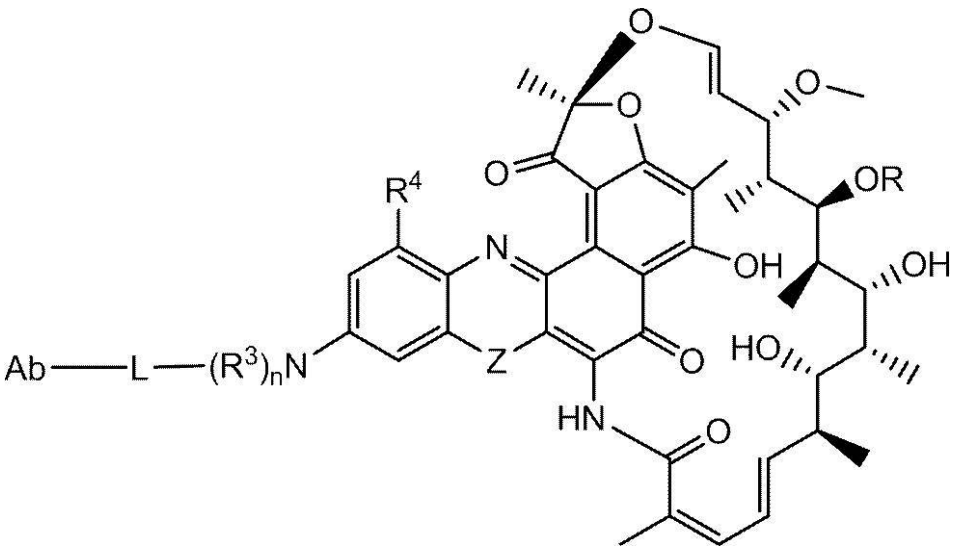


Ｉ

（式中、
破線は、任意選択の結合を示し、
Ｒは、Ｈ、C_1－C_{12}アルキル又はＣ（Ｏ）CH_3であり、
R^1は、ＯＨであり、
R^2は、ＣＨ＝Ｎ－（ヘテロシクリル）であり、ヘテロシクリルは、Ｃ（Ｏ）CH_3、C_1－C_{12}アルキル、C_1－C_{12}ヘテロアリール、C_2－C_{20}ヘテロシクリル、C_6－C_{20}アリール及びC_3－C_{12}カルボシクリルから独立して選択される一又は複数の基で置換されていてもよいか、
あるいはR^1及びR^2は、５又は６員の縮合ヘテロアリール又はヘテロシクリルを形成し、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環を形成していてもよく、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_1－C_{12}アルキル又はＯＨで置換されていてもよく、
Ｌは、R^2、又はR^1及びR^2により形成される縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルと結合するペプチドリンカーであり、
Ａｂは、抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体である）
のものである。

【００４９】

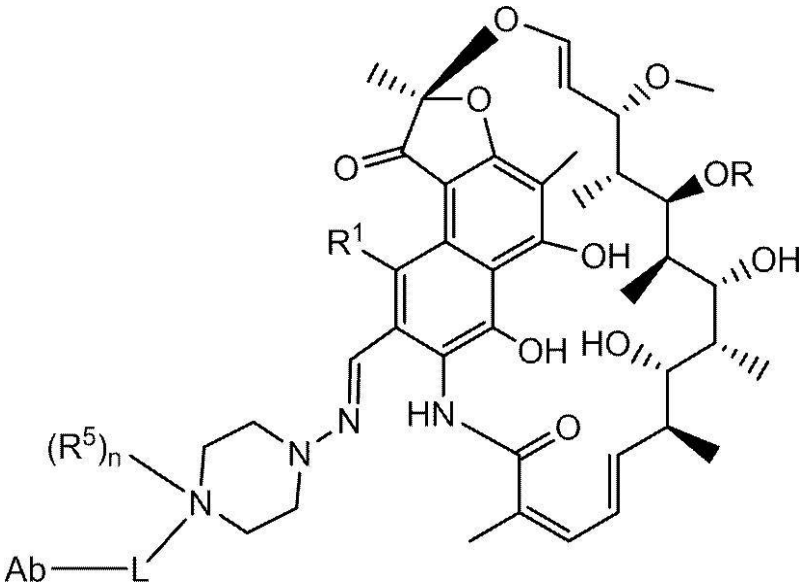
これらの実施態様の一部では、式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



（式中、
R^3は、Ｈ及びC_1－C_{12}アルキルから独立して選択され、
ｎは、１又は２であり、
R^4は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_1－C_{12}アルキル及びＯＨから選択され、
Ｚは、ＮＨ、Ｎ（C_1－C_{12}アルキル）、Ｏ及びＳから選択される）
のものである。

【００５０】

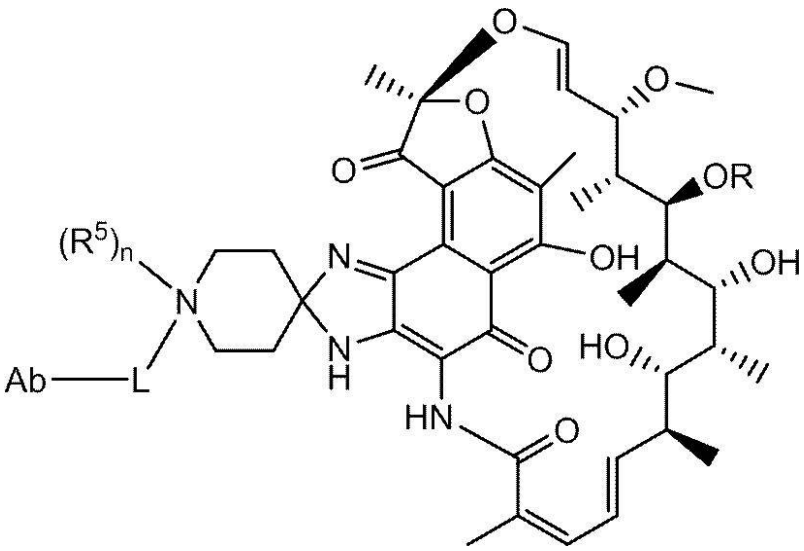
これらの実施態様の一部では、式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



（式中、
R^5は、Ｈ及びC_1－C_{12}アルキルから選択され、
ｎは、０又は１である）
のものである。

【００５１】

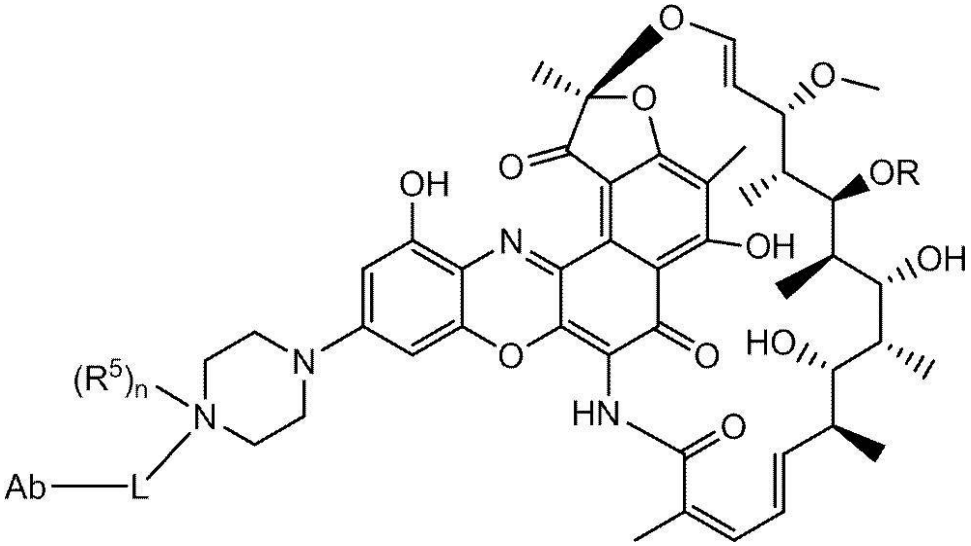
これらの実施態様の一部では、式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



（式中、
Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから選択され、
ｎは、０又は１である）
のものである。

【００５２】

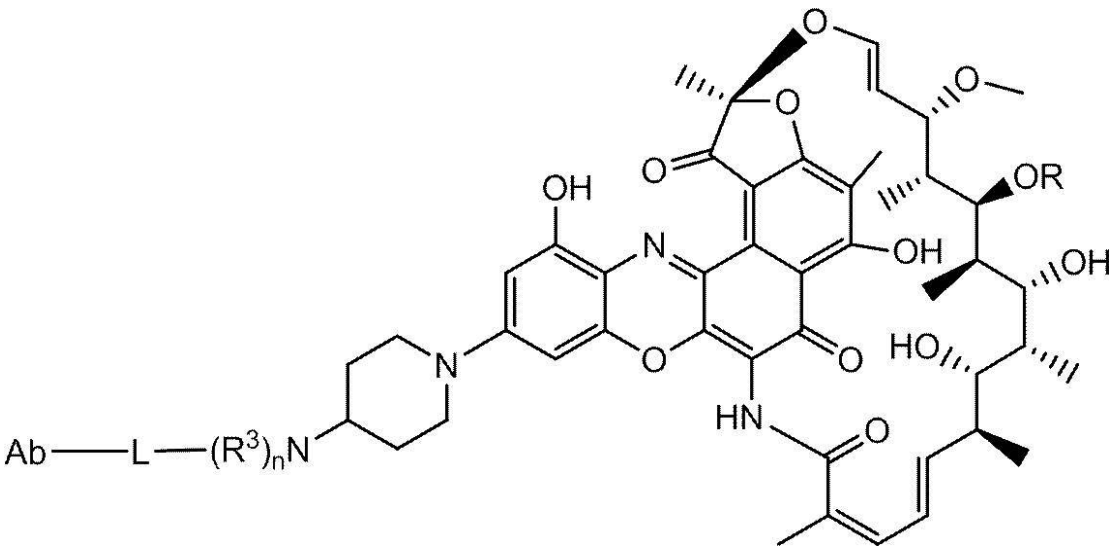
これらの実施態様の一部では、式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



（式中、
Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから独立して選択され、
ｎは、０又は１である）
のものである。

【００５３】

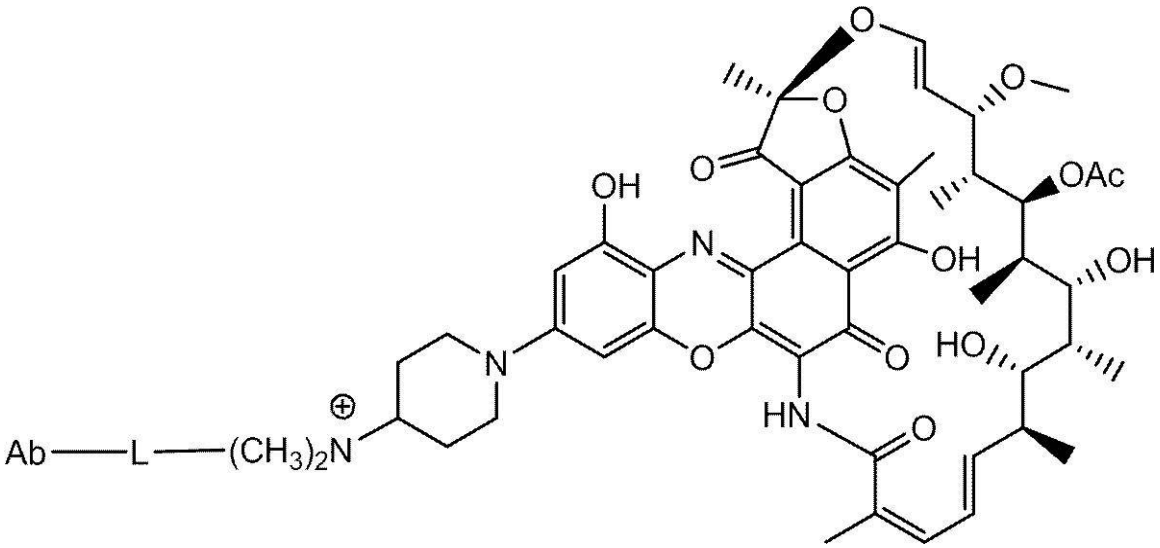
これらの実施態様の一部では、式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



（式中、
Ｒ^{3}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから独立して選択され、
ｎは、１又は２である）
のものである。

【００５４】

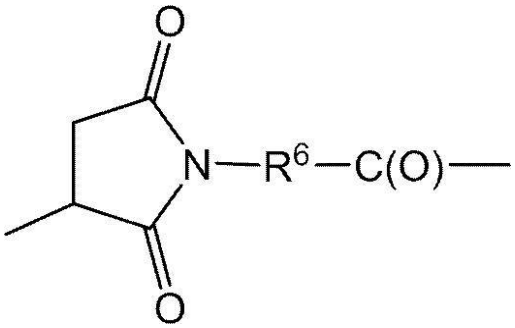
これらの実施態様の一部では、式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



.
のものである。

【００５５】

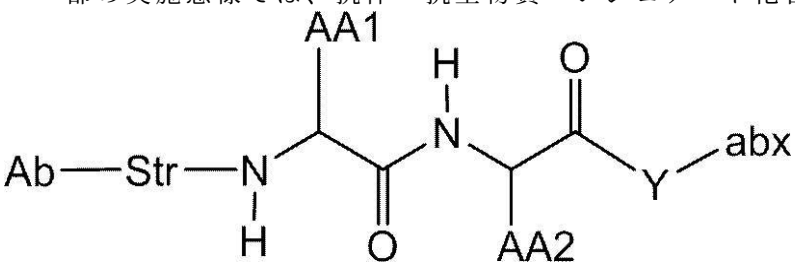
一部の実施態様では、ペプチドリンカーによりリファマイシン型抗生物質と共有結合した本発明の抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体を含む抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）化合物であって、ペプチドリンカーが、式：
－Ｓｔｒ－Ｐｅｐ－Ｙ－
（式中、Ｓｔｒは、抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体と共有結合しているストレッチャー単位であり、Ｐｅｐは、２から１２アミノ酸残基のペプチドであり、Ｙは、リファマイシン型抗生物質と共有結合しているスペーサー単位である）
を有する、抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）化合物が提供される。これらの実施態様の一部では、Ｓｔｒは、式：



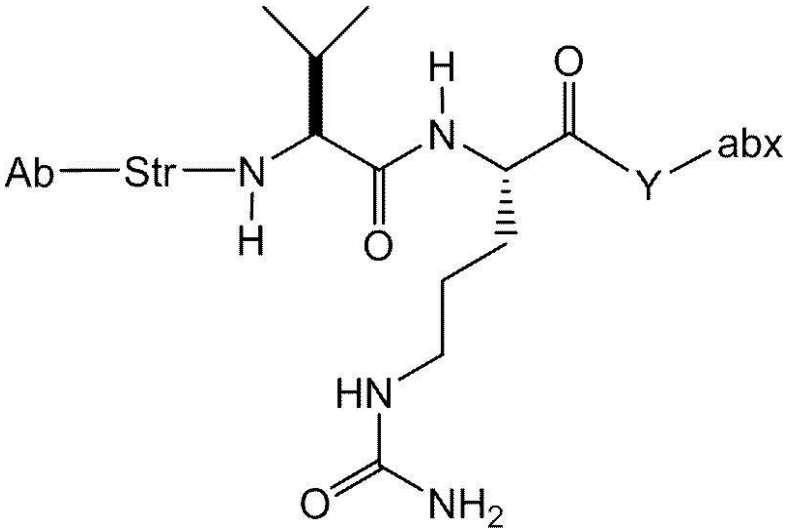
（式中、R^6は、C_1－C_{10}アルキレン－、－C_3－C_8カルボシクロ、－O－（C_1－C_8アルキル）－、－アリーレン－、－C_1－C_{10}アルキレン－アリーレン－、－アリーレン－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_1－C_{10}アルキレン－（C_3－C_8カルボシクロ）－、－（C_3－C_8カルボシクロ）－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_3－C_8ヘテロシクロ－、－C_1－C_{10}アルキレン－（C_3－C_8ヘテロシクロ）－、－（C_3－C_8ヘテロシクロ）－C_1－C_{10}アルキレン－、－（CH_2CH_2O）$_r$－及び－（CH_2CH_2O）$_r$－CH_2－からなる群から選択され、ｒは、１から１０の範囲の整数である）を有する。１つの変動では、R^6は、－（CH_2）$_5$－である。これらの実施態様の一部では、Ｐｅｐは、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、リジン、アルギニン、バリン及びシトルリンから独立して選択される２から１２アミノ酸残基を含む。１つの変動では、Ｐｅｐは、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ、ｖｃ）、フェニルアラニン－リジン（ｆｋ）、ＧＧＡＦＡＧＧＧ（配列番号１２６）、ｔｐｍ－ｃｉｔ、ＧＰＩｍｅＬＦＦ（配列番号１２９）、バリン－シトルリン－フェニルアラニン（ｖａｌ－ｃｉｔ－ｐｈｅ）、ＧＧＡＦＡ（配列番号１３１）及びＬＡＦＧ（配列番号１２８）から選択される。これらの実施態様の一部では、Ｙは、パラ－アミノベンジル又はパラ－アミノベンジルオキシカルボニルを含む。

【００５６】

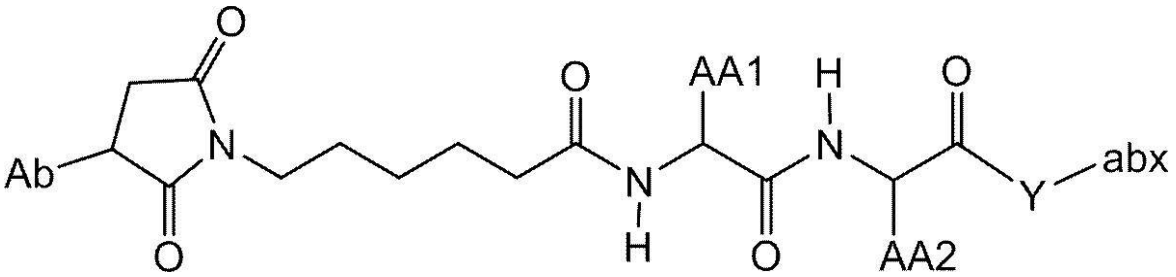
一部の実施態様では、抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



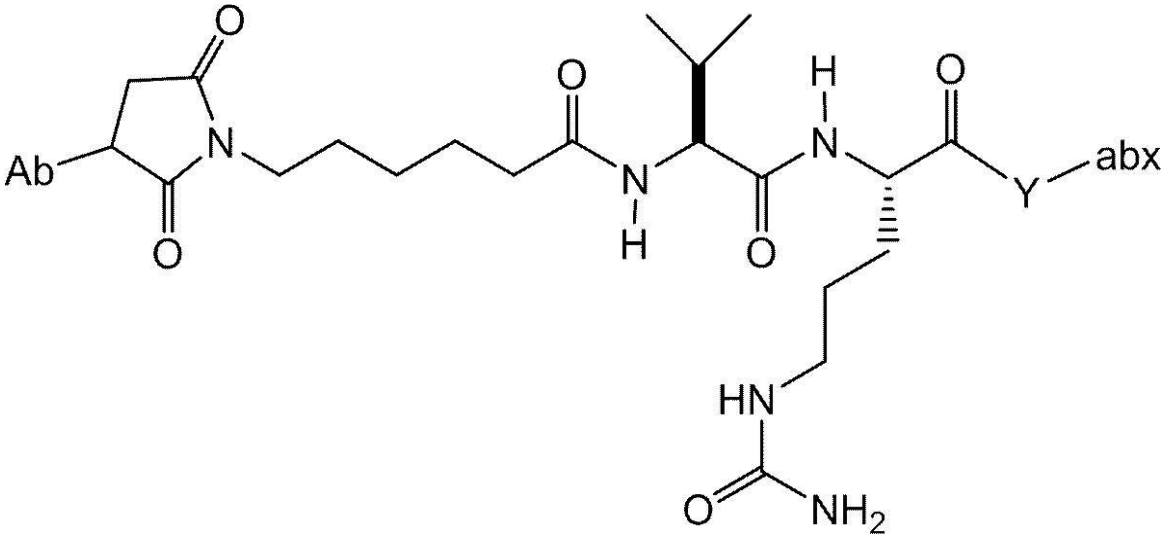
（式中、Ａｂ、Ｓｔｒ、Ｙ及びａｂｘは、本明細書で定義するとおりであり、ＡＡ１及びＡＡ２は、アミノ酸側鎖から独立して選択される）のものである。これらの実施態様の一部では、アミノ酸側鎖は、Ｈ、－CH_3、－CH_2（C_6H_5）、－$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、－$CH_2CH_2CH_2NHC$（NH）NH_2、－CHCH（CH_3）CH_3及び－$CH_2CH_2CH_2NHC$（O）NH_2から独立して選択される。これらの実施態様の一部では、抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：


Ab
Str
N
H
H
O
N
H
O
Y
abx
HN
O
NH2

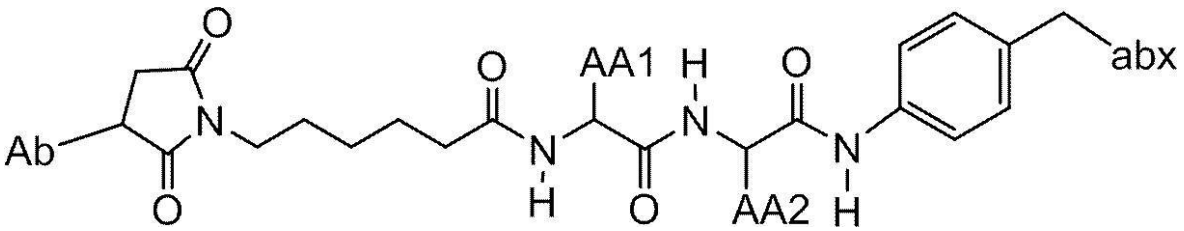
,


O
Ab
N
O
O
N
H
O
AA1
H
N
O
Y
abx
AA2

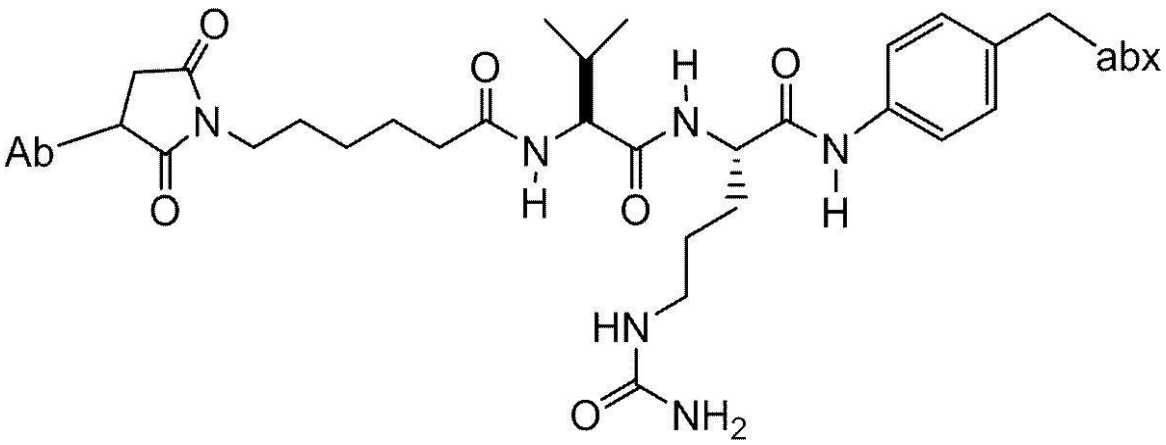
,


O
Ab
N
O
O
N
H
O
H
N
O
Y
abx
HN
O
NH2

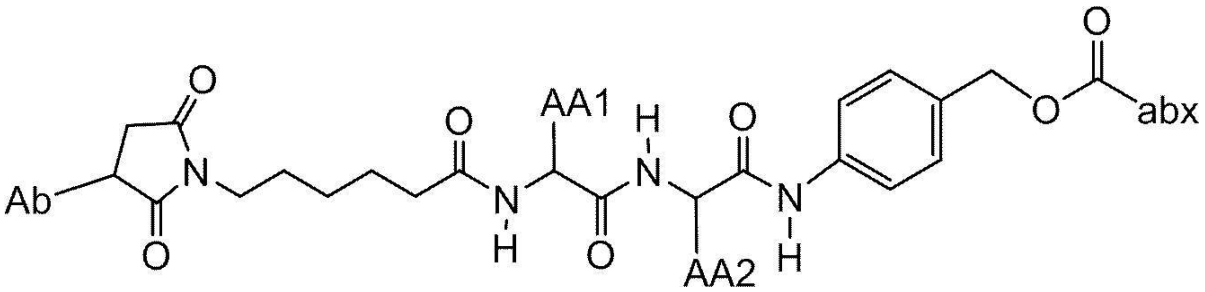
,


O
Ab
N
O
O
N
H
O
AA1
H
N
O
AA2
N
H
abx

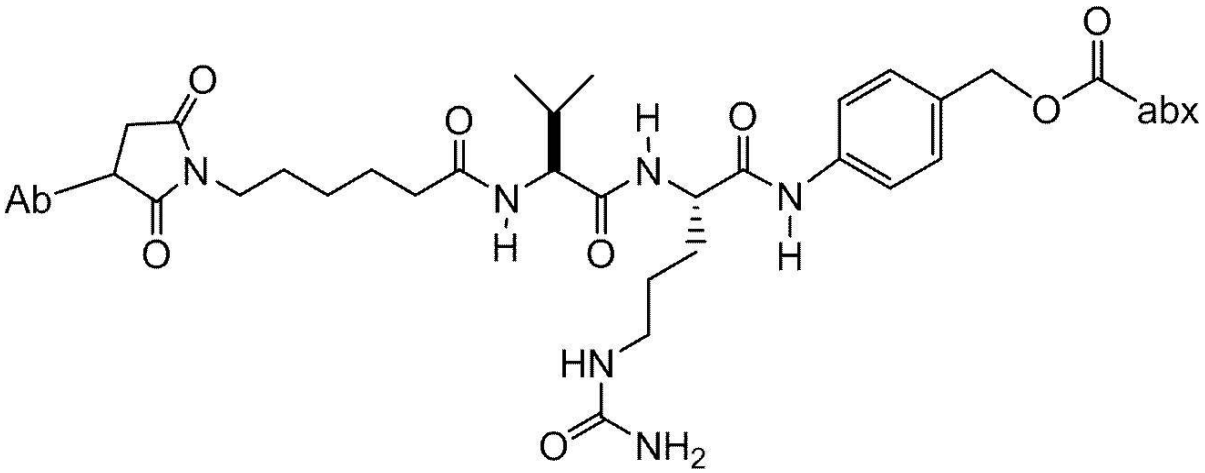
,



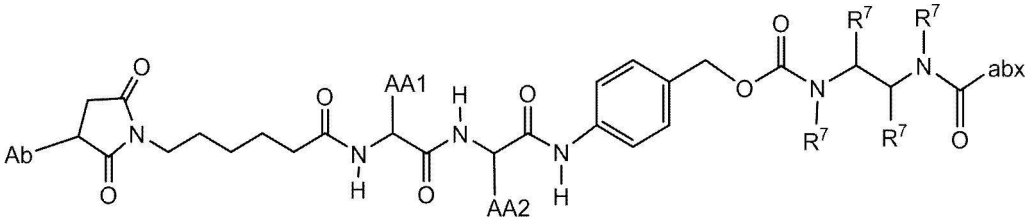
,



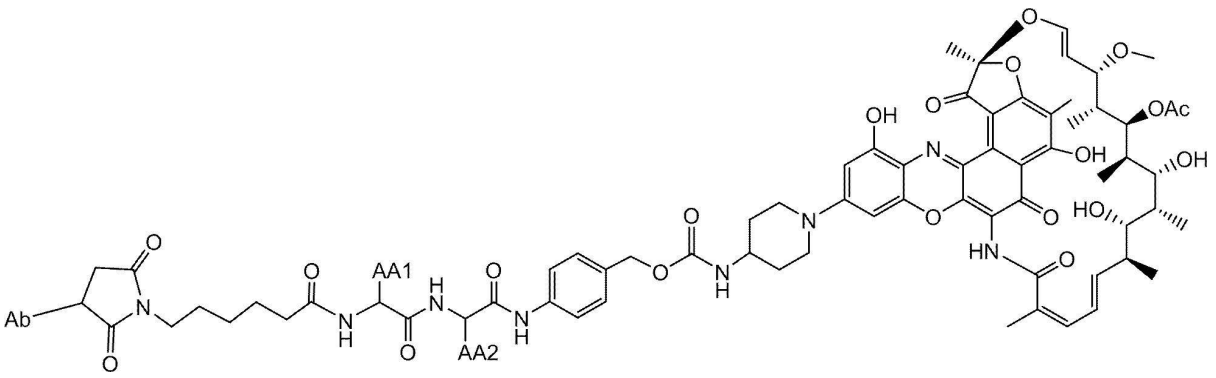
，又は



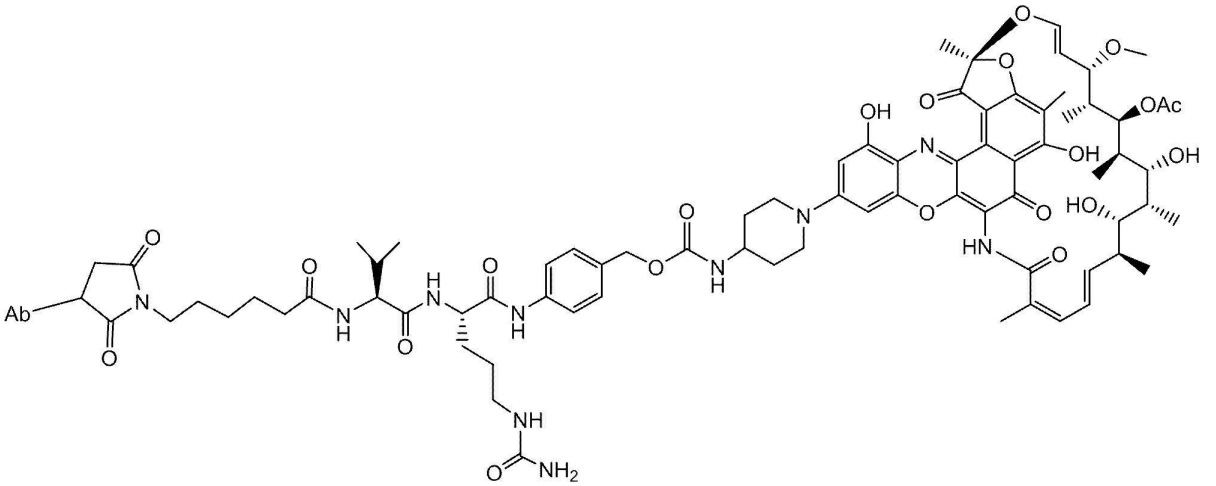
,
のものである。
【００５７】
　これらの実施態様の一部では、抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：



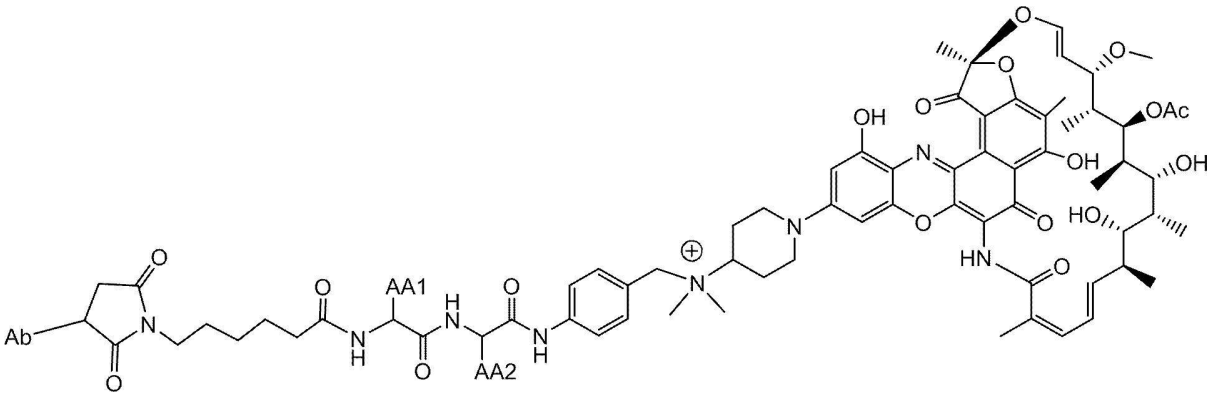
,
（式中、R^7は、Ｈ及びC_1－C_{12}アルキルから独立して選択される）のものである。
これらの実施態様の一部では、抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、式：


Ab
AA1
AA2
OAc
OH
HO
HN

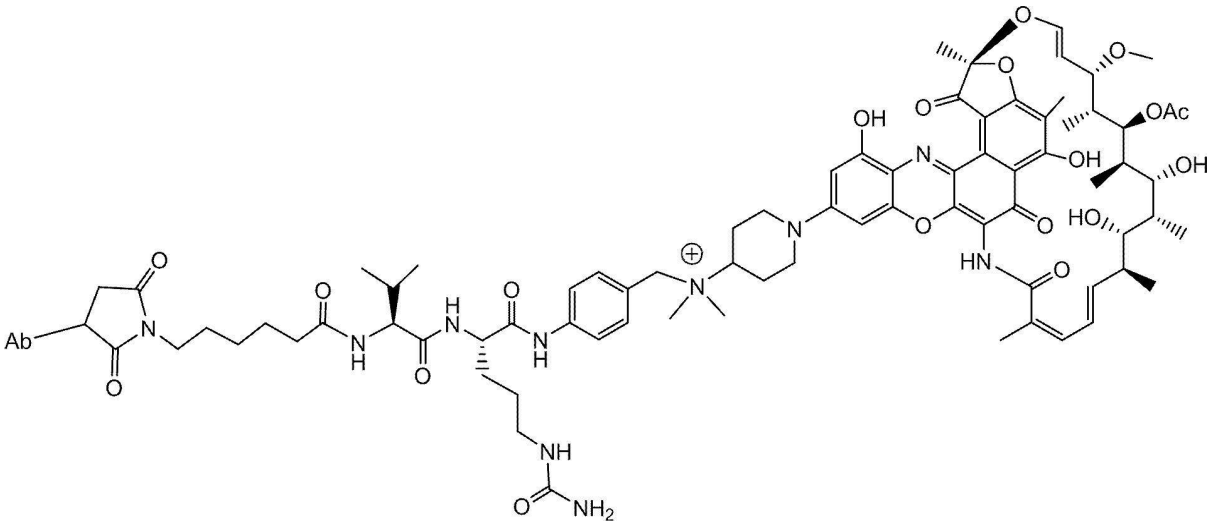
,


Ab
OAc
OH
HO
HN
NH
NH2

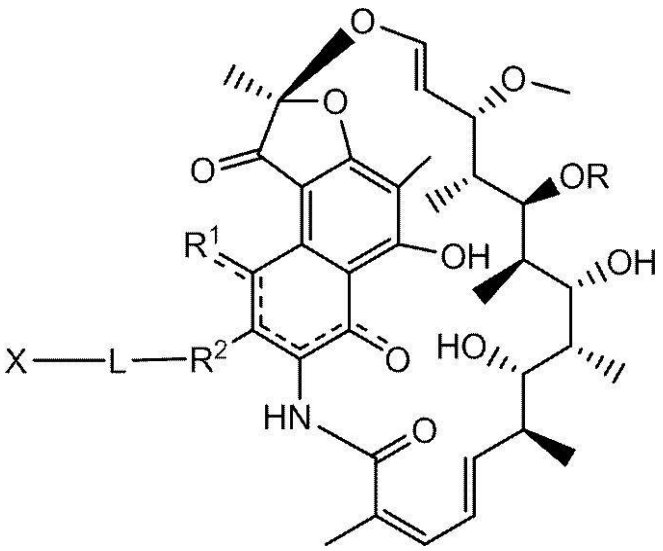
,


Ab
AA1
AA2
OAc
OH
HO
HN

，又は


Ab
OAc
OH
HO
HN
NH
NH2

.
のものである。
【００５８】
本発明の別の態様は、本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物を含む薬学的組成物である。
【００５９】
本発明の別の態様は、治療有効量の上記の実施態様の何れかの抗体－抗生物質コンジュゲート化合物を患者に投与することにより細菌感染症を治療する方法である。一実施態様では、患者は、ヒトである。一実施態様では、細菌感染症は、黄色ブドウ球菌感染症である。一部の実施態様では、患者は、黄色ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈ　ａｕｒｅｕｓ）感染症であると診断されている。一部の実施態様では、細菌感染症を治療することは、細菌負荷を低減することを含む。
【００６０】
本発明は、上記の実施態様の何れかの抗ＷＴＡ－抗生物質コンジュゲート化合物を投与することにより、宿主細胞を死滅させることなく黄色ブドウ球菌感染患者の宿主細胞において細胞内黄色ブドウ球菌を死滅させる方法をさらに提供する。先行する実施態様の何れかのＡＡＣと生残菌細菌を接触させることにより、生残菌細菌細胞（例えばｓｔａｐｈＡ）をインビボで死滅させる別の方法が提供される。
【００６１】
別の実施態様では、治療の方法は、第２の治療剤を投与することをさらに含む。さらなる実施態様では、第２の治療剤は、一般的な黄色ブドウ球菌又は特にＭＲＳＡに対する抗生物質を含む抗生物質である。
【００６２】
一実施態様では、本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物と組み合わせて投与される第２の抗生物質は、（ｉ）アミノ配糖体、（ｉｉ）ベータラクタム、（ｉｉｉ）マクロライド／環状ペプチド、（ｉｖ）テトラサイクリン、（ｖ）フルオロキノリン／フルオロキノロン、及び（ｖｉ）オキサゾリジノンの構造クラスから選択される。
【００６３】
一実施態様では、本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物と組み合わせて投与される第２の抗生物質は、クリンダマイシン、ノボビオシン、レタパムリン、ダプトマイシン、ＧＳＫ－２１４０９４４、ＣＧ－４００５４９、シタフロキサシン、テイコプラニン、トリクロサン、ナフチリドン、ラデゾリド、ドキソルビシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタビン、ダルババンシン及びアジスロマイシンから選択される。
【００６４】
本明細書の一部の実施態様では、対象における細菌負荷は、治療の後に検出不能レベルまで低減される。一実施態様では、患者の血液培養は、治療前の陽性血液培養物と比較して、治療後陰性である。本明細書の一部の実施態様では、対象における細菌耐性は、検出不能又は低い。本明細書の一部の実施態様では、対象は、メチシリン又はバンコマイシンでの治療に対して応答しない。
【００６５】
本発明の別の態様は、リファマイシン型抗生物質を抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体にコンジュゲートさせることを含む、本発明の抗体又は抗体－抗生物質コンジュゲート化合物を作製する方法である。
【００６６】
本発明の別の態様は、本発明の薬学的組成物と、使用説明書とを含む、細菌感染症を治療するためのキットである。
【００６７】
本発明の別の態様は、式ＩＩ：

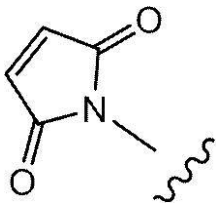


II

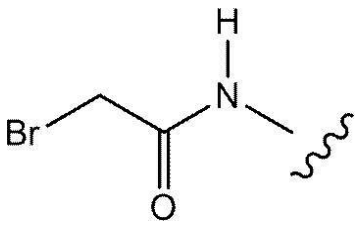
（式中、
破線は、任意選択の結合を示し、
Ｒは、Ｈ、C_1－C_{12}アルキル又はＣ（Ｏ）CH_3であり、
R^1は、ＯＨであり、
R^2は、ＣＨ＝Ｎ－（ヘテロシクリル）であり、ヘテロシクリルは、Ｃ（Ｏ）CH_3、C_1－C_{12}アルキル、C_1－C_{12}ヘテロアリール、C_2－C_{20}ヘテロシクリル、C_6－C_{20}アリール及びC_3－C_{12}カルボシクリルから独立して選択される一又は複数の基で置換されていてもよいか、
あるいはR^1及びR^2は、５又は６員の縮合ヘテロアリール又はヘテロシクリルを形成し、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環を形成していてもよく、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_1－C_{12}アルキル又はＯＨで置換されていてもよく、
Ｌは、R^2又はR^1及びR^2により形成される縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルと結合するペプチドリンカーであり、式：
－Ｓｔｒ－Ｐｅｐ－Ｙ－
（式中、Ｓｔｒは、ストレッチャー単位であり、Ｐｅｐは、２から１２アミノ酸残基のペプチドであり、Ｙは、スペーサー単位である）
を有し、
Ｘは、マレイミド、チオール、アミノ、臭化物、ブロモアセトアミド、ヨードアセトアミド、ｐ－トルエンスルホネート、ヨウ化物、ヒドロキシル、カルボキシル、ピリジルジスルフィド及びＮ－ヒドロキシスクシンイミドから選択される反応性官能基である
）を有するリンカー－抗生物質中間体である。

【００６８】

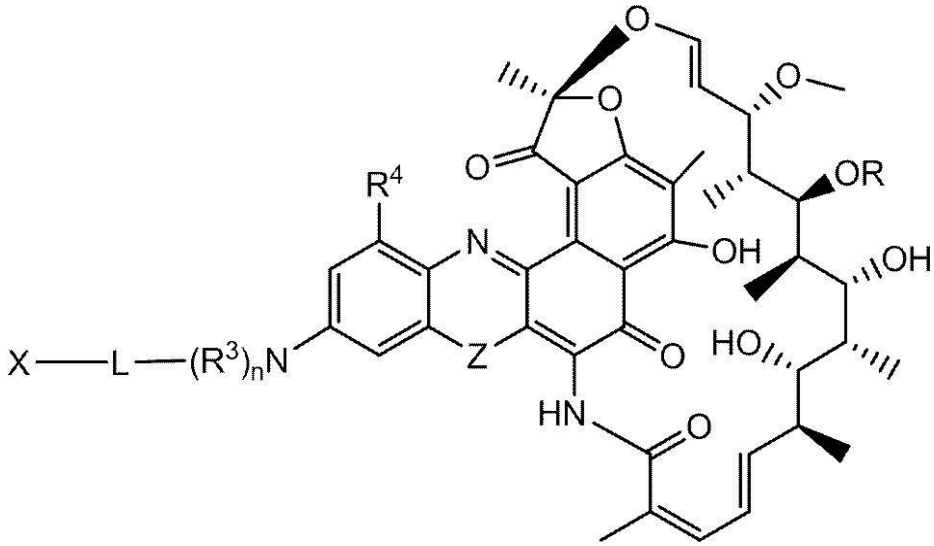
式ＩＩのリンカー－抗生物質中間体の一部の実施態様では、Ｘは、



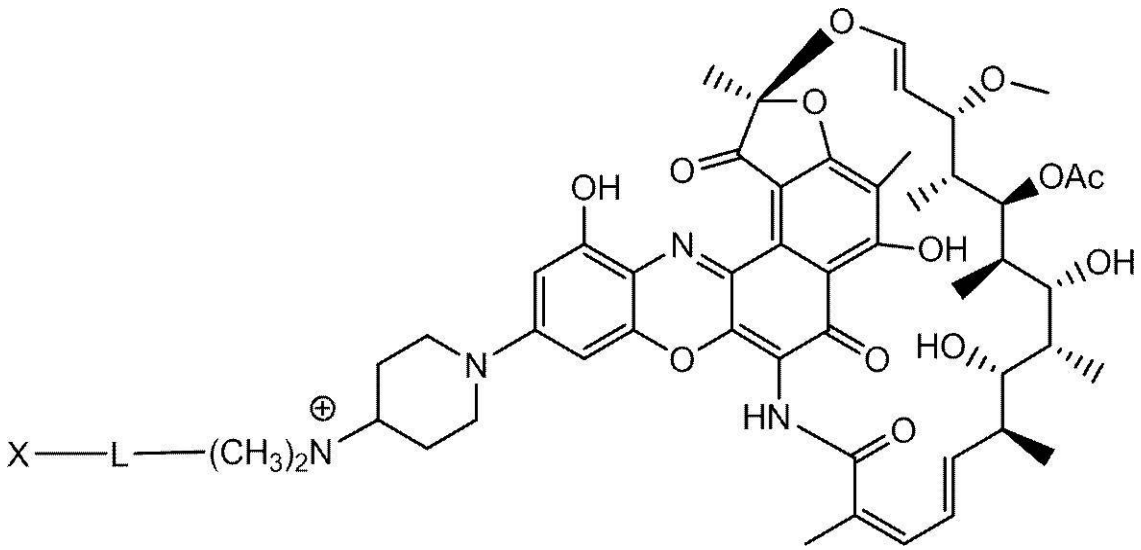
又は



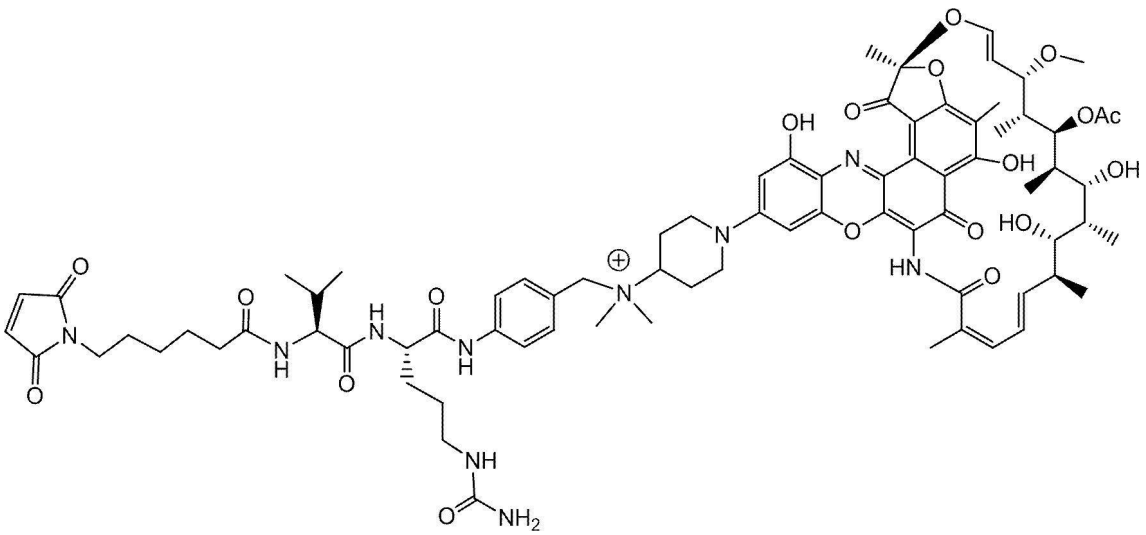
.
である。
【００６９】
一部の実施態様では、式ＩＩのリンカー－抗生物質中間体は、式：



（式中、
R^3は、Ｈ及びC_1－C_{12}アルキルから独立して選択され、
ｎは、１又は２であり、
R^4は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_1－C_{12}アルキル及びＯＨから選択され、
Ｚは、ＮＨ、Ｎ（C_1－C_{12}アルキル）、Ｏ及びＳから選択される）
を有する。
【００７０】
これらの実施態様の一部では、式ＩＩのリンカー－抗生物質中間体は、式：



又は



.

を有する。

【００７１】

本明細書で詳述する抗ＷＴＡ－抗生物質コンジュゲートを投与することを含む、宿主細胞を死滅させることなく黄色ブドウ球菌感染患者の宿主細胞において細胞内黄色ブドウ球菌を死滅させる方法も提供される。

【００７２】

本明細書に記載する様々な実施態様の１つ、一部又は全ての特性を組み合わせて、本発明の他の実施態様を形成してよいことが理解される。本発明のこれらの及び他の態様は、当業者に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【００７３】

【図１】バンコマイシン又はリファンピシンへの曝露が、ＭＲＳＡを徐々に死滅させることを示す。バンコマイシンは、２μｇ／ｍＬ（白抜きの四角）及び２０μｇ／ｍＬ（塗りつぶした四角）で試験した。リファンピシンは、０．０２μｇ／ｍＬ（白抜きの三角）及び０．２μｇ／ｍＬ（塗りつぶした三角）で試験した。

【図２】感染腹膜細胞が、バンコマイシンの存在下で骨芽細胞に感染を移すことができたことを示す。

【図３】細胞膜を安定化し、結合部位を提供する細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）、リポタイコ酸（ＬＴＡ）及びペプチドグリカン（ＰＧＮ）の鞘の戯画図を用いて、黄色ブドウ球菌のようなグラム陽性細菌の細胞壁を示す。

【図４】「定義」の下で詳細に記載する、細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）の化学構造及びグリコシル修飾を示す。

【図５】抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）についての薬物活性化の可能性のある機序を示す。活性抗生物質（Ａｂｘ）は、哺乳動物細胞内部へのＡＡＣの内部移行の後に放出される。

【図６】実施例２１に記載するように、ＵＳＡ３００又はＷｏｏｄ４６株の黄色ブドウ球菌株からの細胞壁調製物とのポジティブなＥＬＩＳＡ結合を示すｍＡｂのライブラリーの一次スクリーニングからのＡｂの特性についてまとめる。ＷＴＡと結合するＡｂのうち、４つはＷＴＡアルファに特異的であり、１３個はＷＴＡベータと特異的に結合する。

【図７Ａ】図７Ａは、ＡＡＣが細胞内ＭＲＳＡを死滅させることを証明するインビトロマクロファージアッセイを示す。

【図７Ｂ】図７Ｂは、ネイキッド非コンジュゲート抗ＷＴＡ抗体Ｓ４４９７と比較した、マクロファージ、骨芽細胞（ＭＧ６３）、気道上皮細胞（Ａ５４９）及びヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）における、５０μｇ／ｍＬのチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２を用いるＭＲＳＡ（ＵＳＡ３００株）の細胞内死滅を示す。破線

は、アッセイの検出限界を示す。
【図７Ｃ】リンカー－抗生物質中間体ＬＡ－５１及びＬＡ－５４（表２）を用いて作製したＡＡＣの比較を示す。ＭＲＳＡは、１０μｇ／ｍＬから０．００３μｇ／ｍＬの範囲の様々な濃度でＳ４４９７抗体単独又はＡＡＣ：ＡＡＣ－１０２若しくはＡＡＣ－１０５（表３）を用いてオプソニン化した。
【図７Ｄ】図７Ｄは、ＡＡＣが、マクロファージに害を与えることなく細胞内細菌を死滅させることを示す。
【図７Ｅ】図７Ｅは、上記のマクロファージ細胞溶解からのマクロファージ内部からの生存ＵＳＡ３００の回収を示す。生存黄色ブドウ球菌は、ネイキッド抗体で処理したコントロールと比較して、Ｓ－４４９７－ＡＡＣオプソニン化細菌に感染したマクロファージからほとんど（１０，０００倍少ない）回収されなかった。
【図８Ａ】図８Ａは、Ａ／Ｊマウスにおける腹腔内感染モデルでのチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２　ＡＡＣのインビボ有効性を示す。マウスを腹腔内注射によりＭＲＳＡに感染させ、腹腔内注射により５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体単独、又は５０ｍｇ／Ｋｇの１０２　ＡＡＣ（ＨＣ－Ａ１１４Ｃ　カバット＝ＨＣ－Ａ１１８Ｃ　ＥＵ）で処置した。マウスを感染の２日後に屠殺し、全細菌負荷を、腹膜上清（細胞外細菌）、腹膜細胞（細胞内細菌）又は腎臓において評価した。
【図８Ｂ】図８Ｂは、Ａ／Ｊマウスにおける静脈内インビボ感染モデルを示す。マウスを静脈内注射によりＭＲＳＡに感染させ、５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体、５０ｍｇ／Ｋｇのチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２　ＡＡＣ又は５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体＋０．５ｍｇ／Ｋｇの遊離リファマイシンの単純混合物で処置した。灰色の破線は、各器官についての検出限界を示す。
【図９Ａ】図９Ａは、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣの滴定による静脈内感染モデルにおけるチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２　ＡＡＣの有効性を示す。
【図９Ｂ】図９Ｂは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５　ＡＡＣが、滴定により静脈内感染モデルにおいてチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２　ＡＡＣよりも効力が高いことを示す。Ｓ４４９７抗体、１０２　ＡＡＣ又はチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　１１２　ＡＡＣでの処置は、感染の３０分後に記載する用量で行った。マウスを感染の４日後に屠殺し、マウスあたりの生存細菌の総数（プールした２つの腎臓）を、プレーティングにより決定した。
【図９Ｃ】チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５　ＡＡＣが、静脈内感染モデルにおいて、Ｓ４４９７抗体又はジメチルｐｉｐＢＯＲ　７抗生物質単独よりも効力が高いことを示す。ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスを、２×１０^{7}ＣＦＵのＭＲＳＡに静脈内注射により感染させた。感染の１日後に、マウスを５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体、５０ｍｇ／ＫｇのＡＡＣ　１０５又は０．５ｍｇ／ＫｇのジメチルーｐｉｐＢＯＲ　７（５０ｍｇ／ＫｇのＡＡＣに含まれる抗生物質の用量に等しい）で処置した。マウスを感染の４日後に屠殺し、マウスあたりの生存細菌の総数（プールした２つの腎臓）を、プレーティングにより決定した。
【図１０Ａ】図１０Ａは、ヒト血清中の抗黄色ブドウ球菌抗体の普及率を示す。黄色ブドウ球菌感染患者又は正常コントロールは、抗ＷＴＡ　Ｓ４４９７と同じ特異性で、高い量のＷＴＡ特異的血清抗体を含む。様々な野生型（ＷＴ）血清試料の、Ｓ４４９７抗原を発現するＭＲＳＡとの結合は、Ｓ４４９７抗体が認識する糖修飾を欠くＭＲＳＡ株ＴａｒＭ／ＴａｒＳ　ＤＫＯ（二重ノックアウト）ミュータントとの結合と比較して調べた。
【図１０Ｂ】図１０Ｂは、ＡＡＣが、ＭＲＳＡのＵＳＡ３００株を用いるインビトロマクロファージアッセイにおいて、生理的レベルのヒトＩｇＧ（１０ｍｇ／ｍＬ）の存在下で有効であることを示す。チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５は、１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの存在下で有効である。ＭＲＳＡのＵＳＡ３００株は、ＡＡＣ単独、又は１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧ中で希釈した

ＡＡＣでオプソニン化した。生存細胞内細菌の総数は、感染の２日後に評価した。

【図１０Ｃ】ＡＡＣが生理的レベルのヒトＩｇＧの存在下で有効であることを証明するインビボ感染モデルを示す。混合データは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５又は１１２　ＡＡＣの２つの別々の調製物を用いる３回の独立した実験からである。ＡＡＣで処置したマウスは、４－ｌｏｇより大きい細菌負荷の低減を有した（スチューデントのｔ検定ｐ＝０．０００５）。

【図１１Ａ】正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスにおいて、ＡＡＣが、現在の標準治療（ＳＯＣ）抗生物質であるバンコマイシンよりも有効であることを証明するインビボ感染モデルを示す。マウスをＳ４４９７抗体（５０ｍｇ／Ｋｇ）、バンコマイシン（１００ｍｇ／Ｋｇ）、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ）、又はＭＲＳＡを認識しないアイソタイプコントロール抗体で作製したＡＡＣであるチオ－ｈｕ－抗ｇＤ　５Ｂ５－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１１０　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ）で処置した。

【図１１Ｂ】ＦＡＣＳにより決定した、インビボ感染モデルにおける腎臓から単離したＵＳＡ３００株との抗黄色ブドウ球菌抗体の相対的結合を示す。Ｓ４４９７抗体は、黄色ブドウ球菌の細胞壁上のベーターアノマー結合を介して細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）と結合するＮ－アセチルグルコサミン修飾を認識する。Ｓ７５７８抗体は、アルファ－アノマー結合を介してＷＴＡとつながれている同様のＮ－アセチルグルコサミン修飾と結合する。ｒＦ１抗体は、ＳＤＲ反復含有細胞壁係留タンパク質のファミリーで見出される糖修飾を認識するポジティブコントロール抗ＭＲＳＡ抗体である。ｇＤ抗体は、黄色ブドウ球菌を認識しないネガティブコントロールヒトIgG_1である。

【図１１Ｃ】正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスにおいて、図１１Ａと同じレジメンに従って、ＡＡＣであるチオ－Ｓ６０７８－ＨＣ　Ａ１１４Ｃ－ＬＣＷＴ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１２９が、ネイキッド抗ＷＴＡ抗体Ｓ４４９７よりも有効であることを証明するインビボ感染モデルを示す。マウスをＳ４４９７抗体（５０ｍｇ／Ｋｇ）又はチオ－Ｓ６０７８－ＨＣ　Ａ１１４Ｃ－ＬＣＷＴ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１２９　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ）で処置した。

【図１２】リンカーをカテプシンＢにより切断しない限り、ＡＡＣが黄色ブドウ球菌に対して毒性でないことを証明する成長阻害アッセイを示す。概略のカテプシン放出アッセイ（実施例２０）を左に示す。ＡＡＣをカテプシンＢで処理して、遊離の抗生物質を放出させる。インタクトＡＡＣ対カテプシンＢ処理ＡＡＣにおける抗生物質活性の総量を、得られる反応物の系列希釈を調製し、黄色ブドウ球菌の成長を阻害できるＡＡＣの最小限の用量を決定することにより決定する。右上のプロットは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２についてのカテプシン放出アッセイを示し、右下のプロットは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５についてのカテプシン放出アッセイを示す。

【図１３Ａ】４つのヒト抗ＷＴＡアルファ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号２５、２７、２９及び３１）の軽鎖可変領域（ＶＬ）のアミノ酸配列アラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。

【図１３Ｂ】図１３Ａの４つのヒト抗ＷＴＡアルファ抗体の重鎖可変領域（ＶＨ）のアミノ酸配列アラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲ　Ｈ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す（記載する順にそれぞれ配列番号２６、２８、３０及び３２）。

【図１４】１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体のＬ及びＨ鎖のＣＤＲ配列（配列番号３３－１１０）を示す。

【図１５Ａ－１】抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４（記載する順にそれぞれ配列番号１１３、１１３、１１５、１１３、１１５、１１３、１１５及び１１５）の完全長Ｌ鎖（軽鎖）のアラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。箱は、カバット及びＣｈｏｔｈｉａに従う接触残基及びＣＤＲ残基を示す。操作されたＣｙｓを含有するＬ鎖変異体は、

定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第２０５番）により示す。変異体の命名、例えばｖ２ＬＣ－Ｃｙｓは、Ｌ鎖中に操作されたＣｙｓを含む変異体２を意味する。ＨＣＬＣ－Ｃｙｓは、Ｈ及びＬ鎖のそれぞれが操作されたＣｙｓを含むことを意味する。変異体２、３及び４は、図１５Ｂに示すように、Ｈ鎖の初めに変更を有する。

【図１５Ａ－２】抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４（記載する順にそれぞれ配列番号１１３、１１３、１１５、１１３、１１５、１１３、１１５及び１１５）の完全長Ｌ鎖（軽鎖）のアラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。箱は、カバット及びＣｈｏｔｈｉａに従う接触残基及びＣＤＲ残基を示す。操作されたＣｙｓを含有するＬ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第２０５番）により示す。変異体の命名、例えばｖ２ＬＣ－Ｃｙｓは、Ｌ鎖中に操作されたＣｙｓを含む変異体２を意味する。ＨＣＬＣ－Ｃｙｓは、Ｈ及びＬ鎖のそれぞれが操作されたＣｙｓを含むことを意味する。変異体２、３及び４は、図１５Ｂに示すように、Ｈ鎖の初めに変更を有する。

【図１５Ｂ－１】抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びＨ鎖の初めに変更を有するその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１３９－１４４及び１４３）の完全長Ｈ鎖（重鎖）のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１５Ｂ－２】抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びＨ鎖の初めに変更を有するその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１３９－１４４及び１４３）の完全長Ｈ鎖（重鎖）のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１５Ｂ－３】抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びＨ鎖の初めに変更を有するその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１３９－１４４及び１４３）の完全長Ｈ鎖（重鎖）のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１５Ｂ－４】抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びＨ鎖の初めに変更を有するその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１３９－１４４及び１４３）の完全長Ｈ鎖（重鎖）のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１６Ａ－１】抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びＣｙｓ操作Ｌ鎖（記載する順にそれぞれ配列番号１２１、１２３、１４５及び１４５）の完全長Ｌ鎖のアラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。箱は、カバット及びＣｈｏｔｈｉａに従う接触残基及びＣＤＲ残基を示す。操作されたＣｙｓを含むＬ鎖変異体は、定常領域の端の近くの点線の箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第２０５番）により示す。

【図１６Ａ－２】抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びＣｙｓ操作Ｌ鎖（記載する順にそれぞれ配列番号１２１、１２３、１４５及び１４５）の完全長Ｌ鎖のアラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。箱は、カバット及びＣｈｏｔｈｉａに従う接触残基及びＣＤＲ残基を示す。操作されたＣｙｓを含むＬ鎖変異体は、定常領域の端の近くの点線の箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第２０５番）により示す。

【図１６Ｂ－１】抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びＣＤＲ　Ｈ３の９６位にてＤがＥに改変され、操作されたＣｙｓを有するか又は有さないそのｖ８変異体（記載する順にそれぞれ配列番号１４６－１４７、１５７及び１４７）の完全長Ｈ鎖のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１６Ｂ－２】抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びＣＤＲ　Ｈ３の９６位にてＤがＥに改変され、操作されたＣｙｓを有するか又は有さないそのｖ８変異体（記載する順にそれぞれ配列番号１４６－１４７、１５７及び１４７）の完全長Ｈ鎖のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１６Ｂ－３】抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びＣＤＲ　Ｈ３の９６位にてＤがＥに改変され、操作されたＣｙｓを有するか又は有さないそのｖ８変異体（記載する順にそれぞれ配列番号１４６－１４７、１５７及び１４７）の完全長Ｈ鎖のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。

【図１７Ａ－１】１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１３、１５８－１６７、１２１及び１６８）の完全長軽鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＬ）は、カバットアミノ酸１位から１０７位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。

【図１７Ａ－２】１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１３、１５８－１６７、１２１及び１６８）の完全長軽鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＬ）は、カバットアミノ酸１位から１０７位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。

【図１７Ａ－３】１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１３、１５８－１６７、１２１及び１６８）の完全長軽鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＬ）は、カバットアミノ酸１位から１０７位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＬ１、Ｌ２及びＬ３に下線を付す。

【図１７Ｂ－１】図１７Ａ－１、１７Ａ－２、１７Ａ－３の１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１６９－１７６、１３３－１３４、１３８及び１２７）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＨ）は、カバットアミノ酸１位－１１３位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＨ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す。アスタリスクで印をつけたＨ鎖Ｅｕ１１８位は、薬物コンジュゲーションのためにＣｙｓに変更できる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図１７Ｂ－２】図１７Ａ－１、１７Ａ－２、１７Ａ－３の１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１６９－１７６、１３３－１３４、１３８及び１２７）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＨ）は、カバットアミノ酸１位－１１３位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＨ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す。アスタリスクで印をつけたＨ鎖Ｅｕ１１８位は、薬物コンジュゲーションのためにＣｙｓに変更できる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図１７Ｂ－３】図１７Ａ－１、１７Ａ－２、１７Ａ－３の１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１６９－１７６、１３３－１３４、１３８及び１２７）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＨ）は、カバットアミノ酸１位－１１３位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＨ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す。アスタリスクで印をつけたＨ鎖Ｅｕ１１８位は、薬物コンジュゲーションのためにＣｙｓに変更できる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図１７Ｂ－４】図１７Ａ－１、１７Ａ－２、１７Ａ－３の１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１６９－１７６、１３３－１３４、１３８及び１２７）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＨ）は、カバットアミノ酸１位－１１３位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲ

Ｈ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す。アスタリスクで印をつけたＨ鎖Ｅｕ１１８位は、薬物コンジュゲーションのためにＣｙｓに変更できる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図１７Ｂ－５】図１７Ａ－１、１７Ａ－２、１７Ａ－３の１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１６９－１７６、１３３－１３４、１３８及び１２７）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＨ）は、カバットアミノ酸１位－１１３位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＨ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す。アスタリスクで印をつけたＨ鎖Ｅｕ１１８位は、薬物コンジュゲーションのためにＣｙｓに変更できる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図１７Ｂ－６】図１７Ａ－１、１７Ａ－２、１７Ａ－３の１３個のヒト抗ＷＴＡベータ抗体（記載する順にそれぞれ配列番号１１４、１６９－１７６、１３３－１３４、１３８及び１２７）の完全長重鎖のアミノ酸配列アラインメントを示す。可変領域（ＶＨ）は、カバットアミノ酸１位－１１３位にわたる。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲＨ１、Ｈ２及びＨ３に下線を付す。アスタリスクで印をつけたＨ鎖Ｅｕ１１８位は、薬物コンジュゲーションのためにＣｙｓに変更できる。黒色で強調した残基は、脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避するために、抗原結合に影響しない他の残基で置き換えることができる。

【図１８Ａ】図１８Ａは、ＥＬＩＳＡにより分析される、黄色ブドウ球菌細胞壁とのＡｂ４４９７ミュータントの結合を示す。

【図１８Ｂ】図１８Ｂは、強調した位置のアミノ酸におけるＡｂ４４９７とそのミュータント（記載する順にそれぞれ配列番号１７７、１７７、１７７－１７８、１７８－１７９、１７９－１８０、１８０及び１８０）との比較、及びＥＬＩＳＡにより試験されるそれらの相対的抗原結合強度を示す。

【図１９】実施例２３に記載する、ＵＳＡ３００のプロテインＡ欠損株（ＵＳＡ３００－ＳＰＡ）とのＡｂ６０７８ＷＴ及びミュータントの結合のＦＡＣＳ解析の結果を示す。ミュータントは、黄色ブドウ球菌との結合が損なわれなかったことを示した。

【図２０】５０ｍｇ／ｋｇの遊離抗体での前処置が静脈内感染モデルにおいて有効でないことを示す。Ｂａｌｂ／ｃマウスに、単回用量のビヒクルコントロール（ＰＢＳ）又は５０ｍｇ／Ｋｇの抗体を静脈内注射により与えた３０分後に、２×１０^{7}ＣＦＵのＵＳＡ３００に感染させた。処置群は、黄色ブドウ球菌と結合しないアイソタイプコントロール抗体（ｇＤ）、細胞壁タイコ酸のベータ修飾に対する抗体（４４９７）、又は細胞壁タイコ酸のアルファ修飾に対する抗体（７５７８）を含んだ。コントロールマウスに、１１０ｍｇ／Ｋｇのバンコマイシンでの処置を腹腔内注射により（Ｖａｎｃｏ）１日２回与えた。

【図２１】正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスを用いる静脈内感染モデルにおいて、細胞壁タイコ酸のベータ修飾又は細胞壁タイコ酸のアルファ修飾に対するＡＡＣが有効であることを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成し、２×１０^{7}ＣＦＵのＵＳＡ３００に静脈内注射により感染させた。処置は、バッファーのみコントロール（ＰＢＳ）、６０ｍｇ／Ｋｇのベーター－ＷＴＡ　ＡＡＣ（１３６　ＡＡＣ）又は６０ｍｇ／Ｋｇのアルファ－ＷＴＡ　ＡＡＣ（１５５　ＡＡＣ）を用いて感染の１日後に開始した。

【図２２】正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスを用いる静脈内感染モデルにおいて、細胞壁タイコ酸のベータ修飾又は細胞壁タイコ酸のアルファ修飾に対するＡＡＣが有効であることを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成し、２×１０^{7}ＣＦＵのＵＳＡ３００に静脈内注射により感染させた。処置は、バッファーのみコントロール（ＰＢＳ）、６０ｍｇ／Ｋｇのベーター－ＷＴＡ　ＡＡＣ（

１３６　ＡＡＣ）又は６０ｍｇ／Ｋｇのアルファ－ＷＴＡ　ＡＡＣ（１５５　ＡＡＣ）を用いて感染の１日後に開始した。

【図２３】２－ニトロベンゼン－１，３－ジオール１からのリンカー－抗生物質中間体５１の合成を示す。

【図２４】ＴＢＳ－保護ベンゾキサジノリファマイシン４からのリンカー－抗生物質中間体であるＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　５４の合成を示す。

【図２５】（５－フルオロ－２－ニトロ－１，３－フェニレン）ビス（オキシ）ビス（メチレン）ジベンゼン９からのジメチルｐｉｐＢＯＲ　７の合成を示す。

【図２６】ＲＥＰＬｉプロテアーゼ活性スクリーニングからのＰ１、Ｐ２及びＰ３中の最も存在量が多い残基を含む、切断検証のためのＦＲＥＴペプチド基質であるｍａｌ－Ｋ（ＴＡＭＲＡ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）の構造を示す。ＲＥＰＬｉ　ＦＲＥＴペプチド構造からのフランキングＧｌｙ残基を保存した。Ｎ末端上のチオール反応性マレイミド基により、反応性システインを用いて抗体へのコンジュゲーションが可能になった。ＦＲＥＴペプチドの切断の際に、消光効果が失われ、蛍光の増加が観察される。

【図２７】目的のプロテアーゼを含む活性画分を同定するために用いるツール化合物であるチオＦＡＢ　Ｓ４４９７－ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－（ｐｉｐＢＯＲ）（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）の構造を示す。Ｍａｌ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－ＤＮＡ３１（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）をチオＦＡＢ　４４９７にコンジュゲートした。チオＦＡＢは、１つの反応性システインを含む。黄色ブドウ球菌プロテアーゼは、Ａｌａに対してＣ末端側のリンカーを切断して、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－（ｐｉｐＢＯＲ）を放出した。

【図２８】Ｍａｌ－Ｋ（ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）ＡＡＣが、Ｗｏｏｄ４６（図２８）及びＵＳＡ３００（図２９）の両方において、黄色ブドウ球菌と結合する抗体（チオ－Ｓ４４９７）にコンジュゲートした場合に切断され、黄色ブドウ球菌と結合しない抗体（チオ－トラスツズマブ）にコンジュゲートした場合に切断されないことを示す。蛍光強度は、Ｗｏｏｄ４６及びＵＳＡ３００　ＭＲＳＡの対数期培養物とインキュベートしたチオＭＡＢ　４４９７　ｍａｌ－Ｋ（ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）を経時的に測定した。図２６のｍａｌ－Ｋ（ＴＡＭＲＡ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）から作製したチオＭＡＢ　４４９７　ＦＲＥＴペプチドコンジュゲートは、両方の株における蛍光の増加を示し、このことは、実験的リンカーが黄色ブドウ球菌プロテアーゼにより切断され、このプロテアーゼが臨床的意義があるＭＲＳＡ株であるＵＳＡ３００に存在することを示す（図２９）。細胞密度は切断速度に影響し、切断は、より高い細胞密度（10^8細胞／ｍｌ）の培養物においてより早期に生じる。アイソタイプコントロールコンジュゲート（チオ－トラスツズマブ）は、何れの条件でも蛍光の増加を示さなかった。

【図２９】Ｍａｌ－Ｋ（ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）ＡＡＣが、Ｗｏｏｄ４６（図２８）及びＵＳＡ３００（図２９）の両方において、黄色ブドウ球菌と結合する抗体（チオ－Ｓ４４９７）にコンジュゲートした場合に切断され、黄色ブドウ球菌と結合しない抗体（チオ－トラスツズマブ）にコンジュゲートした場合に切断されないことを示す。蛍光強度は、Ｗｏｏｄ４６及びＵＳＡ３００　ＭＲＳＡの対数期培養物とインキュベートしたチオＭＡＢ　４４９７　ｍａｌ－Ｋ（ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）を経時的に測定した。図２６のｍａｌ－Ｋ（ＴＡＭＲＡ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５）から作製したチオＭＡＢ　４４９７　ＦＲＥＴペプチドコンジュゲートは、両方の株における蛍光の増加を示し、このことは、実験的リンカーが黄色ブドウ球菌プロテアーゼにより切断され、このプロテアーゼが臨床的意義があるＭＲＳＡ株であるＵＳＡ３００に存在することを示す（図２９）。細胞密度は切断速度に影響し、切断は、より高い細胞密度（10^8細胞／ｍｌ）の培養物においてより初期に生じる。アイソタイプコントロールコンジュゲート（チオ－トラスツズマブ）は、何れの条件でも蛍光の増加を示さなかった。

【図３０】ＡＡＣにおけるスタホパインＢ切断のための２つの最適化リンカーを示す。リンカーは、Ｐ４及びＰ１’について好ましい残基を含むスタホパインＢによる切断のために最適化した。リンカーは、ＲＥＰＬｉスクリーニングからのデータを用いて設計した。ＱＳＹ７を各リンカーのＣ末端に付加して、抗生物質代替物として作用させた。

【図３１】スタホパインにより切断可能なＡＡＣが細胞内細菌を死滅させることができることを証明するマクロファージアッセイからの結果を示す。黄色ブドウ球菌のＵＳＡ３００株を、様々な用量（１００μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ又は０．１ｕｇ／ｍＬ）のＳ４４９７抗体単独、チオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ＷＴ（ｖ８），ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ－１９２又はチオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ｖ１－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－１９３とインキュベートして、細菌とのＡＡＣの結合を可能にした（図３１）。１時間のインキュベーションの後に、オプソニン化した細菌をマウスのマクロファージに供給し、３７℃にて２時間インキュベートして、食作用を可能にした。食作用が完了した後に、５０ｕｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地に感染ミックスを置き換えて、何れの残存細胞外細菌も死滅させ、生存細胞内細菌の総数を、マクロファージ溶解物の系列希釈をトリプシン大豆寒天プレートにプレーティングすることにより２日後に決定した。スタホパインにより切断可能なＡＡＣは、カテプシンＢにより切断可能なＡＡＣと比較して同様の力価で細胞内ＵＳＡ３００を死滅させることができた。灰色の破線は、アッセイの検出限界（１０ＣＦＵ／ウェル）を示す。

【図３２】スタホパインにより切断可能なＡＡＣが細胞内細菌を死滅させることができることを証明するマクロファージアッセイからの結果を示す。ＡＡＣは、抗体の抗原特異的結合により、抗生物質の死滅を黄色ブドウ球菌に向ける。ＩｇＧ抗体のＦｃ領域と結合する分子であるプロテインＡを発現しないため、黄色ブドウ球菌のＷｏｏｄ４６株をこの実験のために選択した。Ｗｏｏｄ４６株の黄色ブドウ球菌を、１０μｇ／ｍＬ又は０．５μｇ／ｍＬのＳ４４９７抗体、カテプシンＢにより切断可能なリンカーを含むアイソタイプコントロール－ＡＡＣであるチオ－トラスツズマブＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ－１０１、チオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ＷＴ（ｖ８），ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）　ＡＡＣ－１９２、スタホパインにより切断可能なリンカーを含むアイソタイプコントロール－ＡＡＣであるチオ－トラスツズマブＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）、又はチオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ｖ１－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－１９３と１時間インキュベートして、細菌とのＡＡＣの結合を可能にした。ＡＡＣの非特異的結合を制限するために、オプソニン化した細菌を遠心分離し、１回洗浄し、バッファーに再懸濁した後に、マウスのマクロファージに供給した。食作用が完了した後に、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地で感染ミックスを置き換えて、何れの残存細胞外細菌も死滅させ、生存細胞内細菌の総数を、トリプシン大豆寒天プレートにマクロファージ溶解物の系列希釈をプレーティングすることにより２日後に決定した。スタホパインにより切断可能なリンカーを含む４４９７－ＡＡＣは、全ての検出可能な細胞内細菌を死滅させることができたが、アイソタイプコントロールＡＡＣは、活性を示さなかった。

【図３３】マウスの静脈内感染モデルにおいてインビボでスタホパインＡＡＣが活性であることを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスを４４９７抗体（５０ｍｇ／ｋｇ）、スタホパインにより切断可能なリンカーを有するＡＡＣ－２１５（５０ｍｇ／ｋｇ）又はアイソタイプコントロールであるスタホパインにより切断可能なリンカーを含む抗ｇＤ　ＡＡＣ（５０ｍｇ／ｋｇ）で処置した。マウスに単回用量のＡＡＣ－２１５を感染後１日目に静脈内注射により与えた。２つの腎臓（図３３）又は心臓（図３４）における生存細菌の総数を、プレーティングにより決定した。

【図３４】マウスの静脈内感染モデルにおいてインビボでスタホパインＡＡＣが活性であることを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスを４４９７抗体（５０ｍｇ／ｋｇ）、スタホパインにより切断可能なリンカーを有するＡＡＣ－２１５（５０ｍｇ／ｋｇ）又はアイソタイプコントロールであるスタホパインにより切断可能なリンカーを含む抗ｇＤ　ＡＡＣ（５０ｍｇ／ｋｇ）で処置した。マウスに単回用量のＡＡＣ－２１５を感染後１日目に静脈内注射により与えた。２つの腎臓（図３３）又は心臓（図３４）における生存細菌の総数を、プレーティングにより決定した。

【図３５】チオ－Ｓ６０７８　ＡＡＣについてのインビトロマクロファージアッセイからの結果を示す。図３５では、チオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣは、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり２．０個（ＡＡＣ－１７３）又は３．９個（ＡＡＣ－１７１）のジメチルｐｉｐＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－５４）の抗生物質負荷量で、０．５μｇ／ｍＬ以上の用量で細胞内細菌を死滅させる効果があった。

【図３６】チオ－Ｓ６０７８　ＡＡＣについてのインビトロマクロファージアッセイからの結果を示す。図３６では、チオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）は、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり１．８個（ＡＡＣ－１７４）又は３．９個（ＡＡＣ－１７２）のｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－６５）の抗生物質負荷量で、０．５μｇ／ｍＬ以上の用量で細胞内細菌を死滅させる効果があった。

【図３７】マウスの静脈内感染モデルにおけるチオ－Ｓ６０７８　ＡＡＣのインビボ有効性からの結果を示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスをＵＳＡ３００に感染させ、ビヒクルコントロール（ＰＢＳ）、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり２．０個（ＡＡＣ－１７３）又は３．９個（ＡＡＣ－１７１）のジメチルｐｉｐＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－５４）の抗生物質負荷量を有するチオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ（図３７）、及びチオ－Ｓ６０７８抗体あたり１．８個（ＡＡＣ－１７４）又は３．９個（ＡＡＣ－１７２）のｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－６５）の抗生物質負荷量を有するチオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）（図３８）で処置した。マウスに単回用量のＡＡＣを感染後１日目に静脈内注射により与え、感染後４日目に屠殺した。２つの腎臓における生存細菌の総数をプレーティングにより決定した。より低い負荷量の抗生物質を含むＡＡＣでの処置は、細菌量をおよそ１，０００倍低減し、より高い負荷量で抗生物質を含むＡＡＣでの処置は、細菌量を１０，０００倍を超えて低減した。

【図３８】マウスの静脈内感染モデルにおけるチオ－Ｓ６０７８　ＡＡＣのインビボ有効性からの結果を示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスをＵＳＡ３００に感染させ、ビヒクルコントロール（ＰＢＳ）、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり２．０個（ＡＡＣ－１７３）又は３．９個（ＡＡＣ－１７１）のジメチルｐｉｐＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－５４）の抗生物質負荷量を有するチオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ（図３７）、及びチオ－Ｓ６０７８抗体あたり１．８個（ＡＡＣ－１７４）又は３．９個（ＡＡＣ－１７２）のｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－６５）の抗生物質負荷量を有するチオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）（図３８）で処置した。マウスに単回用量のＡＡＣを感染後１日目に静脈内注射により与え、感染後４日目に屠殺した。２つの腎臓における生存細菌の総数をプレーティングにより決定した。より低い負荷量の抗生物質を含むＡＡＣでの処置は、細菌量をおよそ１，０００倍低減し、より高い負荷量で抗生物質を含むＡＡＣ

での処置は、細菌量を１０，０００倍を超えて低減した。

【発明を実施するための形態】

【００７４】

本発明のある特定の実施態様について以下に詳細に説明し、これらの実施態様の例は、付随する構造及び式に示す。本発明を、方法、材料及び例を含む列挙する実施態様とともに説明するが、このような説明は非限定的であり、本発明は、一般的に知られるか又は本明細書に援用される全ての代替、修飾及び等価物をカバーすることを意図する。一又は複数の援用される文献、特許及び同様の資料が、それらに限定されないが定義される用語、用語の用法、記載される技術などを含んで本願と異なるか又は矛盾する場合、本願が支配する。そうでないと定義しない限り、本明細書で用いる全ての技術的及び科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解されるのと同じ意味を有する。当業者は、本明細書に記載するものと同様又は等価な多くの方法及び材料を認識しており、これらを本発明を実施するために用いることができる。本発明は、記載する方法及び材料に限定されない。

【００７５】

本明細書で言及する全ての刊行物、特許出願、特許及びその他の参考文献は、それらの全体が出典明示により本明細書に援用されている。

【００７６】

Ｉ．全般的な技術

本明細書に記載又は参照する技術及び手順は、例えばＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ第3版（２００１）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌら編、（２００３））；一連のＭｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．）：ＰＣＲ ２：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｍ．Ｊ．ＭａｃＰｈｅｒｓｏｎ、Ｂ．Ｄ．Ｈａｍｅｓ及びＧ．Ｒ．Ｔａｙｌｏｒ編（１９９５））、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ編（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ａｎｄ Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ編（１９８７））；Ｏｌｉｇｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｍ．Ｊ．Ｇａｉｔ編、１９８４）；Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｎｏｔｅｂｏｏｋ（Ｊ．Ｅ．Ｃｅｌｌｉｓ編、１９９８）Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ａｎｉｍａｌ Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｒ．Ｉ．Ｆｒｅｓｈｎｅｙ）編、１９８７）；Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｊ．Ｐ．Ｍａｔｈｅｒ及びＰ．Ｅ．Ｒｏｂｅｒｔｓ、１９９８）Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ；Ｃｅｌｌ ａｎｄ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ：Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｏｃｅｄｕｒｅｓ（Ａ．Ｄｏｙｌｅ、Ｊ．Ｂ．Ｇｒｉｆｆｉｔｈｓ及びＤ．Ｇ．Ｎｅｗｅｌｌ編、１９９３－８）Ｊ．Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ；Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｄ．Ｍ．Ｗｅｉｒ及びＣ．Ｃ．Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ編）；Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ Ｖｅｃｔｏｒｓ ｆｏｒ Ｍａｍｍａｌｉａｎ Ｃｅｌｌｓ（Ｊ．Ｍ．Ｍｉｌｌｅｒ及びＭ．Ｐ．Ｃａｌｏｓ編、１９８７）；ＰＣＲ：Ｔｈｅ Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ Ｃｈａｉｎ Ｒｅａｃｔｉｏｎ、（Ｍｕｌｌｉｓら編、１９９４）；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（Ｊ．Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎら編、１９９１）；Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、１９９９）；Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ（Ｃ．Ａ．Ｊａｎｅｗａｙ及びＰ．Ｔｒａｖｅｒｓ、１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｐ．Ｆｉｎｃｈ、１９９７）；Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｄ．Ｃａｔｔｙ．編、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、１９８８－１９８９）；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：

Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ（Ｐ．Ｓｈｅｐｈｅｒｄ及びＣ．Ｄｅａｎ編、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、２０００）；Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｅ．Ｈａｒｌｏｗ及びＤ．Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、１９９９）；Ｔｈｅ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｍ．Ｚａｎｅｔｔｉ及びＪ．Ｄ．Ｃａｐｒａ編、Ｈａｒｗｏｏｄ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、１９９５）；並びにＣａｎｃｅｒ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ（Ｖ．Ｔ．ＤｅＶｉｔａら編、Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏｍｐａｎｙ、１９９３）に記載される広く用いられる方法論のように、当業者により従来の方法論を用いて全般的によく理解され、通常採用されている。

【００７７】

本出願で用いる命名法は、そうでないと示さない限り、ＩＵＰＡＣ系統的命名法に基づく。そうでないと定義しない限り、本明細書で用いる技術的及び科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有し、Ｓｉｎｇｌｅｔｏｎら（１９９４）Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、第２版、Ｊ．Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ；及びＪａｎｅｗａｙ，Ｃ．、Ｔｒａｖｅｒｓ，Ｐ．、Ｗａｌｐｏｒｔ，Ｍ．、Ｓｈｌｏｍｃｈｉｋ（２００１）Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ、第５版、Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋと一貫している。

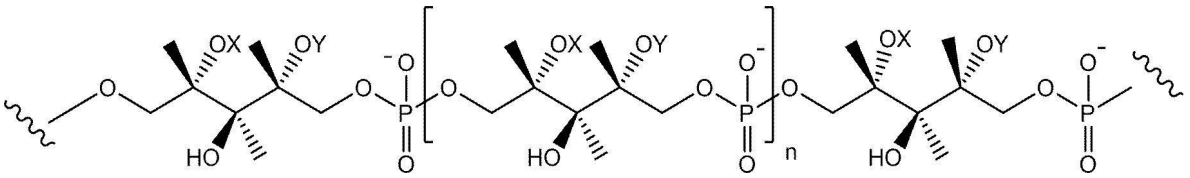
【００７８】

ＩＩ．定義

置換基の数を示す場合、用語「一又は複数」は、１つの置換基から可能な限り最高の置換の数、すなわち１つの水素の置き換えから全ての水素の置換基による置き換えまでの範囲のことをいう。用語「置換基」は、親の分子の水素原子を置き換える原子又は原子団を示す。用語「置換された」は、明記された基が一又は複数の置換基を有することを示す。何れの基も複数の置換基を有することができ、多様な可能性のある置換基がある場合、置換基は独立して選択され、同じである必要はない。用語「置換されていない」は、明記された基が置換基を有さないことを意味する。用語「置換されていてもよい」は、明記された基が置換されていないか、又は可能性のある置換基の群から独立して選択される１若しくは複数の置換基で置換されることを意味する。置換基の数を示す場合、用語「一又は複数」は、１つの置換基から可能な限り最高の置換の数、すなわち１つの水素の置き換えから全ての水素の置換基による置き換えまでの範囲のことをいう。

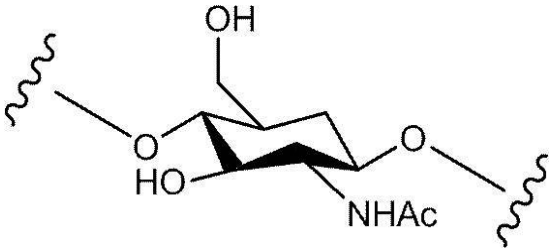
【００７９】

用語「細胞壁タイコ酸」（ＷＴＡ）は、ペプチドグリカンに、ホスホジエステル結合を介して、Ｎ－アセチルムラミン酸糖類のＣ６ヒドロキシルに共有結合しているアニオン性糖重合体を意味する。厳密な化学構造は生物体間で変動できるが、一実施態様では、ＷＴＡは、２位のＤ－リビトール及びＤ－アラニルエステルと４位のグリコシル置換基との１，５－ホスホジエステル結合の反復単位を有するリビトールタイコ酸である。グリコシル基は、黄色ブドウ球菌に存在するようなＮ－アセチルグルコサミニルα（アルファ）又はβ（ベータ）であってよい。アルジトール／糖アルコールリン酸反復上のヒドロキシルは、カチオン性Ｄ－アラニンエステル及び単糖類、例えばＮ－アセチルグルコサミンで置換される。一態様では、ヒドロキシル置換基は、Ｄ－アラニル及びアルファ（α）又はベータ（β）ＧｌｃＮＨＡｃを含む。特定の一態様では、ＷＴＡは、式：



（式中、波線は、反復結合単位又はポリアルジトール－Ｐ若しくはペプチドグリカンの結合部位を示し、Ｘは、Ｄ－アラニル又は－Ｈであり、Ｙは、α（アルファ）－ＧｌｃＮＨ

Ａｃ又はβ（ベータ）－ＧｌｃＮＨＡｃである）
の化合物を含む。



GlcNHAc

【００８０】

黄色ブドウ球菌では、ＷＴＡは、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）－１－Ｐ及びＮ－アセチルマンノースアミン（ＭａｎＮＡｃ）から構成される二糖を介してＮ－アセチルムラミン酸（ＭｕｒＮＡｃ）の６－ＯＨと共有結合し、その後に約２又は３単位のグリセロールリン酸が続く。実際のＷＴＡポリマーは、次いで、１１－４０のリビトールリン酸（Ｒｂｏ－Ｐ）反復単位から構成される。ＷＴＡの段階的合成は、まず、ＴａｇＯと呼ばれる酵素により開始され、（遺伝子の人工的欠失により）ＴａｇＯ遺伝子を欠く黄色ブドウ球菌株は、ＷＴＡを作らない。反復単位は、Ｃ２－ＯＨにてＤ－アラニン（Ｄ－Ａｌａ）及び／又はＣ４－ＯＨ位にてＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）で、α－（アルファ）又はβ－（ベータ）グリコシド結合を介してさらに調整することができる。黄色ブドウ球菌株又は細菌の増殖期に応じて、グリコシド結合は、α－、β－又は２つのアノマーの混合物であり得る。

【００８１】

用語「抗生物質」（ａｂｘ又はＡｂｘ）は、細菌のような微生物の成長を特異的に阻害又は死滅させるが、用いられる濃度及び投与間隔で宿主にとって致死的でない任意の分子を含む。具体的な態様では、抗生物質は、用いられる濃度及び投与間隔で宿主にとって毒性でない。細菌に対して効果的な抗生物質は、殺菌性（すなわち直接死滅させる）又は静菌性（すなわち分裂を妨げる）の何れかに広く分類できる。抗殺菌性抗生物質は、狭域スペクトル又は広域スペクトルとしてさらに再分類できる。より小さい範囲又は特定の細菌のファミリーに対して効果的である狭域スペクトル抗生物質とは対照的に、広域スペクトル抗生物質は、グラム陽性及びグラム陰性細菌を含む広い範囲の細菌に対して効果的であるものである。抗生物質としては、例えば（ｉ）アミノ配糖体、例えばアミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン、ピューロマイシン、（ｉｉ）アンサマイシン、例えばゲルダナマイシン、ハービマイシン、（ｉｉｉ）カルバセフェム、例えばロラカルベフ、（ｉｖ）カルバペネム、例えばエルタペネム、ドリペネム、イミペネム／シラスタチン、メロペネム、（ｖ）セファロスポリン（第１世代）、例えばセファドロキシル、セファゾリン、セファロチン、セファレキシン、（ｖｉ）セファロスポリン（第２世代）、例えばセフラクロール、セファマンドール、セフォキシチン、セフプロジル、セフロキシム、（ｖｉ）セファロスポリン（第３世代）、例えばセフィキシム、セフジニル、セフジトレン、セフォペラゾン、セフォタキシム、セフポドキシム、セフタジジム、セフチブテン、セフチゾキシム、セフトリアキソン、（ｖｉｉ）セファロスポリン（第４世代）、例えばセフェピム、（ｖｉｉｉ）セファロスポリン（第５世代）、例えばセフトビプロール、（ｉｘ）糖ペプチド、例えばテイコプラニン、バンコマイシン、（ｘ）マクロライド、例えばアジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、ロキシスロマイシン、トロレアンドマイシン、テリスロマイシン、スペクチノマイシン、（ｘｉ）モノバクタム、例えばアズトレオナム、（ｘｉｉ）ペニシリン、例えばアモキシシリン、アンピシリン、アズロシリン、カルベニシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、メズロシリン、メチシリン、ナフシリン、オキサシリン、ペニシリン、ピペラシリン、チカルシリン、（ｘｉｉｉ）抗生物質ポリペプチド、例えばバシトラシン、コリスチン、ポ

リミキシンＢ、（ｘｉｖ）キノロン、例えばシプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン、（ｘｖ）スルホンアミド、例えばマフェニド、プロントシル、スルファセタミド、スルファメチゾール、スルファニルアミド、スルファサラジン、スルフイソキサゾール、トリメトプリム、トリメトプリム－スルファメトキサゾール（ＴＭＰ－ＳＭＸ）、（ｘｖｉ）テトラサイクリン、例えばデメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン並びに（ｘｖｉｉ）その他のもの、例えばアルスフェナミン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン、リンコマイシン、エタンブトール、ホスホマイシン、フシジン酸、フラゾリドン、イソニアジド、リネゾリド、メトロニダゾール、ムピロシン、ニトロフラントイン、プラテンシマイシン、ピラジナミド、キヌプリスチン／ダルホプリスチン、リファンピン／リファンピシン又はチニダゾールが挙げられる。

【００８２】

本明細書で用いる場合、用語「ＷＴＡ抗体」は、ＷＴＡアルファ又はＷＴＡベータの何れかのＷＴＡと結合する任意の抗体のことをいう。用語「抗細胞壁タイコ酸アルファ抗体」又は「抗ＷＴＡアルファ抗体」又は「抗αＷＴＡ」又は「抗αＧｌｃＮａｃ　ＷＴＡ抗体」は、交換可能に用いて、細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）アルファと特異的に結合する抗体のことをいう。同様に、用語「抗細胞壁タイコ酸ベータ抗体」又は「抗ＷＴＡベータ抗体」又は「抗βＷＴＡ」又は「抗βＧｌｃＮａｃ　ＷＴＡ抗体」は、交換可能に用いて、細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）ベータと特異的に結合する抗体のことをいう。用語「抗Ｓｔａｐｈ抗体」及び「Ｓｔａｐｈと結合する抗体」は、黄色ブドウ球菌（「Ｓｔａｐｈ」又は「黄色ブドウ球菌」）上の抗原と十分な親和性で結合でき、よって、Ｓｔａｐｈを標的にする診断及び／又は治療剤として有用な抗体のことをいう。一実施態様では、無関係の非Ｓｔａｐｈタンパク質との抗Ｓｔａｐｈ抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）により測定して、ＭＲＳＡとの抗体の結合の約１０％未満である。ある特定の実施態様では、Ｓｔａｐｈと結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦５ｎＭ、≦４ｎＭ、≦３ｎＭ、≦２ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ又は≦０．００１ｎＭ（例えば10^{-8}Ｍ以下、例えば10^{-8}Ｍから10^{-13}Ｍまで、例えば10^{-9}Ｍから10^{-13}Ｍまで）の解離定数（Ｋｄ）を有する。ある特定の実施態様では、抗Ｓｔａｐｈ抗体は、異なる種からのＳｔａｐｈのうちで保存されているＳｔａｐｈのエピトープと結合する。

【００８３】

多剤耐性黄色ブドウ球菌又はオキサシリン耐性黄色ブドウ球菌（ＯＲＳＡ）としても知られる用語「メチシリン耐性黄色ブドウ球菌」（ＭＲＳＡ）は、ペニシリン（例えばメチシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、オキサシリンなど）及びセファロスポリンを含むベータラクタム抗生物質に対して耐性である黄色ブドウ球菌の任意の株のことをいう。「メチシリン感受性黄色ブドウ球菌」（ＭＳＳＡ）は、ベータラクタム抗生物質に感受性である黄色ブドウ球菌の任意の株のことをいう。

【００８４】

用語「最小阻止濃度」（「ＭＩＣ」）は、終夜のインキュベーションの後に微生物の目視可能な成長を阻害する抗生物質の最低濃度のことをいう。ＭＩＣを決定するためのアッセイは、知られている。１つの方法を以下の実施例１８に記載する。

【００８５】

用語「抗体」は、本明細書において、最も広い意味で用いられ、具体的に、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ダイマー、マルチマー、多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）及びその抗原結合抗体断片をカバーする（Millerら(2003) J. of Immunology 170:4854-4861）。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラであってよいか、又は他の種に由来してよい。抗体は、特定の抗原を認識してそれと結合する免疫系により作製されるタンパク質である（Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 第5版, Garland Publishing, New York）。標的抗原は、複数の抗体上のＣＤ

Ｒにより認識されるエピトープとも呼ばれる多くの結合部位を通常有する。異なるエピトープと特異的に結合する抗体はそれぞれ、異なる構造を有する。よって、１つの抗原は、１つより多い対応する抗体により認識され、該抗体が結合できる。抗体は、完全長免疫グロブリン分子又は完全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち目的の標的（このような標的は、それらに限定されないが、がん細胞又は自己免疫疾患と関連する自己免疫抗体を生成する細胞、感染細胞又は細菌のような微生物を含む）の抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子又はその部分を含む。本明細書で開示する免疫グロブリン（Ｉｇ）は、ＩｇＭ以外の任意のアイソタイプ（例えばＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＤ及びＩｇＡ）及びサブクラス（例えばＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）のものであり得る。免疫グロブリンは、任意の種に由来できる。一態様では、Ｉｇは、ヒト、マウス又はウサギの起源のものである。具体的な実施態様では、Ｉｇは、ヒト起源のものである。

【００８６】

抗体の「クラス」は、その重鎖によりプロセシングされる定常ドメイン又は定常領域の型のことをいう。抗体には、５つの主要なクラス、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭがあり、これらのうちいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばIgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1及びIgA_2にさらに分けられる。免疫グロブリンの異なるクラスに相当する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ及びμと呼ばれる。

【００８７】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子のことをいう。例えば、天然ＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合している２つの同一の軽鎖及び２つの同一の重鎖から構成される約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端まで、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）と、その後に３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）とを有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端まで、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）と、その後に定常軽鎖（ＣＬ）ドメインとを有する。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２つの型のうちの１つに割り当てることができる。

【００８８】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」は、本明細書において交換可能に用いて、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、又は本明細書で定義するＦｃ領域を含む重鎖を有する抗体のことをいう。

【００８９】

抗体の「抗原結合断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原と結合するインタクトな抗体の一部分を含む、インタクトな抗体以外の分子のことをいう。抗体断片としては、例えば、それらに限定されないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、$F(ab')_2$、ダイアボディ、直鎖抗体、単鎖抗体分子（例えばｓｃＦｖ）、及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【００９０】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で用いる場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことをいい、すなわち該集団に含まれる個別の抗体は、例えば天然に存在する変異を含むか又はモノクローナル抗体調製物の生成中に生じる（例えば糖鎖付加における天然の変動）可能性のある変異体抗体（このような変異体は、通常、少量で存在する）を除いて、同一であり、かつ／又は同じエピトープと結合する。ＩｇＧ１抗体についての１つのこのような可能性のある変異体は、重鎖定常領域のＣ末端リジン（Ｋ）の切断である。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の１つの決定基に対する。よって、修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られたという抗体の特徴を示し、何れの特定の方法により抗体が生成されるこ

とを必要とすると解釈されない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体は、それらに限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むトランスジェニック／遺伝子組換え動物を利用する方法（モノクローナル抗体を作製するためのこのような方法及び他の例示的方法は、本明細書に記載する）を含む様々な技術により作製できる。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の抗体が夾雑せずに合成できるという利点を有する。

【００９１】

用語「キメラ抗体」は、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が特定の供給源又は種に由来し、重鎖及び／又は軽鎖の残りが異なる供給源又は種に由来する抗体のことをいう。

【００９２】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞により生成されるか、又はヒト抗体レパートリー若しくは他のヒト抗体をコードする配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のものに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

【００９３】

「ヒト化抗体」は、非ヒトＨＶＲからのアミノ酸残基とヒトＦＲからのアミノ酸残基とを含むキメラ抗体のことをいう。ある特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的に２つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、全て又は実質的に全てのＨＶＲ（例えばＣＤＲ）は、非ヒト抗体のものに相当し、全て又は実質的に全てのＦＲは、ヒト抗体のものに相当する。ヒト化抗体は、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を任意選択的に含んでよい。抗体、例えば非ヒト抗体の「ヒト化形」は、ヒト化を受けた抗体のことをいう。

【００９４】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗原との抗体の結合に関与する抗体重鎖又は軽鎖のドメインのことをいう。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨ及びＶＬ）は、通常、同様の構造を有し、各ドメインは、４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と３つの超可変領域（ＨＶＲ）とを含む。（例えばKindtらKuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., p91 (2007)を参照されたい。）単一ＶＨ又はＶＬドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。さらに、特定の抗原と結合する抗体は、抗原と結合する抗体からのＶＨ又はＶＬドメインを用いてそれぞれ補完的ＶＬ又はＶＨドメインのライブラリーをスクリーニングすることにより単離してよい。例えばＰｏｒｔｏｌａｎｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：８８０－８８７（１９９３）；Ｃｌａｒｋｓｏｎら、Ｎａｔｕｒｅ　３５２：６２４－６２８（１９９１）を参照されたい。

【００９５】

用語「超可変領域」、「ＨＶＲ」又は「ＨＶ」は、本明細書で用いる場合、配列が超可変であり（「相補性決定領域」又は「ＣＤＲ」）、かつ／又は構造が規定されたループを形成し、かつ／又は抗原接触残基（「抗原接触」）を含む、抗体可変ドメインの領域のことをいう。一般的に、抗体は、６つのＨＶＲ、ＶＨ中の３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）及びＶＬ中の３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）を含む。天然抗体では、Ｈ３及びＬ３は、６つのＨＶＲのうち最も高い多様性を示し、Ｈ３は、特に、抗体に良好な特異性を付与する独特の役割を演じると考えられている。例えばＸｕら、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１３：３７－４５（２０００）；Ｊｏｈｎｓｏｎ及びWu、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　２４８：１－２５（Ｌｏ編、Ｈｕｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ、２００３）を参照されたい。実際に、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ科の抗体は、軽鎖の非存在下で機能的かつ安定である（Hamers-Castermanら, (1993) Nature 363:446-448; Sheriffら, (1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736）。

【００９６】

いくつかのＨＶＲの描写を本明細書において用いて包含する。カバット相補性決定領域

（ＣＤＲ）は、配列変動性に基づき、最も一般的に用いられる（Kabatら，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD.（1991））。Ｃｈｏｔｈｉａは、代わりに、構造ループの位置を参照する（Chothia及びLesk，(1987) J. Mol. Biol. 196:901-917）。抗原接触について、ＭａｃＣａｌｌｕｍらＪ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２６２：７３２－７４５（１９９６）を参照されたい。ＡｂＭ　ＨＶＲは、カバットＨＶＲとＣｈｏｔｈｉａ構造ループとの間の折衷案であり、Ｏｘｆｏｒｄ　ＭｏｌｅｃｕｌａｒのＡｂＭ抗体モデル化ソフトウェアにより用いられている。「接触」ＨＶＲは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらのＨＶＲのそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(カバット番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(Chothia番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【００９７】
ＨＶＲは、以下のような「拡張ＨＶＲ」を含んでよい：ＶＬ中に２４－３６又は２４－３４（Ｌ１）、４６－５６又は５０－５６（Ｌ２）及び８９－９７又は８９－９６（Ｌ３）並びにＶＨ中に２６－３５（Ｈ１）、５０－６５又は４９－６５（Ｈ２）及び９３－１０２、９４－１０２又は９５－１０２（Ｈ３）。別途指示がない限り、可変ドメイン中のＨＶＲ残基、ＣＤＲ残基及び他の残基（例えばＦＲ残基）は、本明細書において、既出のＫａｂａｔらに従って番号付ける。

【００９８】
「カバットにおける可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットにおけるアミノ酸位置番号付け」との表現及びその変形は、既出のＫａｂａｔらにおける抗体の収集物の重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインについて用いられる番号付け系のことをいう。この番号付け系を用いて、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのＦＲ若しくはＨＶＲを短縮したもの又は可変ドメインのＦＲ若しくはＨＶＲに対する挿入に対応する、より少ない又はさらなるアミノ酸を含むことがある。例えば、重鎖可変ドメインは、Ｈ２の残基５２の後に単一アミノ酸挿入（カバットに従って残基５２ａ）を、及び重鎖ＦＲ残基８２の後に挿入残基（例えばカバットに従って残基８２ａ、８２ｂ及び８２ｃなど）を含んでよい。残基のカバット番号付けは、ある抗体について、抗体の配列の相同性の領域を「標準」のカバット番号付けした配列とアラインメントすることにより決定してよい。

【００９９】
「フレームワーク」又は「ＦＲ」は、超可変領域（ＨＶＲ）残基以外の可変ドメイン残基のことをいう。可変ドメインのＦＲは、通常、４つのＦＲドメイン、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４からなる。したがって、ＨＶＲ及びＦＲ配列は、通常、ＶＨ（又はＶＬ）において以下の配列で出現する：ＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４。

【０１００】
本発明の目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又は以下に定義するヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（ＶＨ）フレームワークのアミノ酸

配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それと同じアミノ酸配列を含むか、又はこれはアミノ酸配列の変更を含んでよい。一部の実施態様では、アミノ酸変更の数は、１０個以下、９個以下、８個以下、７個以下、６個以下、５個以下、４個以下、３個以下又は２個以下である。一部の実施態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【０１０１】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、選択されたヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨフレームワーク配列のうちで最も一般に存在するアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般的に、ヒト免疫グロブリンＶＬ又はＶＨ配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般的に、配列のサブグループは、Ｋａｂａｔら、Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ、第５版、ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ９１－３２４２、Ｂｅｔｈｅｓｄａ ＭＤ（１９９１）、第１－３巻におけるようなサブグループである。一実施態様では、ＶＬについて、サブグループは、既出のＫａｂａｔらにおけるサブグループカッパＩである。一実施態様では、ＶＨについて、サブグループは、既出のＫａｂａｔらにおけるサブグループＩＩＩである。

【０１０２】

「親和性」は、分子（例えば抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有相互作用の総計の強さのことをいう。そうでないと示さない限り、本明細書で用いる場合、「結合親和性」は、結合対（例えば抗体及び抗原）の構成員の間の１：１相互作用を反映する固有の結合親和性のことをいう。分子Ｘの、そのパートナーＹについての親和性は、一般的に、解離定数（Ｋｄ）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載するものを含む当該技術分野で知られる一般的な方法により測定できる。

【０１０３】

「親和性成熟」抗体は、改変を有さない親の抗体と比較して一又は複数の超可変領域（ＨＶＲ）中で一又は複数の改変（そのような改変は、抗原についての抗体の親和性の改善をもたらす）を有する抗体のことをいう。

【０１０４】

用語「エピトープ」は、抗体が結合する抗原分子上の特定の部位のことをいう。

【０１０５】

参照抗体と「同じエピトープと結合する抗体」は、競合アッセイにおいて抗原に対する参照抗体の結合を５０％以上ブロックする抗体のことをいう。逆に、参照抗体は、競合アッセイにおいて抗原に対する抗体の結合を５０％以上ブロックする。例示的競合アッセイは、本明細書に示す。

【０１０６】

「ネイキッド抗体」は、異種部分（例えば細胞傷害性部分）又は放射性標識にコンジュゲートしていない抗体のことをいう。ネイキッド抗体は、医薬製剤中に存在してよい。

【０１０７】

「エフェクター機能」は、抗体のＦｃ領域に帰する生物活性のことをいい、抗体アイソタイプによって変動する。抗体エフェクター機能としては、例えば、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、食作用、細胞表面受容体（例えばＢ細胞受容体）の下方制御、並びにＢ細胞活性化が挙げられる。

【０１０８】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又はＡＤＣＣは、ある特定の細胞傷害性細胞（例えばナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球及びマクロファージ）上に存在するＦｃ受容体（ＦｃＲ）と結合した分泌Ｉｇが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞と特異的に結合して、続いて細胞毒を用いて標的細胞を死滅させることができるよう

にする形の細胞傷害性のことをいう。抗体は、細胞傷害性細胞で「武装」し、この機序により標的細胞を死滅させるために必要である。ＡＤＣＣを媒介する初代細胞であるＮＫ細胞は、Ｆｃγ（ガンマ）ＲＩＩＩのみを発現するが、単球は、Ｆｃγ（ガンマ）ＲＩ、Ｆｃγ（ガンマ）ＲＩＩ及びＦｃγ（ガンマ）ＲＩＩＩを発現する。造血細胞上のＦｃ発現は、Ｒａｖｅｔｃｈ及びＫｉｎｅｔ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：４５７－９２（１９９１）の第４６４頁の表３にまとめられている。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するために、ＵＳ５，５００，３６２又はＵＳ５，８２１，３３７に記載されるようなインビトロＡＤＣＣアッセイを行ってよい。このようなアッセイのために有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。あるいは又はさらに、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、インビボで、例えばＣｌｙｎｅｓら、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９５：６５２－６５６（１９９８）に開示されるような動物モデルで評価してよい。

【０１０９】

「食作用」は、宿主細胞（例えばマクロファージ又は好中球）により病原体が飲み込まれるか又は内部移行されるプロセスのことをいう。食細胞は、３つの経路により食作用を媒介する：（ｉ）直接細胞表面受容体（例えばレクチン、インテグリン及びスカベンジャー受容体）、（ｉｉ）補体増進－補体でオプソニン化した病原体と結合してそれを摂食する補体受容体（Ｃ３ｂ、ＣＲ３及びＣＲ４についての受容体ＣＲＩを含む）を用いる、及び（ｉｉｉ）抗体増進－抗体でオプソニン化した粒子（これは、次いで内部移行され、リソソームと融合してファゴリソソームになる）と結合するＦｃ受容体（ＦｃγガンマＲＩ、ＦｃγガンマＲＩＩＡ及びＦｃγガンマＲＩＩＩＡを含む）を用いる。本発明では、経路（ｉｉｉ）が感染白血球、例えば好中球及びマクロファージへの抗ＭＲＳＡ　ＡＡＣ治療剤の送達において重要な役割を演じていると考えられる（D. Underhill及びA Ozinsky. (2002) Annual Review of Immunology, Vol 20:825によるPhagocytosis of Microbes: complexity in Action）。

【０１１０】

「補体依存性細胞傷害性」又は「ＣＤＣ」は、補体の存在下での標的細胞の溶解のことをいう。古典的補体経路の活性化は、補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）が（適当なサブクラスの）抗体と結合することにより開始され、該抗体には同族抗原が結合する。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイ、例えばＧａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　２０２：１６３（１９９６）に記載されるものを行ってよい。

【０１１１】

用語「Ｆｃ領域」は、本明細書において、免疫グロブリン重鎖のＣ末端領域を定義するために用いる。この用語は、天然配列Ｆｃ領域及び変異Ｆｃ領域を含む。免疫グロブリン重鎖のＦｃ領域の境界は変動することがあるが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６位又はＰｒｏ２３０位のアミノ酸残基からそのカルボキシル末端まで広がると通常定義される。Ｆｃ領域のＣ末端リジン（ＥＵインデックスとも呼ばれるＥＵ番号付け系に従って残基４４７、Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるとおり）は、例えば、抗体の生成若しくは精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換えにより操作することにより除去してよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、全てのＫ４４７残基が除去された抗体集団、Ｋ４４７残基が除去されていない抗体集団、及びＫ４４７残基を有する抗体と有さない抗体との混合物を有する抗体集団を含んでよい。用語「Ｆｃ受容体」又は「ＦｃＲ」は、母性ＩｇＧを胎児に移す役割を果たす新生児受容体ＦｃＲｎも含む。Ｇｕｙｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１７：５８７（１９７６）及びＫｉｍら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２４９（１９９４）。ＦｃＲｎとの結合を測定する方法は、知られている（例えばGhetie及びWard, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetieら, Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hintonら, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6 (2004);国際公開第２００４／９２２１９号（Ｈｉｎｔｏｎ

ら）を参照されたい）。ヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドのＦｃＲｎとのインビボでの結合及び血清半減期は、例えば、トランスジェニック／遺伝子組換えのマウス若しくはヒトＦｃＲｎを発現するトランスフェクトされたヒト細胞株において、又は変異Ｆｃ領域を有するポリペプチドを投与した霊長類においてアッセイできる。国際公開第２００４／４２０７２号（Ｐｒｅｓｔａ）は、ＦｃＲとの結合が改善又は減少された抗体変異体について記載している。例えばＳｈｉｅｌｄｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１－６６０４（２００１）も参照されたい。

【０１１２】

Ｆｃ領域と結合している炭水化物は、改変してよい。哺乳動物細胞により生成される天然抗体は、分岐した二分岐オリゴ糖を典型的に含み、該オリゴ糖は、通常、Ｎ－結合により、Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７と結合する。例えばＷｒｉｇｈｔら（１９９７）ＴＩＢＴＥＣＨ　１５：２６－３２を参照されたい。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えばマンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「幹」中のＧｌｃＮＡｃと結合したフコースを含んでよい。一部の実施態様では、ＩｇＧ中のオリゴ糖の修飾を作製して、ある特定のさらに改善された特性を有するＩｇＧを創出してよい。例えば、Ｆｃ領域と（直接的又は間接的に）結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する抗体修飾をもたらす。このような修飾は、ＡＤＣＣ機能の改善を有することがある。例えばＵＳ２００３／０１５７１０８（Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ．）；ＵＳ２００４／００９３６２１（Ｋｙｏｗａ　Ｈａｋｋｏ　Ｋｏｇｙｏ　Ｃｏ．，Ｌｔｄ）を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体修飾に関する刊行物としては、ＵＳ２００３／０１５７１０８；WO２０００／６１７３９；WO２００１／２９２４６；ＵＳ２００３／０１１５６１４；ＵＳ２００２／０１６４３２８；ＵＳ２００４／００９３６２１；ＵＳ２００４／０１３２１４０；ＵＳ２００４／０１１０７０４；ＵＳ２００４／０１１０２８２；ＵＳ２００４／０１０９８６５；WO２００３／０８５１１９；WO２００３／０８４５７０；WO２００５／０３５５８６；WO２００５／０３５７７８；WO２００５／０５３７４２；WO２００２／０３１１４０；Ｏｋａｚａｋｉら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３６：１２３９－１２４９（２００４）；Ｙａｍａｎｅ－ＯｈｎｕｋｉらＢｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｅｎｇ．８７：６１４（２００４）が挙げられる。脱フコシル化抗体を生成できる細胞株としては、例えば、タンパク質フコシル化を欠損するＬｅｅ　１３　ＣＨＯ細胞（RipkaらArch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986);米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８　Ａ１号、Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ；及び国際公開第２００４／０５６３１２　Ａ１号、Ａｄａｍｓら、特に実施例１１）、及びノックアウト細胞株、例えばアルファ－１，６－フコシルトランスフェラーゼ遺伝子ＦＵＴ８ノックアウトＣＨＯ細胞（例えばYamane-Ohnukiら，Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y.ら，Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006);及び国際公開第２００３／０８５１０７号を参照されたい）が挙げられる。

【０１１３】

「単離抗体」は、その天然の環境の成分から分離されたものである。一部の実施態様では、抗体は、例えば、電気泳動（例えばＳＤＳ－ＰＡＧＥ、等電点（ＩＥＦ）、キャピラリー電気泳動）又はクロマトグラフィー（例えばイオン交換又は逆相ＨＰＬＣ）により決定される、９５％又は９９％より大きい純度まで精製される。抗体純度の評価についての方法の概説は、例えばＦｌａｔｍａｎら、Ｊ．Ｃｈｒｏｍａｔｏｇｒ．Ｂ　８４８：７９－８７（２００７）を参照されたい。

【０１１４】

「単離核酸」は、その天然の環境の成分から分離された核酸分子のことをいう。単離核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子であるが、核酸分子が染色体外又はその天然の染色体上の場所とは異なる染色体上の場所にある核酸分子を含む。

【０１１５】

「抗ＷＴＡベータ抗体をコードする単離核酸」は、単一ベクター若しくは別々のベクター中にある核酸分子、宿主細胞中の一又は複数の場所に存在する核酸分子を含む、抗体重

鎖及び軽鎖をコードする一又は複数の核酸分子のことをいう。

【０１１６】

本明細書で用いる場合、用語「特異的に結合する」又は「・・・に特異的」は、生物学的分子を含む分子の不均質集団の存在下で標的の存在を決定できる、標的と抗体との間の結合のような測定可能で再現可能な相互作用のことをいう。例えば、標的（これは、エピトープであり得る）と特異的に結合する抗体は、他の標的と結合するよりもより大きい親和性、アビディティーで、より容易に、かつ／又はより長い期間結合する抗体である。一実施態様では、ＷＴＡ－ベータと無関係の標的との抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）により測定される、標的との抗体の結合の約１０％未満である。ある特定の実施態様では、ＷＴＡベータと特異的に結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ又は≦０．１ｎＭの解離定数（Ｋｄ）を有する。ある特定の実施態様では、抗体は、種々の種から保存されたエピトープと特異的に結合する。別の実施態様では、特異的結合は、排他的な結合を含み得るが、排他的な結合を要求しない。

【０１１７】

「結合親和性」は、一般的に、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的相互作用の総計の強度のことをいう。そうでないと示さない限り、本明細書で用いる場合、「結合親和性」は、結合対（例えば抗体及び抗原）の構成員の間の１：１相互作用を反映する固有の結合親和性のことをいう。分子Ｘの、そのパートナーＹについての親和性は、一般的に、解離定数（Ｋｄ）で表すことができる。親和性は、本明細書に記載するものを含む当該技術分野で知られる一般的な方法により測定できる。低親和性抗体は、一般的に、抗原とゆっくり結合し、容易に解離する傾向にあるが、高親和性抗体は、一般的に、抗原と迅速に結合し、より長く結合したままの傾向にある。結合親和性を測定する様々な方法が当該技術分野で知られており、本発明の目的のためにこれらの何れも用いることができる。結合親和性を測定するための具体的な説明のための及び例示的な実施態様を、以下に記載する。

【０１１８】

一実施態様では、本発明に従う「Ｋｄ」又は「Ｋｄ値」は、以下のアッセイにより説明されるように、目的の抗体のＦａｂバージョンとその抗原とを用いて行う放射性標識抗原結合アッセイ（ＲＩＡ）により測定される。抗原についてのＦａｂの溶液結合親和性は、Ｆａｂを、最小限濃度の（^{125}Ｉ）－標識抗原により、未標識抗原の滴定系列の存在下で平衡化し、次いで、結合した抗原を、抗Ｆａｂ抗体でコーティングされたプレートを用いて捕捉することにより測定される（例えばChenら，(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881を参照されたい）。アッセイのための条件を確立するために、マイクロタイタープレート（ＤＹＮＥＸ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ　９．６）中の５μｇ／ｍｌの捕捉抗Ｆａｂ抗体（Ｃａｐｐｅｌ　Ｌａｂｓ）で終夜コーティングし、その後、ＰＢＳ中の２％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミンで２から５時間室温（およそ２３℃）にてブロックする。非吸着プレート（Ｎｕｎｃ＃２６９６２０）中に、１００ｐＭ又は２６ｐＭの［^{125}Ｉ］－抗原を、目的のＦａｂの系列希釈（例えばPrestaら，Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)における抗ＶＥＧＦ抗体Ｆａｂ－１２の評価と一貫する）と混合する。目的のＦａｂを、次いで、終夜インキュベートする。しかし、インキュベーションは、より長い期間（例えば約６５時間）継続して、平衡に確実に到達するようにしてもよい。その後、混合物を捕捉プレートに移して、室温にてインキュベートする（例えば１時間）。溶液を次いで除去し、プレートをＰＢＳ中の０．１％　ＴＷＥＥＮ－２０（商標）界面活性剤で８回洗浄する。プレートが乾燥したら、１５０μｌ／ウェルの閃光物質（ＭＩＣＲＯＳＣＩＮＴ－２０（商標）；Ｐａｃｋａｒｄ）を加え、プレートをＴＯＰＣＯＵＮＴ（商標）ガンマカウンタ（Ｐａｃｋａｒｄ）で１０分間計測する。最大結合の２０％以下を与える各Ｆａｂの濃度を選択して、競合結合アッセイのために用いる。

【０１１９】

別の実施態様によると、Ｋｄは、２５℃にて固定化抗原ＣＭ５チップを～１０反応単位

（ＲＵ）で用いてＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－２０００又はＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－３０００装置（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いる表面プラスモン共鳴アッセイにより測定される。簡単に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（ＣＭ５、ＢＩＡｃｏｒｅ　Ｉｎｃ．）をＮ－エチル－Ｎ’－（３－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）及びＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）で、供給業者の指示書に従って活性化する。抗原を１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ４．８で５μｇ／ｍｌ（～０．２μＭ）まで希釈した後に、５μｌ／分の流速で注入して、およそ１０反応単位（ＲＵ）のカップリングタンパク質を達成する。抗原の注入の後に、１Ｍエタノールアミンを注入して、未反応基をブロックする。反応速度論的な測定のため、２倍系列希釈のＦａｂ（０．７８ｎＭから５００ｎＭ）を、０．０５％　ＴＷＥＥＮ　２０（商標）界面活性剤を含むＰＢＳ（ＰＢＳＴ）中に、２５℃にておよそ２５μｌ／分の流速で注入する。会合速度（k_{on}）及び解離速度（k_{off}）を、会合及び解離センサーグラムを同時にフィットさせることにより、単純な１対１ラングミュア結合モデル（ＢＩＡｃｏｒｅ（登録商標）評価ソフトウェアバージョン３．２）を用いて算出する。平衡解離定数（Ｋｄ）は、k_{off}／k_{on}の比として算出する。例えばＣｈｅｎら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２９３：８６５－８８１（１９９９）を参照されたい。会合速度が上記の表面プラスモン共鳴アッセイにより$10^{6}M^{-1}s^{-1}$を超えるならば、会合速度は、分光計、例えばストップドフローを備えた分光光度計（Ａｖｉｖ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）又は撹拌キュベットを備えた８０００シリーズＳＬＭ－ＡＭＩＮＣＯ（商標）分光光度計（ＴｈｅｒｍｏＳｐｅｃｔｒｏｎｉｃ）において測定される、漸増濃度の抗原の存在下で、ＰＢＳ、ｐＨ７．２中の２０ｎＭ抗抗原抗体（Ｆａｂ形）の蛍光放出強度（励起＝２９５ｎｍ；放出＝３４０ｎｍ、１６ｎｍ帯域通過）の増加又は減少を２５℃にて測定する蛍光消光技術を用いることにより決定できる。

【０１２０】

本発明による「会合速度（ｏｎ－ｒａｔｅ）」、「会合の速度」、「会合速度（ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ　ｒａｔｅ）」又は「k_{on}」は、ＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－２０００又はＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）－３０００システム（ＢＩＡｃｏｒｅ，Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いて上記のようにして決定することもできる。

【０１２１】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」は、交換可能に用い、細胞の子孫を含む外因性核酸が導入された細胞のことをいう。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これらは初代形質転換細胞及び継代数を問わないそれに由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と完全に同一の核酸含有量でないことがあるが、変異を含んでよい。元の形質転換細胞においてスクリーニング又は選択されるのと同じ機能又は生物活性を有するミュータント子孫は、本明細書において含まれる。

【０１２２】

用語「ベクター」は、本明細書で用いる場合、結合する別の核酸を伝播できる核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、及びベクターが導入される宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。ある特定のベクターは、動作可能に連結された核酸の発現を駆動できる。このようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」という。

【０１２３】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、配列をアラインメントし、最大限のパーセント配列同一性を達成するために必要であればギャップを導入した後に参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一であり、配列同一性の一部として何れの保存的置換も考慮しない、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、例えば公共で利用可能なコンピュータソフトウェア、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアを用いて、当該技術分野の熟練の範囲内である様々な方式で達成できる。当業者は、比較する配列の完全長にわ

たって最大限のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適当なパラメータを決定できる。本明細書における目的のために、しかし、％アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を用いて得る。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．により著され、ソースコードは、米国著作権局、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ Ｄ．Ｃ．、２０５５９においてユーザ文書と共にファイルされており、Ｕ．Ｓ．著作権第ＴＸＵ５１００８７号の下で登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ，Ｉｎｃ．、Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａから公共で入手可能であるか、又はソースコードからコンパイルできる。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、デジタルＵＮＩＸ Ｖ４．０Ｄを含むＵＮＩＸオペレーティングシステムで用いるためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定され、変動しない。

【０１２４】

ＡＬＩＧＮ－２をアミノ酸配列比較のために採用する状況では、あるアミノ酸配列Ａの、あるアミノ酸配列Ｂに対する（ｔｏ／ｗｉｔｈ／ａｇａｉｎｓｔ）％アミノ酸配列同一性（これは、あるアミノ酸配列Ｂに対する（ｔｏ／ｗｉｔｈ／ａｇａｉｎｓｔ）ある特定の％アミノ酸配列同一性を有する、又は含むあるアミノ酸配列Ａと代わりに言うことができる）は、以下のようにして算出する：分数Ｘ／Ｙの１００倍（ここで、Ｘは、Ａ及びＢのプログラムのアラインメントにおいて配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２により同一マッチとして評点されたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂにおけるアミノ酸残基の総数である）。アミノ酸配列Ａの全長がアミノ酸配列Ｂの全長と等しくない場合、ＡのＢに対する％アミノ酸配列同一性は、ＢのＡに対する％アミノ酸配列同一性と等しくないことが理解される。そうでないと具体的に述べない限り、本明細書で用いる全ての％アミノ酸配列同一性の値は、記載したようにして得られる。

【０１２５】

用語「リファマイシン型抗生物質」は、リファマイシンの構造又はリファマイシンに類似する構造を有する抗生物質のクラス又は群を意味する。

【０１２６】

用語「リファラジル型抗生物質」は、リファラジルの構造又はリファラジルに類似する構造を有する抗生物質のクラス又は群を意味する。

【０１２７】

置換基の数を示す場合、用語「一又は複数」は、１つの置換基から可能な限り最高の置換の数、すなわち１つの水素の置き換えから全ての水素の置換基による置き換えまでの範囲のことをいう。用語「置換基」は、親の分子の水素原子を置き換える原子又は原子団を示す。用語「置換された」は、明記された基が一又は複数の置換基を有することを示す。何れの基も複数の置換基を有することができ、多様な可能性のある置換基がある場合、置換基は独立して選択され、同じである必要はない。用語「置換されていない」は、明記された基が置換基を有さないことを意味する。用語「置換されていてもよい」は、明記された基が置換されていないか、又は可能性のある置換基の群から独立して選択される１若しくは複数の置換基で置換されることを意味する。置換基の数を示す場合、用語「一又は複数」は、１つの置換基から可能な限り最高の置換の数、すなわち１つの水素の置き換えから全ての水素の置換基による置き換えまでの範囲のことをいう。

【０１２８】

用語「アルキル」は、本明細書で用いる場合、１から１２炭素原子（C_1－C_{12}）の飽和した直鎖又は分岐鎖の一価の炭化水素基のことをいい、該アルキル基は、以下に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。別の実施態様では、アルキル基は、１から８炭素原子（C_1－C_8）、又は１から６炭素原子（C_1－C_6）である。アルキル基としては、例えば、それらに限定されないが、メチル（Ｍｅ，－CH_3）、エチル（Ｅｔ，－CH_2CH_3）、１－プロピル（ｎ－Ｐｒ，ｎ－プロピル，－$CH_2CH_2CH_3$）、２－プロピル（ｉ－Ｐｒ，ｉ－プロピル，－$CH(CH_3)_2$）、１－ブ

チル（n－Bu，n－ブチル，－$CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－メチル－１－プロピル（i－Bu，i－ブチル，－$CH_2CH(CH_3)_2$）、２－ブチル（s－Bu，s－ブチル，－$CH(CH_3)CH_2CH_3$）、２－メチル－２－プロピル（t－Bu，t－ブチル，－$C(CH_3)_3$）、１－ペンチル（n－ペンチル，－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－ペンチル（－$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$）、３－ペンチル（－$CH(CH_2CH_3)_2$）、２－メチル－２－ブチル（－$C(CH_3)_2CH_2CH_3$）、３－メチル－２－ブチル（－$CH(CH_3)CH(CH_3)_2$）、３－メチル－１－ブチル（－$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$）、２－メチル－１－ブチル（－$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$）、１－ヘキシル（－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－ヘキシル（－$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$）、３－ヘキシル（－$CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$）、２－メチル－２－ペンチル（－$C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$）、３－メチル－２－ペンチル（－$CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$）、４－メチル－２－ペンチル（－$CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$）、３－メチル－３－ペンチル（－$C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$）、２－メチル－３－ペンチル（－$CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$）、２，３－ジメチル－２－ブチル（－$C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$）、３，３－ジメチル－２－ブチル（－$CH(CH_3)C(CH_3)_3$、１－ヘプチル、１－オクチルなどが挙げられる。

【０１２９】

用語「アルキレン」は、本明細書で用いる場合、１から１２炭素原子（C_1－C_{12}）の飽和した直鎖又は分岐鎖の二価の炭化水素基のことをいい、該アルキレン基は、以下に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。別の実施態様では、アルキレン基は、１から８炭素原子（C_1－C_8）、又は１から６炭素原子（C_1－C_6）である。アルキレン基としては、例えば、それらに限定されないが、メチレン（－CH_2－）、エチレン（－CH_2CH_2－）、プロピレン（－$CH_2CH_2CH_2$－）などが挙げられる。

【０１３０】

用語「アルケニル」は、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち炭素－炭素sp^2二重結合を有する２から８炭素原子（C_2－C_8）の直鎖又は分岐鎖の一価の炭化水素基のことをいい、該アルケニル基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよく、「シス」及び「トランス」配向、又は代わりに「Ｅ」及び「Ｚ」配向を有する基を含む。例えば、それらに限定されないが、エチレニル又はビニル（－CH＝CH_2）、アリル（－CH_2CH＝CH_2）などが挙げられる。

【０１３１】

用語「アルケニレン」は、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち炭素－炭素sp^2二重結合を有する２から８炭素原子（C_2－C_8）の直鎖又は分岐鎖の二価の炭化水素基のことをいい、該アルケニレン基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよく、「シス」及び「トランス」配向、又は代わりに「Ｅ」及び「Ｚ」配向を有する基を含む。例えば、それらに限定されないが、エチレニレン又はビニレン（－CH＝CH－）、アリル（－CH_2CH＝CH－）などが挙げられる。

【０１３２】

用語「アルキニル」は、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち炭素－炭素ｓｐ三重結合を有する２から８炭素原子（C_2－C_8）の直鎖又は分岐鎖の一価の炭化水素基のことをいい、該アルキニル基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。例えば、それらに限定されないが、エチニル（－C≡CH）、プロピニル（プロパルギル、－CH_2C≡CH）などが挙げられる。

【０１３３】

用語「アルキニレン」は、少なくとも１つの不飽和部位、すなわち炭素－炭素ｓｐ三重結合を有する２から８炭素原子（C_2－C_8）の直鎖又は分岐鎖の二価の炭化水素基のことをいい、該アルキニレン基は、以下に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。例えば、それらに限定されないが、エチニレン（－C≡C－）、プロピ

ニレン（プロパルギレン、－$CH_2C≡C$－）などが挙げられる。

【０１３４】

用語「炭素環」、「カルボシクリル」、「炭素環式環」及び「シクロアルキル」は、単環式環として３から１２炭素原子（C_3－C_{12}）又は二環式環として７から１２炭素原子を有する一価の非芳香族の飽和した又は部分的に不飽和の環のことをいう。７から１２原子を有する二環式炭素環は、例えば、ビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］又は［６，６］系として配置でき、９又は１０環原子を有する二環式炭素環は、ビシクロ［５，６］若しくは［６，６］系として、又はビシクロ［２．２．１］ヘプタン、ビシクロ［２．２．２］オクタン及びビシクロ［３．２．２］ノナンのような架橋系として配置できる。スピロ部分も本定義の範囲に含まれる。単環式炭素環としては、例えば、それらに限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペント－１－エニル、１－シクロペント－２－エニル、１－シクロペント－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキス－１－エニル、１－シクロヘキス－２－エニル、１－シクロヘキス－３－エニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプチル、シクロオクチル、シクロノニル、シクロデシル、シクロウンデシル、シクロドデシルなどが挙げられる。カルボシクリル基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。

【０１３５】

「アリール」は、親の芳香環系の単一炭素原子から１つの水素原子を除去することにより導かれる６－２０炭素原子（C_6－C_{20}）の一価の芳香族炭化水素基を意味する。いくつかのアリール基としては、例示的構造において「Ａｒ」と表される。アリールは、飽和、部分的に不飽和の環、又は芳香族炭素環式環と縮合した芳香環を含む二環式基を含む。典型的なアリール基は、それらに限定されないが、ベンゼン（フェニル）、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニル、インデニル、インダニル、１，２－ジヒドロナフタレン、１，２，３，４－テトラヒドロナフチルに由来する基などが挙げられる。アリール基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。

【０１３６】

「アリーレン」は、親の芳香環系の２つの炭素原子から２つの水素原子を除去することにより導かれる６－２０炭素原子（C_6－C_{20}）の二価の芳香族炭化水素基を意味する。いくつかのアリーレン基は、例示的構造において「Ａｒ」と表される。アリーレンは、飽和、部分的に不飽和の環、又は芳香族炭素環式環と縮合した芳香環を含む二環式基を含む。典型的なアリーレン基としては、それらに限定されないが、ベンゼン（フェニレン）、置換ベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニレン、インデニレン、インダニレン、１，２－ジヒドロナフタレン、１，２，３，４－テトラヒドロナフチルに由来する基などが挙げられる。アリーレン基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で置換されていてもよい。

【０１３７】

用語「複素環」、「ヘテロシクリル」及び「複素環式環」は、本明細書において交換可能に用いられ、３から約２０環原子の飽和又は部分的に不飽和（すなわち１若しくは複数の二重及び／又は三重結合を環の中に有する）の炭素環式基のことをいい、ここで、少なくとも１つの環原子は、窒素、酸素、リン及び硫黄から選択されるヘテロ原子であり、残りの環原子はＣであり、一又は複数の環原子は、以下に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。複素環は、３から７員環（２から６炭素原子並びにＮ、Ｏ、Ｐ及びＳから選択される１から４ヘテロ原子）の単環又は７から１０員環（４から９炭素原子並びにＮ、Ｏ、Ｐ及びＳから選択される１から６ヘテロ原子）の二環、例えばビシクロ［４，５］、［５，５］、［５，６］又は［６，６］系であってよい。複素環は、Ｐａｑｕｅｔｔｅ，Ｌｅｏ Ａ．；「Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ｏｆ Ｍｏｄｅｒｎ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」（Ｗ．Ａ．Ｂｅｎｊａｍｉｎ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９６８）、特に第１、３、４、６、７及び９章；「Ｔｈｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ，Ａ ｓｅｒｉｅｓ ｏｆ

Ｍｏｎｏｇｒａｐｈｓ」（Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９５０から現在まで）、特に第１３、１４、１６、１９及び２８巻；並びにＪ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．（１９６０）８２：５５６６に記載されている。「ヘテロシクリル」は、複素環基が、飽和、部分的に不飽和の環、又は芳香族炭素環式若しくは複素環式環と縮合した基も含む。複素環式環としては、例えば、それらに限定されないが、モルホリン－４－イル、ピペリジン－１－イル、ピペラジニル、ピペラジン－４－イル－２－オン、ピペラジン－４－イル－３－オン、ピロリジン－１－イル、チオモルホリン－４－イル、Ｓ－ジオキソチオモルホリン－４－イル、アゾカン－１－イル、アゼチジン－１－イル、オクタヒドロピリド［１，２－ａ］ピラジン－２－イル、［１，４］ジアゼパン－１－イル、ピロリジニル、テトラヒドロフラニル、ジヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テトラヒドロピラニル、ジヒドロピラニル、テトラヒドロチオピラニル、ピペリジノ、モルホリノ、チオモルホリノ、チオキサニル、ピペラジニル、ホモピペラジニル、アゼチジニル、オキセタニル、チエタニル、ホモピペリジニル、オキセパニル、チエパニル、オキサゼピニル、ジアゼピニル、チアゼピニル、２－ピロリニル、３－ピロリニル、インドリニル、２Ｈ－ピラニル、４Ｈ－ピラニル、ジオキサニル、１，３－ジオキソラニル、ピラゾリニル、ジチアニル、ジチオラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロチエニル、ジヒドロフラニル、ピラゾリニルイミダゾリニル、イミダゾリニル、３－アザビシクロ［３．１．０］ヘキサニル、３－アザビシクロ［４．１．０］ヘプタニル、アザビシクロ［２．２．２］ヘキサニル、３Ｈ－インドリルキノリジニル及びＮ－ピリジルウレアが挙げられる。スピロ部分もこの定義の範囲に含まれる。２つの環原子がオキソ（＝Ｏ）部分で置換された複素環式基の例は、ピリミジノニル及び１，１－ジオキソ－チオモルホリニルである。本明細書における複素環基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。

【０１３８】

用語「ヘテロアリール」は、５、６又は７員環の一価の芳香族基のことをいい、窒素、酸素及び硫黄から独立して選択される一又は複数のヘテロ原子を含む５－２０原子の縮合環系（その少なくとも１つは芳香族である）を含む。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル（例えば２－ヒドロキシピリジニルを含む）、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、ピリミジニル（例えば４－ヒドロキシピリミジニルを含む）、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソキサゾリル、チアゾリル、オキサジアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、インドリル、ベンズイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノリニル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル及びプロピリジニルである。ヘテロアリール基は、本明細書に記載する一又は複数の置換基で、独立して置換されていてもよい。

【０１３９】

複素環又はヘテロアリール基は、可能であれば、炭素（炭素結合した）又は窒素（窒素結合した）結合してよい。例として、そして限定せずに、炭素結合複素環又はヘテロアリールは、ピリジンの２位、３位、４位、５位若しくは６位、ピリダジンの３位、４位、５位若しくは６位、ピリミジンの２位、４位、５位若しくは６位、ピラジンの２位、３位、５位若しくは６位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロール若しくはテトラヒドロピロールの２位、３位、４位若しくは５位、オキサゾール、イミダゾール若しくはチアゾールの２位、４位若しくは５位、イソオキサゾール、ピラゾール若しくはイソチアゾールの３位、４位若しくは５位、アジリジンの２位若しくは３位、アゼチジンの２位、３位若しくは４位、キノリンの２位、３位、４位、５位、６位、７位若しくは８位、又はイソキノリンの１位、３位、４位、５位、６位、７位若しくは８位にて結合する。

【０１４０】
例として、そして限定せずに、窒素結合複素環又はヘテロアリールは、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、１Ｈ－インダゾールの１位、イソインドール又はイソインドリンの２位、モルホリンの４位、及びカルバゾール又はβ－カルボリンの９位にて結合する。
【０１４１】
「代謝産物」は、特定の化合物又はその塩の体内での代謝により生成される生成物である。ある化合物の代謝産物は、当該技術分野で知られる常套的技術を用いて同定でき、それらの活性は、本明細書に記載するもののような試験を用いて決定できる。このような生成物は、投与された化合物の例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、脱アミド、エステル化、脱エステル化、酵素切断などから得ることができる。したがって、本発明は、本発明の式Ｉの化合物を、その代謝生成物を生じるのに十分な期間哺乳動物と接触させることを含む方法により生成される化合物を含む、本発明の化合物の代謝産物を含む。
【０１４２】
用語「医薬製剤」は、含まれる活性成分の生物活性が効果的になることを許容する形であり、製剤を投与する対象において許容できないほど毒性であるさらなる成分を含まない調製物のことをいう。
【０１４３】
「滅菌」製剤は、無菌、又は全ての生存微生物及びそれらの胞子を含まないことである。
【０１４４】
「安定」製剤は、含まれるタンパク質が貯蔵中に物理的及び化学的安定性及び完全性を本質的に保持するものである。タンパク質安定性を測定するための様々な分析技術が当該技術分野で利用可能であり、Ｐｅｐｔｉｄｅ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ、２４７－３０１、Ｖｉｎｃｅｎｔ Ｌｅｅ編、Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｐｕｂｓ．（１９９１）及びＪｏｎｅｓ，Ａ．Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖ．１０：２９－９０（１９９３）に概説がある。安定性は、選択された温度にて選択された期間測定できる。迅速スクリーニングのために、製剤を４０℃に２週間から１カ月間保存し、その時に安定性を測定する。製剤が２－８℃で貯蔵されるものである場合、一般的に、製剤は、３０℃若しくは４０℃にて少なくとも１カ月間安定であり、かつ／又は２－８℃にて少なくとも２年間安定である。製剤が３０℃で貯蔵されるものである場合、一般的に、製剤は、３０℃にて少なくとも２年間安定であり、かつ／又は４０℃にて少なくとも６カ月間安定である。例えば、貯蔵中の凝集の程度は、タンパク質安定性の指標として用いることができる。よって、「安定」製剤は、タンパク質の約１０％未満及び好ましくは約５％未満が製剤中に凝集物として存在するものであってよい。他の実施態様では、製剤の貯蔵中の凝集物形成の何れの増加も決定できる。
【０１４５】
「等張」製剤は、ヒト血液と本質的に同じ浸透圧を有するものである。等張製剤は、一般的に、約２５０から３５０ｍＯｓｍまでの浸透圧を有する。用語「低張」は、ヒト血液のものより低い浸透圧を有する製剤のことをいう。同様に、用語「高張」は、ヒト血液のものより高い浸透圧を有する製剤のことをいうために用いる。等張性は、例えば蒸気圧浸透圧計又は氷結型浸透圧計を用いて測定できる。本発明の製剤は、塩及び／又はバッファーの添加により高張である。
【０１４６】
「担体」は、本明細書で用いる場合、採用される投与量及び濃度にて、曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を含む。頻繁に、生理的に許容される担体は、水性ｐＨ緩衝溶液である。生理的に許容される担

体としては、例えば、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のようなバッファー；アスコルビン酸を含む抗酸化剤；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンのようなタンパク質；ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジンのようなアミノ酸；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物；ＥＤＴＡのようなキレート剤；マンニトール又はソルビトールのような糖アルコール；ナトリウムのような塩形成性対イオン；並びに／あるいはＴＷＥＥＮ（登録商標）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）及びＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）のような非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【０１４７】

「薬学的に許容される担体」は、活性成分以外の医薬製剤中の成分のことをいい、対象に対して非毒性である。薬学的に許容される担体としては、それらに限定されないが、バッファー、賦形剤、安定化剤又は保存剤が挙げられる。「薬学的に許容される酸」は、処方される濃度及び様式にて非毒性である無機及び有機酸を含む。例えば、適切な無機酸としては、塩化水素酸、過塩素酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硝酸、硫酸、スルホン酸、スルフィン酸、スルファニル酸、リン酸、炭酸などが挙げられる。適切な有機酸としては、直鎖及び分岐鎖アルキル、芳香族、環状、脂環式、アリール脂肪族、複素環式、飽和、不飽和のモノ、ジ及びトリカルボン酸（例えばギ酸、酢酸、２－ヒドロキシ酢酸、トリフルオロ酢酸、フェニル酢酸、トリメチル酢酸、ｔ－ブチル酢酸、アントラニル酸、プロパン酸、２－ヒドロキシプロパン酸、２－オキソプロパン酸、プロパン二酸、シクロペンタンプロピオン酸、シクロペンタンプロピオン酸、３－フェニルプロピオン酸、ブタン酸、ブタン二酸、安息香酸、３－（４－ヒドロキシベンゾイル）安息香酸、２－アセトキシ－安息香酸、アスコルビン酸、桂皮酸、ラウリル硫酸、ステアリン酸、ムコン酸、マンデル酸、コハク酸、エンボン酸、フマル酸、リンゴ酸、マレイン酸、ヒドロキシマレイン酸、マロン酸、乳酸、クエン酸、酒石酸、グリコール酸、グリコン酸、グルコン酸、ピルビン酸、グリオキサル酸、シュウ酸、メシル酸、コハク酸、サリチル酸、フタル酸、パルモ酸、パルメイン酸、チオシアン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、１，２－エタンジスルホン酸、２－ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、４－クロロベンゼンスルホン酸、ナフタレン－２－スルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、カンファスルホン酸、４－メチルビシクロ［２．２．２］－オクト－２－エン－１－カルボン酸、　グルコヘプトン酸、４，４’－メチレンビス－３－（ヒドロキシ－２－エン－１－カルボン酸）、ヒドロキシナフトエ酸を含む）が挙げられる。

【０１４８】

「薬学的に許容される塩基」は、製剤中で処方される濃度及び様式にて非毒性である無機及び有機塩基を含む。例えば、適切な塩基としては、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アンモニウム、鉄、亜鉛、銅、マンガン、アルミニウム、Ｎ－メチルグルカミン、モルホリン、ピペリジンのような無機塩基形成性金属から形成されるもの、並びに第一級、第二級及び第三級アミン、置換アミン、環状アミン並びに塩基性イオン交換樹脂［例えばＮ（Ｒ’）$_4^+$（ここで、Ｒ’は、独立してＨ又はＣ$_{1-4}$アルキル、例えばアンモニウム、トリスである）］、例えばイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、エタノールアミン、２－ジエチルアミノエタノール、トリメタミン、ジシクロヘキシルアミン、リジン、アルギニン、ヒスチジン、カフェイン、プロカイン、ヒドラバミン、コリン、ベタイン、エチレンジアミン、グルコサミン、メチルグルカミン、テオブロミン、プリン、ピペラジン、ピペリジン、Ｎ－エチルピペリジン、ポリアミン樹脂などを含む有機非毒性塩基が挙げられる。特に好ましい有機非毒性塩基は、イソプロピルアミン、ジエチルアミン、エタノールアミン、トリメタミン、ジシクロヘキシルアミン、コリン及びカフェインである。

【０１４９】

本発明で用いることができるさらなる薬学的に許容される酸及び塩基としては、アミノ酸、例えばヒスチジン、グリシン、フェニルアラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、

リジン及びアスパラギンに由来するものが挙げられる。

【０１５０】

「薬学的に許容される」バッファー及び塩としては、上記の酸及び塩基の酸及び塩基付加塩の両方に由来するものが挙げられる。具体的なバッファー及び／又は塩としては、ヒスチジン、コハク酸塩及び酢酸塩が挙げられる。

【０１５１】

「薬学的に許容される糖」は、目的のタンパク質と混合した場合に、貯蔵の際のタンパク質の化学的及び／又は物理的不安定性を著しく妨げるか又は低減する分子である。製剤を凍結乾燥させ、次いで再構成することを目的とする場合、「薬学的に許容される糖類」は、「凍結乾燥保護剤」としても知られる。例示的糖類及び対応する糖アルコールとしては、グルタミン酸１ナトリウム又はヒスチジンのようなアミノ酸；ベタインのようなメチルアミン；硫酸マグネシウムのようなリオトロピックな塩；三価又はそれより高い分子量の糖アルコールのようなポリオール、例えばグリセリン、デキストラン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）；及びそれらの混合物が挙げられる。さらなる例示的な凍結乾燥保護剤としては、グリセリン及びゼラチン、並びに糖類メリビオース、メレジトース、ラフィノース、マンノトリオース及びスタキオースが挙げられる。還元糖類としては、例えば、グルコース、マルトース、ラクトース、マルチュロース、イソマルチュロース及びラクチュロースが挙げられる。非還元糖類としては、糖アルコール及び他の直鎖多価アルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元グリコシドが挙げられる。好ましい糖アルコールは、モノグリコシド、特にラクトース、マルトース、ラクチュロース及びマルチュロースのような二糖類の還元により得られる化合物である。グリコシド側鎖は、グルコシド又はガラクトシドの何れかであり得る。糖アルコールのさらなる例は、グルシトール、マルチトール、ラクチトール及びイソマルチュロースである。好ましい薬学的に許容される糖類は、非還元糖類トレハロース又はショ糖である。薬学的に許容される糖類は、タンパク質がその物理的及び化学的な安定性及び完全性を貯蔵中（例えば再構成及び貯蔵の後）に本質的に保持することを意味する「保護量」（例えば凍結乾燥前）で製剤に加えられる。

【０１５２】

目的の「希釈剤」は、本明細書において、薬学的に許容され（ヒトへの投与について安全で非毒性である）、液体製剤の調製物、例えば凍結乾燥後に再構成される製剤のために有用であるものである。例示的な希釈剤は、滅菌水、静菌性の注射用水（ＢＷＦＩ）、ｐＨ緩衝溶液（例えばリン酸緩衝生理食塩水／食塩水）、滅菌生理食塩／食塩水溶液、リンゲル液又はデキストローズ溶液を含む。代替の実施態様では、希釈剤は、塩の水性溶液及び／又はバッファーを含み得る。

【０１５３】

「保存剤」は、細菌の活性を低減するために本明細書における製剤に加えることができる化合物である。保存剤の添加は、例えば、複数使用（複数回用量）製剤の製造を容易にすることがある。可能性のある保存剤としては、例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロライド、ベンザルコニウムクロライド（アルキル基が長鎖化合物であるアルキルベンジルジメチルアンモニウムクロライドの混合物）及びベンゼトニウムクロライドが挙げられる。他の型の保存剤としては、芳香族アルコール、例えばフェノール、ブチル及びベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、３－ペンタノール及びｍ－クレゾールが挙げられる。本明細書において最も好ましい保存剤は、ベンジルアルコールである。

【０１５４】

「個体」又は「対象」又は「患者」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、それらに限定されないが、家畜動物(例えばウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類(例えばヒト及びサルのような非ヒト霊長類)、ウサギ及びげっ歯類(例えばマウス及びラット)が

挙げられる。ある特定の実施態様では、個体又は対象は、ヒトである。

【０１５５】

本明細書で用いる場合、「治療」（及び「治療する（ｔｒｅａｔ）」又は「治療する（ｔｒｅａｔｉｎｇ）」のようなその文法的変形）は、臨床病理学の経過中に治療される個体、組織又は細胞の自然の経過を改変するように設計された臨床介入のことをいう。治療の望ましい効果としては、それらに限定されないが、疾患進行の速度の減少、病態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善（全ては医師のような当業者により測定可能である）が挙げられる。一実施態様では、治療は、症状の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的帰結の漸減、感染性疾患の進行速度の減少、病態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善を意味し得る。一部の実施態様では、本発明の抗体を用いて、疾患の発生を遅らせるか、又は感染性疾患の進行を遅くする。

【０１５６】

本明細書で用いる場合、「ともに」は、ある治療モダリティーを別の治療モダリティーに加えて施与することをいう。したがって、「ともに」は、ある治療モダリティーを、個体に対して、別の治療モダリティーの施与の前、施与中又は施与の後に施与することをいう。

【０１５７】

用語「ファゴソーム」は、食作用細胞の、内部移行され、膜で囲まれた細胞内小胞のことをいう。これは、直接的、抗体増進、又は補体増進食作用により開始できる。用語「ファゴリソソーム」は、一又は複数のリソソームと融合した、内部移行された細胞小胞のことをいう。

【０１５８】

細菌は、伝統的に、グラム染料の保持に基づいて２つの主な群、グラム陽性（Ｇｍ＋）及びグラム陰性（Ｇｍ－）に分けられる。グラム陽性細菌には、単一単位脂質膜を境界とし、グラム染料を保持する役割を果たす厚い（２０－８０ｎｍ）ペプチドグリカン層を一般的に含む。グラム陽性細菌は、グラム染色により濃い青色又は紫色に染色されるものである。対照的に、グラム陰性細菌は、クリスタルバイオレット染料を保持できず、代わりに、対比染色（サフラニン又はフクシン）を取り込み、赤色又はピンク色になる。グラム陽性細胞壁は、典型的に、グラム陰性細菌で見出される外膜を欠く。

【０１５９】

用語「菌血症」は、血流中の細菌の存在のことをいい、これは、血液培養により最も一般的に検出される。細菌は、感染症（例えば肺炎又は髄膜炎）の重度の合併症として、手術中（特に消化管のような粘膜が関与する場合）、又は動脈若しくは静脈に侵入するカテーテル及びその他の外来物体を原因として血流中に侵入できる。菌血症は、いくつかの帰結をもたらし得る。細菌への免疫応答は、敗血症及び敗血症性ショックを引き起こすことができ、これらは比較的高い死亡率を有する。細菌は、体の他の部分に広がるために血液を用いることもでき、感染症が元の感染部位から離れることを引き起こす。例えば、心内膜炎又は骨髄炎が挙げられる。

【０１６０】

「治療有効量」は、特定の障害の測定可能な改善をもたらすために必要な最小限の濃度である。治療有効量は、本明細書において、患者の病状、年齢、性別及び体重、並びに個体において所望の応答を引き起こすための抗体の能力のような因子によって変動し得る。治療有効量は、抗体の任意の毒性又は有害な影響よりも治療的に有益な効果が勝ることでもある。一実施態様では、治療有効量は、インビボ感染症において菌血症を低減するために効果的な量である。一態様では、「治療有効量」は、少なくとも、血液のような患者試料から単離された細菌負荷又はコロニー形成単位（ＣＦＵ）を、薬物投与の前と比べて少なくとも１ｌｏｇ低減するのに効果的な量である。より具体的な態様では、低減は、少なくとも２ｌｏｇである。別の態様では、低減は、３、４、５ｌｏｇである。さらに別の態様では、低減は、検出可能なレベルより低い。別の実施態様では、治療有効量は、治療期間にわたって与えられる一又は複数回の投与におけるＡＡＣの量であって、感染した患者

の治療の前又は治療の開始時のポジティブな血液培養と比較して、ネガティブな血液培養（すなわちＡＡＣの標的である細菌が成長しない）を達成する量である。

【０１６１】

「予防有効量」は、必要な投与量及び投与期間にて、所望の予防的結果を達成するのに効果的な量のことをいう。必ずではないが、通常、予防的用量は疾患の前、疾患の早期段階又は感染症の危険性が上昇する状態への曝露の前にさえ対象において用いられるため、予防有効量は、治療有効量未満であり得る。一実施態様では、予防有効量は、少なくとも、感染症の出現又はある細胞から別の細胞への感染症の広がりを低減し、妨げるのに効果的な量である。

【０１６２】

「慢性」投与は、急性の形態に対して、初期の治療効果（活性）を長期間維持するような連続的な医薬の投与のことをいう。「間欠的」投与は、中断なく連続的に行うのではなく、むしろ周期的な治療である。

【０１６３】

用語「添付文書」は、市販の治療用製品の包装に通常含まれる指示書のことをいうために用い、適応症、使用法、投与量、投与、併用療法、禁忌及び／又はそのような治療用製品の使用に関する注意に関する情報を含む。

【０１６４】

用語「キラル」は、鏡像パートナーと重ね合わせることができない特性を有する分子のことをいい、用語「アキラル」は、それらの鏡像パートナーと重ね合わせることができる分子のことをいう。

【０１６５】

用語「立体異性体」は、同一の化学構成を有するが、空間における原子又は基の配置に関して異なる化合物のことをいう。

【０１６６】

「ジアステレオマー」は、２つ以上のキラル中心を有する立体異性体であって、それらの分子が互いに鏡像でない異性体のことをいう。ジアステレオマーは、異なる物理的特性、例えば融点、沸点、スペクトル特性及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動及びクロマトグラフィーのような高分解能の分析手順の下で分離できる。

【０１６７】

「光学異性体」は、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の２つの立体異性体のことをいう。

【０１６８】

本明細書で用いる立体化学の定義及び慣習は、全般的に、Ｓ．Ｐ．Ｐａｒｋｅｒ編、ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｄｉｃｔｉｏｎａｒｙ ｏｆ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｔｅｒｍｓ（１９８４）ＭｃＧｒａｗ－Ｈｉｌｌ Ｂｏｏｋ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ；及びＥｌｉｅｌ，Ｅ．及びＷｉｌｅｎ，Ｓ．、Ｓｔｅｒｅｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｓ（１９９４）Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋに従う。多くの有機化合物が光学活性形で存在し、すなわち、これらは、平面偏光を回転させる能力を有する。光学活性化合物について記載する場合、接頭辞Ｄ及びＬ、又はＲ及びＳを用いて、キラル中心についての分子の絶対的立体構造を示す。接頭辞ｄ及びｌ、又は（＋）及び（－）を用いて、化合物による平面偏光の回転の記号を示し、（－）又はｌは、化合物が左旋性であることを意味する。（＋）又はｄを接頭辞として有する化合物は、右旋性である。与えられた化学構造について、これらの立体異性体は、互いに鏡像である以外は同一である。具体的な立体異性体は、光学異性体とも呼ばれ、このような異性体の混合物は、頻繁に光学異性体混合物と呼ばれる。光学異性体の５０：５０混合物は、ラセミ混合物又はラセミ体と呼ばれ、これは、化学反応又はプロセスにおいて立体選択又は立体特異性がなかった場合に生じることがある。用語「ラセミ混合物」及び「ラセミ体」は、光学活性がない２つの光学異性体種の等モル混合物のことをいう。

【０１６９】
用語「保護基」は、他の官能基が化合物と反応する間に特定の機能性をブロック又は保護するために通常用いられる置換基のことをいう。例えば、「アミノ保護基」は、化合物におけるアミノ機能性をブロック又は保護するアミノ基と結合する置換基である。適切なアミノ保護基としては、それらに限定されないが、アセチル、トリフルオロアセチル、ｔ－ブトキシカルボニル（ＢＯＣ）、ベンジルオキシカルボニル（ＣＢＺ）及び９－フルオレニルメチレンオキシカルボニル（Ｆｍｏｃ）が挙げられる。保護基及びそれらの使用についての全般的な説明について、Ｔ．Ｗ．Ｇｒｅｅｎｅ、Ｐｒｏｔｅｃｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐｓ ｉｎ Ｏｒｇａｎｉｃ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９１又は後続の版を参照されたい。

【０１７０】
用語「約」は、本明細書で用いる場合、この技術分野における当業者に容易に知られる、それぞれの値の通常の誤差範囲のことをいう。本明細書における値又はパラメータの「約」との言及は、その値又はパラメータ自体に向けられる実施態様を含む（そして記載する）。

【０１７１】
本明細書及び添付の特許請求の範囲で用いる場合、単数形「１つの（ａ）」、「１つの（ａｎ）」及び「その（ｔｈｅ）」は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の言及も含む。例えば、「抗体」への言及は、モル量のような１から多くの抗体までに対する言及であり、当業者に知られるその等価物を含む、などである。

【０１７２】
ＩＩＩ．組成物及び方法
抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）
本発明のＡＡＣ化合物は、ブドウ球菌を含むいくつかのヒト及び獣医学的グラム陽性、グラム陰性病原体に対して効果的な、抗菌活性を有するものを含む。例示的な実施態様では、ＡＡＣ化合物は、リファマイシン型抗生物質部分にコンジュゲートした、すなわちリンカーにより共有結合した、システイン操作抗体を含む。リファマイシン型抗生物質部分の生物活性は、抗体へのコンジュゲーションによりモジュレートされる。本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）は、感染部位へ有効用量の抗菌物質を選択的に送達し、そのことにより、治療指数（「治療ウィンドウ」）を増やしながら、より大きい選択性、すなわちより低い有効用量を達成できる。

【０１７３】
本発明は、従来の抗生物質療法を逃れる細菌の集団を標的にすることにより、抗生物質回避を妨げることを目的とする新規な抗菌療法を提供する。この新規な抗菌療法は、黄色ブドウ球菌（ＭＲＳＡを含む）上で見出される細胞壁成分に特異的な抗体が、効力がある抗生物質（リファマイシンの誘導体）と化学結合した抗体抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）を用いて達成される。抗生物質は、抗体に、プロテアーゼにより切断可能なペプチドリンカーを介してつながれ、該リンカーは、ほとんどの型の哺乳動物細胞で見出されるリソソームプロテアーゼであるカテプシンＢにより切断されるように設計されている（Dubowchikら(2002) Bioconj. Chem. 13:855-869）。ＡＡＣは、リンカーが切断されるまで抗生物質が不活性である（抗体のサイズが大きいことによる）プロドラッグとして作用する。自然の感染において見出される著しい割合の黄色ブドウ球菌が宿主における感染症の経過中のある時点にて宿主細胞、主に好中球及びマクロファージにより取り込まれるため、宿主細胞内で費やされる時間は、細菌が抗生物質活性を逃れる著しい機会を提供する。本発明のＡＡＣは、黄色ブドウ球菌と結合し、細菌が宿主細胞により取り込まれた後にファゴリソソーム内で抗生物質を放出する。この機序により、ＡＡＣは、活性な抗生物質を、黄色ブドウ球菌が従来の抗生物質によりうまく治療されない場所において特異的に濃縮できる。本発明は何れの特定の作用機序によっても限定又は定義されないが、ＡＡＣは、３つの可能性のある機序により抗生物質活性を改善する。（１）ＡＡＣは、抗生物質を、細菌を取り込む哺乳動物細胞の内部に送達することにより、細菌が隔離されるファゴリソソ

ーム内にあまり拡散しない抗生物質の力価を増加する。（２）ＡＡＣは細菌をオプソニン化し（そのことにより、食作用細胞による遊離細菌の取り込みが増加する）、抗生物質を局所的に放出して、細菌がファゴリソソームに隔離されている間に細菌を死滅させる。（３）ＡＡＣは、抗生物質を抗体と結合させることにより、抗生物質のインビボ半減期を改善する（改善された薬物動態）。ＡＡＣの薬物動態の改善により、全身投与する必要がある抗生物質の全体的な用量を制限しながら、黄色ブドウ球菌が濃縮された領域に十分な抗生物質を送達できる。この特性は、最小限の抗生物質副作用で、持続的な感染症を標的にするＡＡＣを用いる長期療法を可能にする。

【０１７４】

本出願は、新規なコンジュゲート抗ＷＴＡ抗体治療剤及び黄色ブドウ球菌感染症を含むグラム陽性（Ｇｍ＋）細菌感染症の治療におけるそれらの使用について記載する。これらの抗体は、従来の抗生物質療法を逃れるＧｍ＋細菌の集団を標的にできる。

【０１７５】

本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物は、リファマイシン型抗生物質とペプチドリンカーにより共有結合した抗細胞壁タイコ酸ベータ（ＷＴＡベータ）抗体を含む。

【０１７６】

一実施態様では、抗体－抗生物質コンジュゲートは、式：

$Ab-(L-abx)_p$

（式中、

Ａｂは、抗細胞壁タイコ酸抗体であり、

Ｌは、式：

－Ｓｔｒ－Ｐｅｐ－Ｙ－

（式中、Ｓｔｒは、ストレッチャー単位であり、Ｐｅｐは、２から１２アミノ酸残基のペプチドであり、Ｙは、スペーサー単位である）

を有するペプチドリンカーであり、

ａｂｘは、リファマイシン型抗生物質であり、

ｐは、１から８の整数である）

を有する。

【０１７７】

反応性リンカー部分を介して抗体分子にコンジュゲートできる抗生物質部分の数は、本明細書に記載する方法による導入できる遊離のシステイン残基の数により制限され得る。式Ｉの例示的ＡＡＣは、よって、１、２、３又は４つの操作されたシステインアミノ酸を有する抗体を含む（Lyon, R.ら(2012) Methods in Enzym. 502:123-138）。

【０１７８】

抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体

黄色ブドウ球菌を含むいくつかのＧｍ＋細菌上で発現されるＷＴＡと結合するある特定の抗ＷＴＡ　Ａｂ及びコンジュゲート抗ＷＴＡ抗体が、本明細書で開示される。抗ＷＴＡ抗体は、ＵＳ８２８３２９４；Ｍｅｉｊｅｒ　ＰＪら（２００６）Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．３５８（３）：７６４－７２；Ｌａｎｔｔｏ　Ｊら（２０１１）Ｊ　Ｖｉｒｏｌ．８５（４）：１８２０－３３及び以下の実施例２１で教示する方法により選択して生成できる。本発明は、これらの抗ＷＴＡ　Ａｂの組成物を提供する。

【０１７９】

グラム陽性細菌の細胞壁は、細胞膜を安定化するだけでなく、他の分子が結合できる多くの部位も提供する複数のペプチドグリカン（ＰＧＮ）の鞘の厚い層から構成される（図３）。これらの細胞表面糖タンパク質の主なクラスは、タイコ酸（「ＴＡ」）であり、これは、多くのグリカン結合タンパク質（ＧＰＢ）上で見出されるホスフェートに富む分子である。ＴＡには２種類ある：（１）原形質膜に係留され、細胞表面からペプチドグリカン層まで延びるリポタイコ酸（「ＬＴＡ」）、及び（２）ペプチドグリカンと共有結合し、細胞壁全体及び細胞壁を超えて延びる細胞壁ＴＡ（ＷＴＡ）（図３）。ＷＴＡは、ＧＰＢにおける全細胞壁質量の６０％ほど多くを占めることができる。その結果、これは、高

度に発現される細胞表面抗原となる。

【０１８０】

ＷＴＡの化学構造は、生物体の間で変動する。黄色ブドウ球菌では、ＷＴＡは、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）－１－Ｐ及びＮ－アセチルマンノースアミン（ＭａｎＮＡｃ）から構成される二糖を介してＮ－アセチルムラミン酸（ＭｕｒＮＡｃ）の６－ＯＨと共有結合し、その後に約２又は３単位のグリセロールリン酸が続く（図４）。実際のＷＴＡポリマーは、次いで、約１１－４０のリビトールリン酸（Ｒｂｏ－Ｐ）反復単位から構成される。ＷＴＡの段階的合成は、まず、ＴａｇＯと呼ばれる酵素により開始され、（遺伝子の欠失により）ＴａｇＯ遺伝子を欠く黄色ブドウ球菌株は、ＷＴＡを作らない。反復単位は、Ｃ２－ＯＨにてＤ－アラニン（Ｄ－Ａｌａ）及び／又はＣ４－ＯＨ位にてＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）で、α－（アルファ）又はβ－（ベータ）グリコシド結合を介してさらに調整することができる。黄色ブドウ球菌株又は細菌の増殖期に応じて、グリコシド結合は、α－、β－又は２つのアノマーの混合物であり得る。これらのＧｌｃＮＡｃ糖修飾は、２つの特異的な黄色ブドウ球菌由来グリコシルトランスフェラーゼ（Ｇｔｆ）により調整され、ＴａｒＭ　Ｇｔｆはα－グリコシド結合を媒介し、ＴａｒＳ　Ｇｔｆは、β－（ベータ）グリコシド結合を媒介する。

【０１８１】

ＭＲＳＡの細胞内貯蔵物が抗生物質から保護されることを示す著しい証拠があることに鑑みて、本発明の新規な治療組成物は、黄色ブドウ球菌特異的抗体を用いて、細菌が宿主細胞によりインビボで飲み込まれるか又は内部移行された場合に抗生物質を一緒に宿主細胞内に持ち込むように抗生物質を細菌につなぎとめることによりこの方法での抗生物質回避を妨げるように開発された。

【０１８２】

一態様では、本発明は、抗ＷＴＡα又は抗ＷＴＡβである抗ＷＴＡ抗体を提供する。別の態様では、本発明は、抗黄色ブドウ球菌Ａｂを提供する。例示的Ａｂは、黄色ブドウ球菌感染患者からのＢ細胞からクローニングされた（実施例２１で教示するように）。一実施態様では、抗ＷＴＡ及び抗黄色ブドウ球菌Ａｂは、ヒトモノクローナル抗体である。本発明は、本発明のＷＴＡ　ＡｂのＣＤＲを含むキメラＡｂ及びヒト化Ａｂを包含する。

【０１８３】

治療的使用のために、抗生物質にコンジュゲートしてＡＡＣを作製するための本発明のＷＴＡ　Ａｂは、ＩｇＭ以外の任意のアイソタイプのものであり得る。一実施態様では、ＷＴＡ　Ａｂは、ヒトＩｇＧアイソタイプのものである。より具体的な実施態様では、ＷＴＡ　Ａｂは、ヒトＩｇＧ１である。

【０１８４】

図６Ａ及び６Ｂは、抗ＷＴＡα又は抗ＷＴＡβであるＡｂを列挙する。明細書及び図面を通して、４桁の数字（例えば４４９７）で示すＡｂは、先行する「Ｓ」とともに例えばＳ４４９７ということもあり、両方の名称は、抗体の野生型（ＷＴ）の非修飾の配列である同じ抗体のことをいう。抗体の変異体は、抗体番号の後に「ｖ」で例えば４４９７．ｖ８と示す。特に明記しない限り（例えば変異体番号によるような）、示すアミノ酸配列は、元の非修飾／未改変の配列である。これらのＡｂは、野生型で非修飾の抗体と比較して抗原との結合親和性を実質的にほぼ同じに保つか又は改善しながら、例えばｐＫ、安定性、発現、製造しやすさ（例えば以下の実施例に記載するように）を改善するために、一又は複数の残基にて改変できる。保存的アミノ酸置換を有する本発明のＷＴＡ抗体の変異体は、本発明に包含される。以下、そうでないと明記しない限り、ＣＤＲ番号付けは、カバットに従い、定常ドメイン番号付けは、ＥＵ番号付けに従う。

【０１８５】

図１３Ａ及び図１３Ｂは、４つのヒト抗ＷＴＡアルファ抗体のそれぞれ軽鎖可変領域（ＶＬ）及び重鎖可変領域（ＶＨ）のアミノ酸配列アラインメントを示す。カバット番号付けに従うＣＤＲ配列ＣＤＲ　Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３及びＣＤＲ　Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３に下線を付す。

表6A:抗WTAαの軽鎖CDR配列

抗体	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4461	KSSQSVLSRANNNYYVA (配列番号1)	WASTREF (配列番号2)	QQYYTSRRT (配列番号3)
4624	RSNQNLLSSSNNNYLA (配列番号7)	WASTRES (配列番号8)	QQYYANPRT (配列番号9)
4399	KSNQNVLASSNDKNYLA (配列番号13)	WASIRES (配列番号14)	QQYYTNPRT (配列番号15)
6267	KSSQNVLYSSNNKNYLA (配列番号19)	WASTRES (配列番号20)	QQYYTSPPYT (配列番号21)

表6B:抗WTAαの重鎖CDR配列

抗体	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4461	DYYMH (配列番号4)	WINPKSGGTNYAQRFQG (配列番号5)	DCGSGGLRDF (配列番号6)
4624	DYYIH (配列番号10)	WINPNTGGTYYAQKFRD (配列番号11)	DCGRGGLRDI (配列番号12)
4399	DYYIH (配列番号16)	WINPNTGGTNYAQKFQG (配列番号17)	DCGNAGLRDI (配列番号18)
6267	SYWIG (配列番号22)	IIHPGDSKTRYSPSFQG (配列番号23)	LYCSGGSCYSDR AFSSLGAGGYYY YGMGV (配列番号24)

【０１８６】

ＶＬ及びＶＨのそれぞれの対の配列は、以下のとおりである。

４４６１軽鎖可変領域

ＤＩＱＭＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＫＳＳＱＳＶＬＳＲＡＮＮＮＹＹＶＡＷＹＱＨＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＥＦＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＮＳＬＱＡＥＤＶＡＶＹＹＣＱＱＹＹＴＳＲＲＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号２５）

４４６１重鎖可変領域

ＱＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＲＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＳＦＴＤＹＹＭＨＷＶＲＱＡＰＧＱＧＬＥＷＭＧＷＩＮＰＫＳＧＧＴＮＹＡＱＲＦＱＧＲＶＴＭＴＧＤＴＳＩＳＡＡＹＭＤＬＡＳＬＴＳＤＤＴＡＶＹＹＣＶＫＤＣＧＳＧＧＬＲＤＦＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号２６）

４６２４軽鎖可変領域

ＤＩＱＭＴＱＳＰＤＳＬＳＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＲＳＮＱＮＬＬＳＳＳＮＮＮＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＱＰＬＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＡＥＤＶＡＶＹＹＣＱＱＹＹＡＮＰＲＴＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号２７）

４６２４重鎖可変領域

ＱＶＱＬＱＱＳＲＶＥＶＫＲＰＧＴＳＶＫＶＳＣＫＴＳＧＹＴＦＳＤＹＹＩＨＷＶＲＬＡＰＧＱＧＬＥＬＭＧＷＩＮＰＮＴＧＧＴＹＹＡＱＫＦＲＤＲＶＴＭＴＲＤＴＳＩＡＴＡＹＬＥＭＳＳＬＴＳＤＤＴＡＶＹＹＣＡＫＤＣＧＲＧＧＬＲＤＩＷＧＰＧＴＭＶＴＶＳＳ（配列番号２８）

４３９９軽鎖可変領域

ＥＩＶＬＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＫＳＮＱＮＶＬＡＳＳＮＤＫＮＹＬＡＷＦＱＨＫＰＧＱＰＬＫＬＬＩＹＷＡＳＩＲＥＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴ

ＩＳＳＬＲＡＥＤＶＡＶＹＹＣＱＱＹＹＴＮＰＲＴＦＧＱＧＴＫＶＥＦＮ（配列番号２９）

４３９９重鎖可変領域

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＴＳＶＫＶＳＣＫＡＳＧＹＴＦＴＤＹＹＩＨＷＶＲＬＡＰＧＱＧＬＥＬＭＧＷＩＮＰＮＴＧＧＴＮＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＭＴＲＤＴＳＩＡＴＡＹＭＥＬＳＳＬＴＳＤＤＴＡＶＹＹＣＡＫＤＣＧＮＡＧＬＲＤＩＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号３０）

６２６７軽鎖可変領域

ＤＩＱＬＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＫＳＳＱＮＶＬＹＳＳＮＮＫＮＹＬＡＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＷＡＳＴＲＥＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＳＧＴＤＦＴＬＴＩＳＳＬＱＡＥＤＶＡＶＹＹＣＱＱＹＹＴＳＰＰＹＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＥ（配列番号３１）

６２６７重鎖可変領域

ＥＶＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＥＳＬＫＩＳＣＫＧＳＧＹＳＦＴＳＹＷＩＧＷＶＲＱＭＰＧＫＧＬＥＷＭＧＩＩＨＰＧＤＳＫＴＲＹＳＰＳＦＱＧＱＶＴＩＳＡＤＫＳＩＳＴＡＹＬＱＷＮＳＬＫＡＳＤＴＡＭＹＹＣＡＲＬＹＣＳＧＧＳＣＹＳＤＲＡＦＳＳＬＧＡＧＧＹＹＹＹＧＭＧＶＷＧＱＧＴＴＶＴＶＳＳ（配列番号３２）。

【０１８７】

本発明は、軽鎖及びＨ鎖を含む細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）と結合する単離モノクローナル抗体であって、Ｌ鎖が、ＣＤＲ　Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３を含み、Ｈ鎖が、ＣＤＲ　Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３を含み、ＣＤＲ　Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３及びＨ１、Ｈ２、Ｈ３が、表６Ａ及び６Ｂに示すように、それぞれＡｂ４４６１（配列番号１－６）、４６２４（配列番号７－１２）、４３９９（配列番号１３－１８）及び６２６７（配列番号１９－２４）のそれぞれのＣＤＲのアミノ酸配列を含む、単離抗ＷＴＡモノクローナル抗体を提供する。

【０１８８】

別の実施態様では、ＷＴＡと結合する単離モノクローナルＡｂは、Ｈ鎖可変領域（ＶＨ）及びＬ鎖可変領域（ＶＬ）を含み、ＶＨは、それぞれ抗体４４６１、４６２４、４３９９及び６２６７のそれぞれのＶＨ領域配列の全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する。さらに別の具体的な態様では、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％である。

【０１８９】

本発明は、図１４に示すＬ及びＨ鎖ＣＤＲ配列を含む抗ＷＴＡベータＡｂも提供する。一実施態様では、単離抗ＷＴＡベータモノクローナルＡｂは、図１４中の１３個のＡｂのそれぞれのＣＤＲからなる群から選択されるＣＤＲ　Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３及びＨ１、Ｈ２、Ｈ３を含む。別の実施態様では、本発明は、１３個の抗体のそれぞれのＶ領域ドメインの全長にわたって少なくとも９５％の配列同一性を有する単離抗ＷＴＡベータＡｂを提供する。さらに別の具体的な態様では、配列同一性は、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％である。

【０１９０】

１３個の抗ＷＴＡベータＡｂのうち、６０７８及び４４９７は、ｉ）リンカー－抗生物質中間体へのコンジュゲーションのためにＬ及びＨ鎖の一方又は両方に操作されたＣｙｓを有し、ｉｉ）Ｈ鎖の最初の残基ＱがＥ（ｖ２）に、又は最初の２残基ＱＭがＥＩ又はＥＶ（ｖ３及びｖ４）に変更された変異体を創出するように修飾された。

【０１９１】

図１５Ａ－１及び１５Ａ－２は、抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及びその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４の完全長Ｌ鎖のアミノ酸配列を示す。操作されたＣｙｓを含むＬ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第２０５番）により示す。変異体の命名、例えばｖ２ＬＣ－Ｃｙｓは、Ｌ鎖中に操作されたＣｙｓを含む変異体２を意味する。ＨＣＬＣ－Ｃｙｓは、抗体のＨ及びＬ鎖の両方が操作されたＣｙｓを含むことを意味する。図１５Ｂ－１から１５Ｂ－４は、抗ＷＴＡベータＡｂ６０７８（非修飾）及

びＨ鎖の最初の残基又は最初の２残基に変更を有するその変異体ｖ２、ｖ３、ｖ４の完全長Ｈ鎖のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（ＥＵ残基第１１８番）により示す。

６０７８軽鎖可変領域（ＶＬ）

ＤＩＶＭＴＱＳＰＳＩＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＴＩＳＧＷＬＡＷＹＱＱＫＰ
ＡＥＡＰＫＬＬＩＹＫＡＳＴＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＧＩＹＹＣＱＱＹＫＳＹＳＦＮＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫ（配列番号１１１）

６０７８重鎖可変領域（ＶＨ）

ＸＸ$_1$ＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＥＡＳＧＹＴＬＴＳＹＤＩＮＷＶＲＱ
ＡＴＧＱＧＰＥＷＭＧＷＭＮＡＮＳＧＮＴＧＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＬＴＧＤＴＳＩＳＴＡ
ＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＳＩＬＶＲＧＡＬＧＲＹＦＤＬＷＧＲＧＴＬ
ＶＴＶＳＳ（配列番号１１２）

（ここで、Ｘは、Ｑ又はＥであり、Ｘ$_1$は、Ｍ、Ｉ又はＶである）。

６０７８軽鎖

ＤＩＶＭＴＱＳＰＳＩＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＴＩＳＧＷＬＡＷＹＱＱＫＰ
ＡＥＡＰＫＬＬＩＹＫＡＳＴＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＧＩＹＹＣＱＱＹＫＳＹＳＦＮＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１１３）

６０７８システイン操作軽鎖

ＤＩＶＭＴＱＳＰＳＩＬＳＡＳＶＧＤＲＶＴＩＴＣＲＡＳＱＴＩＳＧＷＬＡＷＹＱＱＫＰ
ＡＥＡＰＫＬＬＩＹＫＡＳＴＬＥＳＧＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳＧＴＥＦＴＬＴＩＳＳＬＱＰ
ＤＤＦＧＩＹＹＣＱＱＹＫＳＹＳＦＮＦＧＱＧＴＫＶＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰ
ＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱ
ＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧ
ＬＳＳＰＣＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１１５）

６０７８ＷＴ完全長重鎖

ＱＭＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＥＡＳＧＹＴＬＴＳＹＤＩＮＷＶＲＱＡ
ＴＧＱＧＰＥＷＭＧＷＭＮＡＮＳＧＮＴＧＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＬＴＧＤＴＳＩＳＴＡＹ
ＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＳＩＬＶＲＧＡＬＧＲＹＦＤＬＷＧＲＧＴＬＶ
ＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰ
ＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬ
ＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥ
ＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶ
ＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷ
ＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰ
ＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴ
ＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨ
ＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（配列番号１１４）

６０７８変異体（ｖ２、ｖ３又はｖ４）完全長重鎖

ＥＸＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＥＡＳＧＹＴＬＴＳＹＤＩＮＷＶＲＱＡ
ＴＧＱＧＰＥＷＭＧＷＭＮＡＮＳＧＮＴＧＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＬＴＧＤＴＳＩＳＴＡＹ
ＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＳＩＬＶＲＧＡＬＧＲＹＦＤＬＷＧＲＧＴＬＶ
ＴＶＳＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰ
ＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬ
ＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥ
ＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶ
ＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷ
ＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰ

ＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（配列番号１１６）（ここで、Ｘは、Ｍ、Ｉ又はＶであり得る）。

６０７８変異体（ｖ２、ｖ３又はｖ４）Ｃｙｓ操作重鎖

ＥＸＱＬＶＱＳＧＡＥＶＫＫＰＧＡＳＶＫＶＳＣＥＡＳＧＹＴＬＴＳＹＤＩＮＷＶＲＱＡＴＧＱＧＰＥＷＭＧＷＭＮＡＮＳＧＮＴＧＹＡＱＫＦＱＧＲＶＴＬＴＧＤＴＳＩＳＴＡＹＭＥＬＳＳＬＲＳＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＳＳＩＬＶＲＧＡＬＧＲＹＦＤＬＷＧＲＧＴＬＶＴＶＳＳＣＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧ（配列番号１１７）（ここで、Ｘは、Ｍ、Ｉ又はＶである）。

【０１９２】

一実施態様では、本発明は、重鎖及び軽鎖を含む単離抗ＷＴＡベータ抗体であって、重鎖が、配列番号１１２と少なくとも９５％の配列同一性を有するＶＨを含む、単離抗ＷＴＡベータ抗体を提供する。追加の実施態様では、この抗体は、配列番号１１１と少なくとも９５％の配列同一性を有するＶＬをさらに含む。具体的な実施態様では、抗ＷＴＡベータ抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、Ｌ鎖は、配列番号１１１のＶＬを含み、Ｈ鎖は、配列番号１１２のＶＨを含む。さらにより具体的な実施態様では、単離抗ＷＴＡベータ抗体は、配列番号１１３のＬ鎖及び配列番号１１４のＨ鎖を含む。

【０１９３】

６０７８　Ｃｙｓ操作Ｈ及びＬ鎖変異体を以下の組み合わせの何れかでペアリングして、リンカーＡｂｘ中間体にコンジュゲートして本発明の抗ＷＴＡ　ＡＡＣを作製するための全長Ａｂを形成できる。非修飾のＬ鎖（配列番号１１３）は、配列番号１１７のＣｙｓ操作Ｈ鎖変異体とペアリングでき、変異体は、ＸがＭ、Ｉ又はＶであるものであり得る。配列番号１１５のＣｙｓ操作Ｌ鎖は、配列番号１１４のＨ鎖、配列番号１１６のＨ鎖変異体又は配列番号１１７のＣｙｓ操作Ｈ鎖変異体（このバージョンでは、Ｈ及びＬ鎖の両方がＣｙｓ操作されている）とペアリングできる。特定の実施態様では、本発明の抗ＷＴＡベータ抗体及び抗ＷＴＡベータＡＡＣは、配列番号１１５のＬ鎖及び配列番号１１６のＨ鎖を含む。

【０１９４】

図１６Ａ－１及び１６Ａ－２は、抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びそのｖ８変異体の完全長Ｌ鎖を示す。操作されたＣｙｓを含むＬ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（ＥＵ残基第２０５番）により示す。図１６Ｂ－１、１６Ｂ－２、１６Ｂ－３は、抗ＷＴＡベータＡｂ４４９７（非修飾）及びＣＤＲ　Ｈ３の９６位にてＤがＥに改変され、操作されたＣｙｓを有するか又は有さないそのｖ８変異体の完全長Ｈ鎖のアラインメントを示す。操作されたＣｙｓを含むＨ鎖変異体は、定常領域の端の黒い箱の中のＣ（この場合、ＥＵ残基第１１８番）により示す。非修飾のＣＤＲ　Ｈ３は、ＧＤＧＧＬＤＤ（配列番号１０４）であり、４４９７ｖ８　ＣＤＲ　Ｈ３は、ＧＥＧＧＬＤＤ（配列番号１１８）である。

４４９７軽鎖可変領域

ＤＩＱＬＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＫＳＳＱＳＩＦＲＴＳＲＮＫＮＬＬＮＷＹＱＱＲＰＧＱＰＰＲＬＬＩＨＷＡＳＴＲＫＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＦＧＴＤＦＴＬＴＩＴＳＬＱＡＥＤＶＡＩＹＹＣＱＱＹＦＳＰＰＹＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫ（配列番号１１

９）
４４９７重鎖可変領域
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＳＡＳＧＦＳＦＮＳＦＷＭＨＷＶＲＱＶ
ＰＧＫＧＬＶＷＩＳＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧＲＦＩＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＥＭＮＮＬＲＧＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＤＧＧＬＤＤＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１２０）
４４９７．ｖ８重鎖可変領域
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＳＡＳＧＦＳＦＮＳＦＷＭＨＷＶＲＱＶ
ＰＧＫＧＬＶＷＩＳＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧＲＦＩＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＥＭＮＮＬＲＧＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＥＧＧＬＤＤＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号１５６）
４４９７軽鎖
ＤＩＱＬＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＫＳＳＱＳＩＦＲＴＳＲＮＫＮＬＬＮ
ＷＹＱＱＲＰＧＱＰＰＲＬＬＩＨＷＡＳＴＲＫＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＦＧＴＤＦＴＬＴ
ＩＴＳＬＱＡＥＤＶＡＩＹＹＣＱＱＹＦＳＰＰＹＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳ
ＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬ
ＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣ
ＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１２１）
４４９７　ｖ．８重鎖
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＳＡＳＧＦＳＦＮＳＦＷＭＨＷＶＲＱＶ
ＰＧＫＧＬＶＷＩＳＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧＲＦＩＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＥＭＮＮＬＲＧＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＥＧＧＬＤＤＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫ
ＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ
ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮ
ＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦ
ＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧ
ＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣ
ＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮ
ＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤ
ＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬ
ＳＬＳＰＧ（配列番号１２２）
４４９７－Ｃｙｓ軽鎖
ＤＩＱＬＴＱＳＰＤＳＬＡＶＳＬＧＥＲＡＴＩＮＣＫＳＳＱＳＩＦＲＴＳＲＮＫＮＬＬＮ
ＷＹＱＱＲＰＧＱＰＰＲＬＬＩＨＷＡＳＴＲＫＳＧＶＰＤＲＦＳＧＳＧＦＧＴＤＦＴＬＴ
ＩＴＳＬＱＡＥＤＶＡＩＹＹＣＱＱＹＦＳＰＰＹＴＦＧＱＧＴＫＬＥＩＫＲＴＶＡＡＰＳ
ＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬ
ＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣ
ＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ（配列番号１２３）
４４９７．ｖ８－重鎖
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＳＡＳＧＦＳＦＮＳＦＷＭＨＷＶＲＱＶ
ＰＧＫＧＬＶＷＩＳＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧＲＦＩＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＥＭＮＮＬＲＧＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＥＧＧＬＤＤＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＡＳＴＫ
ＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ
ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮ
ＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦ
ＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧ
ＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣ
ＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮ
ＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤ
ＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬ

ＳＬＳＰＧ（配列番号１５７；配列番号１２２と同様）。
４４９７．ｖ８－Ｃｙｓ重鎖
ＥＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＳＡＳＧＦＳＦＮＳＦＷＭＨＷＶＲＱＶ
ＰＧＫＧＬＶＷＩＳＦＴＮＮＥＧＴＴＴＡＹＡＤＳＶＲＧＲＦＩＩＳＲＤＮＡＫＮＴＬＹ
ＬＥＭＮＮＬＲＧＥＤＴＡＶＹＹＣＡＲＧＥＧＧＬＤＤＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳＣＳＴＫ
ＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧ
ＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮ
ＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦ
ＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧ
ＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＧＫＥＹＫＣＫ
ＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱ
ＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧ
ＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳ
ＬＳＰＧ（配列番号１２４）

【０１９５】
本発明により提供される別の単離抗ＷＴＡベータ抗体は、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号１２０と少なくとも９５％の配列同一性を有するＶＨを含む。追加の実施態様では、この抗体は、配列番号１１９と少なくとも９５％の配列同一性を有するＶＬをさらに含む。具体的な実施態様では、抗ＷＴＡベータ抗体は、軽鎖及び重鎖を含み、Ｌ鎖は、配列番号１１９のＶＬを含み、Ｈ鎖は、配列番号１２０のＶＨを含む。さらにより具体的な実施態様では、単離抗ＷＴＡベータ抗体は、配列番号１２１のＬ鎖及び配列番号１２２のＨ鎖を含む。

【０１９６】
４４９７　Ｃｙｓ操作Ｈ及びＬ鎖変異体を以下の組み合わせの何れかでペアリングして、リンカー－Ａｂｘ中間体にコンジュゲートして本発明の抗ＷＴＡ　ＡＡＣを作製するための全長Ａｂを形成できる。非修飾のＬ鎖（配列番号１２１）は、配列番号１２４のＣｙｓ操作Ｈ鎖変異体とペアリングできる。配列番号１２３のＣｙｓ操作Ｌ鎖は、配列番号１５７のＨ鎖変異体又は配列番号１２４のＣｙｓ操作Ｈ鎖変異体（このバージョンでは、Ｈ及びＬ鎖の両方がＣｙｓ操作されている）とペアリングできる。特定の実施態様では、本発明の抗ＷＴＡベータ抗体及び抗ＷＴＡベータＡＡＣは、配列番号１２３のＬ鎖を含む。

【０１９７】
さらに別の実施態様は、図１３Ａ及び図１３Ｂの抗ＷＴＡアルファＡｂのそれぞれと同じエピトープと結合する抗体である。図１４、図１５Ａ及び１５Ｂ、並びに図１６Ａ及び１６Ｂの抗ＷＴＡベータＡｂのそれぞれと同じエピトープと結合する抗体も提供される。

【０１９８】
ＷＴＡとの抗ＷＴＡ抗体の結合は、ＷＴＡ上のＧｌｃＮＡｃ－糖修飾のアノマーの向きに影響される。ＷＴＡは、それぞれＴａｒＭグリコシルトランスフェラーゼ又はＴａｒＳグリコシルトランスフェラーゼにより、α－又はβ－グリコシド結合を介してＣ４－ＯＨ位にてＮ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）糖修飾により修飾される。したがって、ＴａｒＭ（ΔＴａｒＭ）、ＴａｒＳ（ΔＴａｒＳ）又はＴａｒＭ及びＴａｒＳの両方（ΔＴａｒＭ／ΔＴａｒＳ）を欠くグリコシルトランスフェラーゼミュータント株からの細胞壁調製物を、ＷＴＡに対する抗体を用いるイムノブロッティング分析に供した。ＷＴＡ上のα－ＧｌｃＮＡｃ修飾に特異的なＷＴＡ抗体（Ｓ７５７４）は、ΔＴａｒＭ株からの細胞壁調製物と結合しない。逆に、ＷＴＡ上のβ－ＧｌｃＮＡｃ修飾に特異的なＷＴＡ抗体（Ｓ４４６２）は、ΔＴａｒＳ株からの細胞壁調製物と結合しない。予期されたように、これらの抗体はともに、両方のグリコシルトランスフェラーゼを欠く欠失株（ΔＴａｒＭ／ΔＴａｒＳ）及び何れのＷＴＡも欠く株（ΔＴａｇＯ）からの細胞壁調製物と結合しない。このような分析に従って、図６Ａ及び６Ｂの表に列挙する抗α－ＧｌｃＮＡｃ　ＷＴＡ　ｍＡｂ又は抗β－ＧｌｃＮＡｃ　ＷＴＡ　ｍＡｂとしての抗体の特徴を明らかにした。

【０１９９】
　システインアミノ酸は、鎖内又は分子間ジスルフィド結合を形成しない抗体の反応部位にて操作してよい(Junutulaら, 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornanら(2009) Blood 114(13):2721-2729;ＵＳ７５２１５４１;ＵＳ７７２３４８５;国際公開第２００９／０５２２４９号、Shenら(2012) Nature Biotech., 30(2):184-191; Junutulaら(2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52)。操作されたシステインチオールは、マレイミド又はアルファーハロアミドのようなチオール反応性で求電子性の基を有する本発明のリンカー試薬又はリンカー－抗生物質中間体と反応して、システイン操作抗体（チオＭａｂ）及び抗生物質（ａｂｘ）部分を有するＡＡＣを形成できる。抗生物質部分の場所は、よって、設計でき、コントロールでき、わかっている。抗生物質の負荷量は、コントロールできる。なぜなら、操作されたシステインチオール基は、典型的に、チオール反応性リンカー試薬又はリンカー－抗生物質中間体と高い収率で反応するからである。重鎖又は軽鎖の単一部位にて置換によりシステインアミノ酸を導入するために抗ＷＴＡ抗体を操作することにより、対称のテトラマー抗体上に２つの新しいシステインが得られる。２に近い抗生物質負荷量を達成でき、コンジュゲーション生成物のほぼ均一性を達成できる。

【０２００】
　ある特定の実施態様では、抗体の一又は複数の残基がシステイン残基で置換された、システイン操作抗ＷＴＡ抗体、例えば「チオＭＡｂ」を創出することが望ましいことがある。特定の実施態様では、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位にある。これらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、抗体のアクセス可能な位置に配置され、本明細書にさらに記載するように、抗体を他の部分、例えば抗生物質部分又はリンカー－抗生物質部分にコンジュゲートして、イムノコンジュゲートを創出するために用いることができる。ある特定の実施態様では、以下の残基：軽鎖のＶ２０５（カバット番号付け）、重鎖のＡ１１８（ＥＵ番号付け）及び重鎖Ｆｃ領域のＳ４００（ＥＵ番号付け）の任意の一又は複数をシステインで置換してよい。抗ＷＴＡ抗体の非限定的で例示的なシステイン操作重鎖Ａ１１８Ｃ（配列番号１４９）及び軽鎖Ｖ２０５Ｃ（配列番号１５１）ミュータントを示す。システイン操作抗ＷＴＡ抗体は、記載されるようにして作製してよい（Junutulaら, 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932;ＵＳ７５２１５４１;ＵＳ－２０１１／０３０１３３４）。

【０２０１】
　別の実施態様では、本発明は、重鎖及び軽鎖を含む単離抗ＷＴＡ抗体であって、重鎖が、野生型重鎖定常領域配列又はシステイン操作ミュータント（チオＭａｂ）を含み、軽鎖が、野生型軽鎖定常領域配列又はシステイン操作ミュータント（チオＭａｂ）を含む、単離抗ＷＴＡ抗体に関する。一態様では、重鎖は、以下のものに対して少なくとも９５％の配列同一性を有し：

重鎖（ＩｇＧ１）定常領域、野生型
ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ
ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴ
ＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧ
ＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷ
ＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫ
ＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥ
ＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶ
ＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴ
ＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ
（配列番号１４８）

重鎖（ＩｇＧ１）定常領域、Ａ１１８Ｃ「チオＭａｂ」
ＣＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳ
ＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴ
ＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧ

ＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ

（配列番号１４９）

軽鎖は、以下のものに対して少なくとも９５％の配列同一性を有する：

軽鎖（カッパ）定常領域、野生型

ＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

（配列番号１５０）

軽鎖（カッパ）定常領域、Ｖ２０５Ｃ「チオＭａｂ」

ＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＣＴＫＳＦＮＲＧＥＣ

（配列番号１５１）

【０２０２】

本発明のＡＡＣは、野生型又は親の抗ＷＴＡ抗体の一又は複数のアミノ酸がシステインアミノ酸で置き換えられた、システイン操作抗ＷＴＡ抗体を含む。任意の形の抗体をこのように操作、すなわち変異させることができる。例えば、親のＦａｂ抗体断片を操作して、本明細書において「チオＦａｂ」というシステイン操作Ｆａｂを形成してよい。同様に、親のモノクローナル抗体を操作して、「チオＭａｂ」を形成してよい。単一部位の変異は、チオＦａｂにおいて単一の操作されたシステイン残基を生じるが、単一部位変異は、ＩｇＧ抗体のダイマーの性質のためにチオＭａｂにおいて２つの操作されたシステイン残基を生じることに注意すべきである。置き換えられた（「操作された」）システイン（Ｃｙｓ）残基を有するミュータントは、新しく導入された、操作されたシステインチオール基の反応性について評価される。

【０２０３】

本明細書に記載する抗体は、培養において宿主細胞を用いて生成してよい。宿主細胞は、本明細書に記載する抗体をコードする一又は複数の核酸を含むベクター（発現又はクローニングベクター）で形質転換してよい。細胞を、抗体を生成するために適切な条件下で培養し、細胞により生成される抗体をさらに精製してよい。抗体を生成するために適切な細胞としては、原核生物、酵母又は高等真核生物（例えば哺乳動物）細胞が挙げられる。一部の実施態様では、哺乳動物細胞（ヒト又は非ヒト哺乳動物細胞）を用いる。一部の実施態様では、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞を用いる。

【０２０４】

哺乳動物細胞を培養してよく、培養（組織培養）における哺乳動物細胞の増殖は、常套的手段になっている。哺乳動物宿主細胞株としては、例えば、限定することなく、ＳＶ４０により形質転換されたサル腎臓ＣＶ１系列（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１６５１）、ヒト胎児性／胚性腎臓系列（２９３又は懸濁培養における成長のためにサブクローニングされた２９３細胞、Grahamら, J. Gen Virol. 36:59 (1977)）、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　１０）、マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）、サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７０）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）、ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　２）、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　３４）、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ　１４４２）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ　７５）、ヒト肝臓細胞（ＨｅｐＧ２、ＨＢ　８０６５）、マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ　０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５

１）、ＴＲＩ細胞（Matherら，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）、ＭＲＣ５細胞、ＦＳ４細胞、及びヒト肝癌系列（Ｈｅｐ　Ｇ２）が挙げられる。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、ＮＳ０及びＳｐ２／０のような骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体生成のために適切なある特定の哺乳動物宿主細胞株の概説について、例えばＹａｚａｋｉ及びＷｕ、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、第２４８巻（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ編、Ｈｕｍａｎａ　Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、Ｎ．Ｊ．、２００３）、ｐｐ．２５５－２６８を参照されたい。

【０２０５】

ワタ、トウモロコシ、ダイズ、ペチュニア、トマト、アオウキクサ（アマ科）、アルファルファ（タルウマゴヤシ（Ｍ．ｔｒｕｎｃａｔｕｌａ））及びタバコの植物細胞培養物も宿主として利用できる。

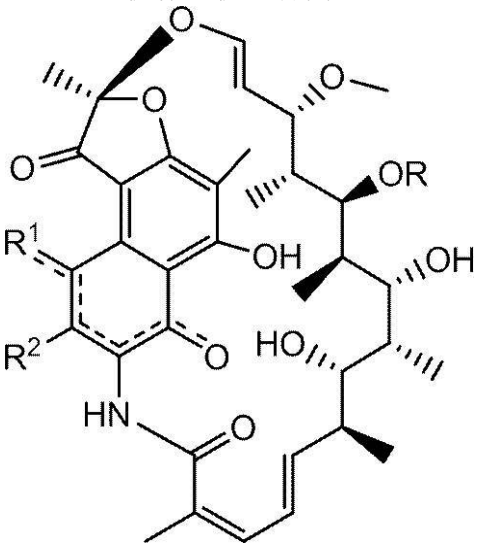
【０２０６】

この目的のために適切な原核細胞としては、グラム陰性又はグラム陽性生物体のような真正細菌、例えば腸内細菌科、例えばエシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）、例えば大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）、エンテロバクター（Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒ）、エルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）、クレブシエラ（Ｋｌｅｂｓｉｅｌｌａ）、プロテウス（Ｐｒｏｔｅｕｓ）、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、例えばネズミチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）、セラチア（Ｓｅｒｒａｔｉａ）、例えばセラチア・マルセッセンス（Ｓｅｒｒａｔｉａ　ｍａｒｃｅｓｃｅｎｓ）及びシゲラ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）、並びにバチルス属、例えば枯草菌（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及びＢ．リケニフォルミス（Ｂ．ｌｉｃｈｅｎｉｆｏｒｍｉｓ）（例えば１９８９年４月１２日に公開されたＤＤ２６６，７１０に開示されるＢ．リケニフォルミス４１Ｐ）、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）、例えば緑膿菌（Ｐ．ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）並びにストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）が挙げられる。ある好ましい大腸菌クローニング宿主は、大腸菌２９４（ＡＴＣＣ３１，４４６）であるが、他の株、例えば大腸菌Ｂ、大腸菌Ｘ１７７６（ＡＴＣＣ３１，５３７）及び大腸菌Ｗ３１１０（ＡＴＣＣ２７，３２５）は、適切である。これらの例は、限定ではなく、説明のためである。

【０２０７】

原核生物に加えて、真核微生物、例えば糸状菌又は酵母は、抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。出芽酵母（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）又は一般的なパン酵母は、下等真核生物宿主微生物のうちで最も一般的に用いられる。しかし、分裂酵母（Ｓｃｈｉｚｏｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ　ｐｏｍｂｅ）、クリベロマイセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）宿主、例えばＫ．ラクチス（Ｋ．ｌａｃｔｉｓ）、Ｋ．フラギリス（Ｋ．ｆｒａｇｉｌｉｓ）（ＡＴＣＣ１２，４２４）、Ｋ．ブルガリカス（Ｋ．ｂｕｌｇａｒｉｃｕｓ）（ＡＴＣＣ１６，０４５）、Ｋ．ウィカラミイ（Ｋ．ｗｉｃｋｅｒｈａｍｉｉ）（ＡＴＣＣ２４，１７８）、Ｋ．ワルティイ（Ｋ．ｗａｌｔｉｉ）（ＡＴＣＣ５６，５００）、Ｋ．ドロソフィラルム（Ｋ．ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａｒｕｍ）（ＡＴＣＣ３６，９０６）、Ｋ．サーモトレランス（Ｋ．ｔｈｅｒｍｏｔｏｌｅｒａｎｓ）及びＫ．マーキシアヌス（Ｋ．ｍａｒｘｉａｎｕｓ）、ヤロウィニア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）（ＥＰ４０２，２２６）、ピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　ｐａｓｔｏｒｉｓ）（ＥＰ１８３，０７０）、カンジダ（Ｃａｎｄｉｄａ）、トリコデルマ・リーゼイ（Ｔｒｉｃｈｏｄｅｒｍａ　ｒｅｅｓｅｉ）（ＥＰ２４４，２３４）、アカパンカビ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ　ｃｒａｓｓａ）、シュワニオマイセス（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ）、例えばシュワニオマイセス・オクシデンタリス（Ｓｃｈｗａｎｎｉｏｍｙｃｅｓ　ｏｃｃｉｄｅｎｔａｌｉｓ）、並びに糸状菌、例えばニューロスポラ（Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ）、ペニシリカム（Ｐｅｎｉｃｉｌｌｉｕｍ）、トリポクラジウム（Ｔｏｌｙｐｏｃｌａｄｉｕｍ）及びアスペルギルス（Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ）宿主、例えば偽巣性コウジ菌（Ａ．ｎｉｄｕｌａｎｓ）及びクロコウジカビ（Ａ．ｎｉｇｅｒ）のようないくつかの他の属、種及び株が通常利用可能であり、本明細書において有用である。

【０２０８】
リファマイシン型抗生物質部分
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）の抗生物質部分（ａｂｘ）は、細胞傷害又は細胞分裂停止の効果を有するリファマイシン型抗生物質又は基である。リファマイシンは、細菌ノカルジア・メディテラーネイ（Ｎｏｃａｒｄｉａ ｍｅｄｉｔｅｒｒａｎｅｉ）、アミコラプトシス・メディテラーネイ（Ａｍｙｃｏｌａｔｏｐｓｉｓ ｍｅｄｉｔｅｒｒａｎｅｉ）により自然に、又は人工的に得られる抗生物質の群である。これらは、細菌ＲＮＡポリメラーゼを阻害するより大きいアンサマイシンファミリーのサブクラスであり（Fujiiら(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:1489-1492; Feklistovら(2008) Proc Natl Acad Sci USA, 105(39): 14820-5）、グラム陽性及び選択的グラム陰性細菌に対して力価を有する。リファマイシンは、マイコバクテリアに対して特に効果的であり、よって、結核、ハンセン病及びマイコバクテリウム・アビウムコンプレックス（ＭＡＣ）感染症を治療するために用いられる。リファマイシン型の基としては、「古典的」リファマイシン薬物、並びにリファマイシン誘導体であるリファンピシン（リファンピン、ＣＡ Ｒｅｇ．Ｎｏ．１３２９２－４６－１）、リファブチン（ＣＡ Ｒｅｇ．Ｎｏ．７２５５９－０６－９；ＵＳ２０１１／０１７８００１）、リファペンチン及びリファラジル（ＣＡ Ｒｅｇ．Ｎｏ．１２９７９１－９２－０、Rothsteinら(2003) Expert Opin. Investig. Agents 12(2):255-271; Fujiiら(1994) Antimicrob. Agents Chemother. 38: 1118-1122）が挙げられる。多くのリファマイシン型抗生物質は、耐性の発展という有害な特性を共有する（Wichelhausら(2001) J. Antimicrob. Chemother. 47:153-156）。リファマイシンは、ストレプトマイセス・メディテラーネイ（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ｍｅｄｉｔｅｒｒａｎｅｉ）の発酵培養物から１９５７年に最初に単離された。約７種のリファマイシンが発見され、リファマイシンＡ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｓ及びＳＶと命名された（ＵＳ３１５００４６）。リファマイシンＢは、最初に市販され、１９６０年代に薬物耐性結核の治療において有用であった。リファマイシンは、多くの疾患の治療のために用いられ、最も重要なものはＨＩＶ関連結核である。多数の利用可能なアナログ及び誘導体のために、リファマイシンは、通常用いられる抗生物質に対して耐性になった病原性細菌を排除するために広く利用されている。例えば、リファンピシンは、薬物耐性を妨げる有効な効果及び能力があることが知られている。これは、迅速に分裂する桿菌株とともに、生物学的に不活性なまま長期間残っているため抗生物質活性を逃れることができる「生残菌」細胞を迅速に死滅させる。さらに、リファブチン及びリファペンチンは、ともに、ＨＩＶ陽性患者で獲得された結核に対して用いられている。
【０２０９】
式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲートの抗生物質部分（ａｂｘ）は、構造：

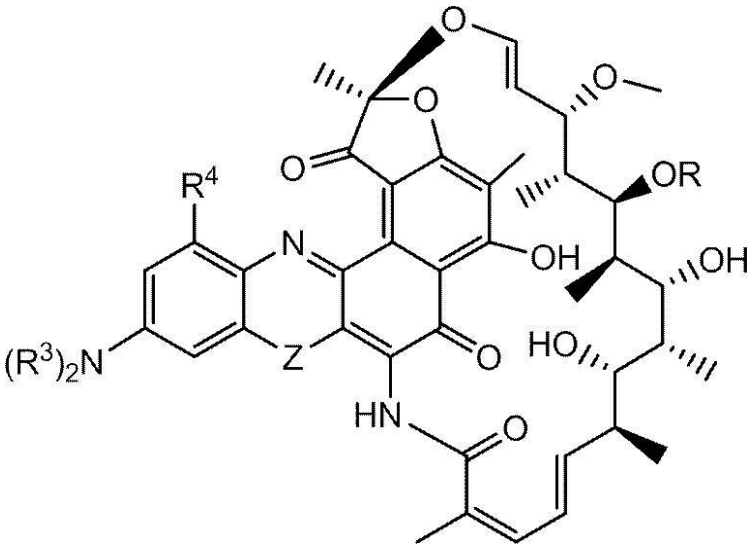


（式中、
破線は、任意選択の結合を示し、

Ｒは、Ｈ、C_{1}－C_{12}アルキル又はＣ（Ｏ）CH_{3}であり、
R^{1}は、ＯＨであり、
R^{2}は、ＣＨ＝Ｎ－（ヘテロシクリル）であり、ヘテロシクリルは、Ｃ（Ｏ）CH_{3}、C_{1}－C_{12}アルキル、C_{1}－C_{12}ヘテロアリール、C_{2}－C_{20}ヘテロシクリル、C_{6}－C_{20}アリール及びC_{3}－C_{12}カルボシクリルから独立して選択される一又は複数の基で置換されていてもよいか、
あるいはR^{1}及びR^{2}は、５又は６員の縮合ヘテロアリール又はヘテロシクリルを形成し、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環を形成していてもよく、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_{1}－C_{12}アルキル又はＯＨで置換されていてもよく、
ペプチドリンカーＬは、R^{2}と共有結合する）
を有するリファマイシン型部分である。

【０２１０】

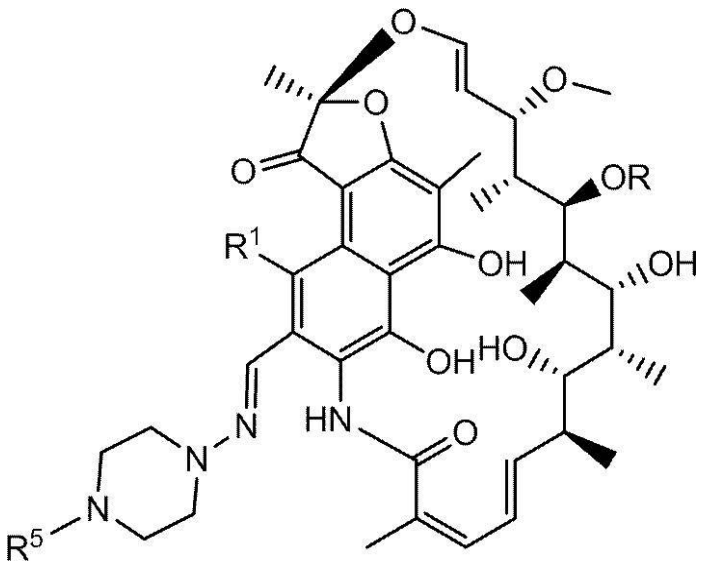
リファマイシン型部分のある実施態様は：



（式中、R^{3}は、Ｈ及びC_{1}－C_{12}アルキルから独立して選択され、R^{4}は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_{1}－C_{12}アルキル及びＯＨから選択され、Ｚは、ＮＨ、Ｎ（C_{1}－C_{12}アルキル）、Ｏ及びＳから選択され、ペプチドリンカーＬは、Ｎ（R^{3}）$_{2}$の窒素原子と共有結合する）
である。

【０２１１】

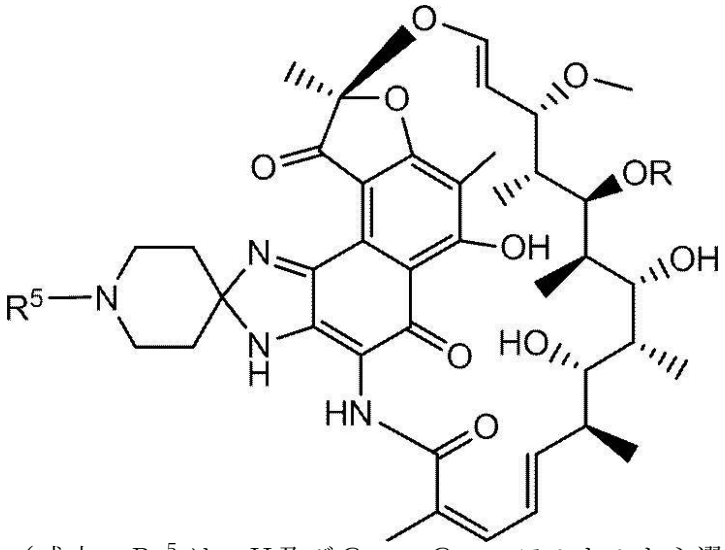
リファンピシン型部分のある実施態様は：



（式中、
Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから選択され、ペプチドリンカーＬは、ＮＲ^{5}の窒素原子と共有結合する）
である。

【０２１２】

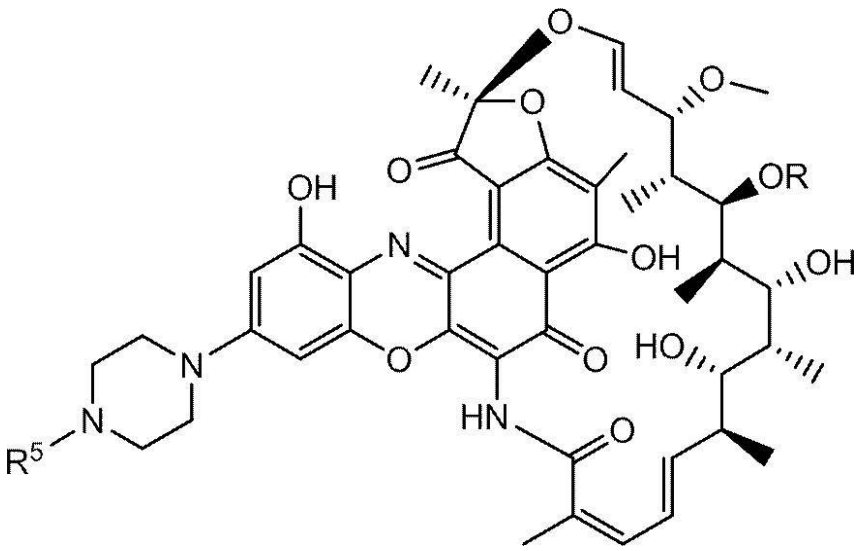
リファブチン型部分のある実施態様は：



（式中、Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから選択され、ペプチドリンカーＬは、ＮＲ^{5}の窒素原子と共有結合する）
である。

【０２１３】

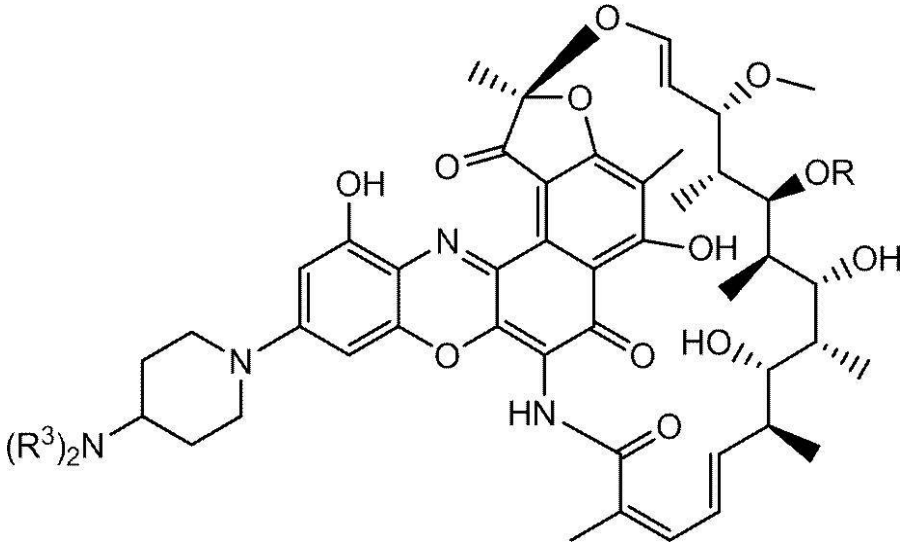
ベンゾキサジノリファマイシン型部分のある実施態様は：



（式中、R^5は、H及びC_1－C_{12}アルキルから選択され、ペプチドリンカーＬは、ＮR^5の窒素原子と共有結合する）
である。

【０２１４】

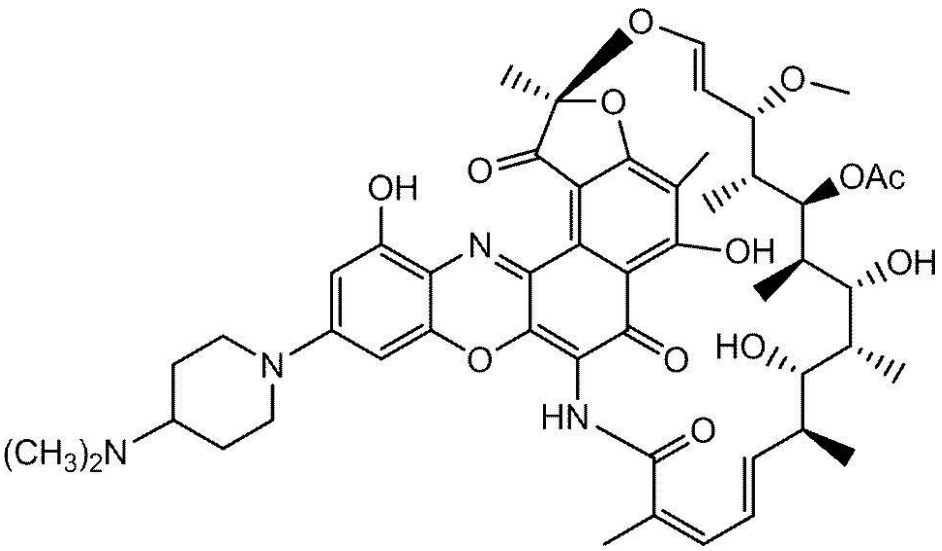
本明細書においてｐｉｐＢＯＲというベンゾキサジノリファマイシン型部分のある実施態様は：



（式中、R^3は、H及びC_1－C_{12}アルキルから独立して選択され、ペプチドリンカーＬは、Ｎ（R^3）$_2$の窒素原子と共有結合する）
である。

【０２１５】

本明細書においてジメチルｐｉｐＢＯＲというベンゾキサジノリファマイシン型部分のある実施態様は：



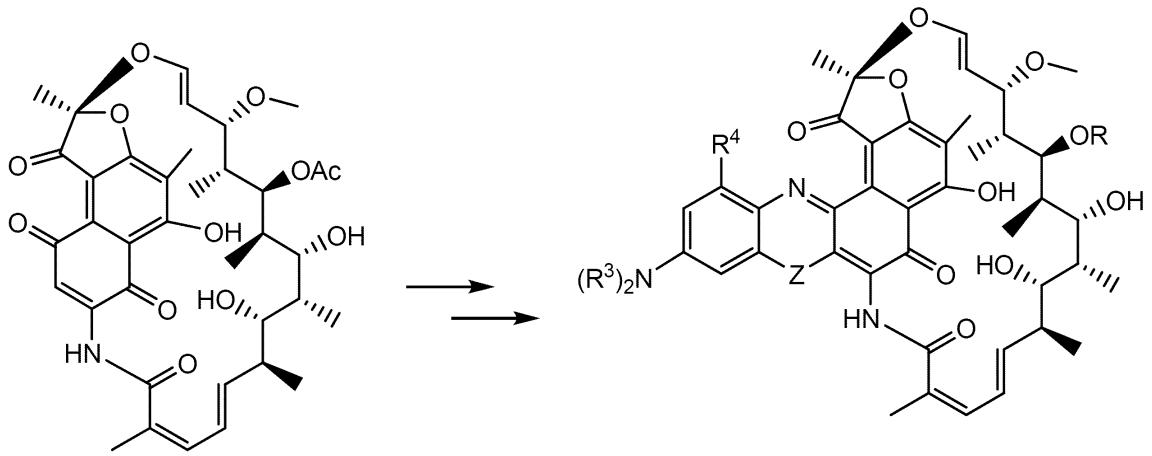
（式中、ペプチドリンカーＬは、Ｎ（ＣＨ$_3$）$_2$の窒素原子と共有結合する）
である。

【０２１６】

半合成誘導体リファマイシンＳ又は還元ナトリウム塩形リファマイシンＳＶは、いくつかの工程でリファラジル型抗生物質に変換でき、ここで、図９－１１に例示するように、Ｒは、Ｈ又はＡｃであり、Ｒ^{3}は、Ｈ及びＣ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキルから独立して選択され、Ｒ^{4}は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル及びＯＨから選択され、Ｚは、ＮＨ、Ｎ（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル）、Ｏ及びＳから選択される。ベンゾキサジノ（Ｚ＝Ｏ）、ベンズチアジノ（Ｚ＝Ｓ）、ベンズジアジノ（Ｚ＝ＮＨ、Ｎ（Ｃ$_1$－Ｃ$_{12}$アルキル）リファマイシンを調製してよい（ＵＳ７２７１１６５）。置換基を含むベンゾキサジノリファマイシン（ＢＯＲ）、ベンズチアジノリファマイシン（ＢＴＲ）及びベンズジアジノリファマイシン（ＢＤＲ）アナログは、ＵＳ７２７１１６５（これは、この目的のために出典明示により援用されている）の第２８欄の式Ａに示す番号付けスキームに従って番号付けされる。「２５－Ｏ－デアセチル」リファマイシンは、２５位のアセチル基が除去されたリファマイシンアナログを意味する。この位置がさらに誘導体化されたアナログは、「２５－Ｏ－デアセチル－２５－（置換基）リファマイシン」といい、完全な化合物名では誘導体化する基の名称が「置換基」を置き換える。

【０２１７】

リファマイシン型抗生物質部分は、ＵＳ４６１０９１９、ＵＳ４９８３６０２、ＵＳ５７８６３４９、ＵＳ５９８１５２２、ＵＳ４８５９６６１、ＵＳ７２７１１６５、ＵＳ２０１１／０１７８００１、Ｓｅｌｉｇｓｏｎら、（２００１）Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇｓ １２：３０５－１３；Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．、（１９９３）４１：１４８（これらのそれぞれは、本明細書に出典明示により援用されている）に開示されるものと類似する方法により合成できる。リファマイシン型抗生物質部分は、標準的なＭＩＣインビトロアッセイを用いてそれらの最小阻止濃度（ＭＩＣ）を測定することにより（Tomiokaら, (1993) Antimicrob. Agents Chemother. 37:67）、抗微生物活性についてスクリーニングできる。



リファマイシン-S　　ベンゾキサジノリファマイシン

【０２１８】

ペプチドリンカー

「ペプチドリンカー」（Ｌ）は、一又は複数の抗生物質部分（ａｂｘ）及び抗体単位（Ａｂ）と共有結合して式Ｉの抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）を形成する二官能性又は多官能性部分である。ＡＡＣ中のペプチドリンカーは、リソソーム条件を含む細胞内プロテアーゼによる切断についての基質である。プロテアーゼとしては、様々なカテプシン及びカスパーゼが挙げられる。細胞内部でのＡＡＣのペプチドリンカーの切断は、抗菌効果を有するリファマイシン型抗生物質を放出できる。

【０２１９】

ＡＡＣの切断により放出される活性抗生物質の量は、実施例２０のカスパーゼ放出アッセイにより測定できる。

【０２２０】

抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）は、簡便には、抗生物質（ａｂｘ）及び抗体（Ａｂ）との結合のための反応性機能性を有するリンカー試薬又はリンカー－抗生物質中間体を用いて調製できる。例示的な一実施態様では、システイン操作抗体（Ａｂ）のシステインチオールは、リンカー試薬、抗生物質部分又は抗生物質－リンカー中間体の官能基と結合を形成できる。

【０２２１】

ＡＡＣのペプチドリンカー部分一態様では、リンカー試薬又はリンカー－抗生物質中間体は、抗体上に存在する求核システインと反応性である求電子基を有する反応部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー試薬又はリンカー－抗生物質上の求電子基と反応性であり、共有結合を形成する。有用な求電子基としては、それらに限定されないが、マレイミド及びハロアセトアミド基が挙げられる。

【０２２２】

システイン操作抗体は、Ｋｌｕｓｓｍａｎら（２００４）、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ１５（４）：７６５－７７３の第７６６頁のコンジュゲーション方法及び実施例１９のプロトコールに従って、マレイミド又はα－ハロカルボニルのような求電子官能基を有するリンカー試薬又はリンカー－抗生物質中間体と反応する。

【０２２３】

別の実施態様では、リンカー試薬又はリンカー－抗生物質中間体の反応性基は、抗体の遊離のシステインチオールと結合を形成できるチオール－反応性官能基を含む。チオール－反応官能基としては、例えば、それらに限定されないが、マレイミド、α－ハロアセチル、活性化エステル、例えばスクシンイミドエステル、４ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、スルホニル塩化物、イソシアネート及びイソチオシアネートが挙げられる。

【０２２４】

別の実施態様では、リンカー試薬又は抗生物質－リンカー中間体は、抗体上に存在する求電子基と反応性である求核基を有する反応性官能基を有する。抗体上の有用な求電子基としては、それらに限定されないが、ピリジルジスルフィド、アルデヒド及びケトンカルボニル基が挙げられる。リンカー試薬又は抗生物質－リンカー中間体の求核基のヘテロ原子は、抗体上の求電子基と反応して、抗体単位と共有結合を形成できる。リンカー試薬又は抗生物質－リンカー中間体上の有用な求核基としては、それらに限定されないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、チオール、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが挙げられる。抗体上の求電子基は、リンカー試薬又は抗生物質－リンカー中間体との結合のための簡便な部位を提供する。

【０２２５】

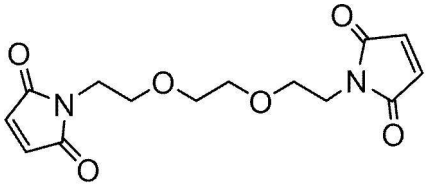
ペプチドリンカーは、一又は複数のリンカー成分を含んでよい。例示的リンカー成分としては、ペプチド単位、６－マレイミドカプロイル（「ＭＣ」）、マレイミドプロパノイル（「ＭＰ」）、バリン－シトルリン（「ｖａｌ－ｃｉｔ」又は「ｖｃ」）、アラニン－フェニルアラニン（「ａｌａ－ｐｈｅ」）及びｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（「ＰＡＢ」）、４－（２－ピリジルチオ）ペンタン酸Ｎ－スクシンイミジル（「ＳＰＰ」）及びシクロヘキサン－１カルボン酸４－（Ｎ－マレイミドメチル）（「ＭＣＣ」）が挙げられる。様々なリンカー成分が当該技術分野で知られており、そのうちのいくつかを以下に記載する。

【０２２６】

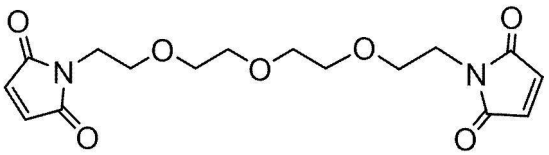
別の実施態様では、リンカーは、溶解度又は反応性をモジュレートする基で置換してよい。例えば、スルホネート（$-SO_3^-$）又はアンモニウムのような荷電置換基は、試薬の水溶解度を増加して、リンカー試薬と抗体若しくは抗生物質部分とのカップリング反応を容易にするか、又はＡＡＣを調製するために採用する合成経路に応じて、Ａｂ－Ｌ（抗体－リンカー中間体）とａｂｘ、若しくはａｂｘ－Ｌ（抗生物質－リンカー中間体）とＡｂとのカップリング反応を容易にすることがある。

【０２２７】

本発明のＡＡＣは、それらに限定されないが、リンカー試薬：ＢＭＰＥＯ、ＢＭＰＳ、ＥＭＣＳ、ＧＭＢＳ、ＨＢＶＳ、ＬＣ－ＳＭＣＣ、ＭＢＳ、ＭＰＢＨ、ＳＢＡＰ、ＳＩＡ、ＳＩＡＢ、ＳＭＣＣ、ＳＭＰＢ、ＳＭＰＨ、スルホ－ＥＭＣＳ、スルホ－ＧＭＢＳ、スルホ－ＫＭＵＳ、スルホ－ＭＢＳ、スルホ－ＳＩＡＢ、スルホ－ＳＭＣＣ、スルホ－ＳＭＰＢ、ＳＶＳＢ（（４－ビニルスルホン）安息香酸スクシンイミジル）、並びにビス－マレイミド試薬、例えばＤＴＭＥ、ＢＭＢ、ＢＭＤＢ、ＢＭＨ、ＢＭＯＥ、ＢＭ（ＰＥＧ）$_2$及びＢＭ（ＰＥＧ）$_3$を用いて調製されたものを明示的に企図する。ビス－マレイミド試薬は、チオール含有抗生物質部分、標識又はリンカー中間体へのシステイン操作抗体のチオール基の結合を、逐次的又は収斂的な様式で可能にする。システイン操作抗体、抗生物質部分又はリンカー－抗生物質中間体のチオール基と反応性であるマレイミド以外の他の官能基としては、ヨードアセトアミド、ブロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジルジスルフィド、イソシアネート及びイソチオシアネートが挙げられる。



BM(PEG)$_2$



BM(PEG)$_3$

【０２２８】

有用なリンカー試薬は、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｉｎｃ.（Ｂｏｕｌｄｅｒ、ＣＯ）のような他の市販の供給源から得ることもできるか、又はＴｏｋｉら（２００２）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６７：１８６６－１８７２；Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら（１９９７）Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔｅｒｓ、３８：５２５７－６０；Ｗａ

ｌｋｅｒ，Ｍ．Ａ．（１９９５）Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．６０：５３５２－５３５５；Ｆｒｉｓｃｈら（１９９６）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．７：１８０－１８６；ＵＳ６２１４３４５；国際公開第０２／０８８１７２号；ＵＳ２００３１３０１８９；ＵＳ２００３０９６７４３；国際公開第０３／０２６５７７号；国際公開第０３／０４３５８３号；及び国際公開第０４／０３２８２８号に記載される手順に従って合成できる。

【０２２９】

別の実施態様では、ＡＡＣのペプチドリンカー部分は、分岐した多機能性リンカー部分により１つより多い抗生物質部分を抗体と共有結合させるための樹状型リンカーを含む（Sunら(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sunら(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768）。樹状リンカーは、抗体に対する抗生物質のモル比、すなわちＡＡＣの力価と関係する負荷量を増加できる。よって、システイン操作抗体が反応性システインチオール基を１つだけ有する場合、樹状リンカーにより多くの抗生物質部分を結合させてよい。

【０２３０】

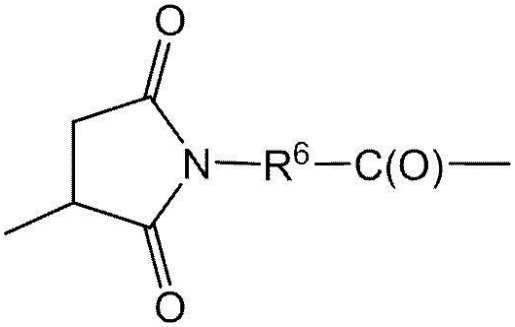
式ＩのＡＡＣのある特定の実施態様では、ペプチドリンカーは、式：

－Ｓｔｒ－Ｐｅｐ－Ｙ－

（式中、Ｓｔｒは、抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体と共有結合するストレッチャー単位であり、Ｐｅｐは、２から１２アミノ酸残基のペプチドであり、Ｙは、リファマイシン型抗生物質と共有結合するスペーサー単位である）を有する。このようなリンカーの例示的実施態様は、本明細書に出典明示により明示的に援用されているＵＳ７４９８２９８に記載されている。

【０２３１】

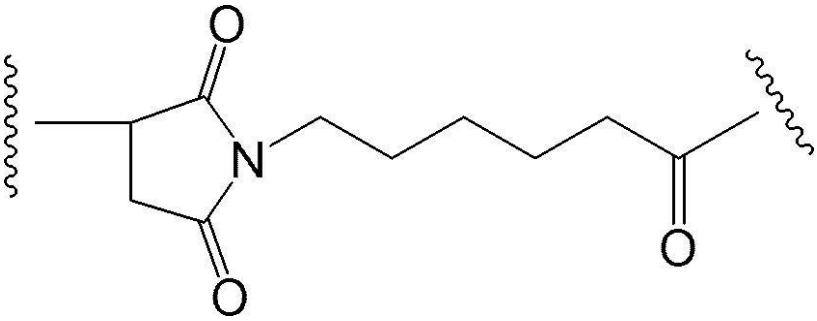
一実施態様では、ストレッチャー単位「Ｓｔｒ」は、式：



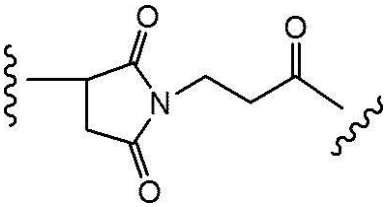
（式中、R^6は、C_1－C_{10}アルキレン－、－C_3－C_8カルボシクロ、－Ｏ－（C_1－C_8アルキル）－、－アリーレン－、－C_1－C_{10}アルキレン－アリーレン－、－アリーレン－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_1－C_{10}アルキレン－（C_3－C_8カルボシクロ）－、－（C_3－C_8カルボシクロ）－C_1－C_{10}アルキレン－、－C_3－C_8ヘテロシクロ－、－C_1－C_{10}アルキレン－（C_3－C_8ヘテロシクロ）－、－（C_3－C_8ヘテロシクロ）－C_1－C_{10}アルキレン－、－$(CH_2CH_2O)_r$－及び－$(CH_2CH_2O)_r$－CH_2－からなる群から選択され、ｒは、１から１０の範囲の整数である）を有する。

【０２３２】

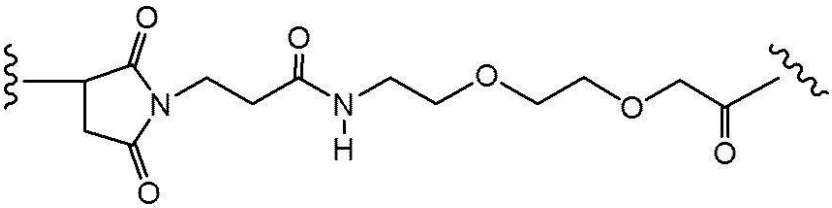
例示的ストレッチャー単位を以下に示す（ここで、波線は、抗体との共有結合部位を示す）：

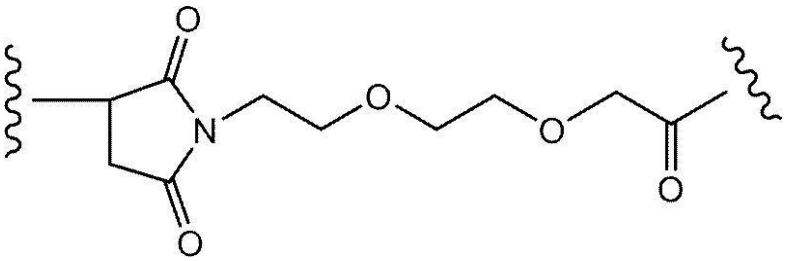


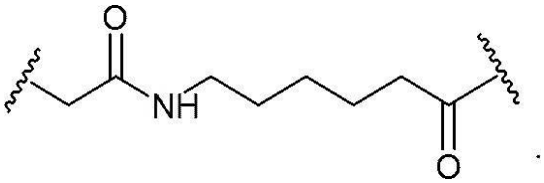
MC



MP







【０２３３】

ペプチド単位「Ｐｅｐ」は、生化学の分野で公知の２０個の主要アミノ酸及びシトルリンのようなマイナーアミノ酸を含む、自然に存在する２つ以上のアミノ酸残基を含む。アミノ酸は、それらの側鎖により区別される。ペプチド単位は、よって、それらに限定されないが、$-CH_3$（アラニン）、$-CH_2CH_2CH_2NHC(NH)NH_2$（アルギニン）、$-CH_2C(O)NH_2$（アスパラギン）、$-CH_2CO_2H$（アスパラギン酸）、$-CH_2CH_2CH_2NHC(O)NH_2$（シトルリン）、$-CH_2SH$（システイン）、$-CH_2CH_2CO_2H$（グルタミン酸）、$-CH_2CH_2C(O)NH_2$（グルタミン）、$-H$（グリシン）、$-CH_2$（イミダゾリル）（ヒスチジン）、$-CH(CH_3)CH_2CH_3$（イソロイシン）、$-CH_2CH(CH_3)CH_3$（ロイシン）、$-CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$（リジン）、$-CH_2CH_2SCH_3$（メチオニン）、$-CH_2(C_6H_5)$（フェニルアラニン）、$-CH_2CH_2CH_2-$（プロリン）、$-CH_2OH$（セリン）、$-CH(OH)CH_3$（スレオニン）、$-CH_2$（インドール）（トリプトファン）、$-CH_2(p-C_6H_4OH)$（チロシン）、$-CHCH(CH_3)CH_3$（バリン）を含む、２つ以上のアミノ酸側鎖を含む。第１０７６－１０７７頁、「Ｏｒｇａｎｉｃ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ」第５版、Ｊｏｈｎ　ＭｃＭｕｒｒｙ、Ｂｒｏｏｋｓ

／Ｃｏｌｅ　ｐｕｂ．（２０００）を参照されたい。ペプチド単位のアミノ酸残基は、全ての立体異性体を含み、Ｄ又はＬ立体配置であってよい。一実施態様では、Ｐｅｐは、グリシン、アラニン、フェニルアラニン、リジン、アルギニン、バリン及びシトルリンから独立して選択される２から１２アミノ酸残基を含む。このような一実施態様では、アミノ酸単位は、プロテアーゼによるリンカーの切断を可能にして、そのことにより、細胞内プロテアーゼ、例えばリソソーム酵素への曝露の際のＡＡＣからの抗生物質の放出を容易にする（Doroninaら(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784）。例示的アミノ酸単位としては、それらに限定されないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド及びヘキサペプチドが挙げられる。例示的ジペプチドとしては、バリン－シトルリン（ｖｃ又はｖａｌ－ｃｉｔ）、アラニン－フェニルアラニン（ａｆ又はａｌａ－ｐｈｅ）、フェニルアラニン－リジン（ｆｋ又はｐｈｅ－ｌｙｓ）又はＮ－メチル－バリン－シトルリン（Ｍｅ－ｖａｌ－ｃｉｔ）が挙げられる。例示的トリペプチドとしては、グリシン－バリン－シトルリン（ｇｌｙ－ｖａｌ－ｃｉｔ）、バリン－シトルリン－フェニルアラニン（ｖａｌ－ｃｉｔ－ｐｈｅ）及びグリシン－グリシン－グリシン（ｇｌｙ－ｇｌｙ－ｇｌｙ）が挙げられる。さらなるペプチドリンカーとしては、ＧＧＡＦＡＧＧＧ（配列番号１２６）、ｔｐｍ－ｃｉｔ、ＧＰＩｍｅＬＦＦ（配列番号１２９）及びＬＡＦＧ（配列番号１２８）が挙げられる。ペプチドリンカーは、２つ以上のアミノ酸及び／又はペプチド断片の間にペプチド結合を形成することにより調製できる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野で公知である液相合成法（E. Schroder及びK. Lubke (1965) "The Peptides"、第1巻、p 76-136、Academic Press）に従って調製できる。アミノ酸単位は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンＢ、Ｃ及びＤ又はプラスミンプロテアーゼによる酵素切断のためのアミノ酸単位の選択性を設計して最適化できる。

【０２３４】

一実施態様では、スペーサー単位Ｙは、パラ－アミノベンジル又はパラ－アミノベンジルオキシカルボニルを含む。「非自壊性」スペーサー単位は、スペーサー単位の一部又は全体がＡＡＣの酵素（例えばタンパク質分解性）切断の際に抗生物質部分と結合したままであるものである。非自壊性スペーサー単位としては、例えば、それらに限定されないが、グリシンスペーサー単位及びグリシン－グリシンスペーサー単位が挙げられる。配列特異的酵素切断を受けやすいペプチド性スペーサーの他の組み合わせも企図される。例えば、グリシン－グリシンスペーサー単位を含むＡＡＣの腫瘍細胞関連プロテアーゼによる酵素切断は、ＡＡＣの残りの部分からのグリシン－グリシン－抗生物質部分の放出をもたらす。このような一実施態様では、グリシン－グリシン－抗生物質部分は、次いで、腫瘍細胞において別の加水分解工程に付され、よってグリシン－グリシンスペーサー単位が抗生物質部分から切断される。

【０２３５】

スペーサー単位は、別の加水分解工程なしで抗生物質部分の放出を可能にする。スペーサー単位は、「自壊性」又は「非自壊性」であってよい。ある特定の実施態様では、リンカーのスペーサー単位は、ｐ－アミノベンジル単位（ＰＡＢ）を含む。このような一実施態様では、ｐ－アミノベンジルアルコールは、ｐ－アミノベンジル基と抗生物質部分との間のアミド結合、カルバメート、メチルカルバメート又はカーボネートによりアミノ酸単位と結合する（Hamannら(2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103）。一実施態様では、スペーサー単位は、ｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢ）である。

【０２３６】

一実施態様では、抗生物質は、ペプチドリンカーのＰＡＢスペーサー単位と結合する場合に、ジメチルアミノピペリジル基のような第四級アミンを形成する。このような第四級アミンの例は、表２からのリンカー－抗生物質中間体（ＬＡ）５４、６１、６６、６７、７３、７４、７６、７８、７９、８３、８４である。第四級アミン基は、抗生物質部分の切断を調節して、ＡＡＣの抗菌効果を最適化できる。別の実施態様では、抗生物質は、ペプチドリンカーのＰＡＢＣスペーサー単位と結合して、ＡＡＣ中にカルバメート官能基を

形成する。このようなカルバメート官能基も、ＡＡＣの抗菌効果を最適化できる。ＰＡＢＣカルバメートリンカー－抗生物質中間体（ＬＡ）の例は、表２からの５１、５２、５３、５５、５６、５７、５８、６２、６３、６４、６５、７２、７５、８０、８１、８７である。他のリンカー－抗生物質中間体（ＬＡ）は、アミド（５９、６９、７０、７１、７７、８２、８５）又はフェノール性（６０、６８、８６）基を採用する。

【０２３７】

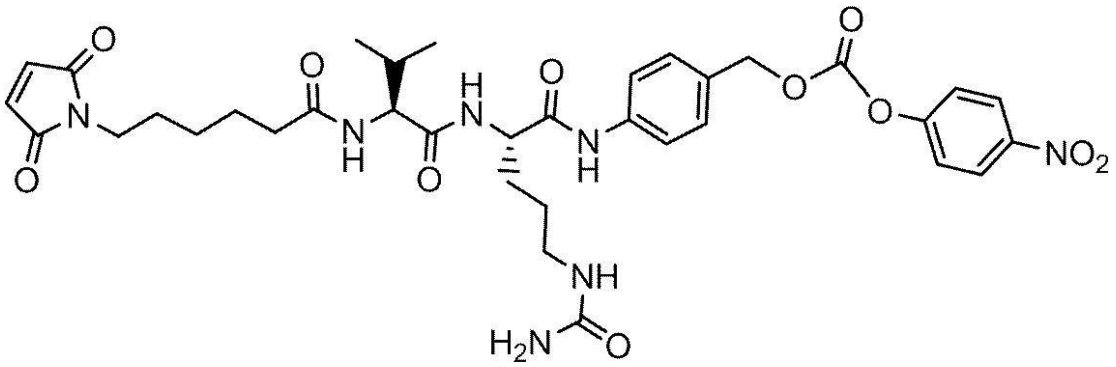
他の自壊性スペーサーとしては、例えば、それらに限定されないが、２－アミノイミダゾール－５－メタノール誘導体（ＵＳ７３７５０７８; Hayら(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237）及びオルソ－又はパラ－アミノベンジルアセタールのような、ＰＡＢ基と電気的に類似する芳香族化合物が挙げられる。置換又は非置換の４－アミノ酪酸アミド（Rodriguesら(1995) Chemistry Biology 2:223）、適切に置換されたビシクロ［２．２．１］及びビシクロ［２．２．２］環系（Stormら(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815）並びに２－アミノフェニルプロピオン酸アミド（Amsberryら(1990) J. Org. Chem. 55:5867）のような、アミド結合加水分解の際に環化を受けるスペーサーを用いることができる。グリシンで置換されたアミン含有薬物の消滅（Kingsburyら(1984) J. Med. Chem. 27:1447）も、ＡＡＣにおいて有用な例示的自壊性スペーサーである。

【０２３８】

ＡＡＣのために有用なリンカー－抗生物質中間体

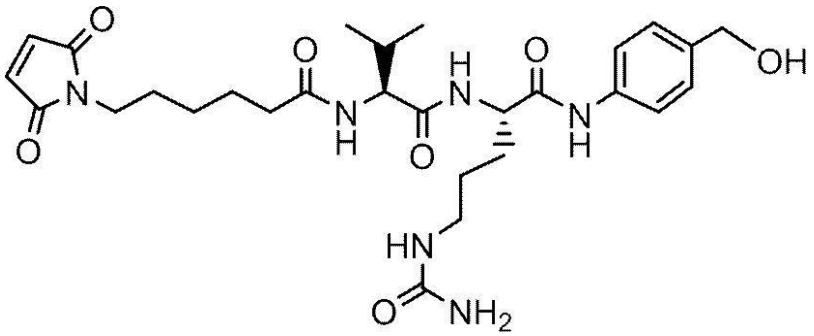
式ＩＩ及び表２のリンカー－抗生物質中間体（ＬＡ）を、図２３－２５及び実施例１－１７に例示するようにして、リファマイシン型抗生物質部分をペプチド－リンカー試薬とカップリングすることにより調製した。炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル

6



6

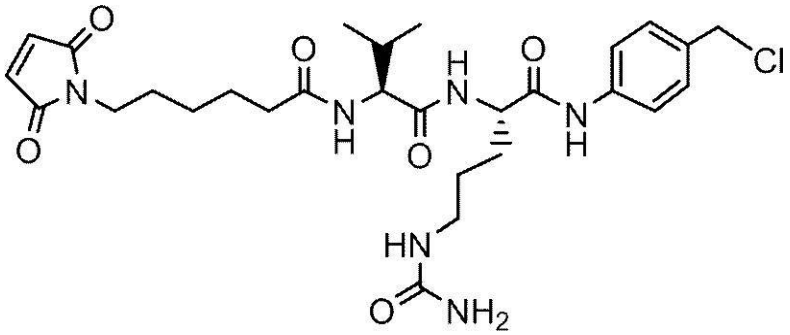
６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（ヒドロキシメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）ヘキサンアミド８



8

Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（クロロメチル）フェニルアミノ）－１－オ

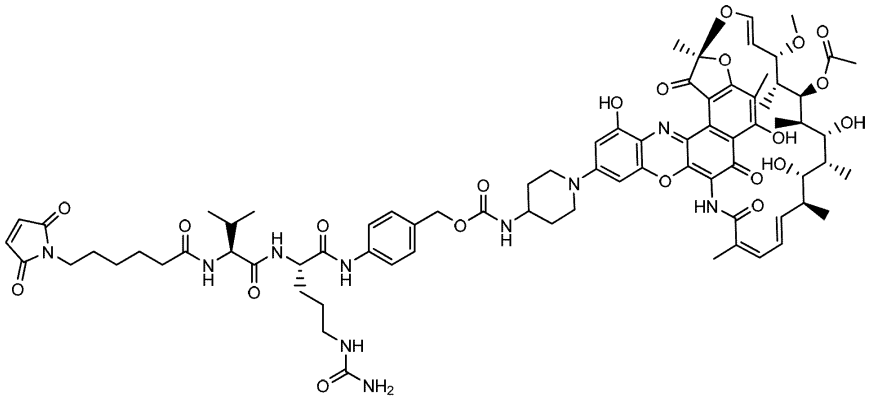
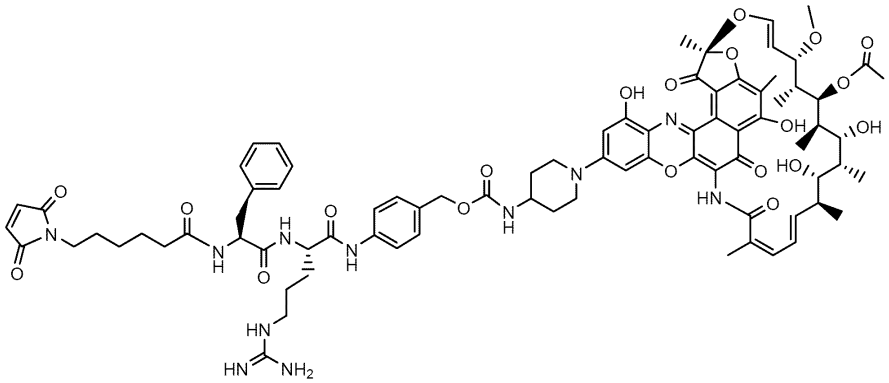
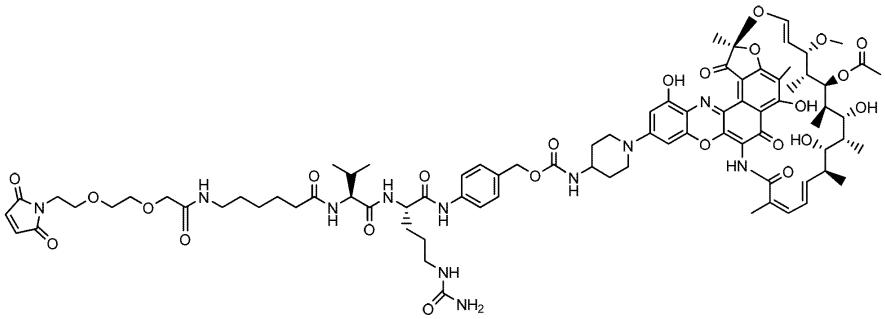
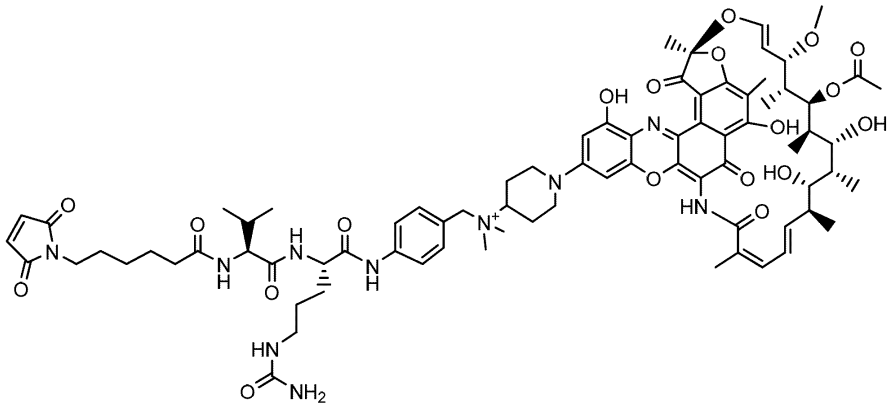
キソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）－６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド９

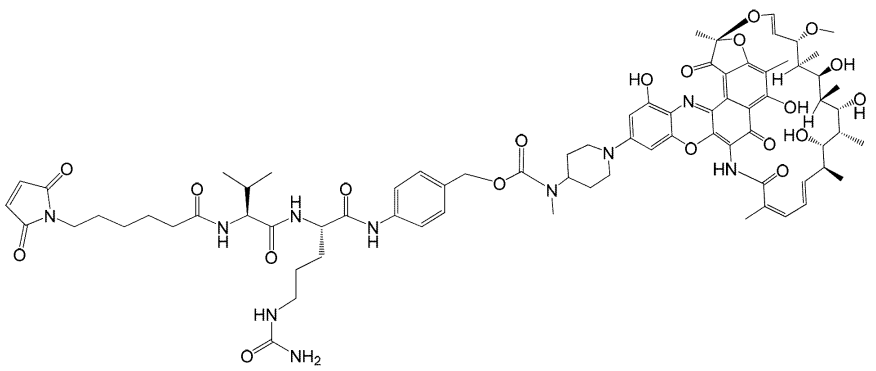
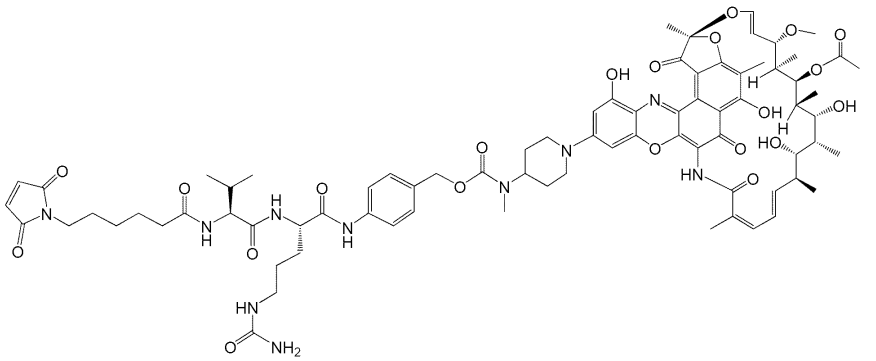
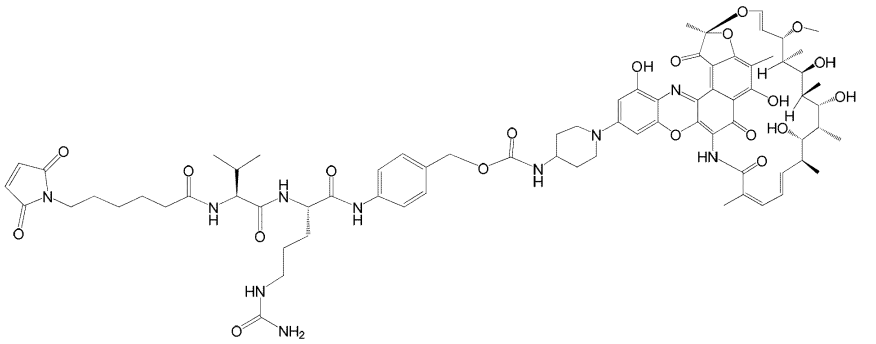
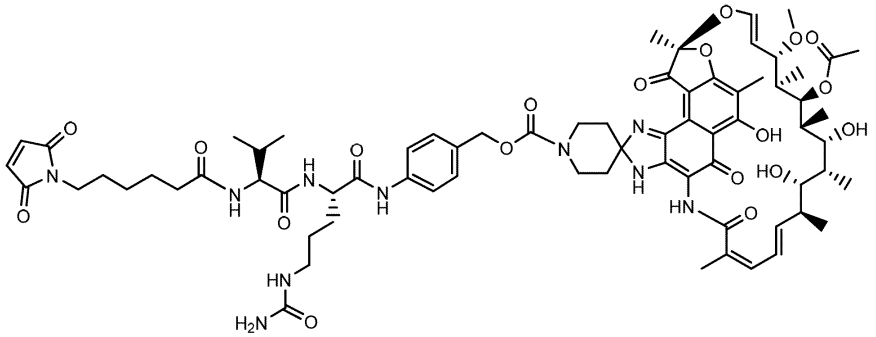
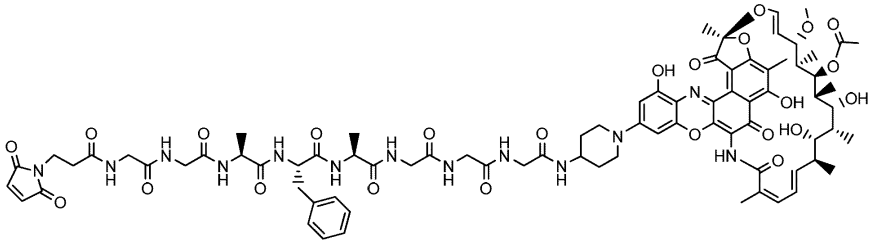


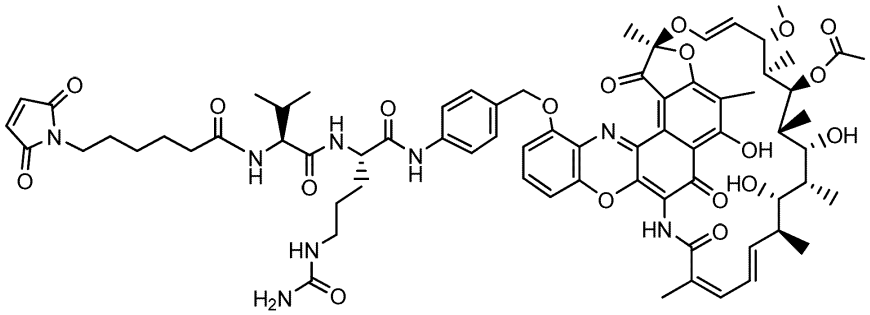
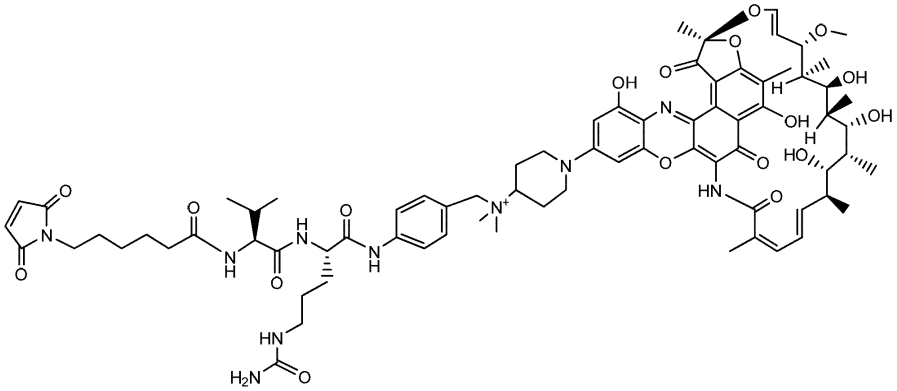
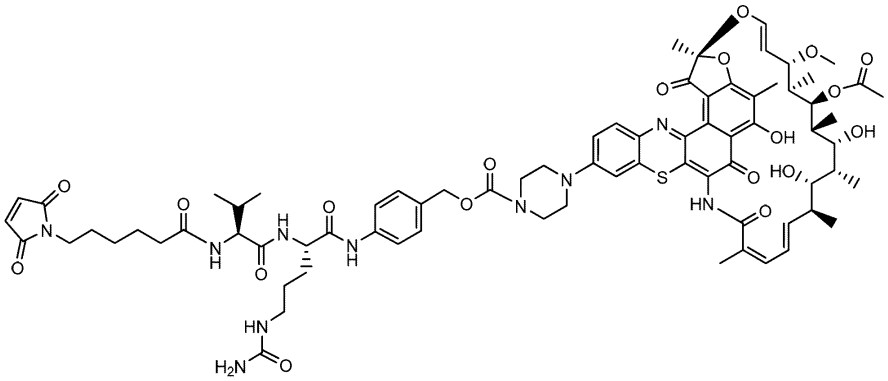
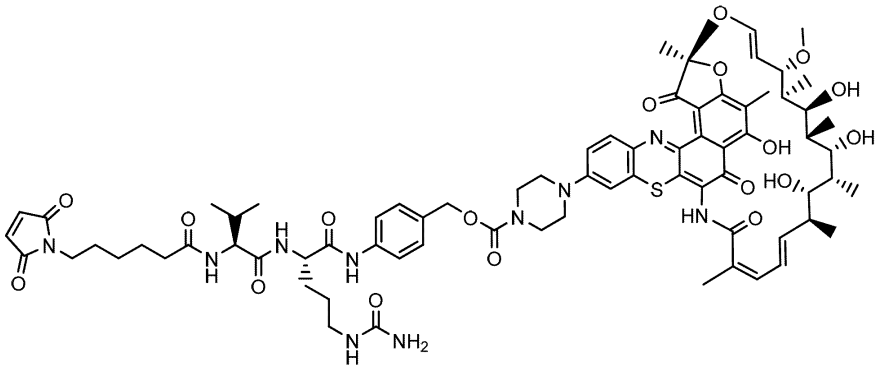
9

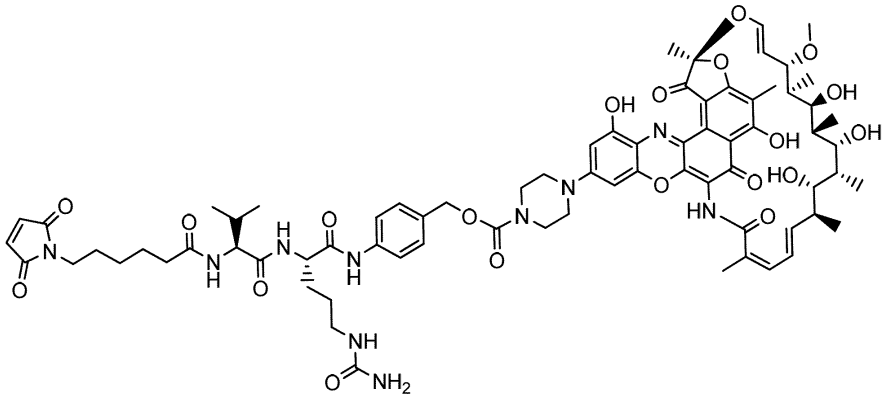
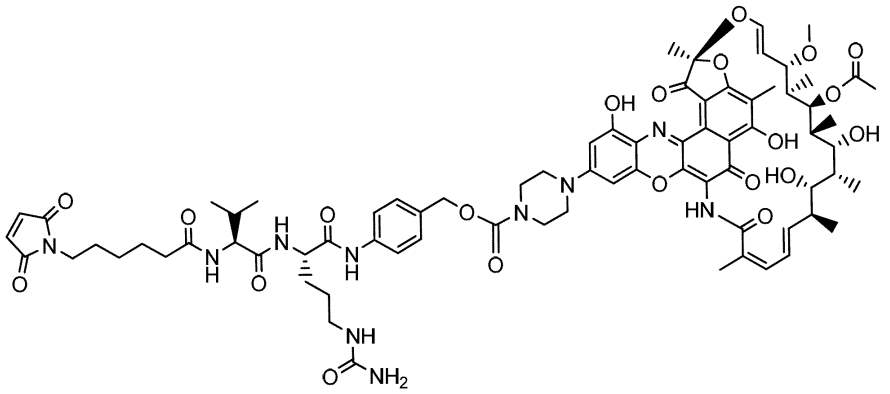
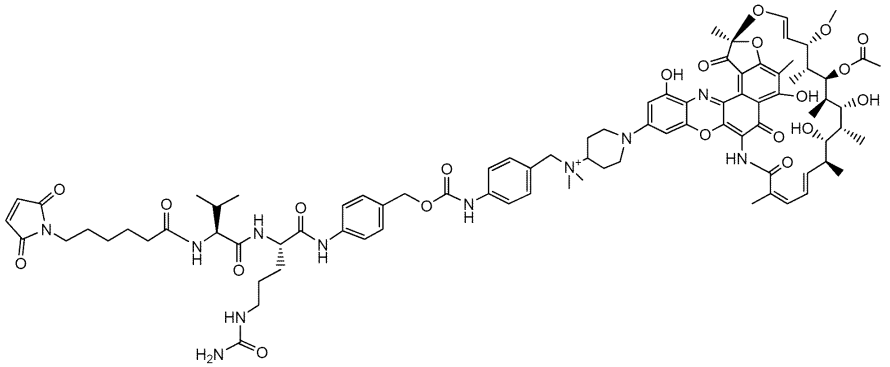
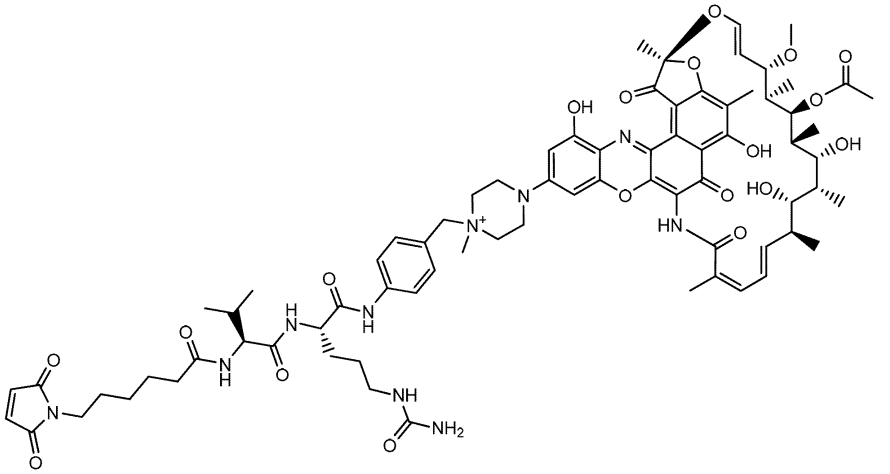
を含むリンカー試薬は、国際公開第２０１２／１１３８４７号、ＵＳ７６５９２４１、ＵＳ７４９８２９８、ＵＳ２００９０１１１７５６、ＵＳ２００９／００１８０８６、ＵＳ６２１４３４５、Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｃｈｅｍ．１３（４）：８５５－８６９に記載される方法により調製した。

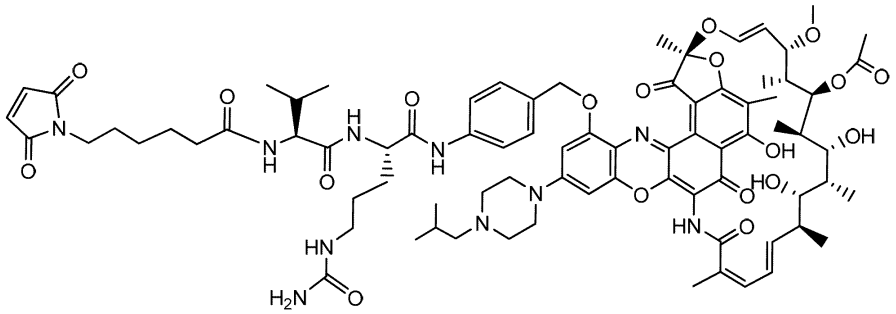
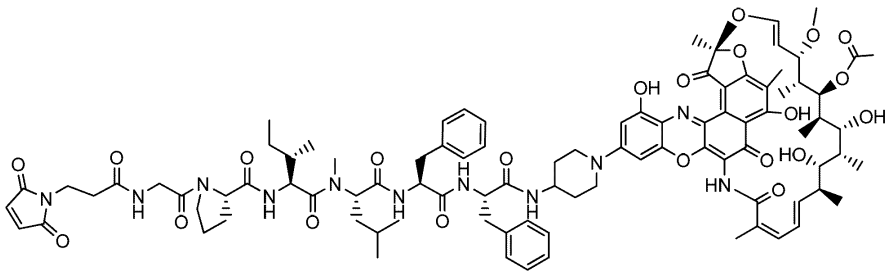
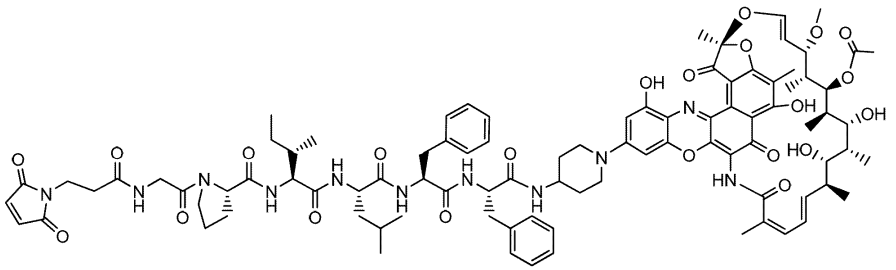
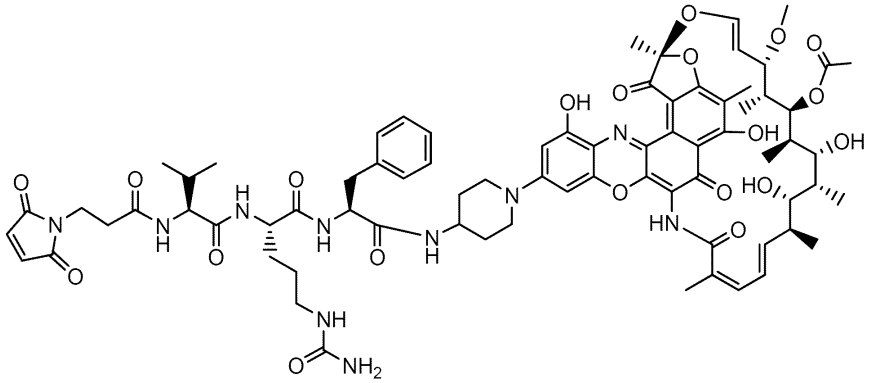
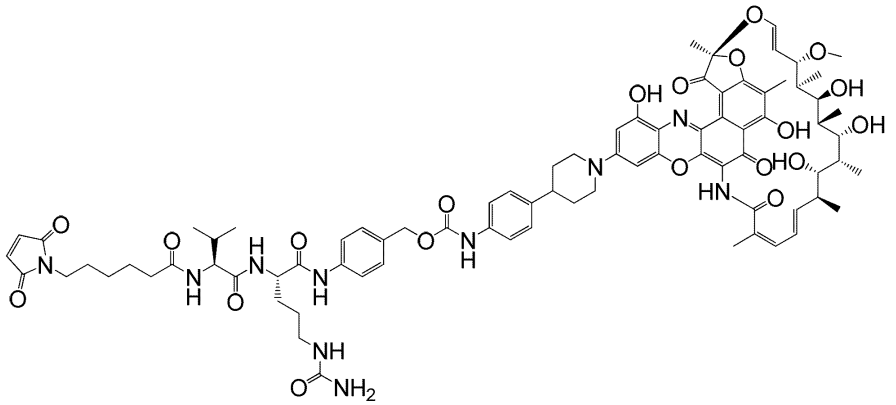
表2 リンカー-抗生物質中間体(LA)

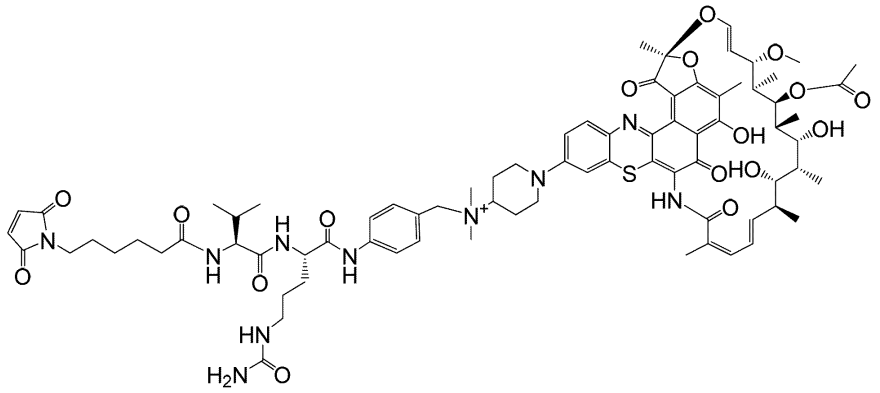
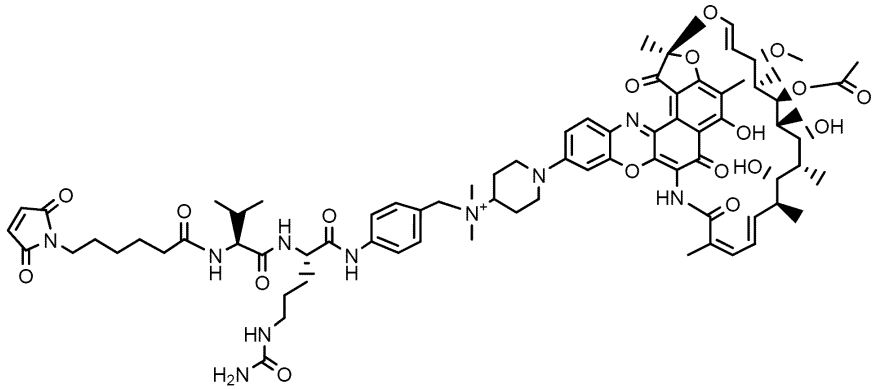
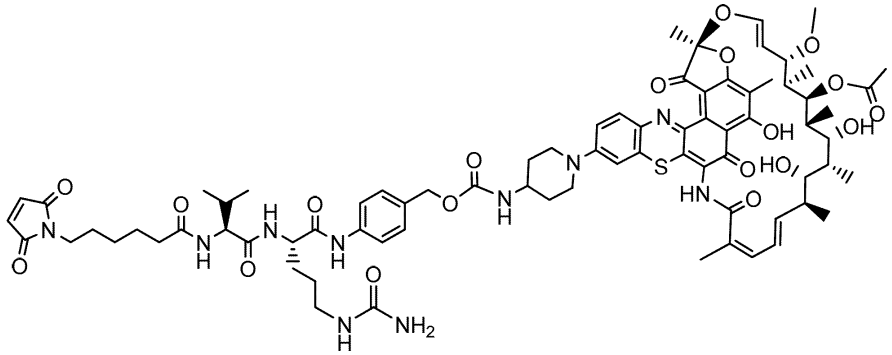
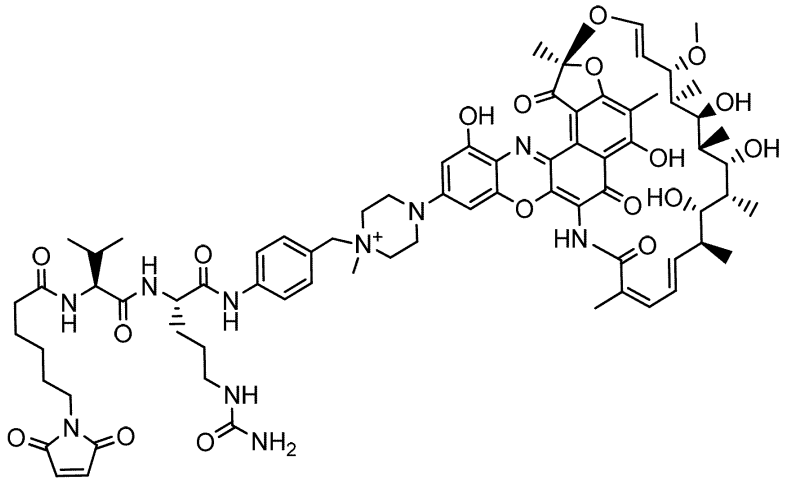
LA 番号	構造
LA-51	
LA-52	
LA-53	
LA-54	

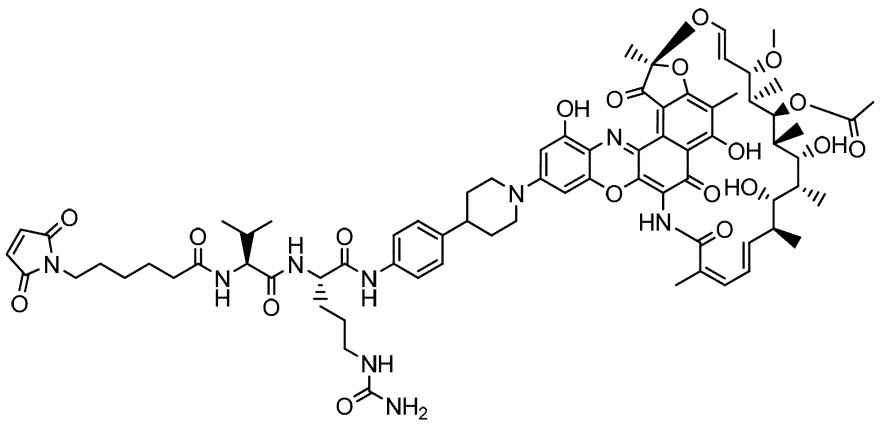
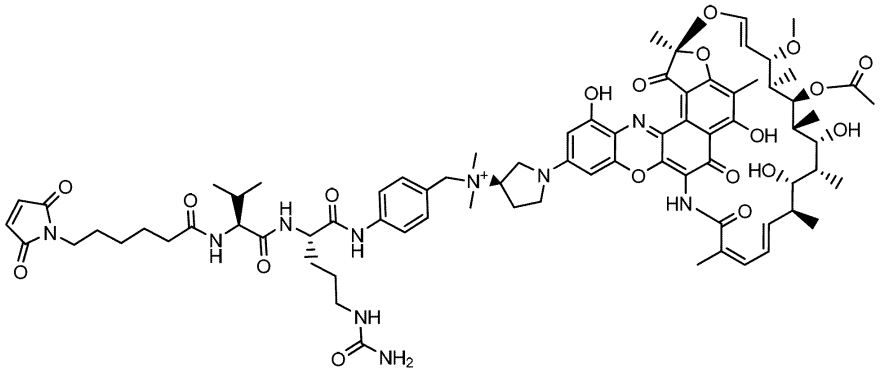
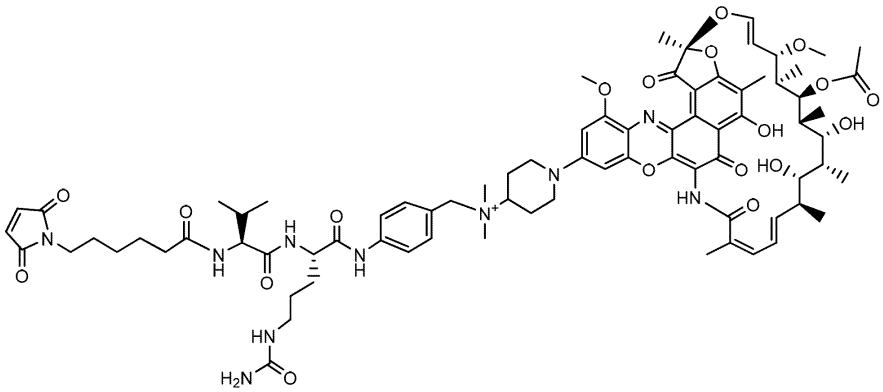
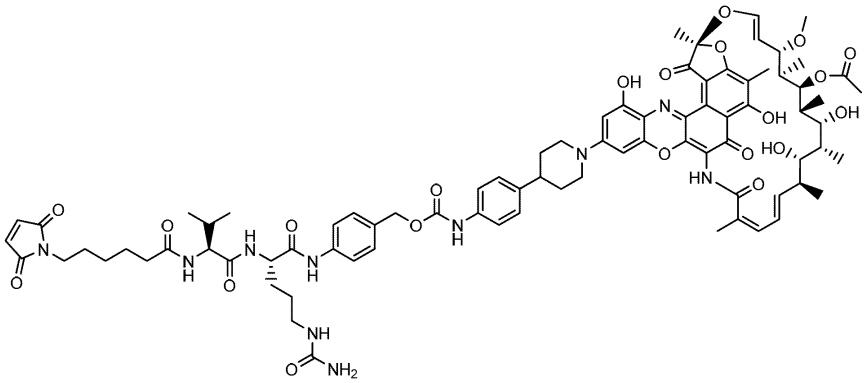
LA-55	
LA-56	
LA-57	
LA-58	
LA-59	

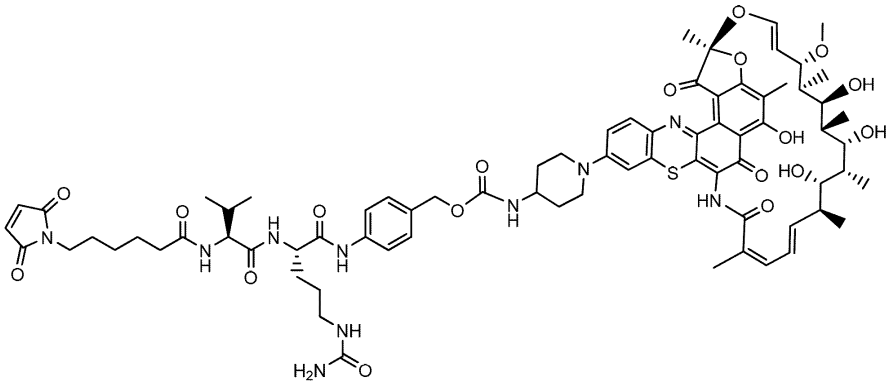
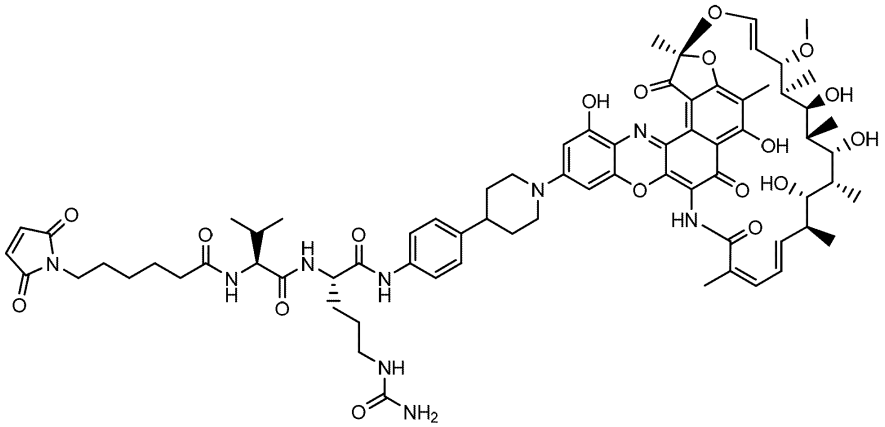
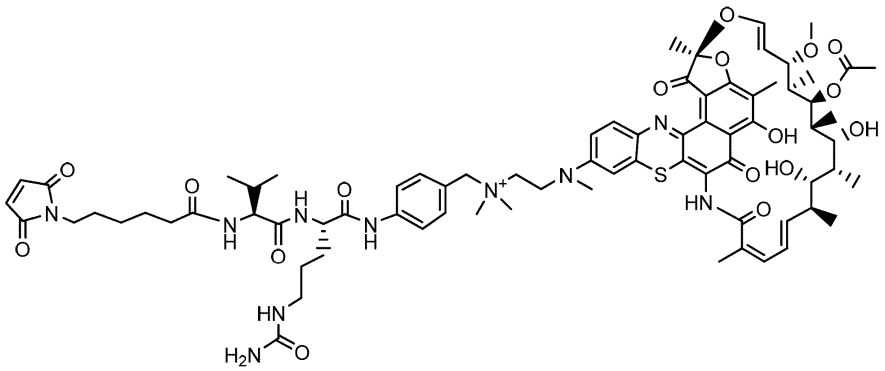
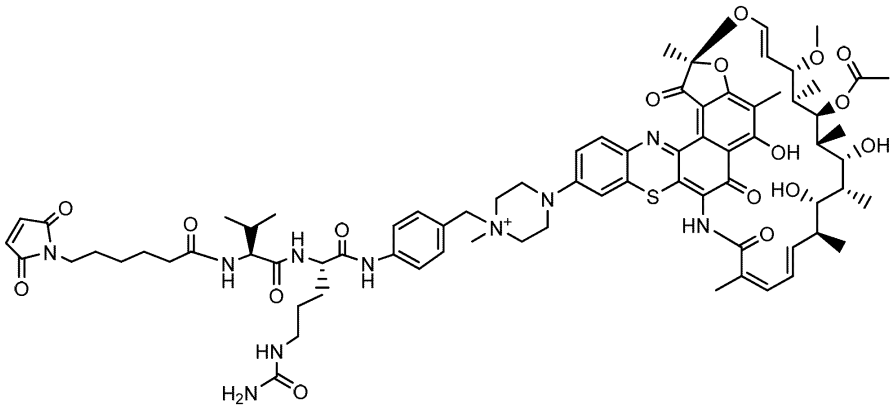
LA-60	
LA-61	
LA-62	
LA-63	

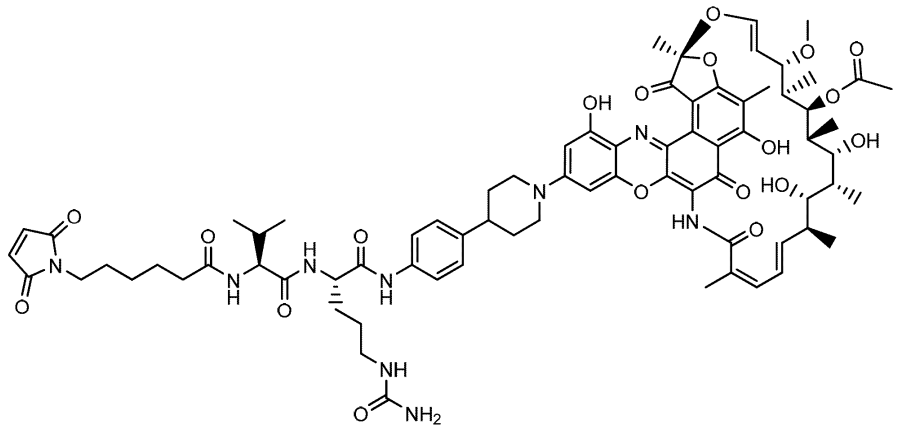
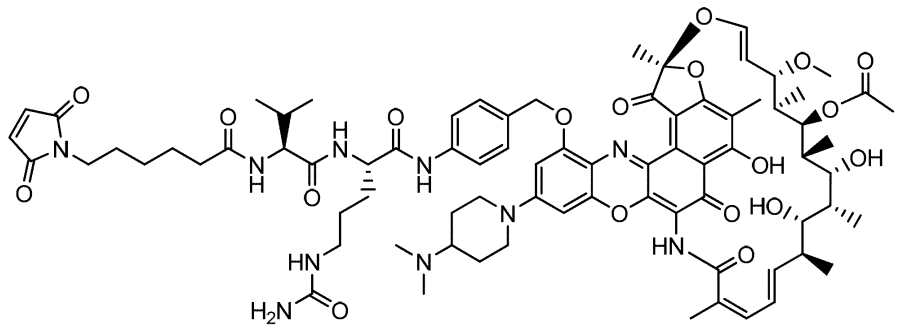
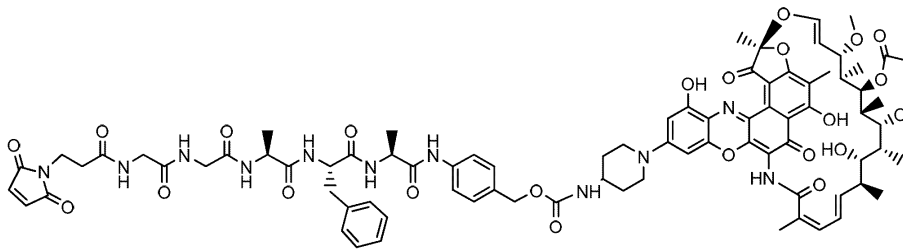
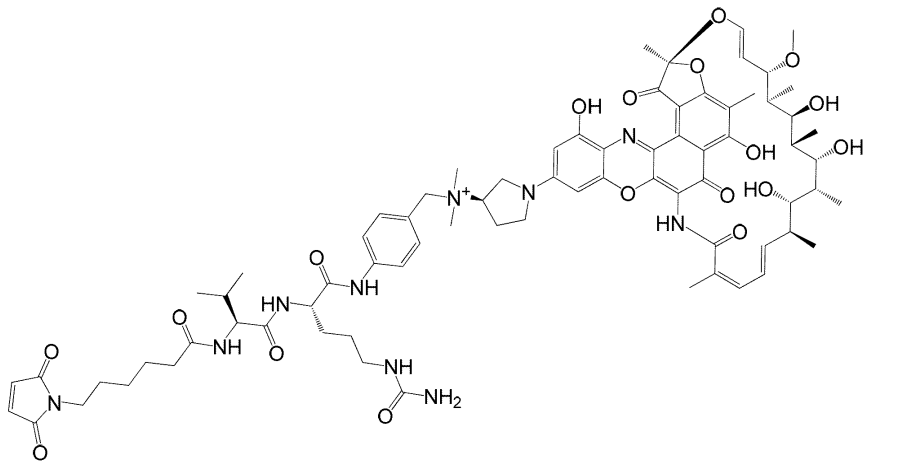
LA-64	
LA-65	
LA-66	
LA-67	

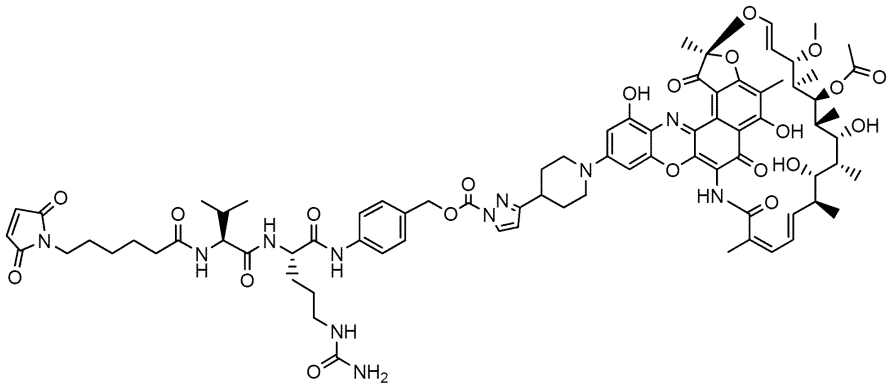
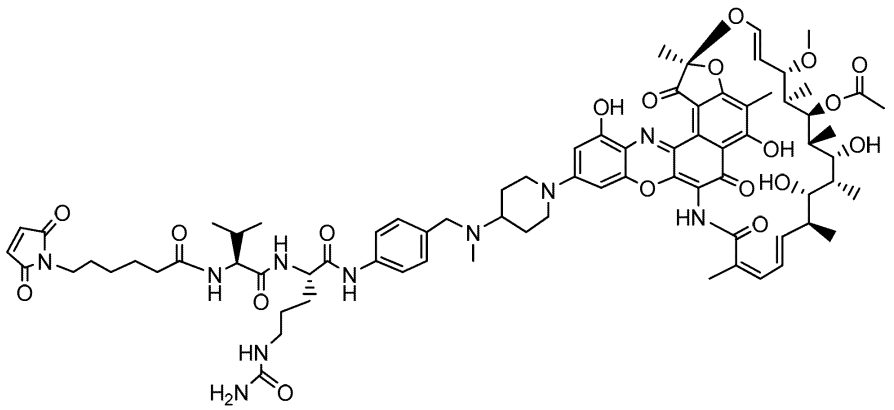
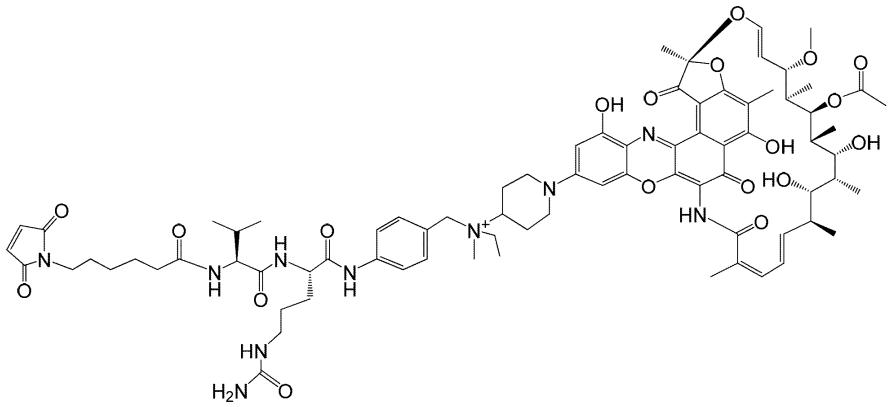
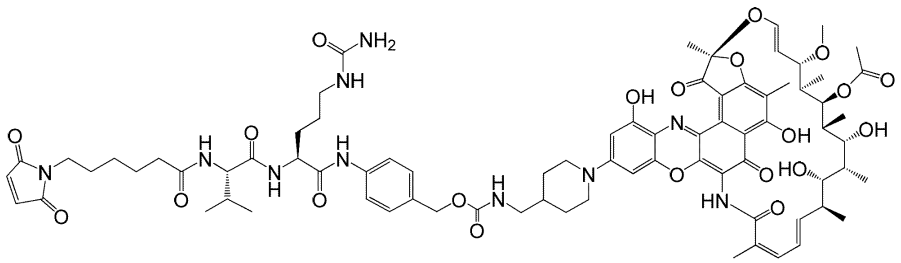
LA-68	
LA-69	
LA-70	
LA-71	
LA-72	

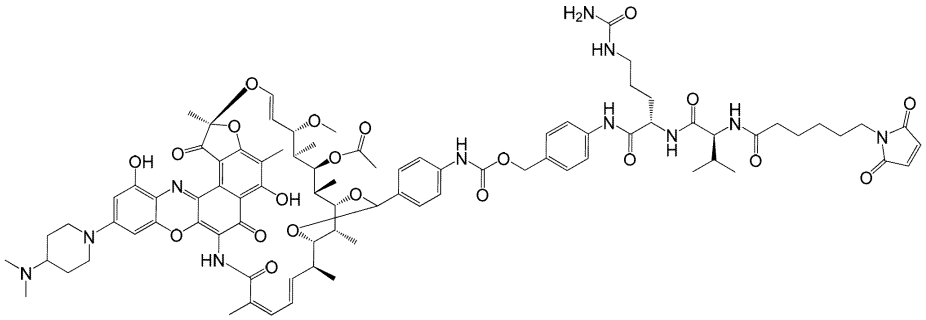
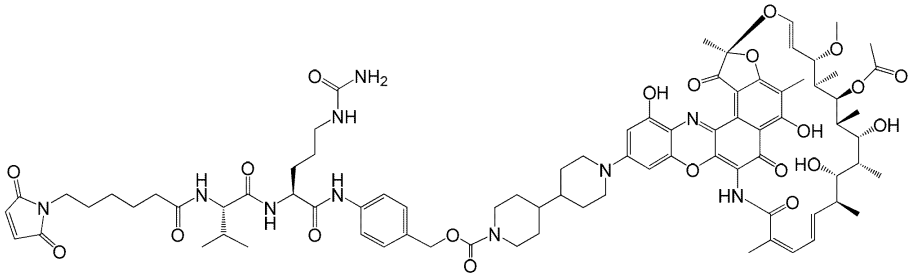
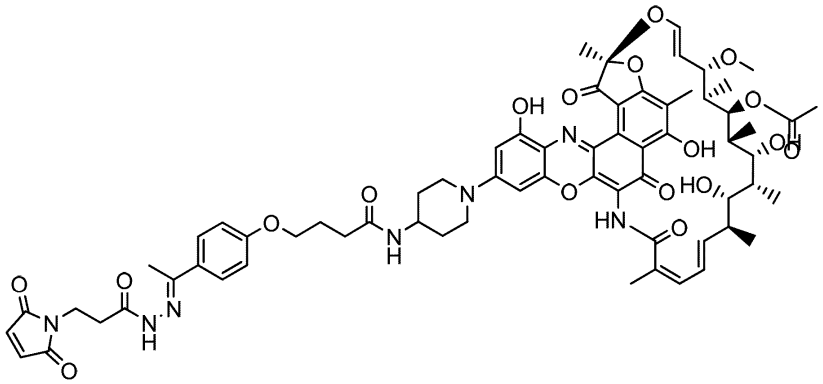
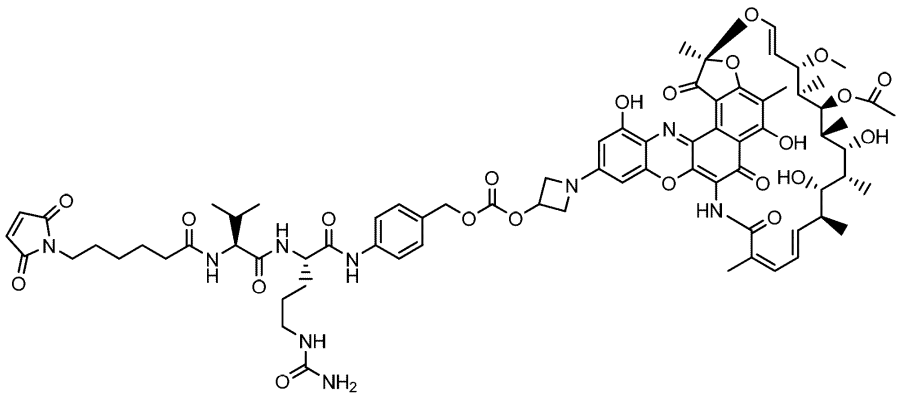
LA-73	
LA-74	
LA-75	
LA-76	

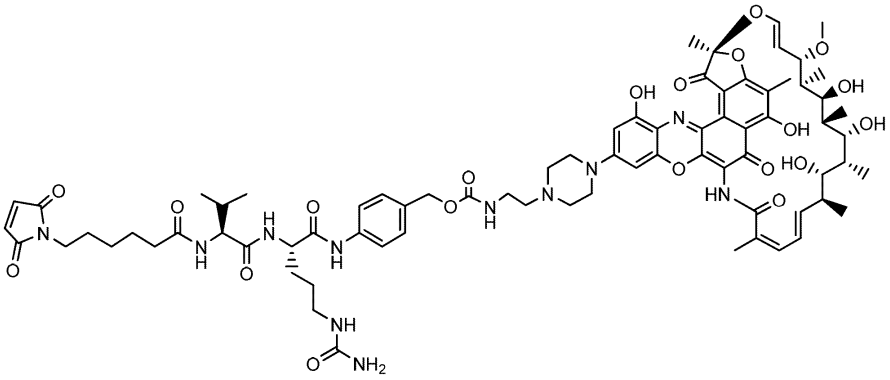
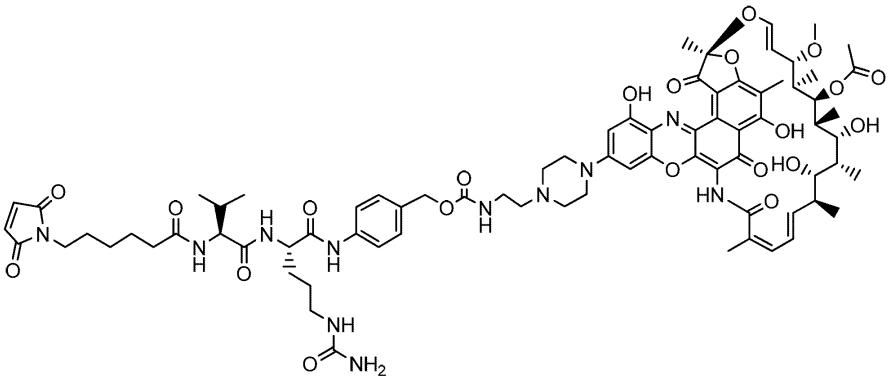
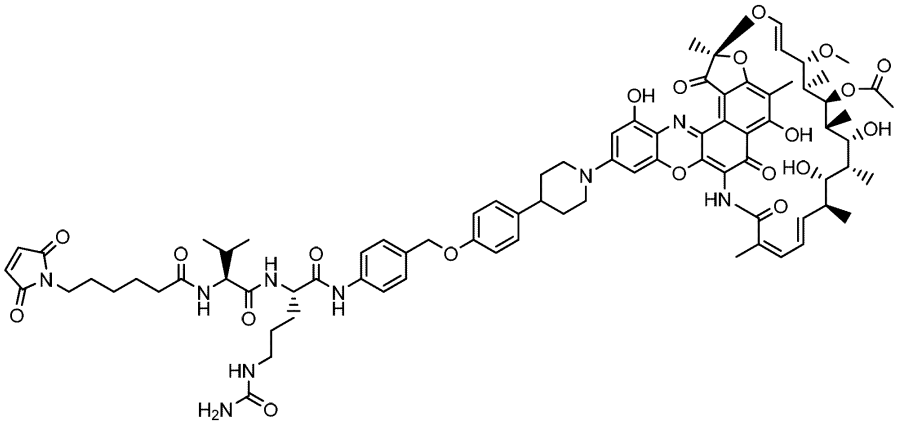
LA-77	
LA-78	
LA-79	
LA-80	

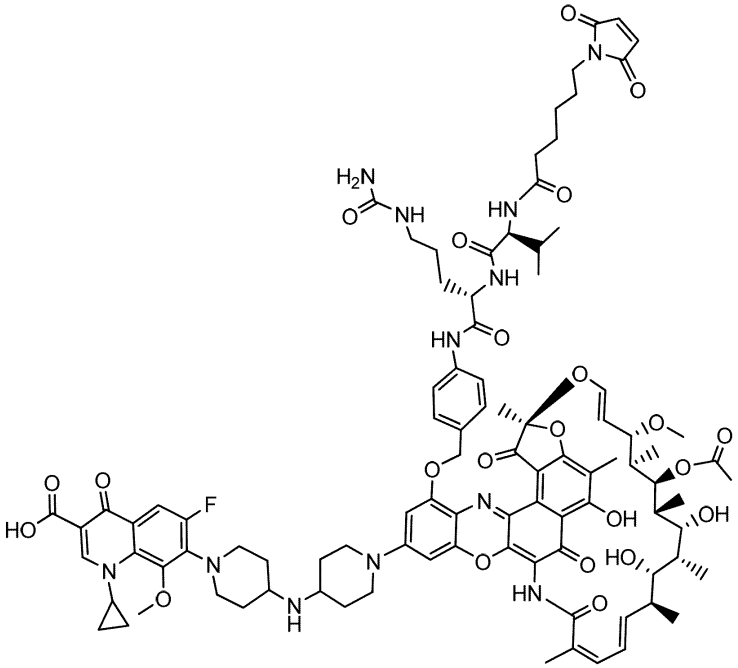
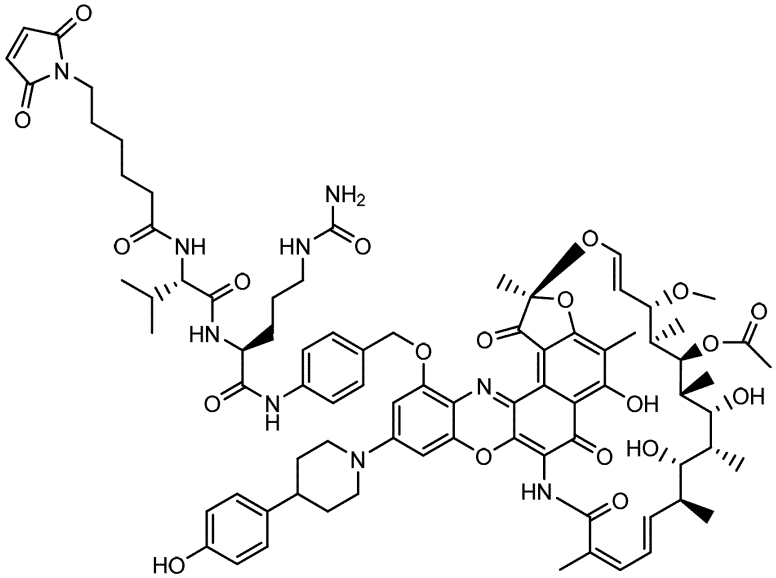
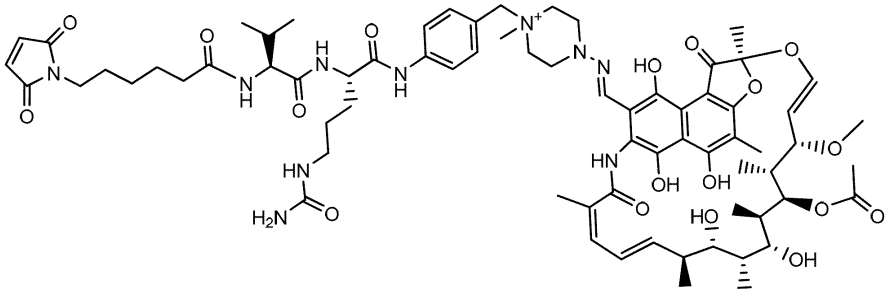
LA-81	
LA-82	
LA-83	
LA-84	

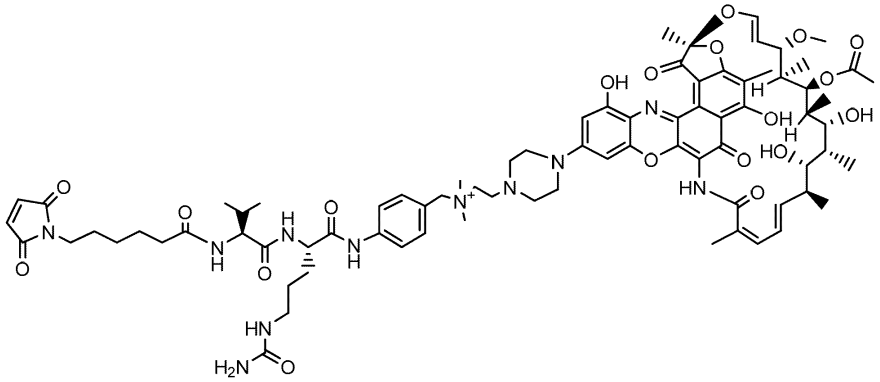
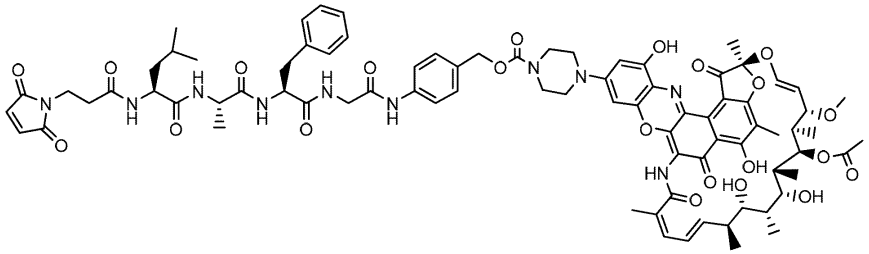
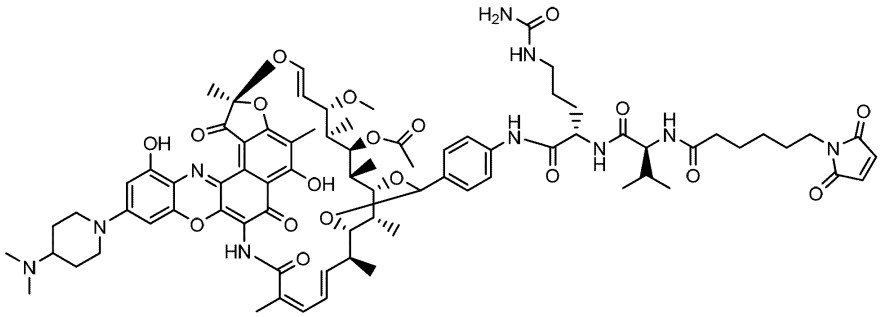
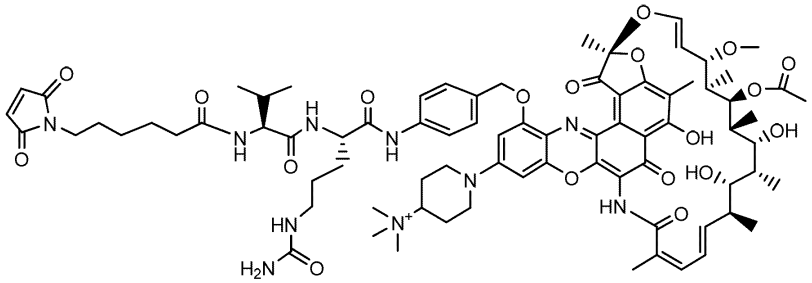
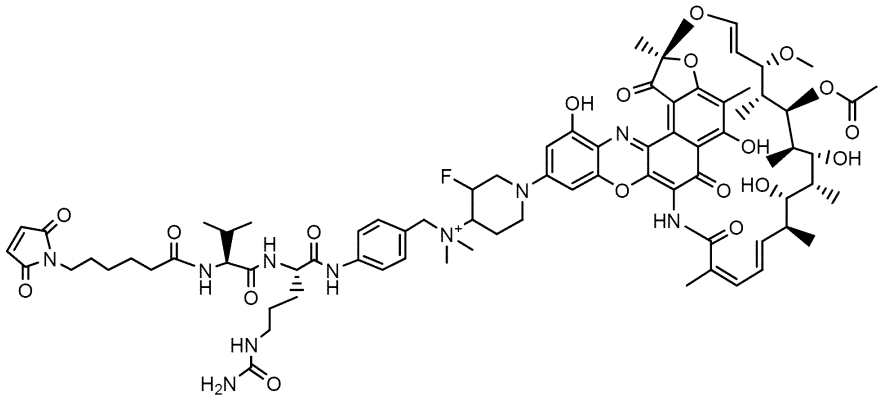
LA-85	
LA-86	
LA-87	
LA-88	

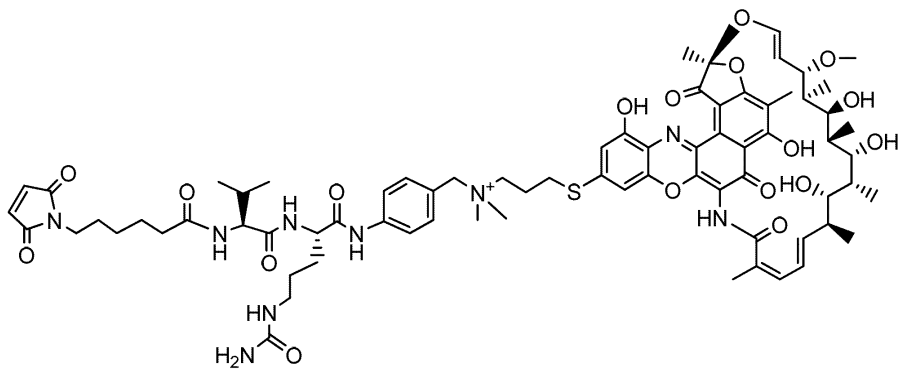
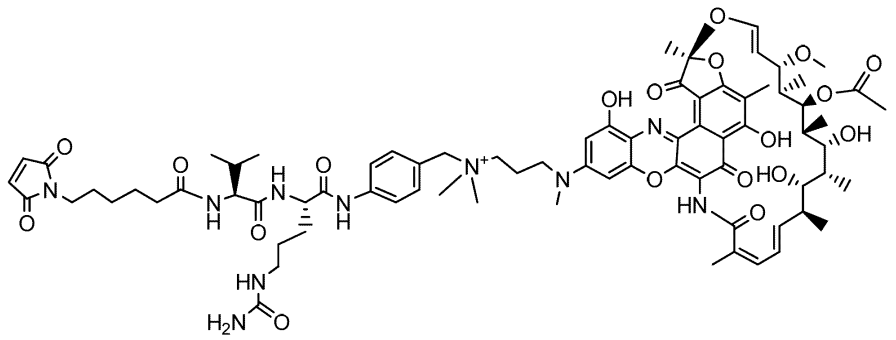
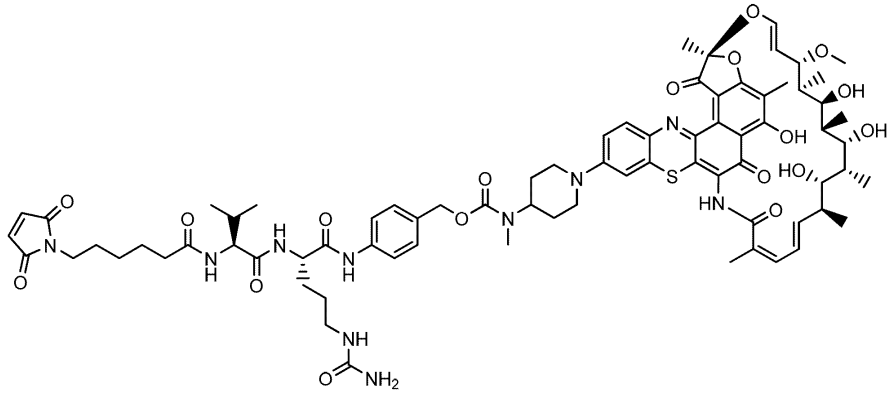
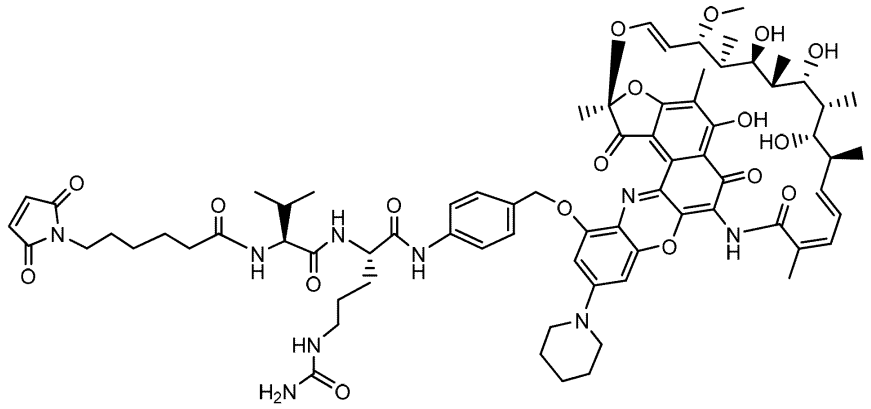
LA-89	
LA-90	
LA-91	
LA-92	

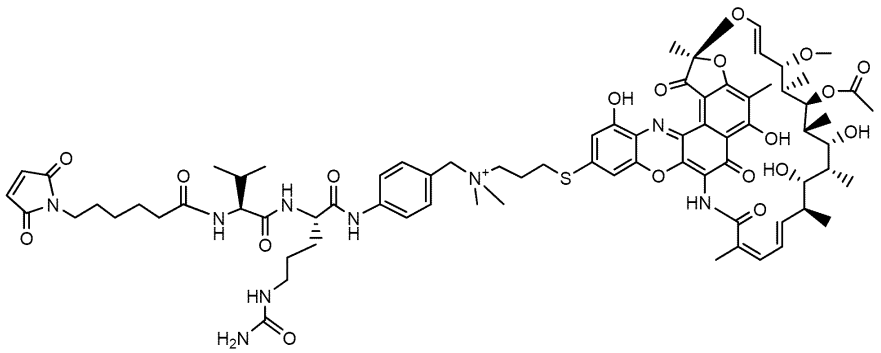
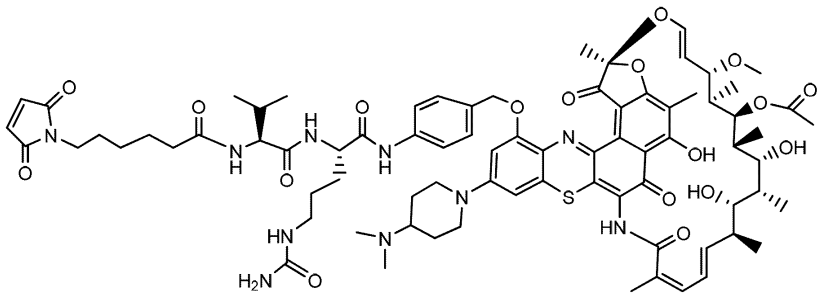
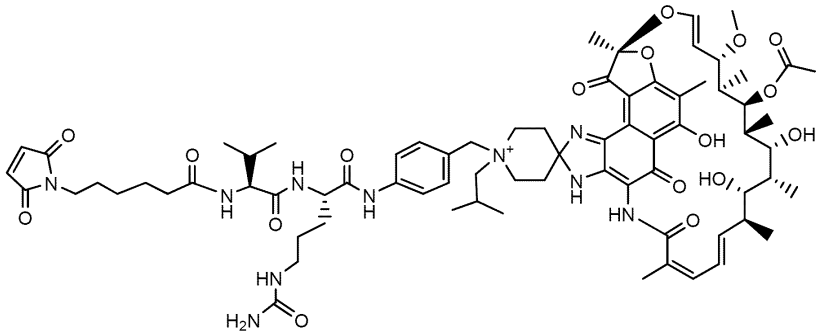
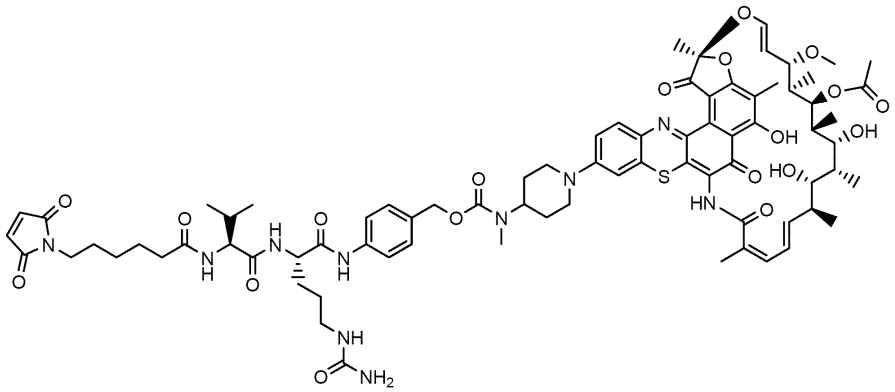
LA-93	
LA-94	
LA-95	
LA-96	

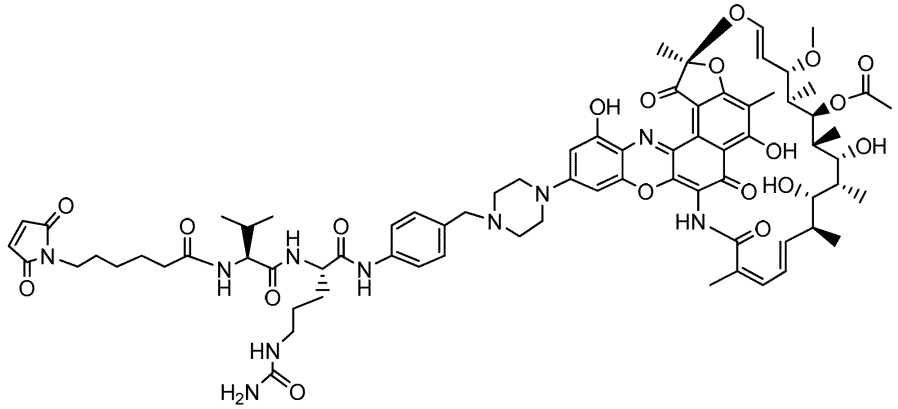
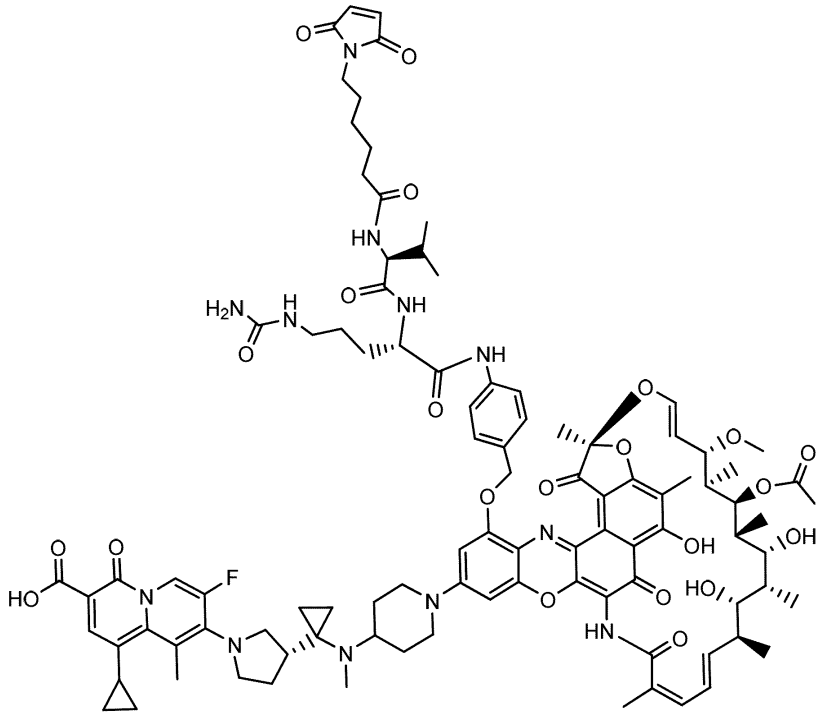
LA-97	
LA-98	
LA-99	

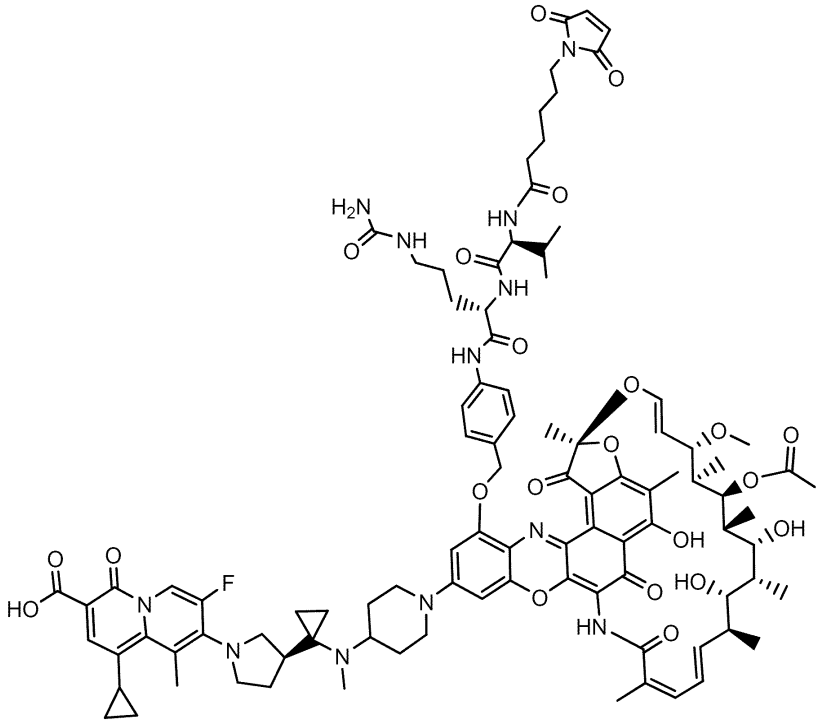
LA-100	
LA-101	
LA-102	

LA-103	
LA-104	
LA-105	
LA-106	
LA-107	

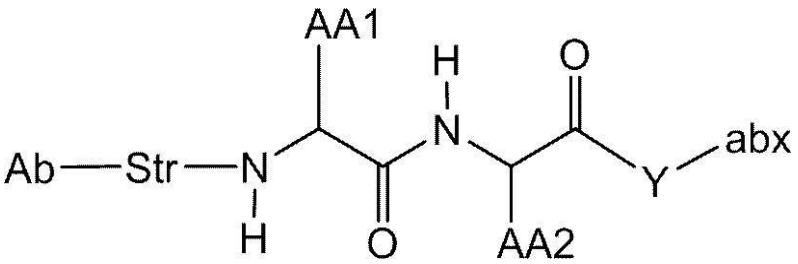
LA-108	
LA-109	
LA-110	
LA-111	

LA-112	
LA-113	
LA-114	
LA-115	

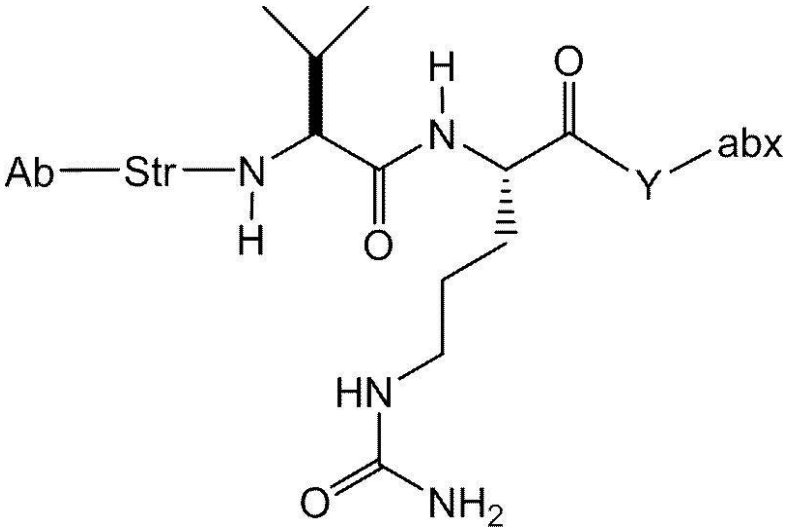
LA-116	
LA-117	

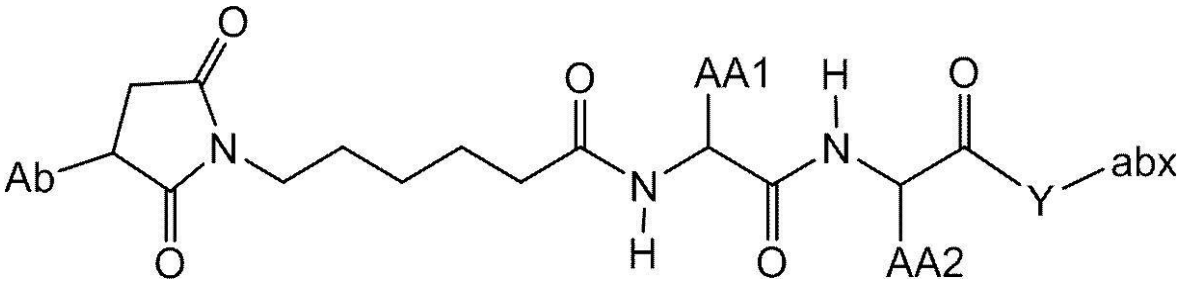
LA-118	

【０２３９】
抗体－抗生物質コンジュゲートの実施態様
　Ｓ４４９７抗体を、ｐｉｐＢＯＲと称する表３中のリファマイシン誘導体などと、プロテアーゼにより切断可能なペプチドリンカーを介して結合させた。リンカーは、バリン－シトルリン（ｖａｌ－ｃｉｔ、ｖｃ）ジペプチド（Dubowchikら(2002) Bioconj. Chem. 13:855-869）を含むペプチド単位を認識するカテプシンＢ、Ｄなどを含むリソソームプロテアーゼにより切断されるように設計する。抗生物質及びＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢリンカーなどからなるリンカー－抗生物質中間体の作製は、実施例１－１７に詳細に記載する。リンカーは、ＰＡＢ部分のアミド結合の切断が活性状態の抗生物質から抗体を分離するように設計する。
【０２４０】
　Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲと称するＡＡＣは、抗生物質上のジメチル化アミノ及びリンカー上のオキシカルボニル基以外は、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣと同一である。
【０２４１】
　図５は、抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）についての薬物活性化の可能性のある機序を示す。活性な抗生物質（Ａｂ）は、哺乳動物細胞の内部へのＡＡＣの内部移行の後にのみ放出される。ＡＡＣ中の抗体のＦａｂ部分は黄色ブドウ球菌と結合し、ＡＡＣのＦｃ部分は、好中球及びマクロファージを含む食作用細胞とのＦｃ－受容体が媒介する結合によって細菌の取り込みを増進する。ファゴリソソームへの内部移行の後に、Ｖａｌ－Ｃｉｔリンカーは、リソソームプロテアーゼにより切断され、活性な抗生物質をファゴリソソームの内部に放出する。
【０２４２】
　本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）化合物のある実施態様は、以下：

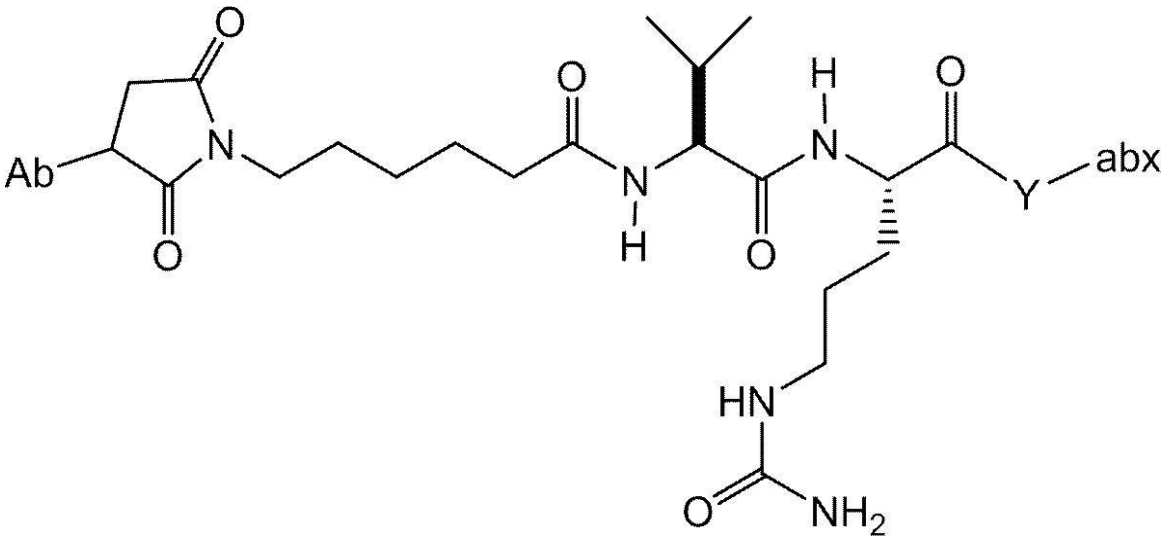


（式中、ＡＡ１及びＡＡ２は、Ｈ、－CH_3、－CH_2（C_6H_5）、－$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_2$、－$CH_2CH_2CH_2NHC$（ＮＨ）NH_2、－ＣＨＣＨ（CH_3）CH_3及び－$CH_2CH_2CH_2NHC$（Ｏ）NH_2を含むアミノ酸側鎖から独立して選択される）を含み、式：

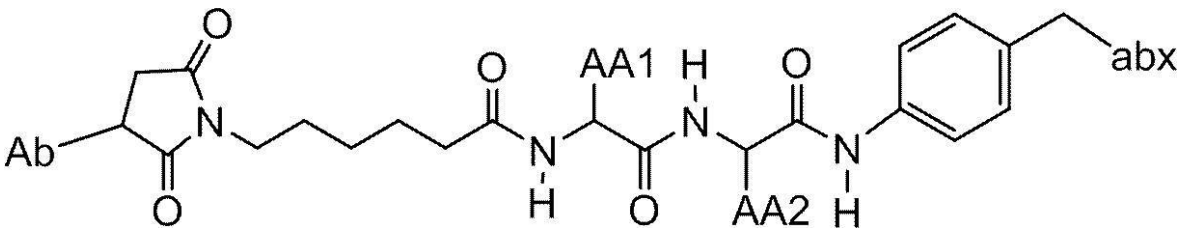




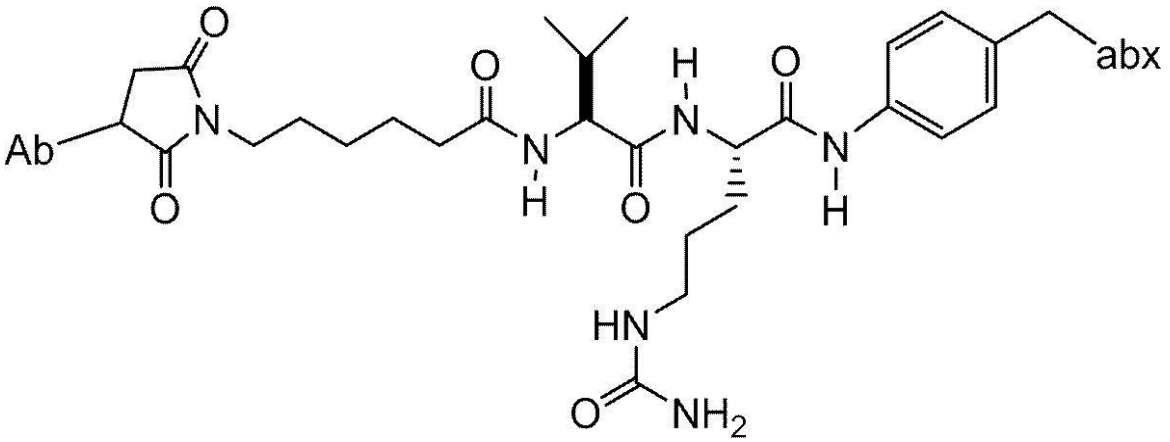
.



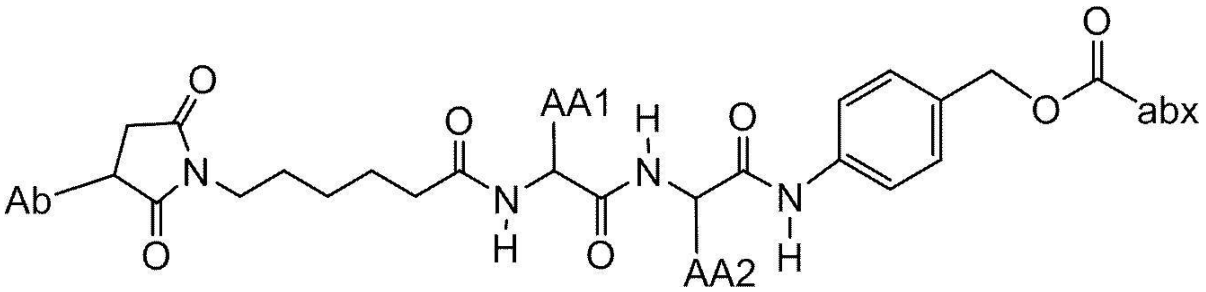
.

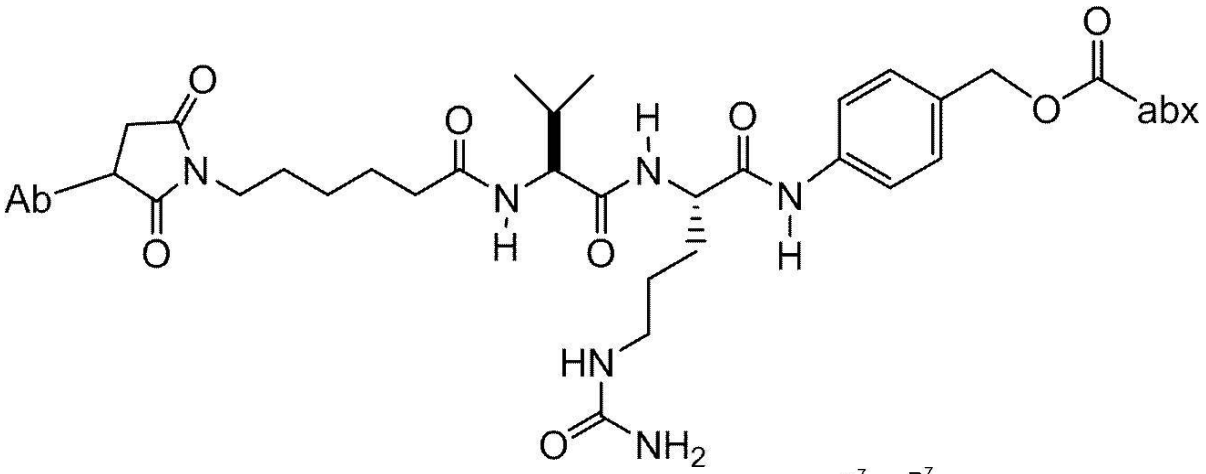


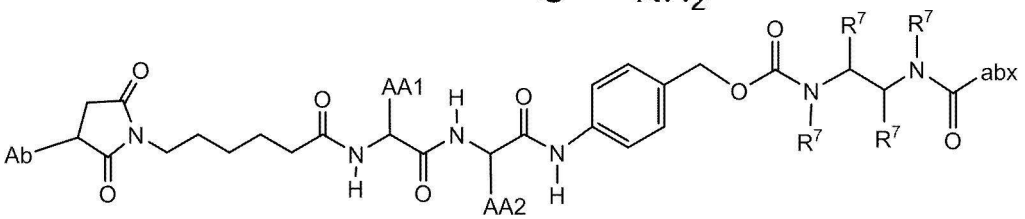
.



.





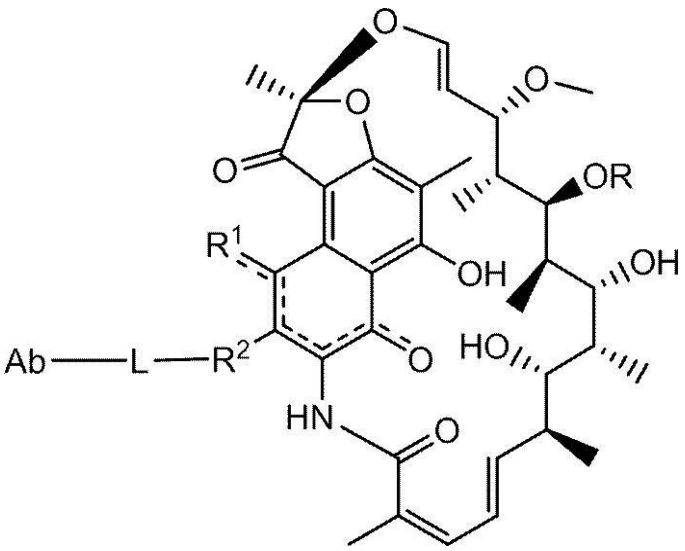


.

を含む。

【０２４３】

本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下：



I

（式中、

破線は、任意選択の結合を示し、

Ｒは、Ｈ、C_1－C_{12}アルキル又はＣ（Ｏ）CH_3であり、

R^1は、ＯＨであり、

R^2は、ＣＨ＝Ｎ－（ヘテロシクリル）であり、ヘテロシクリルは、Ｃ（Ｏ）CH_3、C_1－C_{12}アルキル、C_1－C_{12}ヘテロアリール、C_2－C_{20}ヘテロシクリル、C_6－C_{20}アリール及びC_3－C_{12}カルボシクリルから独立して選択される一又は複数の基で置換されていてもよいか、

あるいはR^1及びR^2は、５又は６員の縮合ヘテロアリール又はヘテロシクリルを形成し、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環を形成していてもよく、スピロ又は縮合６員ヘテロアリール、ヘテロシクリル、アリール若しくはカルボシクリル環は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_1－C_{12}アルキル又はＯＨで置換されていてもよく、

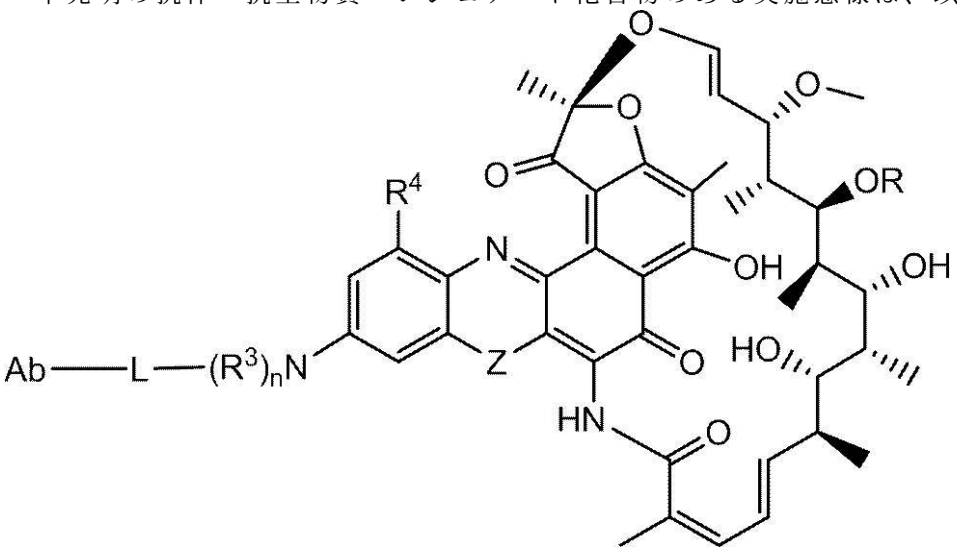
Ｌは、R^2又はR^1及びR^2により形成される縮合ヘテロアリール若しくはヘテロシクリルと結合するペプチドリンカーであり、

Ａｂは、抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体である）

を含む。

【０２４４】

本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下：

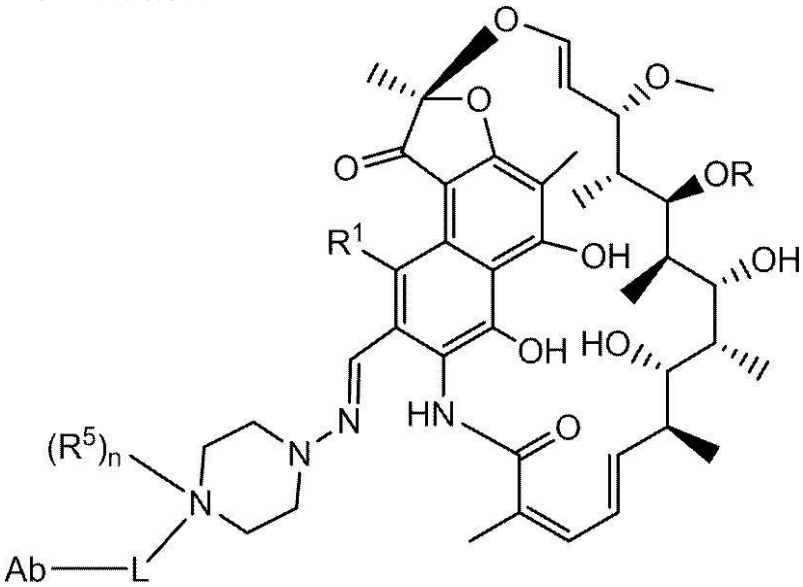


（式中、R^3は、Ｈ及びC_1－C_{12}アルキルから独立して選択され、ｎは、１又は２であり、R^4は、Ｈ、Ｆ、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、C_1－C_{12}アルキル及びＯＨから選択され、

Ｚは、ＮＨ、Ｎ（Ｃ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキル）、Ｏ及びＳから選択される）
を含む。

【０２４５】

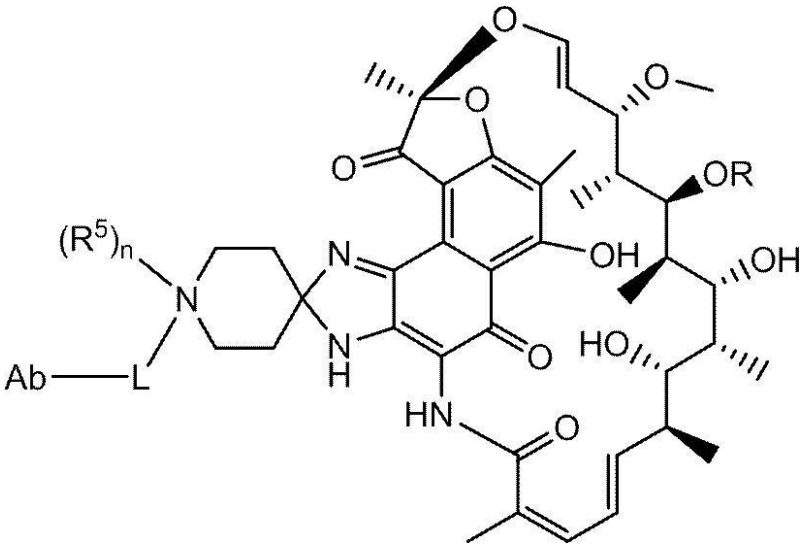
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下のリファンピン型抗生物質部分：



（式中、Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから選択され、ｎは、０又は１である）
を含む。

【０２４６】

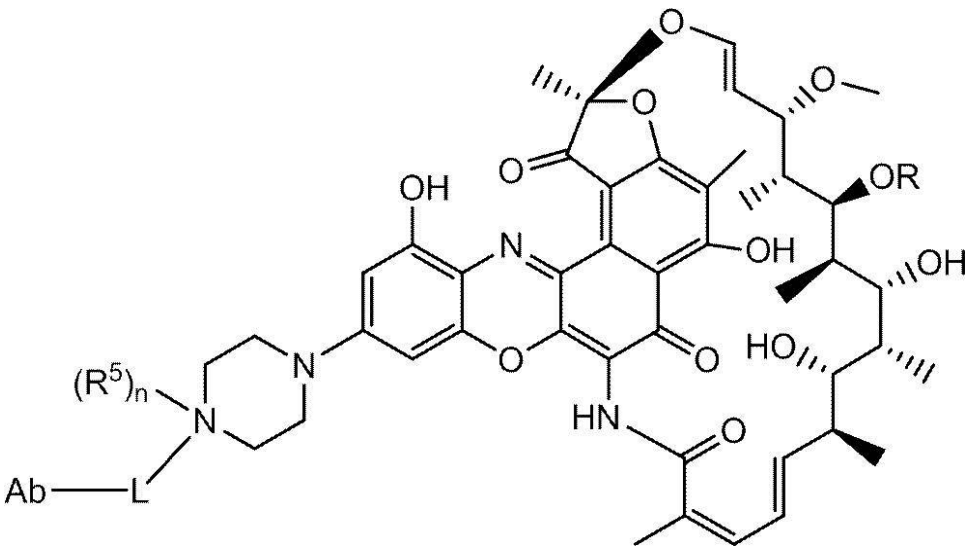
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下のリファブチン型抗生物質部分：



（式中、Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから選択され、ｎは、０又は１である）
を含む。

【０２４７】

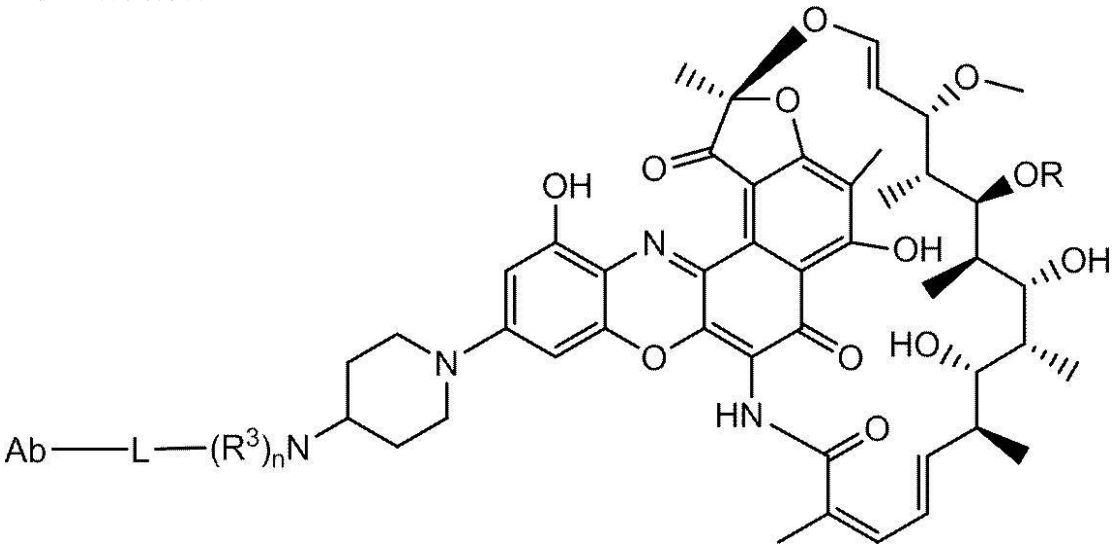
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下のリファラジル型抗生物質部分：



（式中、Ｒ^{5}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから選択され、ｎは、０又は１である）
を含む。

【０２４８】

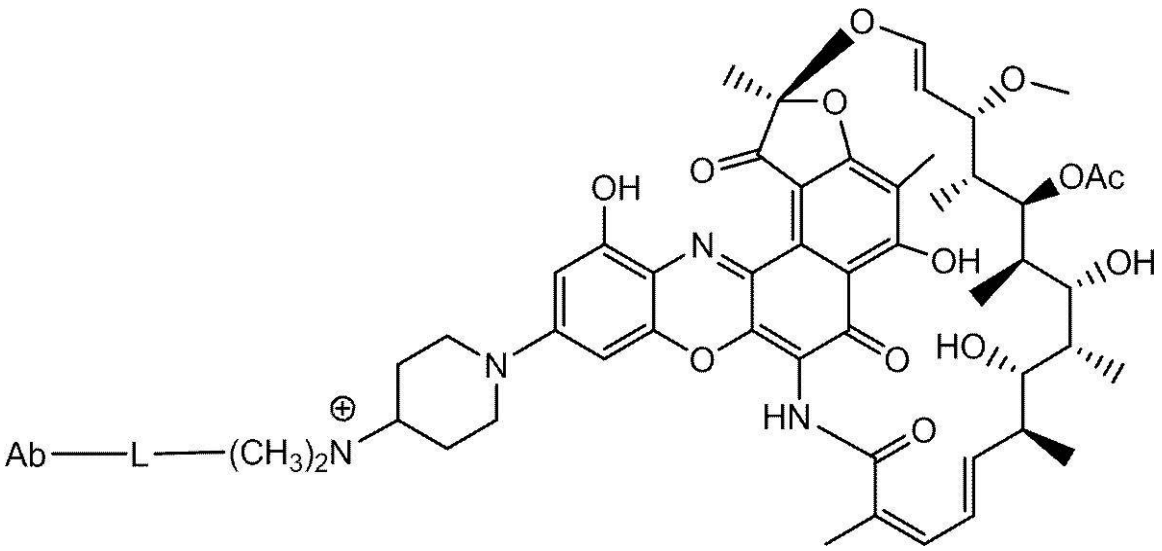
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下のｐｉｐＢＯＲ型抗生物質部分：



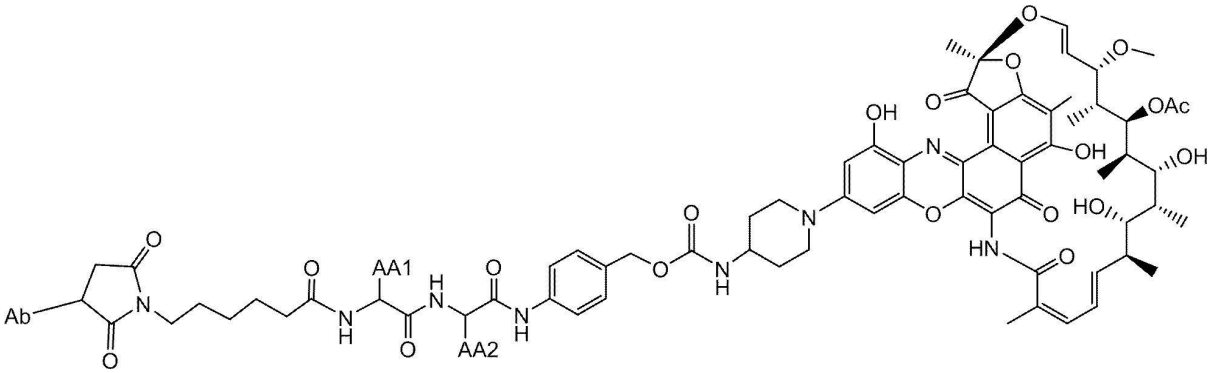
（式中、Ｒ^{3}は、Ｈ及びＣ$_{1}$－Ｃ$_{12}$アルキルから独立して選択され、ｎは、１又は２である）
を含む。

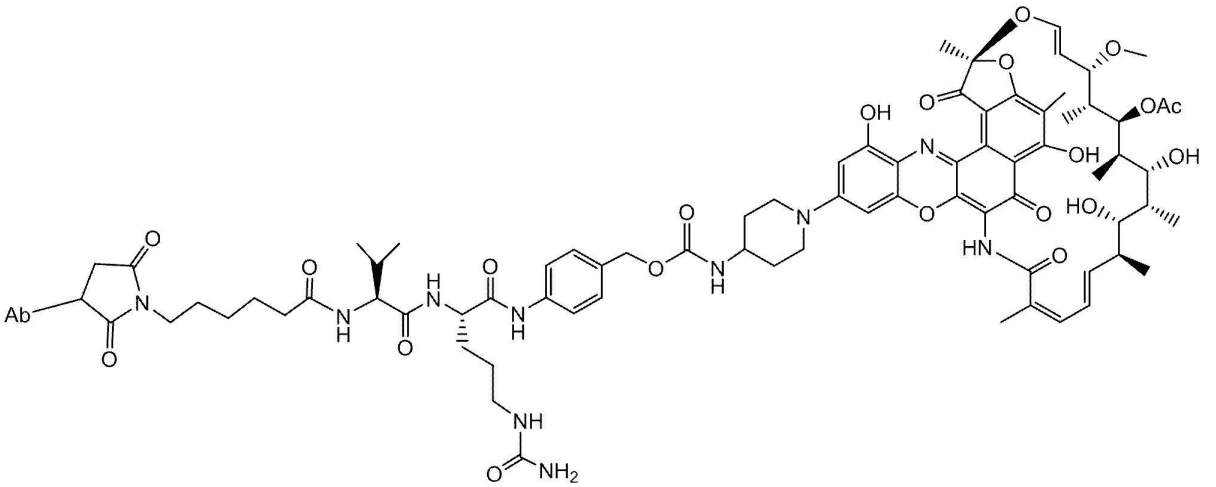
【０２４９】

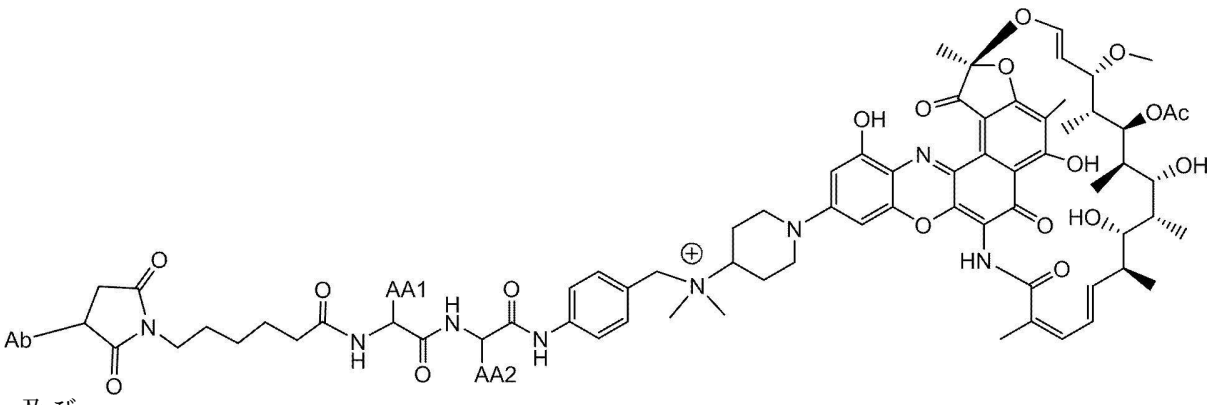
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のある実施態様は、以下：



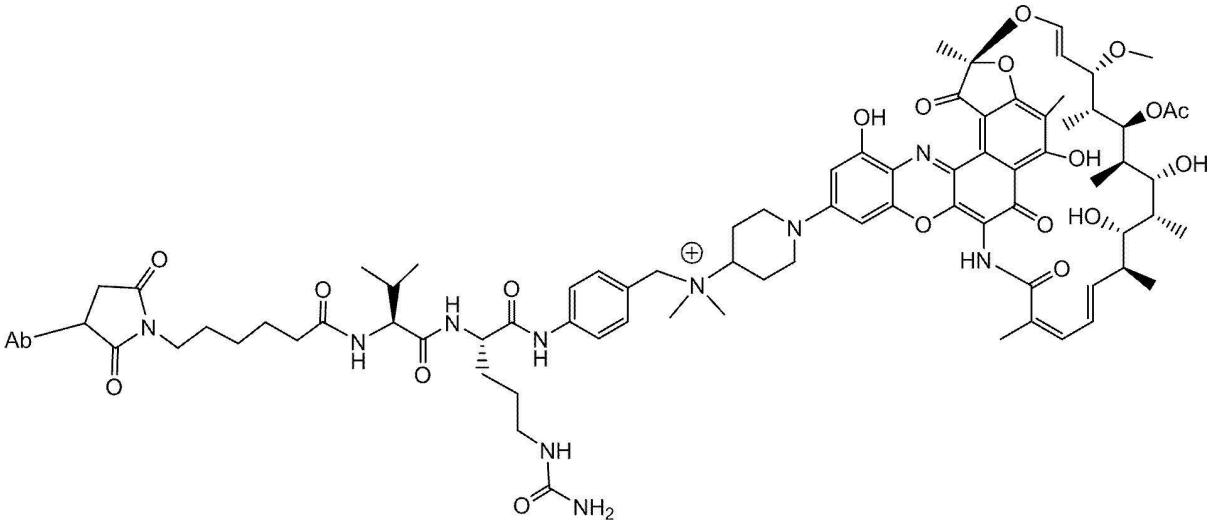
.
を含む。
【０２５０】
本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物のさらなる実施態様は、以下：







,及び



.

を含む。

【０２５１】

ＡＡＣの抗生物質負荷量

抗生物質負荷量は、式Ｉの分子における抗体あたりの抗生物質（ａｂｘ）部分の平均数であるｐで表す。抗生物質負荷量は、抗体あたり１から２０抗生物質部分（Ｄ）の範囲であってよい。式ＩのＡＡＣは、１から２０までの範囲の抗生物質部分とコンジュゲートした抗体の収集物又はプールを含む。コンジュゲーション反応からのＡＡＣの調製物中の抗体あたりの抗生物質部分の平均数は、質量分光分析、ＥＬＩＳＡアッセイ及びＨＰＬＣのような従来の手段により特徴を明らかにしてよい。ｐについてのＡＡＣの量的分布も決定できる。いくつかの場合では、他の抗生物質負荷量を有するＡＡＣから、逆相ＨＰＬＣ又は電気泳動のような手段により、ｐがある特定の値である均一ＡＡＣを分離、精製及び特徴づけできる。

【０２５２】

いくつかの抗体－抗生物質コンジュゲートについて、ｐは、抗体上の結合部位の数により制限されることがある。例えば、上記の例示的実施態様におけるように結合がシステインチオールである場合、抗体は、１つ若しくはいくつかのシステインチオール基だけを有することがあるか、又はリンカーを結合させることができる１つ若しくはいくつかの十分に反応性のチオールだけを有することがある。ある特定の実施態様では、より高い抗生物質負荷量、例えばｐ＞５は、ある特定の抗体－抗生物質コンジュゲートの凝集、不溶性、毒性又は細胞透過性の喪失を引き起こすことがある。ある特定の実施態様では、本発明のＡＡＣについての抗生物質負荷量は、１から約８まで、約２から約６まで、約２から約４まで、又は約３から約５まで、約４、又は約２の範囲である。

【０２５３】

ある特定の実施態様では、理論的最大値より少ない抗生物質部分が、コンジュゲーショ

ン反応中に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、以下に論じるように抗生物質－リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリジン残基を含んでよい。一般的に、抗体は、抗生物質部分と結合できる多くの遊離で反応性のシステインチオール基を含まない。実際、抗体中のほとんどのシステインチオール残基は、ジスルフィド架橋として存在する。ある特定の実施態様では、抗体を、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）又はトリカルボニルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）のような還元剤を用いて、部分的又は完全に還元性の状態の下で還元して、反応性システインチオール基を得ることができる。ある特定の実施態様では、抗体を変性条件に供して、リジン又はシステインのような反応性求核基を露出させる。

【０２５４】

ＡＡＣの負荷量（抗生物質／抗体比、「ＡＡＲ」）は、例えば（ｉ）抗体に対して過剰モルの抗生物質－リンカー中間体又はリンカー試薬を制限し、（ｉｉ）コンジュゲーション反応時間及び温度を制限し、（ｉｉｉ）システインチオール修飾についての還元条件を部分的又は制限することによる様々な方法でコントロールしてよい。

【０２５５】

１つより多い求核基が抗生物質－リンカー中間体又はリンカー試薬、次いで抗生物質部分試薬と反応すならば、得られる生成物は、一又は複数の抗生物質部分が抗体と結合した分布を有するＡＡＣ化合物の混合物であることが理解される。抗体あたりの抗生物質の平均数は、抗体に特異的でありかつ抗生物質に特異的である二重ＥＬＩＳＡ抗体アッセイにより、混合物から算出できる。個別のＡＡＣ分子は、混合物中で質量分光分析により同定して、ＨＰＬＣ、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィーにより分離できる（例えばMc Donaghら(2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblettら(2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J.ら "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C.ら"Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照されたい）。ある特定の実施態様では、単一の負荷量の値を有する均一ＡＡＣを、コンジュゲーション混合物から、電気泳動又はクロマトグラフィーにより単離できる。本発明のシステイン操作抗体は、より均一な調製物を可能にする。なぜなら、抗体上の反応部位は、操作されたシステインチオールにまず制限されるからである。一実施態様では、抗体あたりの抗生物質部分の平均数は、約１から約２０の範囲である。一部の実施態様では、範囲は、約１から４までに選択してコントロールされる。

【０２５６】

抗体－抗生物質コンジュゲートを調製する方法

式ＩのＡＡＣは、（１）共有結合によりＡｂ－Ｌを形成するための抗体の求核基と二価リンカー試薬との反応と、その後の抗生物質部分（ａｂｘ）との反応、及び（２）共有結合によりＬ－ａｂｘを形成するための抗生物質部分の求核基と二価リンカー試薬との反応と、その後の抗体の求核基との反応を含む、当業者に知られる有機化学反応、条件及び試薬を用いるいくつかの経路により調製してよい。後者の経路により式ＩのＡＡＣを調製するための例示的方法は、本明細書に出典明示により明示的に援用されているＵＳ７４９８２９８に記載されている。

【０２５７】

抗体上の求核基としては、それらに限定されないが、（ｉ）Ｎ末端アミン基、（ｉｉ）側鎖アミン基、例えばリジン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えばシステイン及び（ｉｖ）抗体がグリコシル化されている場合に糖ヒドロキシル又はアミノ基が挙げられる。アミン、チオール及びヒドロキシル基は、求核性であり、（ｉ）活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロホルメート及び酸ハロゲン化物、（ｉｉ）アルキル及

びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド、（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を含むリンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成できる。ある特定の抗体は、還元可能な鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全又は部分的に還元されるような、ＤＴＴ（ジチオスレイトール）又はトリカルボニルエチルホスフィン（ＴＣＥＰ）のような還元剤での処理によるリンカー試薬とのコンジュゲーションのために反応性にしてよい。各システイン架橋は、よって、理論的に、２つの反応性チオール求核基を形成する。例えばリジン残基を２－イミノチオラン（トラウト試薬）と反応させてアミンをチオールに変換することにより、さらなる求核基をリジン残基の修飾により抗体に導入できる。１、２、３、４つ以上のシステイン残基を（例えば一又は複数の非天然システインアミノ酸残基を含む変異体抗体を調製することにより）導入することにより、反応性チオール基を抗体に導入してよい。

【０２５８】

本発明の抗体－抗生物質コンジュゲートは、抗体上の求電子基、例えばアルデヒド又はケトンカルボニル基と、リンカー試薬又は抗生物質上の求核基との間の反応によって生成することもできる。リンカー試薬上の有用な求核基としては、それらに限定されないが、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジドが挙げられる。一実施態様では、抗体を修飾して、リンカー試薬又は抗生物質上の求核置換基と反応できる求電子部分を導入する。別の実施態様では、グリコシル化抗体の糖類を、例えば過ヨウ素酸酸化試薬で酸化して、リンカー試薬又は抗生物質部分のアミン基と反応できるアルデヒド又はケトン基を形成してよい。得られるイミンシッフ塩基基は、安定な結合を形成できるか、又は例えばホウ化水素試薬により還元して、安定なアミン結合を形成できる。一実施態様では、グリコシル化抗体の炭水化物部分とガラクトースオキシダーゼ又はメタ過ヨウ素酸ナトリウムの何れかとの反応は、抗体中にカルボニル（アルデヒド及びケトン）基を生じ、これが抗生物質上の適当な基と反応できる（Hermanson, Bioconjugate Techniques）。別の実施態様では、Ｎ末端セリン又はスレオニン残基を含む抗体は、メタ過ヨウ素酸ナトリウムと反応して、最初のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成できる（Geoghegan及びStroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146;ＵＳ５３６２８５２）。このようなアルデヒドは、抗生物質部分又はリンカーの求核基と反応できる。

【０２５９】

抗生物質部分上の求核基としては、それらに限定されないが、（ｉ）活性エステル、例えばＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロホルメート及び酸ハロゲン化物、（ｉｉ）アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド、（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基を含むリンカー部分及びリンカー試薬上の求電子基と反応して共有結合を形成できるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジド基が挙げられる

【０２６０】

表３の抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）を、実施例２４に記載される方法に従って、表２に記載される抗ＷＴＡ抗体及びリンカー－抗生物質中間体のコンジュゲーションにより調製した。インビトロマクロファージアッセイ（実施例１８）及びインビボマウス腎臓モデル（実施例１９）により、有効性についてＡＡＣを試験した。

表3 抗体-抗生物質コンジュゲート(AAC)

AAC番号	AACの式	リンカー-abx LA番号 (表2)	AAR *
AAC-101	チオ-トラスツズマブHC A118C-MC-vc-PAB-(ジメチル-pipBOR)	LA-54	1.8
AAC-102	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pipBOR)	LA-51	1.9
AAC-103	チオ-S4497-HC-A114C-MC-fk-PABC-(pipBOR)	LA-52	1.0
AAC-104	チオ-S4497-HC-A114C-MP-vc-PABC-(pipBOR)	LA-53	1.8
AAC-105	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.73 1.9
AAC-106	チオ-S4462-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	
AAC-107	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(モノメチルpip,デスアセチルBOR)	LA-55	1.75
AAC-108	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(モノメチルpipBOR)	LA-56	1.5
AAC-109	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pip,デスアセチルBOR)	LA-57	1.9
AAC-110	チオ-hu-抗gD 5B5-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.94
AAC-111	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(リファブチン)	LA-58	1.6
AAC-112	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチル-pipBOR)	LA-54	1.65
AAC-113	チオ-S4497 HC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR)(配列番号126として開示する「コアペプチド」)	LA-59	1.6
AAC-114	チオ-S4462 HC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR)(配列番号126として開示する「コアペプチド」)	LA-59	1.8
AAC-115	チオ-Tmab LC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR)(配列番号126として開示する「コアペプチド」)	LA-59	1.7
AAC-116	チオ-S7578-MC-vc-PAB-(ジメチル-pipBOR)	LA-54	tbd
AAC-117	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pipBOR)	LA-51	tbd
AAC-118	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(オキシBOR)	LA-60	1.8
AAC-119	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpip,デスアセチルBOR)	LA-61	1.7
AAC-120	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperazBTR)	LA-62	1.8

AAC-121	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperaz,デスアセチルBTR)	LA-63	1.8
AAC-122	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-123	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-124	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperazBTR)	LA-62	1.8
AAC-125	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperaz,デスアセチルBOR)	LA-64	0.9
AAC-126	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(piperazBOR)	LA-65	1.7
AAC-127	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-66	1.7
AAC-128	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(メチルpiperazBOR)	LA-67	1.9
AAC-129	チオ-S6078-HC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.6
AAC-130	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(オキシ,イソプロピルpipBOR)	LA-68	1.8
AAC-131	チオ-S4497-HC-A118C-MC-tpm-cit-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-69	1.8
AAC-132	チオ-S4497 HC MC-GPImeLFF-(pipBOR)(配列番号129として開示する「コアペプチド」)	LA-69	1.3
AAC-133	チオ-S4497 HC MC-GPILFF-(pipBOR)(配列番号130として開示する「コアペプチド」)	LA-70	1.2
AAC-134	チオ-S4497 HC MC-val-cit-phe-(pipBOR)	LA-71	1.7
AAC-135	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-136	チオ-S4497.v1 HC WT,LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	2
AAC-137	チオ-S4497.v1 HC WT,LC V205C-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	tbd
AAC-138	チオ-S4497 HC WT v8,LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-139	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.8
AAC-140	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1.6
AAC-141	チオ-S6078-HCA114C-LCWT-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.6
AAC-142	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.7
AAC-143	チオ-S4497 HC-MP-GGAFA-PAB-(pipBOR)(配列番号131として開示する「コアペプチド」)	LA-87	1.55

AAC-144	チオ-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(フェニルpipBOR)	LA-72	1.7
AAC-145	チオ-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(ジメチルBTR)	LA-73	1.7
AAC-146	チオ-Tmab HC A118C-MP-GGAFA-PABC-(pipBOR) (配列番号131として開示する「コアペプチド」)	LA-87	1.3
AAC-147	チオ-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-74	1.9
AAC-148	チオ-S4497v1 HC-MC-vc-PABC-(pipBTR)	LA-75	1.9
AAC-149	チオ-S4497v1 HC-MC-vc-PAB-(メチルpiperaz,デスアセチルBOR)	LA-76	2
AAC-150	チオ-S4497v1 HC-MC-vc-(フェニルpipBOR)	LA-77	1.8
AAC-151	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(3-ジメチルアミノピロールBOR)	LA-78	tbd
AAC-152	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(O-メチル,ジメチルpipBOR)	LA-79	1.7
AAC-153	チオ-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(フェニルpipBOR)	LA-80	tbd
AAC-154	チオ-S4497v1 HC WT,LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.8
AAC-155	チオ-S7578-HC WT-LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-156	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(3-ジメチルアミノピロールBOR)	LA-78	tbd
AAC-157	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-PABC-(デスアセチル,pipBTR)	LA-81	2.2
AAC-158	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-(デスアセチル,フェニルpipBOR)	LA-82	-
AAC-159	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(ジメチルアミノ,メチルアミノエチルBTR)	LA-83	2.2
AAC-160	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(メチルpiperaz BTR)	LA-84	tbd
AAC-161	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-(フェニルpipBOR)	LA-85	tbd
AAC-162	チオ-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(オキシ,ジメチルアミノpipBOR)	LA-86	tbd
AAC-163	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-LAFG-PAB-(ジメチルアミノ-3-ピロロBOR)(配列番号128として開示する「コアペプチド」)	LA-88	2.2
AAC-164	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABピラゾロ(pipBOR)	LA-89	tbd
AAC-165	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(モノメチルアミノpipBOR)	LA-90	1.3

AAC-166	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.8
AAC-167	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(メチル,エチルアミノpipBOR)	LA-91	2.0
AAC-168	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PABC-(アミノメチルpipBOR)	LA-92	1.6
AAC-169	チオ-S4497 WT(v8),LC V205C-MC-vc-PABC-C21,C23-フェニルアセタール-(ジメチルアミノpipBOR)	LA-93	1.6
AAC-170	チオ-S4497 WT(v8),LC V205C-MC-vc-PABC pip-(pipBOR)	LA-94	1.4
AAC-171	チオ-S6078 v4 HC-Cys LC-Cys-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	3.9
AAC-172	チオ-S6078 v4 HC-CYS,LC-CYS-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	3.9
AAC-173	チオ-S6078 v4 HC-WT,LC-Cys-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	2.0
AAC-174	チオ-S6078.v4.HC-WT,LC-CYS-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1.8
AAC-175	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MP-ヒドラジドPP-(pipBor)	LA-95	2.0
AAC-176	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PABC-(アゼチジニルBOR)	LA-96	tbd
AAC-177	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABC-(エチルピペラジノ,デスアセチルBOR)	LA-97	1.6
AAC-178	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABC-(エチルアミノピペラジノBOR)	LA-98	1.7
AAC-179	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABフェニル-(pipBOR)	LA-99	1.9
AAC-180	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(フルオロキノロン,オキシBOR)	LA-100	1.9
AAC-181	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(フェノキシpip,オキシBOR)	LA-101	1.6
AAC-182	チオ-S6078 v4 HC-CYS,LC-CYS-MC-vc-PAB-(オキシ,ジメチルアミノpipBOR)	LA-86	4.0
AAC-183	チオ-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PABC-(デスアセチル,pipBTR)	LA-81	3.8
AAC-184	チオ-S6078 v4 HC-CYS,LC-CYS-MC-vc-PAB-(オキシ,イソプロピルpipBOR)	LA-68	tbd
AAC-185	チオ-S6078 v4 HC-CYS,LC-CYS-MC-vc-PAB-(メチルリファンピシン)	LA-102	tbd
AAC-186	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-187	チオ-S6078 v4 HC-CYS,LC-CYS-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	3.8
AAC-188	チオ-S6078 v4 HC-WT,LCCYS-MC-vc-PAB-	LA-68	1.6

	(オキシ,イソプロピルpipBOR)		
AAC-189	チオ-S6078 v4 HC-WT,LC-CYS-MC-vc-PAB-(メチルリファンピシン)	LA-102	1.8
AAC-190	チオ-S7578-HC-WT-LC-Cys-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-191	チオ-S4497-v8-LC-V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルアミノエチルピペラジノBOR)	LA-103	1.7
AAC-192	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-193	チオ-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(ピペラジノBOR)(配列番号128として開示する「コアペプチド」)	LA-104	1.8
AAC-194	チオ-S6078 v4 HC-WT,LC-CYS-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1.8
AAC-195	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-C21,C23-アニリノアセタール-(ジメチルアミノpipBOR)	LA-105	2.0
AAC-196	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-アニリノ-(トリメチルアンモニウム-pip,オキシBOR)	LA-106	2.1
AAC-197	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルアンモニウム,フルオロpipBOR)	LA-107	2.0
AAC-198	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルアンモニウム,チオプロピル,デスアセチルBOR)	LA-108	1.9
AAC-199	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルアンモニウム,メチルアミノプロピルBOR)	LA-109	1.8
AAC-200	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.0
AAC-201	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PABC-(メチルアミノpip,デスアセチルBOR)	LA-110	1.9
AAC-202	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(オキシ,pip,デスアセチルBOR)	LA-111	1.9
AAC-203	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(メチルリファンピシン)	LA-102	1.8
AAC-204	チオ-S4497-v8-LC-cys-MC-vc-PAB-(ジメチルアンモニウム,チオプロピルBOR)	LA-112	2.0
AAC-205	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(オキシ,ジメチルアミノpipBOR)	LA-113	1.8
AAC-206	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(N-イソブチルリファブチン)	LA-114	1.9
AAC-207	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(メチルリファンピシン)	LA-102	1.8
AAC-208	チオ-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルアンモニウム,フルオロpipBOR)	LA-107	1.8
AAC-209	チオ-S4497-v8-LC cys-D10-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-210	チオ-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PABC-(モノメ	LA-115	1.5

	チルpipBTR)		
AAC-211	チオ-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(ピペラジノBOR)	LA-116	tbd
AAC-212	チオ-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(R-フルオロキノロン,オキシBOR	LA-117	tbd
AAC-213	チオ-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(S-フルオロキノロン,オキシBOR	LA-118	tbd
AAC-214	チオ-S4497-v8-LC-cys-MC-vc-PAB-(ジメチルpip,デスアセチルBOR)	LA-61	2.0
AAC-215	チオ-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(ピペラジノBOR) (配列番号128として開示する「コアペプチド」)	LA-104	1.6
AAC-216	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(piperazBOR)	LA-65	1.9
AAC-217	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(モノメチルアミノpipBOR)	LA-90	1.8
AAC-218	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PAB-(ジメチルpipBOR)	LA-54	1.9
AAC-219	チオ-S4497 HC WT(v8),LC V205C-MC-vc-PABC-(piperazBOR)	LA-65	1.9
AAC-220	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(ピペラジノBOR)	LA-116	tbd
AAC-221	チオ-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(メチルpiperaz BOR)	LA-67	tbd
AAC-222	チオ-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(ピペラジノBOR) (配列番号128として開示する「コアペプチド」)	LA-104	tbd

*AAR=平均の抗生物質/抗体比
野生型(「WT」)、システイン操作変異抗体(「チオ」)、軽鎖(「LC」)、重鎖(「HC」)、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジル(「PAB」)及びp-アミノベンジルオキシカルボニル(「PABC」)
tbd=未決定
HC-A114C(カバット)=HC-A118C(EU)

【０２６１】
ＡＡＣが細胞内ＭＲＳＡを死滅させることを証明するインビトロ分析
　インビトロ実験により、抗体と抗生物質との間のリンカーがカテプシンＢのような適当な酵素により切断された後にのみＡＡＣが活性抗生物質を放出することを確認する。ＭＲＳＡを通常の細菌成長培地で、１０μｇ／ｍＬのＡＡＣまで終夜培養した。ＭＲＳＡをＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ又はＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣとインキュベートしても、ＡＡＣをカテプシンＢで前処理して活性抗生物質を放出させるまでは、細菌成長は阻害されなかった。マウスの腹腔マクロファージを用いるインビトロアッセイにより、ＡＡＣが活性抗生物質を放出し、食作用細胞内部のＭＲＳＡを死滅させることが確認された（実施例１８）。細胞壁関連タンパク質のファミリーと結合する抗体ｒＦ１を含むＡＡＣをリファマイシン誘導体にコンジュゲートした。黄色ブドウ球菌（Ｎｅｗｍａｎ株）を、様々な用量のｒＦ１－ＡＡＣ又は等価な用量の抗体のみ、リファンピシンのみ若しくは抗体と遊離のリファンピシンとの混合物で処理して、細菌との抗体の結合を可能にし（オプソニン化）、１時間のインキュベーションの後に、オプソニン化した細菌をマクロファージに供給した（図７Ａ）。

【０２６２】
図７Ａは、ＡＡＣが細胞内ＭＲＳＡを死滅させることを証明するインビトロマクロファージアッセイを示す。黄色ブドウ球菌（Ｎｅｗｍａｎ）を、ｒＦ１抗体単独、遊離のリファンピシン単独、ＡＡＣにおいて見出されるのと同じ抗生物質に対する抗体の比でのｒＦ１抗体と遊離のリファンピシンとの単純混合物、又はｒＦ１－ＡＡＣと１時間インキュベートし、マウスのマクロファージに加えた。マクロファージを３７℃にて２時間インキュベートして、食作用を可能にした。食作用が完了した後に、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地に感染ミックスを置き換えて、細胞外細菌の成長を阻害し、生存細胞内細菌の総数を、プレーティングにより感染の２日後に決定した。

【０２６３】
マクロファージを２時間感染させ、感染を除去し、ゲンタマイシンを含む培地に置き換えて、マクロファージにより取り込まれなかった何れの残存細胞外細菌も死滅させた。２日後に、マクロファージを溶解し、生存細胞内細菌の総数を、寒天プレート上でのプレーティングにより決定した。分析により、ＡＡＣでの処理が、ＡＡＣにおいて見出されるのと同じ抗生物質に対する抗体の比でのｒＦ１抗体と遊離のリファンピシンとの単純混合物での処理と比較して、細胞内細菌の数を１００倍を超えて低減させたことを明らかにした（図７Ａ）。

【０２６４】
ＭＲＳＡは、骨芽細胞を含むいくつかの非食作用性細胞型並びに様々な上皮及び内皮細胞型に侵入できる（Garzoni及びKelly, (2008) Trends in Microbiology）。ＭＲＳＡは、骨芽細胞株（ＭＧ６３）、気道上皮細胞株（Ａ５４９）及びヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）の初代培養物に感染できる。図７Ｂは、マクロファージ、骨芽細胞（ＭＧ６３）、気道上皮細胞（Ａ５４９）及びヒト臍帯静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）における５０μｇ／ｍＬのＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２を用いるＭＲＳＡ（ＵＳＡ３００株）の細胞内死滅を示し、ネイキッド非コンジュゲート抗体Ｓ４４９７は死滅させない。これらの細胞型は、マクロファージのような専門の食作用細胞よりも全体的に低いレベルのカテプシンＢを発現する可能性があるが、５０μｇ／ｍＬで処理したＭＲＳＡは、これらの細胞株の３つ全てへの内部移行の後に効率的に死滅した。破線は、アッセイの検出限界を示す。

【０２６５】
インビトロ分析を行って、抗生物質に抗体をつなぐリンカーを変動させて作製したＡＡＣの活性を比較した。Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣは、マクロファージ細胞内死滅アッセイにおいてＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣよりも効力がある。Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ及びＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣを滴定して、我々のマクロファージ細胞内死滅アッセイにおける最小有効用量を決定した（図７Ｃ）。少なくとも２μｇ／ｍＬのＡＡＣでの処理が、細胞内細菌の最適クリアランスを達成するために必要であり得る。

【０２６６】
図７Ｃは、ｐｉｐＢＯＲ　５１対ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ（ｄｉＭｅ－ｐｉｐＢＯＲ）５４で作製したＡＡＣの比較を示す。ＭＲＳＡは、１０μｇ／ｍＬから０．００３μｇ／ｍＬまでの範囲の様々な濃度でＳ４４９７抗体単独又はＡＡＣ、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　１０２若しくはＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　１０５を用いてオプソニン化した。これらのデータは、両方のＡＡＣについて、ＡＡＣを２μｇ／ｍＬより多くで試験した場合に最適な死滅が生じ、活性の用量依存的喪失は０．４μｇ／ｍＬにて明らかになり始めたことを明らかにした。死滅の全体的なレベルは、Ｓ４４９７ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５を用いた場合に著しく優れていた。より高い用量のＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５での処理により、細胞内細菌が検出限界未満に消滅し、０．４μｇ／ｍＬの最適以下の用量のＡＡＣを用いて３００倍を超える死滅が観察された。

【０２６７】

図７Ｄは、ＡＡＣが、マクロファージに害を与えることなく細胞内細菌を死滅させることを示す。黄色ブドウ球菌のＵＳＡ３００株を、５０μｇ／ｍＬのＳ４４９７抗黄色ブドウ球菌抗体（抗体）又は５０μｇ／ｍＬのチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５　ＡＡＣと１時間プレインキュベートして、細菌との抗体の結合を可能にした。オプソニン化した細菌をマウスの腹腔マクロファージに、マクロファージあたり１０－２０細菌の感染多重度で加え、３７℃にて２時間インキュベートして食作用を可能にした。食作用が完了した後に、遊離の細菌を除去し、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地でマクロファージを２日間培養して、非内部移行細菌を死滅させた。培養期間の最後に、培養上清への細胞質乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）の放出を検出することによりマクロファージの生存を評価した。各ウェルから放出されるＬＤＨの全量を、ウェルに洗浄剤を加えることにより溶解したマクロファージを含むコントロールウェルと比較した。洗浄剤で処理したウェルにおけるマクロファージ、非感染マクロファージ、Ｓ４４９７抗体で予めオプソニン化したＵＳＡ３００に感染したマクロファージ、又はチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５　ＡＡＣで予めオプソニン化したＵＳＡ３００に感染したマクロファージのマクロファージ細胞溶解の程度を測定した。

【０２６８】

図７Ｅは、上記のマクロファージ細胞溶解からのマクロファージ内部からの生存ＵＳＡ３００の回収を示す。マクロファージを溶解し、細胞溶解物の系列希釈をプレーティングして、生存細胞内細菌を計数した。

【０２６９】

図９は、リンカーがカテプシンＢにより切断されない限り、ＡＡＣが黄色ブドウ球菌に対して毒性がないことを証明する成長阻害アッセイを示す。概略カテプシン放出アッセイ（実施例２０）を左に示す。ＡＡＣをカテプシンＢで処理して、遊離の抗生物質を放出した。インタクト対カテプシンＢ処理ＡＡＣにおける抗生物質活性の全量を、得られる反応物の系列希釈を調製し、黄色ブドウ球菌の成長を阻害できるＡＡＣの最小限の用量を決定することにより決定する。右上のプロットは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２についてのカテプシン放出アッセイを示し、右下のプロットは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５についてのカテプシン放出アッセイを示す。

【０２７０】

抗体抗生物質コンジュゲートのインビボ有効性：

マウスにおけるインビボ腹膜炎モデルを確立して、ＡＡＣの有効性を試験した。このモデルでは、ＭＲＳＡの腹腔内注射（Ｉ．Ｐ．）によりマウスを感染させ、細菌負荷を感染の２日後に、腹水及び腎臓においてモニタリングする。腹膜から採集した細菌は、遊離の浮遊細胞外細菌として、又は感染の部位に動員される、主に好中球及びマクロファージの腹膜細胞内部に内部移行されて見出すことができた。このモデルにおいて同定される細胞外細菌は抗生物質処置に対して感受性であるように見受けられたが、細胞内細菌は、リファンピン（Sandbergら(2009) Antimicrobial Agents Chemother）を含む臨床的に意義があるいくつかの抗生物質での処置に対して非応答性であることが示され、よって、我々のＡＡＣの有効性を試験するために優れた標的であることがわかった。

【０２７１】

図８Ａは、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２のインビボ有効性を示す。Ａ／Ｊマウスにおける腹腔内感染モデル。マウスを腹腔内注射により５×１０^{7}ＣＦＵのＭＲＳＡに感染させ、腹腔内注射により５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体単独、又は５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２を用いて処置した（プロトコール１１－２０３２Ａ）。マウスを感染の２日後に屠殺し、全細菌負荷を、腹膜上清（細胞外細菌）、腹膜細胞（細胞内細菌）又は腎臓において評価した。

【０２７２】

Ａ／ＪマウスをＵＳＡ３００に感染させ、５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体又はＳ４４

９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２を感染の３０分後に投与した。２日後に、マウスを屠殺し、細菌負荷を、腹腔洗浄液及び腎臓においてモニタリングした。細胞外細菌と細胞内細菌とを区別するために、腹腔洗浄液を穏やかに遠心分離して細胞外細菌を含む上清と腹膜細胞とを分離した。腹膜細胞をリゾスタフィンで処理して何れの夾雑細胞外細菌も死滅させ、溶解して、採集時の細胞内細菌の総数を計数した。抗体単独で処置したマウスは腹腔洗浄液中に10^5から10^6ＣＦＵの間の細胞内及び細胞外細菌の両方と、腎臓において10^4から10^6の間の細菌を保持したが、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣで処置したマウスは、感染が検出限界未満に一掃された。これらのデータは、ＡＡＣは活性抗生物質をファゴリソソーム内部で放出するように設計されているが、ＭＲＳＡの細胞内及び細胞外の両方のプールの優れたクリアランスが観察されたことを明らかにした。ＡＡＣは細胞外細菌を直接死滅させないため、これらの細菌がＡＡＣ処置によっても一掃されたという事実は、著しい画分の細胞外細菌が感染中のある時期に細胞により取り込まれたか、又はＡＡＣが細胞外細菌の取り込みを増進することにより、細胞内（ここでＡＡＣは細菌を効率的に死滅させる）にある細菌の相対的割合を増加させることができたことを示唆する。

【０２７３】

静脈内感染モデルにおけるＡＡＣの有効性も調べた。このモデルでは、黄色ブドウ球菌は、血液中で見出される大部分の細菌が感染の数分後に宿主細胞と結合するほど感染症のすぐ後に循環好中球により取り込まれる（Rogersら(1956) J. Exp. Med. 103:713-742）。Ａ／Ｊマウスを2×10^6ＣＦＵのＭＲＳＡに静脈内注射により感染させ、次いで、静脈内注射により５０ｍｇ／ＫｇのＡＡＣで感染の３０分後に処置した。このモデルでは、初感染部位は腎臓であり、マウスは、感染の２日後に検出可能な、処置なしでは３０日後まで一掃できない大きい膿瘍を生じる。５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２での処置は、試験した全てのマウスにおいて感染を一掃した（図８Ｂ）。

【０２７４】

図８Ｂは、Ａ／Ｊマウスにおける静脈内感染モデルを示す。マウスを静脈内注射により2×10^6ＣＦＵに感染させ、５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体、５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２又は５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体＋０．５ｍｇ／Ｋｇの遊離のリファマイシンの単純混合物で処置した。処置は、ＩＶ注射により、感染の３０分後に送達し、腎臓を感染の４日後に採集した。灰色の破線は、各器官についての検出限界を示す。５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体単独又は５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体と０．５ｍｇ／ｋｇの遊離のリファマイシンとの単純混合物（５０ｍｇ／ＫｇのＡＡＣに存在するのと等価な用量の抗生物質）で処置したコントロール群は、有効でなかった。

【０２７５】

ｐｉｐＢＯＲ及びジメチル－ｐｉｐＢＯＲ抗生物質部分で作製したＡＡＣの有効性を、Ａ／Ｊマウスにおける静脈内感染モデルにおいてインビボで比較した。Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２（図９Ａ）又はＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５（図９Ｂ）を５０ｍｇ／Ｋｇから２ｍ／Ｋｇまでの範囲の様々な用量で感染の３０分後に投与し、腎臓を感染の４日後に調べて、全細菌負荷を決定した。図９Ａは、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２の滴定による静脈内感染モデルにおけるＳ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２の有効性を示す。７週齢の雌性Ａ／Ｊマウスを2×10^6ＣＦＵのＭＲＳＡ（ＵＳＡ３００株）に、尾静脈への静脈内注射により感染させた。図９Ｂは、Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５の滴定による静脈内感染モデルにおけるジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５の有効性を示す。Ｓ４４９７抗体、ＡＡＣ　１０２又はＡＡＣ　１０５での処置を、記載する用量にて感染の３０分後に施与した。マウスを感染の４日後に屠殺し、マウスあたりの生存細菌の総数（プールした２つの腎臓）を、プレーティングにより決定した。

【０２７６】

両方のＡＡＣは、最高用量の５０ｍｇ／Ｋｇにて効果的であったが、Ｓ４４９７－ｐｉ

ｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０２は、より低い用量では部分的にのみ有効であった。Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５は、１０ｍｇ／Ｋｇを超える用量にて完全な細菌クリアランスを生じた。後続の実験は、１５ｍｇ／Ｋｇを超える用量が、一貫した細菌クリアランスのために必要であったことを示した。図９Ａ及び９Ｂは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１０５　ＡＡＣが、静脈内感染モデルにおいてチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　１０２　ＡＡＣよりも有効であることを示し、それぞれ１０２と１０５との間のカルバメート（５１）及びジメチルピペリジル（５４）構造の違いの影響を示す。

【０２７７】

マウスをＡＡＣで感染の３０分後に処置した。治療を求めるＭＲＳＡ患者において生じる可能性がある状態をよりよく再現するために、ＡＡＣが確立された感染を一掃するために効果的であるか、及び抗生物質を抗黄色ブドウ球菌抗体と結合させることが、抗生物質単独での治療を超える確かな利点をもたらすかを決定した。このために、ＡＡＣと等価な用量の抗生物質ジメチル－ｐｉｐＢＯＲとの有効性を比較した。

【０２７８】

図９Ｃは、２×１０^{7}ＣＦＵのＭＲＳＡに静脈内注射により感染したＣＢ１７．ＳＣＩＤマウス（プロトコール１２－２４１８）を示す。感染の１日後に、マウスを５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７抗体、５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５又は０．５ｍｇ／ＫｇのジメチルーｐｉｐＢＯＲ抗生物質７（５０ｍｇ／ＫｇのＡＡＣに含まれるのと等価な用量の抗生物質）で処置した。マウスを感染の４日後に屠殺し、マウスあたりの生存細菌の総数（プールした２つの腎臓）を、プレーティングにより決定した。５０ｍｇ／ＫｇのＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣでの処置は、感染の１日後に与えた場合に明らかに有効であったが、等価な用量のジメチル－ｐｉｐＢＯＲ単独での処置は、感染を一掃できなかった。

【０２７９】

ＡＡＣでの処置は、ヒト抗体の存在下で有効であり、現在の標準治療（ＳＯＣ）であるバンコマイシンでの処置より優れる

Ｓ４４９７抗体を、黄色ブドウ球菌感染患者に由来するＢ細胞からクローニングした。このことは、正常ヒト血清又はＭＲＳＡ感染患者に存在する血清が、我々のＡＡＣと結合について競合し得る抗ＭＲＳＡ抗体を含む可能性があるという懸念を生じた。このことに対処するために、正常健常ドナー及びＭＲＳＡ患者のパネルに由来するヒト血清を試験して、ＡＡＣと同じ抗原を認識する抗ＭＲＳＡ抗体の全体的なレベルを見積もった。ＭＲＳＡからの細胞壁調製物を用いるＥＬＩＳＡベースのアッセイを開発した。これらのアッセイにおける細胞壁調製物との非抗原特異的結合を制限するために、プロテインＡについての遺伝子を欠損するＭＲＳＡの株を利用した。プロテインＡは、ＩｇＧ抗体のＦｃ領域と結合する。Ｓ４４９７抗原を発現するＭＲＳＡとの様々な野生型（ＷＴ）血清試料の結合（図１０Ａ、ＷＴ）を、Ｓ４４９７抗体により認識される糖修飾を欠くＭＲＳＡ株ＴａｒＭ／ＴａｒＳ　ＤＫＯ（二重ノックアウト）ミュータントとの結合に対して調べた。図１０Ａは、ヒト血清中の抗黄色ブドウ球菌抗体の普及率を示す。黄色ブドウ球菌感染患者又は正常コントロールは、抗ＷＴＡ　Ｓ４４９７と同じ特異性を有する、高い量のＷＴＡ特異的血清抗体を含む。

【０２８０】

Ｓ４４９７により認識されるのと同じ抗原とよく結合するモノクローナル抗体を用いて、標準曲線を作製した。血清試料における結合のレベルを、標準曲線を作製するために用いた抗体から得られたシグナルと比較することにより、正常健常ドナー若しくはＭＲＳＡ患者に由来する血清試料、又は正常血清から単離した全ＩｇＧ調製物に存在する抗ＭＲＳＡ抗体のレベルを見積もった（図１０Ａ）。正常ヒト血清は、１０－１５ｍｇ／ｍＬの全ＩｇＧを含む（Manzら(2005) Annu Rev. Immunol. 23:367）。異なる血清試料における抗ＭＲＳＡ反応性の分析により、３００μｇ／ｍＬまでのこれらの抗体が、Ｓ４４９７によ

り認識されるのと同じ抗原と潜在的に反応性であり、よって、ＡＡＣとの結合について競合する可能性があることが明らかになった。

【０２８１】

Ｓ４４９７抗体を用いて、ＭＲＳＡに対する非常に高い結合（細菌あたり推定５０，０００結合部位）を含む特性についてＡＡＣを作製した。ヒト血清で見出される競合抗体の存在下でさえ、十分な数のＡＡＣがＭＲＳＡと結合できると考えられる。このことを直接試験するために、１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧを補ったバッファー中のＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ（図１０Ｂ、＋ＩＧＩＶ）を滴定し、細胞内死滅のレベルを、マクロファージ細胞内死滅アッセイにおいて測定した。

【０２８２】

図１０Ｂは、ＡＡＣが生理的レベルのヒトＩｇＧの存在下で有効であることを証明するインビボ感染モデルを示す。ＵＳＡ３００株のＭＲＳＡを用いるインビトロマクロファージアッセイは、Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５が１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの存在下で有効であることを示す。ＭＲＳＡのＵＳＡ３００株を、ＡＡＣ単独、又は１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧで希釈したＡＡＣを用いて１時間、３７℃にて振盪しながらオプソニン化した。オプソニン化した細菌をマウスの腹腔マクロファージに直接加え、２時間インキュベートして、食作用を可能にした。感染の後に、マクロファージ培養物を、ゲンタマイシンを補った完全培地中に維持し、生存細胞内細菌の総数を感染の２日後に評価した。これらのデータにより、ヒトＩｇＧはＡＡＣ死滅をより低い用量にて阻害しなかったが、インビボで容易に達成できる抗体濃度である約１０μｇ／ｍＬを超える用量を用いて優れた死滅が達成されたことが明らかになった。正常血清ＩｇＧは、１０５　ＡＡＣの機能的効果を減じることができる。ＡＡＣの最大限のマクロファージ細胞内死滅活性が、高い抗原結合及びＦｃＲとの効果的な相互作用（オプソニン化食作用のための）の両方のために要求され得るため、予め存在する血清抗体は、ＷＴＡとの結合についてともに競合する可能性があり、対応する、形成された免疫複合体は、マクロファージ上のＦｃＲとの結合について競合する可能性がある。

【０２８３】

ＡＡＣが競合ヒト抗体の存在下でインビボにおいて効果的であることを確認するために、インビボ感染モデルを修飾して、血清中で正常レベルのヒトＩｇＧを発現するマウスを作製した。Ｔ細胞及びＢ細胞をともに欠くため血清中に抗体を有さないＣＢ１７：ＳＣＩＤマウス（Bosna及びCarroll, (1991) Ann Rev Immunol. 9:323）を、高濃度のヒトＩｇＧ（ＩＧＩＶ）を毎日投与することにより１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧで再構成した。予備的研究により、ＳＣＩＤ：ｈｕＩｇＧと称するこれらのマウスが、実際、血清中に少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの持続的なレベルを有し、これらのマウスが、未処置のコントロールと比較して、ＭＲＳＡでの感染に対して等しく感受性であったことを確認した。ＳＣＩＤ：ｈｕＩｇＧマウスにＭＲＳＡを感染させ、Ｓ４４９７抗体又はＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ）の何れかで感染の１日後に処置した。感染の４日後に、腎臓における細菌負荷（図１０Ｃ）を評価した。

【０２８４】

図１０Ｃは、チオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１０５又は１１２の２つの別々の調製物を用いた３回の独立した実験からの組み合わせたデータを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを用いて、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスをＳ４４９７抗体（５０ｍｇ／Ｋｇ）又はＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ）で処置した。ＡＡＣで処置したマウスは、４－ｌｏｇより大きい細菌負荷の低減を有した（スチューデントのｔ検定ｐ＝０．０００５）。細菌負荷は、Ｓ４４９７抗体コントロールで処置したマウスと比較して、Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣで処置したマウスにおいて平均で１０，０００倍を超えてより低く、ＡＡＣが、高レベルの競合ヒト抗ＭＲＳＡ抗体の存在下でさえ、明らかに効果的であったことを示した。

【０２８５】
ＡＡＣの有効性を、ＭＲＳＡ感染症の現在の標準治療処置であるバンコマイシンでの処置のものと比較した。図１１Ａは、正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスにおいて、ＡＡＣが、現在の標準治療（ＳＯＣ）抗生物質であるバンコマイシンよりも有効であることを証明するインビボ感染モデルを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを用いて、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスをＳ４４９７抗体（５０ｍｇ／Ｋｇ）、バンコマイシン（１００ｍｇ／Ｋｇ）、Ｓ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ、１１２又はＭＲＳＡを認識しないアイソタイプコントロール抗体で作製したＡＡＣ、チオ－ｈｕ－抗ｇＤ　５Ｂ５－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣ　１１０（５０ｍｇ／Ｋｇ）で処置した。ＡＡＣを受けたマウスに、単回用量のＡＡＣを感染後１日目に静脈内注射により与えた。バンコマイシン処置を受けたマウスに、１日２回の抗生物質の注射を腹腔内注射により与えた。全てのマウスを感染後４日目に屠殺し、マウスあたりの生存細菌の総数（プールした２つの腎臓）を、プレーティングにより決定した。

【０２８６】
バンコマイシンでの処置は、我々のマウスの静脈内感染モデルにおいて、処置を感染の３０分後に開始するならば、ＭＲＳＡ感染症の治療について効果的である。１００ｍｇ／Ｋｇで１日２回のバンコマイシンの投与は感染を一掃できず、処置を感染の１日後より後に開始した場合に、細菌負荷を約５０倍低減することができただけであった（図１１Ａ）。著しいことに、感染の１日後の単回用量のＳ４４９７－ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣでの処置は、大部分のマウスにおいて感染を一掃できた。驚くべきことに、黄色ブドウ球菌を認識しないヒトＩｇＧ抗体で作製したコントロールＡＡＣ（ｇＤ－ＡＡＣ）での処置は、このモデルにおいていくらかの有効性を有した。ｇＤ抗体は、その抗原結合部位を介して黄色ブドウ球菌を認識しないが、この抗体は、黄色ブドウ球菌で見出されるプロテインＡと結合できる。

【０２８７】
図１１Ｃは、正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスにおいて、図１１Ａと同じレジメンに従って、ＡＡＣチオ－Ｓ６０７８－ＨＣ　Ａ１１４Ｃ－ＬＣＷＴ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１２９が、ネイキッド抗ＷＴＡ抗体Ｓ４４９７よりも有効であることを証明するインビボ感染モデルを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを用いて、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスをＳ４４９７抗体（５０ｍｇ／Ｋｇ）又はチオ－Ｓ６０７８－ＨＣ　Ａ１１４Ｃ－ＬＣＷＴ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　１２９　ＡＡＣ（５０ｍｇ／Ｋｇ）で処置した。

【０２８８】
ＦＡＣＳ解析は、インビボ感染から単離した細菌を高濃度のｇＤ抗体で染色すると、感染腎臓から単離したＭＲＳＡとの抗ＭＲＳＡ抗体の結合と比べて、黄色ブドウ球菌との結合のレベルが低いことを示した（図１１Ｂ）。マウスをＭＲＳＡに静脈内注射により感染させ、感染腎臓を感染の３日後に取り出してホモジナイズした。抗ＭＲＳＡ又はコントロール抗体をＡｌｅｘａ－４８８で標識し、０．０８μｇ／ｍＬから５０μｇ／ｍＬの間の濃度の範囲で試験した。Ｓ４４９７抗体は、黄色ブドウ球菌の細胞壁上に結合したベーターアノマー結合を介して細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）と結合しているＮ－アセチルグルコサミン修飾を認識する。Ｓ７５７８抗体は、アルファーアノマー結合を介してＷＴＡにつながれている同様のＮ－アセチルグルコサミン修飾と結合する。ｒＦ１抗体は、ＳＤＲ反復含有細胞壁係留タンパク質のファミリー上で見出される糖修飾を認識するポジティブコントロール抗ＭＲＳＡ抗体である。ｇＤ抗体は、黄色ブドウ球菌を認識しないネガティブコントロールヒトＩｇＧ$_1$である。ｇＤ抗体との全体的な結合レベルはＳ４４９７抗体を用いて得られるものよりも著しく低いが（ＦＡＣＳ解析により見積もって少なくとも３０倍低い、図１１Ｂ）、ｇＤ－ＡＡＣを用いて見られた限定された有効性は、ＭＲＳＡとのＡ

ＡＣのインビボでの低レベルの結合でさえ、バンコマイシンを用いて得られるＣＦＵの低減と等価とみられる有効性を生じるために十分であることを示す。

【０２８９】

上記のデータは、ＡＡＣが細胞内ＭＲＳＡを死滅させることができ、Ｓ４４９７－ｐｉｐＢＯＲ及びＳ４４９７ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ　ＡＡＣがインビトロ及びインビボの両方においてＭＲＳＡへの感染を制限するために効果的であることを明確に証明する。本発明のＡＡＣは、哺乳動物細胞の内部の細菌を死滅させることにより作用し、そのことにより、バンコマイシンでの処置に対して耐性である細菌の集団を死滅させる効果がより高い独特の治療剤を提供する。

【０２９０】

図２０は、５０ｍｇ／ｋｇの遊離抗体での前処置が静脈内感染モデルにおいて有効でないことを示す。Ｂａｌｂ／ｃマウスに、単回用量のビヒクルコントロール（ＰＢＳ）又は５０ｍｇ／Ｋｇの抗体を静脈内注射により与えた３０分後に、２×１０^{7}ＣＦＵのＵＳＡ３００に感染させた。処置群は、黄色ブドウ球菌と結合しないアイソタイプコントロール抗体（ｇＤ）、細胞壁タイコ酸のベータ修飾に対する抗体（４４９７）、又は細胞壁タイコ酸のアルファ修飾に対する抗体（７５７８）を含んだ。コントロールマウスに、１１０ｍｇ／Ｋｇのバンコマイシンでの処置を腹腔内注射により１日２回与えた（Ｖａｎｃｏ）。全てのマウスを感染後４日目に屠殺し、腎臓（プールした２つの腎臓）における生存細菌の総数を、プレーティングにより決定した。バンコマイシンでの前処置は試験した全てのマウスにおいて感染を一掃したが、黄色ブドウ球菌の細胞壁に対する抗体での前処置は、細菌負荷に対して影響しなかった。

【０２９１】

図２１及び２２は、正常レベルのヒトＩｇＧで再構成したマウスを用いる静脈内感染モデルにおいて、細胞壁タイコ酸のベータ修飾又は細胞壁タイコ酸のアルファ修飾の何れかに対するＡＡＣが有効であることを示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成し、２×１０^{7}ＣＦＵのＵＳＡ３００に静脈内注射により感染させた。処置は、バッファーのみコントロール（ＰＢＳ）、６０ｍｇ／Ｋｇのベーター－ＷＴＡ　ＡＡＣ（１３６　ＡＡＣ）又は６０ｍｇ／Ｋｇのアルファ－ＷＴＡ　ＡＡＣ（１５５　ＡＡＣ）を用いて感染の１日後に開始した。マウスを感染後４日目に屠殺し、腎臓（プールした２つの腎臓、図２１）及び心臓（図２２）における生存細菌の総数を、プレーティングにより決定した。ベーター－ＷＴＡ　ＡＡＣでの処置は、腎臓において、ビヒクルコントロールで処置したマウスと比較して、１００，０００倍の細菌負荷の低減をもたらした。アルファ－ＷＴＡ　ＡＡＣでの処置は、腎臓において、平均で９，０００倍の細菌負荷の低減をもたらした。

【０２９２】

今日までに、現在利用可能な抗生物質がなぜ、細胞内貯蔵細菌を死滅させることに関して頻繁に効果的でないのかは不確かなままである。抗生物質は、細胞の内部で十分な濃度に達しないため失敗する可能性がある。なぜなら、抗生物質は、細胞内貯蔵細菌がいるファゴリソソーム区画内に侵入しないか、又は抗生物質を哺乳動物細胞から除去する流出ポンプの活性の対象になり得るからである。抗生物質は、低ｐＨ、食作用により取り込まれた細菌を死滅させるために特異的に放出される還元剤及び酸化剤を含む、ファゴリソソーム内部で見出される厳しい条件により損傷され得る。あるいは、抗生物質は、細菌が防御機序を上方制御するか、又はファゴリソソームの内部で分裂できず、よって抗生物質に対して一過的に非感受性になるため失敗する可能性がある。抗生物質耐性のこれらの機序の相対的重要性は、異なる病原体及び各抗生物質について異なる。我々のＡＡＣの抗生物質部分であるｐｉｐＢＯＲ及びジメチル－ｐｉｐＢＯＲは、実際に、遊離の抗生物質として試験した場合に、細胞内ＭＲＳＡの死滅について、リファンピシンよりも効力がある。抗体とのこれらの抗生物質の結合は、インビボ（図９Ｃ）において明らかな有効性の実際の用量依存的増加をもたらす。この場合、抗生物質単独よりも改善されたＡＡＣの有効性は

、細菌をオプソニン化するその能力と、ＡＡＣの改善された薬物動態との組み合わせによる可能性がある。ほとんどの遊離抗生物質は、インビボで迅速に一掃され、血清中で十分な抗生物質濃度を維持するために高濃度の抗生物質の反復投与を必要とする。これとは対照的に、ＡＡＣは、分子の抗体部分のために、血清中で長い半減期を有する。ＡＡＣは、黄色ブドウ球菌と結合し、細菌とともにファゴリソソームの隔離された空間に輸送された後にのみ、抗生物質を放出するため、ＡＡＣは、ほとんどの抗生物質が失敗する適所にて少量の抗生物質を濃縮する。よって、細胞内細菌の保護貯蔵所を標的にすることに加えて、ＡＡＣは、単独薬剤としての使用について毒性が高すぎる可能性がある、より効力が高い抗生物質の使用を、最も必要とされる場所で抗生物質の放出を制限することにより、容易にすることができる。

【０２９３】

図３５及び３６は、チオ－Ｓ６０７８　ＡＡＣについてのインビトロマクロファージアッセイからの結果を示す。黄色ブドウ球菌（ＵＳＡ３００　ＮＲＳ３８４）を５０ｕ／ｍＬの非コンジュゲートＳ６０７８抗体及び５０μｇ／ｍＬ、５μｇ／ｍＬ、０．５μｇ／ｍＬ又は０．０５μｇ／ｍＬのＡＡＣと１時間インキュベートして、細菌との抗体の結合を可能にした。得られたオプソニン化した細菌をマウスのマクロファージに供給し、３７℃にてインキュベートして、食作用を可能にした。２時間後に、感染ミックスを除去し、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地で置き換えて、何れの残存細胞外細菌も死滅させた。生存細胞内細菌の総数を、トリプシン大豆寒天プレートにマクロファージ溶解物の系列希釈をプレーティングすることにより２日後に決定した。図３５では、チオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣは、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり２．０個（ＡＡＣ－１７３）又は３．９個（ＡＡＣ－１７１）のジメチルｐｉｐＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－５４）の抗生物質負荷量で、０．５μｇ／ｍＬ以上の用量で細胞内細菌を死滅させる効果があった。図３６では、チオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）は、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり１．８個（ＡＡＣ－１７４）又は３．９個（ＡＡＣ－１７２）のｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－６５）の抗生物質負荷量で、０．５μｇ／ｍＬ以上の用量で細胞内細菌を死滅させる効果があった。

【０２９４】

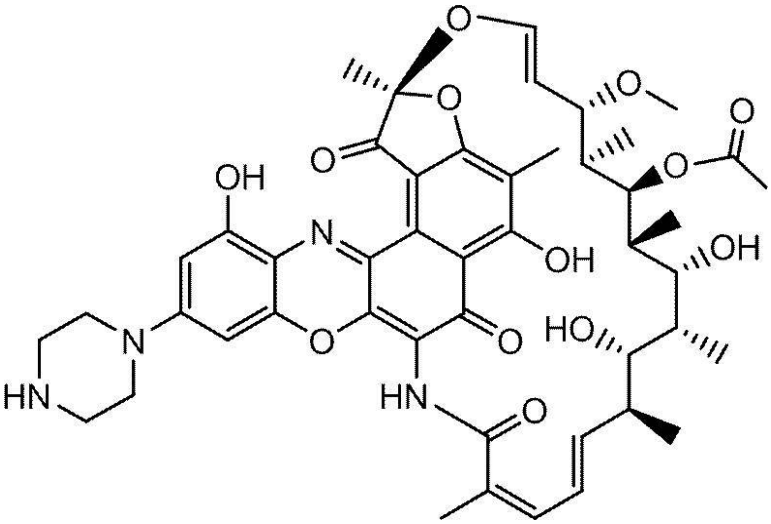
図３７及び３８は、マウスの静脈内感染モデルにおけるチオ－Ｓ６０７８　ＡＡＣのインビボ有効性からの結果を示す。血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスをＵＳＡ３００に感染させ、ビヒクルコントロール（ＰＢＳ）、チオ－Ｓ６０７８抗体あたり２．０個（ＡＡＣ－１７３）又は３．９個（ＡＡＣ－１７１）のジメチルｐｉｐＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－５４）の抗生物質負荷量を有するチオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ（図３７）、及びチオ－Ｓ６０７８抗体あたり１．８個（ＡＡＣ－１７４）又は３．９個（ＡＡＣ－１７２）のｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ抗生物質（ＬＡ－６５）の抗生物質負荷量を有するチオ－Ｓ６０７８．ｖ４．ＨＣ－ＷＴ，ＬＣ－Ｃｙｓ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）（図３８）で処置した。マウスに単回用量のＡＡＣを感染後１日目に静脈内注射により与え、感染後４日目に屠殺した。２つの腎臓における生存細菌の総数をプレーティングにより決定した。より低い負荷量の抗生物質を含むＡＡＣでの処置は、細菌量をおよそ１，０００倍低減し、より高い負荷量で抗生物質を含むＡＡＣでの処置は、細菌量を１０，０００倍を超えて低減した。

【０２９５】

抗体－抗生物質コンジュゲートのためのスタホパインＢにより切断可能なリンカー

プロテアーゼにより切断可能なリンカーは、本明細書において、分泌黄色ブドウ球菌エンドペプチダーゼであるスタホパインＢにより切断されると記載する。黄色ブドウ球菌の細菌により特異的に切断されるリンカーを設計するために、ＦＲＥＴペプチドライブラリーを用いて、黄色ブドウ球菌培養上清のプロテアーゼ活性の特徴を明らかにした。このス

クリーニングから、独特の基質特異性を同定した。この基質を用いて、活性を担う酵素を培養上清から精製し、スタホパインＢと同定した。この同定に基づいて、スタホパインＢ最適化リンカーを作製し、ピペラジノ－リファマイシン：



と結合させた。

【０２９６】

ピペラジノ－リファマイシンは、効力があるリファラジル様抗生物質である。得られるＡＡＣは、ＭＲＳＡ感染のインビトロ及びインビボモデルにおいて有効性が証明されており、ＭＲＳＡ感染症を標的にする新規な機序を提供する。スタホパインＢは、エンドペプチダーゼのパパインファミリーからの分泌システインプロテアーゼであり（ＣＡＳ　Ｒｅｇ．Ｎｏ．３４７８４１－８９－８、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ＃Ｓ３９５１、Filipekら(2005) J. Biol. Chem. 280 (15): 14669-74）、Ｐ２位のかさ高い芳香族側鎖を好む独特の基質特異性を有するように進化した。スタホパインＢの発現は、ブドウ球菌タンパク質分解性カスケード（ＳＣＰ）の一部として、ａｇｒ（又はアクセサリー遺伝子制御因子）クオラムセンシング系（Janzon, L.及びS. Arvidson (1990) The EMBO journal 9(5): 1391-1399）によりコントロールされる。Ａｇｒは、黄色ブドウ球菌の分泌プロテアーゼ並びにオーレオリシン、Ｖ８及びスタホパインＡを含む他の病原性因子の発現を調節する（Shaw, L., E. Golonka,ら(2004) Microbiology 150(Pt 1): 217-228）。スタホパインＢは、宿主の結合組織を分解し、いくつかの免疫系タンパク質を増加させるその能力のために、効力がある病原性因子として関与している（Imamura, T., S. Tanaseら(2005) Journal of experimental medicine 201(10): 1669-1676; Potempa, J., A. Dubinら(1988) Journal of biological chemistry 263(6): 2664-2667; Ohbayashi, T., A. Irieら(2011) Microbiology 157(Pt 3): 786-792; Smagur, J., K. Guzikら(2009); Biological chemistry 390(4): 361-371; Smagur, J., K. Guzikら(2009); Journal of innate immunity 1(2): 98-108; Kulig, P., B. A. Zabelら(2007); Journal of immunology 178(6): 3713-3720）。重要な病原性因子としてのスタホパインＢの役割により、これは、プロテアーゼにより媒介される抗生物質放出のための魅力のある標的となる。

【０２９７】

黄色ブドウ球菌プロテアーゼにより切断される基質の同定：

黄色ブドウ球菌エンドペプチダーゼにより容易に切断される基質を同定するために、Ｗｏｏｄ４６株黄色ブドウ球菌の終夜培養物からの上清を、市販のＦＲＥＴペプチドライブラリーとインキュベートした。Ｗｏｏｄ４６株は、構成的に活性なａｇｒ遺伝子座を有するため、Ｗｏｏｄ４６株は、野生型と比較してプロテアーゼ発現の増加を示す。ＦＲＥＴペプチドライブラリーＲａｐｉｄエンドペプチダーゼプロファイリングライブラリー又はＰｅｐＳｅｔｓ（商標）ＲＥＰＬｉ（Ｍｉｍｏｔｏｐｅｓ、Ｖｉｃｔｏｒｉａ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）は、９６ウェルプレートフォーマットにおいてウェルあたり８の内部で消光された蛍光発生ペプチドを含む５１２ウェルからなる。ペプチドは、切断により蛍光を発

し、リアルタイムでのタンパク質分解性活性のモニタリングを可能にする。各ペプチドは、両側を一連のグリシン残基で挟まれたトリペプチド可変コアと、溶解性のためにＣ末端にてさらに２つのリジン残基とを有する。Ｗｏｏｄ４６培養物からの上清をライブラリーに加え、プレートを３７℃にて終夜インキュベートした。１５倍を超える蛍光の増加を示すウェル（合計５１２ウェルのうち１２）をＬＣ－ＭＳ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｑ－ＴＯＦ）により分析して、切断生成物を決定した。切断部位を頻度に基づいて順位付けした（表４）。上位のヒットのうち、基質特異性のパターン、具体的には、Ｐ２位のＰｈｅ及びＴｙｒのかさ高い疎水性側鎖への優先性が観察された。

表4.Wood46分泌プロテアーゼにより切断されるREPLi配列のアミノ酸優先性。
各位置での存在量(%)

残基	P4	P3	P2	P1	P1’	P2’
G	71.4	50.0	0.0	28.6	35.7	100.0
I/L	21.4	7.1	0.0	0.0	7.1	0.0
A/V	0.0	14.3	0.0	50.0	28.6	0.0
N/Q	7.1	7.1	0.0	0.0	7.1	0.0
S/T	0.0	14.3	0.0	14.3	0.0	0.0
F/Y	0.0	0.0	100.0	0.0	21.4	0.0
K/R	0.0	7.1	0.0	7.1	0.0	0.0

【０２９８】
蛍光の最大の増加を示すウェルのＦＲＥＴペプチドに存在するアミノ酸残基の各位置での存在量。ＲＥＰＬｉペプチドは、配列ＭＣＡ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｘａａ－Ｙａａ－Ｚａａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＤＰＡ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓ（配列番号１３２）（ここで、Ｘａａ、Ｙａａ及びＺａａは変動する）を含む。表に存在するグリシン残基は、可変コアを挟むＧｌｙ残基である。Ｇｌｙ残基がいくつかの位置で最も存在量が多いが、これらは、基質特異性に対してほとんど洞察を与えない。リンカーを設計する場合、可変コアからの優先性をアミノ酸に与えた。上位ヒットの何れにもないアミノ酸は、表から省略した。

【０２９９】
インビトロでＭＲＳＡプロテアーゼにより切断されるＦＲＥＴ基質の設計及びコンジュゲーション：
Ｐ１、Ｐ２及びＰ３についての特異性の情報を用いて、ＲＥＰＬｉスクリーニングから切断されるペプチドにおいて最も頻繁な残基を用いてペプチドを設計して合成した。ペプチドは、配列ＧＧＡＦＡＧＧＧ（配列番号１２６）を有し、切断はＧＧＡＦＡ（配列番号１３１）とＧＧＧとの間で予測された。ペプチドは、蛍光性色素テトラメチルローダミン（ＴＡＭＲＡ）及びフルオレセインをＦＲＥＴ対（図２６）として組み込む固体相合成を用いて合成し、マレイミドープロピオン酸をＮ末端に付加して抗体システイン残基へのコンジュゲーションを可能にした。得られたｍａｌ－ＦＲＥＴ－ペプチド、マレイミドープ

ロピオン酸（ＭＰ）－Ｌｙｓ（ＴＡＭＲＡ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）を、システイン操作チオＭａｂ抗体であるチオ－Ｓ４４９７にコンジュゲートした。ｍａｌ－ＦＲＥＴ－ペプチドは、非結合コントロールであるシステイン操作抗Ｈｅｒ２チオＭａｂトラスツズマブにもコンジュゲートした。

【０３００】

チオ－Ｓ４４９７－ＭＰ－Ｋ（Ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）ＦＲＥＴコンジュゲート及び非結合コントロールＦＲＥＴコンジュゲートであるチオ－トラスツズマブ－ＭＰ－Ｋ（Ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）を、トリプシン大豆ブロス（ＴＳＢ）中で10^8細胞／ｍｌ及び10^7細胞／ｍｌの細胞密度にてＷｏｏｄ４６（図２８）及び野生型ＵＳＡ３００（図２９）の対数期培養物とインキュベートした。全てのウェルについてのＭＰ－Ｌｙｓ（ＴＡＭＲＡ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）の最終濃度は、２μＭであった。蛍光を、経時的に３７℃、励起λ４９５ｎｍ／放出λ５１８ｎｍにてモニタリングした。蛍光の増加は、Ｗｏｏｄ４６及びＵＳＡ３００の両方において４４９７－ｍａｌ－ＦＲＥＴ－ペプチドコンジュゲートを用いて観察され、このことは、ＦＲＥＴペプチドが黄色ブドウ球菌プロテアーゼにより切断され、このプロテアーゼが両方の株に存在することを示した。リンカー単位ＭＰ－Ｋ（Ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）は、黄色ブドウ球菌と結合する抗体とコンジュゲートした場合に、Ｗｏｏｄ４６及びＵＳＡ３００の両方において切断される。ＵＳＡ３００におけるこのモデルリンカーの切断を検証することは、可能性のある治療抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）が標的にするＭＲＳＡの臨床株とこの株が関連するため、重要である。チオ－Ｓ４４９７－ＭＰ－Ｋ（Ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）ＦＲＥＴコンジュゲートは、両方の株において蛍光の増加を示し、このことは、リンカーが黄色ブドウ球菌プロテアーゼにより切断され、このプロテアーゼが臨床的意義があるＭＲＳＡ株であるＵＳＡ３００に存在することを示す。細胞密度は切断の速度に影響し、切断は、より高い細胞密度の培養においてより早期に生じる。非結合コントロールチオ－トラスツズマブ－ＭＰ－Ｋ（Ｔａｍｒａ）ＧＧＡＦＡＧＧＧＫ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）コンジュゲートは、試験した何れの条件においても蛍光の増加を示さなかった。

【０３０１】

細胞ベースのアッセイからの切断された基質に基づいて、リンカー－抗生物質中間体ＬＡ－５９（表２）を調製し、抗体にコンジュゲートして、表３の抗ＭＲＳＡ重鎖、システイン操作チオ－Ｓ４４９７（ＡＡＣ－１１３）及びチオ－Ｓ４４６２（ＡＡＣ－１１４）、並びに抗ＨＥＲ２軽鎖チオ－トラスツズマブ（ＡＡＣ－１１５）を形成した。ＧＧＡＦＡＧＧＧ（配列番号１２６）結合ＡＡＣは、Ｗｏｏｄ４６の終夜培養物からの濃縮上清とインキュベートした場合に、ＦＲＥＴ－ペプチドよりもよい切断速度を示し、このことは、リンカー－抗生物質が目的の未知のプロテアーゼのためにより良い基質であることを示した。切断は、ＧＧＡＦＡＧＧＧ結合（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ（ＡＡＣ－１１３、ＡＡＣ－１１４、ＡＡＣ－１１５）中のアラニンとグリシンとの間の予期された部位で生じた。このリンカー－抗生物質（ＬＡ－５９）は、抗生物質の最適化された送達系ではない。なぜなら、切断の際に、遊離のリファマイシンではなくＧＧＧ－リファマイシンが放出されるからである。このリンカー－抗生物質の治療上の可能性は不確かであるが、プロテアーゼにより切断される能力により、目的の活性プロテアーゼを含む画分を同定するための有用なツール化合物になる。リンカー－抗生物質中間体ＬＡ－５９を、チオ－Ｓ４４９７抗体のＦａｂ部分にコンジュゲートした（Scheer, J. M., W. Sandovalら(2012). PloS one 7(12): e51817）。システイン操作Ｆａｂ抗体である

「チオＦＡＢ」は、１つの反応性システインを有し、このシステインにより、１つのチオール反応性化合物の部位特異的コンジュゲーションが可能になる。チオＦＡＢ　Ｓ－４４９７を、チオＦＡＢよりも３倍過剰モルのＬＡ－５９と１時間、５０ｍＭトリスｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ中で室温にて反応させた。過剰のＬＡ－５９をＡＡＣからＰＢＳ中でのダイアフィルトレーションにより分離した。得られたコンジュゲート、チオＦＡＢ　Ｓ４４９７－ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－（ｐｉｐＢＯＲ）（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）（図２７）をツール化合物として用いて活性画分を同定し、リンカーの切断をＬＣ－ＭＳ分析により検出した。

【０３０２】

スタホパインＢによる効率的な切断のためのリンカーの最適化：

リンカー－抗生物質中間体ＬＡ－５９，ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－（ｐｉｐＢＯＲ）（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）は、Ｐ１位、Ｐ２位及びＰ３位について最適化された基質残基を有する。ＲＥＰＬｉスクリーニングからの結果を用いて、Ｐ４について残基優先性を組み込んだ２つの新しいリンカーを設計して、合成した（図３０）。マレイミド－プロピオン酸－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ａｌａ（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）及びマレイミド－プロピオン酸－Ｌｅｕ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－Ａｌａ（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）は、固体相合成を用いて合成した。イソロイシン及びロイシンは、ＲＥＰＬｉスクリーニングにおいてＰ４における最も頻繁な残基であった（グリシン以外で）。１つの残基、ロイシンだけを選択して、合成するリンカーの数を制限した。Ａｌａ及びＧｌｙをＰ１位にて交互にして、切断に対する影響を調べた。Ｐ１’の残基、Ａｌａも含めた。ＱＳＹ（登録商標）７（キサンチリウム、９－［２－［［４－［［（２，５－ジオキソ－１－ピロリジニル）オキシ］カルボニル］－１－ピペリジニル］スルホニル］フェニル］－３，６－ビス（メチルフェニルアミノ）－ＮＨＳエステル塩化物、ＣＡＳ　Ｒｅｇ．Ｎｏ．３０４０１４－１２－８、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を両方のリンカーのＣ末端に付加して、抗生物質代替物として作用させた（図３０）。ＱＳＹ（登録商標）７を組み込むことにより、これらのリンカーの切断性を、高価で大きな労働力を有する抗生物質を消費することなく評価できた。

【０３０３】

実験的ｍａｌ－ペプチド－ＱＳＹ７リンカーをチオＦＡＢ　Ｓ４４９７にコンジュゲートして、これらのリンカーの切断性を評価した。コンジュゲーションは、以前に記載したようにして行った。得られたチオＦＡＢ　Ｓ４４９７リンカー－ＱＳＹ７コンジュゲートを、ｐＨ７．２にてスタホパインＢ、スタホパインＡ及びヒトカテプシンＢによる切断性について評価した（表５）。スタホパインＢと同様に、スタホパインＡは、プロテアーゼのパパインファミリーからの黄色ブドウ球菌の分泌システインプロテアーゼである。これは、スタホパインＢと構造が類似するが、より広い基質特異性を有する（Filipek, R., M. Rzychonら(2003). The Journal of biological chemistry 278(42): 40959-40966）。哺乳動物システインリソソームプロテアーゼであるカテプシンＢも、エンドペプチダーゼのパパインファミリーの一員である。これは、本特許に記載する他のＡＡＣリンカーにおいて用いるバリン－シトルリンリンカーを切断すると考えられる。

表5.スタホパイン及びヒトカテプシンBによる最適化リンカーの切断

		スタホパインA	スタホパインB	カテプシンB
MP-LAFGA-QSY7 (配列番号135として開示する「コアペプチド」) (図30)	パーセント切断 pH 7.2	38	100	100
	切断生成物	A-QSY7	A-QSY7	A-QSY7
MP-LAFAA-QSY7 (配列番号136として開示する「コアペプチド」) (図30)	パーセント切断 pH 7.2	23	100	100
	切断生成物	A-QSY7	A-QSY7	A-QSY7, QSY7
MP-LAFG-PABC-(ピペラジノBOR) (配列番号128として開示する「コアペプチド」) LA-104	パーセント切断 pH 5	100	100	100
	パーセント切断 pH 7.2	46	100	64
	切断生成物	ピペラジノ-リファマイシン	ピペラジノ-リファマイシン	

【０３０４】

表５は、スタホパインＡ、スタホパインＢ及びカテプシンＢによる、チオＦＡＢにコンジュゲートした最適化リンカーの切断からのデータを示す。最終リンカー－抗生物質、ＭＰ－ＬＡＦＧ－ピペラジノ－リファマイシン（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）は、３つ全てのプロテアーゼにより効率的に切断される。スタホパインによる切断は、遊離のリファマイシンの放出をもたらす。カテプシンＢによる切断は、Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－ピペラジノ－リファマイシンを放出する（実施例２６）。

【０３０５】

遊離の抗生物質を放出するスタホパインＢにより切断可能なリンカーの設計及びコンジュゲーション：

試験した実験的リンカーの切断アッセイから、ｍａｌ－ＬＡＦＧＡ（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）を抗生物質との結合のために選択した。タンパク質分解性切断による遊離の抗生物質放出を達成するために、このリンカーをさらに最適化するこ

とが必要であった。このことを達成するために、Ｐ１’におけるＡｌａを、ｐ－アミノベンジル（ＰＡＢ）又はｐ－アミノベンジルオキシカルボニル（ＰＡＢＣ）で置き換えた。ピペラジノ－リファマイシンをこのリンカーのＣ末端に付加して、リンカー－抗生物質中間体ＬＡ－８８　ＭＣ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢ－（ジメチルアミノ－３－ピロロＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）及びＬＡ－１０４，ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）を完成した。Ｐ１位のＧｌｙの後での切断により、ＰＡＢ及びＰＡＢＣ基は、自壊するように設計され、遊離の抗生物質を放出する。ＬＡ－８８をコンジュゲートして、チオ－Ｓ４４９７－ｖ８－ＬＣＶ２０５Ｃ－ＭＣ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢ－（ジメチルアミノ－３－ピロロＢＯＲ）ＡＡＣ－１６３（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）を形成した（表３）。ＬＡ－１０４をコンジュゲートして、ＡＡＣ－１９３、ＡＡＣ－２１５及びＡＡＣ－２２２を形成した。スタホパインＡ、スタホパインＢ及びカテプシンＢを用いるＡＡＣ１９３の切断アッセイを、ｐＨ７．２及びｐＨ５で行った。これらのｐＨの値は、血漿（ｐＨ７．２）又はファゴリソソームの環境（ｐＨ５）の何れかを模倣するために選択した。スタホパインＢは、ｐＨ５及び７．２の両方で１００％の切断を達成した。スタホパインＡは、ｐＨ５にて１００％の切断、及びｐＨ７．２にて６４％の切断を示した。

【０３０６】

Ｐ１’基におけるＡｌａについてのＰＡＢＣの置換は、カテプシンＢがリンカーを切断する場所を変更した。カテプシンＢによる切断の際に、Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）が放出された。治療剤として、カテプシンＢによるこのリンカーの可能性がある切断は、マクロファージのリソソーム区画において生じる可能性が最も高い。このような状況で、スタホパインＢを含む他のプロテアーゼは、ＦＧ－ＰＡＢＣ－ピペラジノ－リファマイシンをさらにプロセシングして、遊離の抗生物質を放出する可能性がある。

【０３０７】

リンカー－抗生物質中間体、ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＬＡ－１０４をチオＭＡＢ　Ｓ４４９７にコンジュゲートして、得られるＡＡＣ、ＡＡＣ－１９３、ＡＡＣ－２１５、ＡＡＣ－２２２のインビトロ及びインビボ有効性を評価した。２つのコントロールコンジュゲートも、ともにアイソタイプコントロールであるチオＭＡＢ抗Ｈｅｒ２及びチオＭＡＢ抗ｇＤにＬＡ－１０４をコンジュゲートすることにより作製した。軽鎖結合チオＭＡＢ４４９７ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－ピペラジノ－リファマイシンコンジュゲート（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－２１５は、チオＭＡＢ抗ｇＤコントロールコンジュゲートと同様に、抗体に対する薬物の比（ＤＡＲ）が１．６であった。チオＭＡＢ抗Ｈｅｒ２　ｍａｌ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－ピペラジノ－リファマイシン（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）コンジュゲートのＤＡＲは、１．５であった。

【０３０８】

黄色ブドウ球菌培養上清を、ＦＲＥＴペプチドライブラリーを用いてスクリーニングして、分泌プロテアーゼにより容易に切断される基質を同定した。このスクリーニングの結果は、測定されたプロテアーゼ活性の圧倒的大部分が、黄色ブドウ球菌の１つの分泌システインプロテアーゼ、スタホパインＢに帰する可能性があることを示した。スタホパインＢによる切断のために設計されたペプチドリンカーを最適化して、遊離の抗生物質を放出する、効率的に切断される基質を同定した。得られたリンカーは、ともにシステインプロテアーゼである黄色ブドウ球菌プロテアーゼスタホパインＡ及びヒトプロテアーゼカテプシンＢによっても切断される。

【０３０９】

黄色ブドウ球菌と結合する抗体にコンジュゲートする場合、得られるＡＡＣは、インビトロ及びインビボの両方で有効性を示す。ＭＲＳＡの内因性のエンドペプチダーゼは、ＭＲＳＡ感染を標的にする機序を提供し、疾患特異的な様式でペイロードを放出する。このリンカーが黄色ブドウ球菌の分泌プロテアーゼにより切断される能力により、ヒト好中球

、及び宿主血漿／組織において細胞外の両方に存在するＭＲＳＡを標的にすることができる。この二重ターゲティングは、感染の細胞内及び細胞外の両方の部位での高濃度の抗生物質の放出を可能にする可能性がある。

【０３１０】

スタホパインＡ及びＢ発現は、ヒト好中球において上方制御され、重要な病原性因子であると考えられ（Burlak, C.ら(2007) Cellular microbiology 9(5):1172-1190）、これらは、抗生物質のプロテアーゼ媒介性放出のための魅力のある標的になる。ヒトカテプシンＢもリンカーを切断し、代替の放出経路となる。ＡＡＣの観察された有効性は、抗生物質又は抗生物質部分の放出に関与するともに黄色ブドウ球菌及び宿主からの複数のプロテアーゼの結果である可能性がある。一連のプロテアーゼにより切断される血清安定リンカーは、細菌の耐性変異の裏をかくことができる放出機序を提供する。

【０３１１】

抗体－抗生物質コンジュゲートを用いて感染症を治療及び予防する方法

本発明のＡＡＣは、ブドウ球菌、例えば黄色ブドウ球菌、Ｓ．サプロフィチカス（Ｓ．ｓａｐｒｏｐｈｙｔｉｃｕｓ）及びＳ．シミュランス（Ｓ．ｓｉｍｕｌａｎｓ）、リステリア（Ｌｉｓｔｅｒｉａ）、例えばリステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、腸球菌（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｉ）、例えばフェカリス菌（Ｅ．ｆａｅｃａｌｉｓ）、連鎖球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｉ）、例えば肺炎球菌（Ｓ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クロストリジウム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ）、例えばＣ．ディフィシル（Ｃ．ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）を含むいくつかのヒト及び獣医学的グラム陽性細菌に対して効果的な抗微生物剤として有用である。

【０３１２】

持続的な菌血症は、宿主細胞への内部移行を原因とし得る。完全には理解されていないが、内部移行した病原体は、宿主細胞の内部で生存することにより免疫認識を免れることができる。このような生物体としては、黄色ブドウ球菌、サルモネラ（例えばチフス菌（Ｓ．ｔｙｐｉ）、Ｓ．コレレスイス（Ｓ．ｃｈｏｒｅｒａｅｓｕｉｓ）及び腸炎菌（Ｓ．ｅｎｔｅｒｉｔｉｄｉｓ））、レジオネラ（Ｌｅｇｉｏｎｅｌｌａ）（例えばＬ．ニューモフィラ（Ｌ．ｐｎｅｕｍｏｐｈｉｌａ））、リステリア（例えばＬ．モノサイトゲネス）、ブルセラ（Ｂｒｕｃｅｌｌａ）（例えばウシ流産菌（Ｂ．ａｂｏｒｔｕｓ）、ヤギ流産菌（Ｂ．ｍｅｌｉｔｅｎｓｉｓ）、ブタ流産菌（Ｂ．ｓｕｉｓ））、クラミジア（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ）（肺炎クラミジア（Ｃ．ｐｎｅｕｍｏｎｉｅａ）、Ｃ．トラコマチス（Ｃ．ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ））、リケッチア種（Ｒｉｃｋｅｔｔｓｉａ ｓｐｐ．）、シゲラ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）（例えばＳ．フレックスネリ（Ｓ．ｆｌｅｘｎｅｒｉ））及びマイコバクテリアが挙げられる。

【０３１３】

血流への侵入の後に、黄色ブドウ球菌は、ほぼ全ての器官において転移性感染を引き起こすことができる。二次感染は、治療の開始前の約三分の一の症例で（Fowlerら、(2003) Arch. Intern. Med. 163:2066-2072）、患者の１０％においてさえ治療の開始後に生じる（Khatibら、(2006) Scand. J. Infect. Dis., 38:7-14）。感染の顕著な特徴は、膿の大きな貯蔵、組織破壊及び膿瘍の形成（これらは全て、大量の好中球を含む）である。菌血症が４８時間以内に絶やされれば合併症は約５％の患者でのみ発生するが、菌血症が３日を超えて持続すれば、レベルは４０％に上昇する。

【０３１４】

黄色ブドウ球菌は、一般的に、毒素を分泌する細胞外病原体であると考えられているが、これが内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞及び破骨細胞の内部で生存できるという証拠がある（Alexanderら、(2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:361-366; Garzoniら、(2009) Trends Microbiol. 17:59-65）。好中球及びマクロファージは、細菌感染症に対する宿主自然免疫応答の重要な成分である。これらの細胞は、食作用により黄色ブドウ球菌を内部移行し、食作用は、抗体、補体又は病原体と好中球、マクロファージ及び他の専門的な食細胞とに同時に結合できる宿主レクチン、例えばマンノース結合タンパク質

により増進されることがある。以前に述べたように、黄色ブドウ球菌は、リソソーム環境で生存するだけでなく、そのことを、宿主における持続性を発展させるための機序として実際に活用している可能性がある。

【０３１５】

本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）は、ファゴリソソームにいるものを含む細胞内病原体を治療するための著しい治療上の利点を有する。一実施態様では、病原体は、白血球に内部移行し、細胞内成分は、ファゴリソソームである。インタクトなＡＡＣでは、抗体可変領域は、細菌上の細胞表面抗原と結合する（オプソニン化）。何れの１つの理論にも限定されないが、１つの機序では、ＡＡＣの抗体成分が細菌細胞表面と結合することにより、食細胞が細菌に誘引される。抗体のＦｃ部分は食細胞上のＦｃ受容体と結合し、食作用を促進する。ＡＡＣ－細菌複合体が食作用を受けた後に、リソソームと融合する際に、ＡＡＣリンカーは、ファゴリソソーム酵素への曝露により切断され、活性抗生物質を放出する。隔離された空間及び比較的高い局所Ａｂｘ濃度（細菌あたり約10^4）のために、ファゴリソソームは細胞内病原体の生存をもはや支持しない結果となる（図５）。ＡＡＣは本質的に不活性なプロドラッグであるため、抗生物質の治療指数は、遊離（非コンジュゲート）形と比べて拡大できる。抗体は、病原体特異的ターゲティングをもたらし、切断可能なリンカーは、病原体の細胞内の場所に特異的な条件下で切断される。効果は、オプソニン化した病原体及びファゴリソソームに共限局性の他の病原体の両方に対して直接的であり得る。具体的な態様では、病原体は、黄色ブドウ球菌である。

【０３１６】

抗生物質耐容性は、抗生物質及び他の抗微生物剤による死滅に耐える疾患の原因となる病原体の能力であり、多剤耐性とは機序が異なる（Lewis K (2007). "Persister cells, dormancy and infectious disease". Nature Reviews Microbiology 5 (1): 48-56. doi: 10.1038/nrmicro1557）。むしろ、この形の耐容性は、生残菌と呼ばれる微生物細胞の小さい部分集団により引き起こされる（Bigger JW (14 October 1944). "Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization". Lancet 244 (6320): 497-500）。これらの細胞は、古典的な意味で多剤耐性ではないが、むしろ、遺伝子的に同一のそれらの同胞を死滅させることができる抗生物質治療に寛容性がある休止細胞である。この抗生物質耐容性は、非分裂又は分裂が非常に遅い生理的状態により誘導される。これらの生残菌細胞を根絶させる抗微生物治療が失敗した場合、生残菌細胞は、再発性の慢性感染の貯蔵所となる。本発明の抗体－抗生物質コンジュゲートは、これらの生残菌細胞を死滅させ、多剤耐容性細菌集団の出現を抑制する独特の特性を有する。

【０３１７】

別の実施態様では、本発明のＡＡＣを用いて、病原体が生存する細胞内区画に関わらず感染症を治療することができる。

【０３１８】

別の実施態様では、ＡＡＣを用いて、専門の食細胞による内部移行を導く抗体媒介性オプソニン化により浮遊状態又はバイオフィルムの形の細菌（例：黄色ブドウ球菌、肺炎桿菌（Ｋ．ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、大腸菌、Ａ．バウマンニ（Ａ．ｂａｕｍａｎｎｉｉ）、緑膿菌及び腸内細菌）を標的にすることもできる。ファゴソームがリソソームと融合する場合、十分に高濃度の抗生物質がファゴリソソームの酸性又はタンパク質分解性の環境においてＡＡＣから放出されて、食作用を受けた病原体を死滅させる。

【０３１９】

本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）で感染症を治療する方法は、細菌肺感染症、例えば黄色ブドウ球菌肺炎又は結核感染症、細菌眼感染症、例えばトラコーマ及び結膜炎、心臓、脳又は皮膚の感染症、消化管の感染症、例えば旅行者の下痢、骨髄炎、潰瘍性大腸炎、過敏性腸症候群（ＩＢＳ）、クローン病及び全般的にＩＢＤ（炎症性腸疾患）、細菌髄膜炎、並びに任意の器官、例えば筋肉、肝臓、髄膜又は肺での膿瘍を治療することを含む。細菌感染症は、尿道、血流、創傷又はカテーテル挿入部位のような体の他の部分におけるものであり得る。本発明のＡＡＣは、バイオフィルム、インプラント又は

力の及ばない部位に関与する治療が困難な感染症（例えば骨髄炎及び人工関節感染症）、並びに死亡率が高い感染症、例えば院内感染肺炎及び菌血症のために有用である。黄色ブドウ球菌感染症を予防するために処置できる弱い患者の群としては、血液透析患者、免疫無防備状態の患者、集中治療室にいる患者及びある特定の手術を受ける患者が挙げられる。別の態様では、本発明は、動物に本発明のＡＡＣ又はＡＡＣの医薬製剤を投与することを含む、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトにおける微生物感染症を死滅、治療又は予防する方法を提供する。本発明は、このような微生物感染症に関連するか又はこのような微生物感染症から日和見的にもたらされる疾患を治療又は予防することをさらに特徴とする。このような治療又は予防の方法は、本発明の組成物の経口、局所、静脈内、筋肉内又は皮下投与を含んでよい。例えば、手術又はＩＶカテーテルの挿入前に、ＩＣＵケアにおいて、移植医薬中に、がん化学療法とともに若しくはその後に、又は感染症の高い危険性を有する他の活動において、本発明のＡＡＣを投与して、感染症の発症又は広がりを妨げることができる。

【０３２０】

細菌感染症は、活性及び不活性形の細菌により引き起こされることがあり、ＡＡＣは、活性及び不活性の両方で、潜在的な形の細菌感染を治療するために十分な量及び期間投与され、この期間は、活性な形の細菌感染を治療するために必要なものよりも長い。

【０３２１】

様々なグラム＋細菌の分析により、ＷＴＡベータがＭＲＳＡ及びＭＳＳＡ株を含む全ての黄色ブドウ球菌、並びに非黄色ブドウ球菌株、例えばＳ．サプロフィチカス及びＳ．シミュランスで発現されることがわかった。ＷＴＡアルファ（アルファ－ＧＬｃＮＡｃリビトールＷＴＡ）は、全てではないがほとんどの黄色ブドウ球菌と、リステリア・モノサイトゲネス上にも存在する。ＷＴＡは、グラム－細菌上に存在しない。よって、本発明の一態様は、黄色ブドウ球菌又はＳ．サプロフィチカス又はＳ．シミュランスに感染した患者を、治療有効量の本発明の抗ＷＴＡベーター－ＡＡＣを投与することにより治療する方法である。本発明の別の態様は、黄色ブドウ球菌又はリステリア・モノサイトゲネスに感染した患者を、治療有効量の本発明の抗ＷＴＡアルファ－ＡＡＣを投与することにより治療する方法である。本発明は、黄色ブドウ球菌又はＳ．サプロフィチカス又はＳ．シミュランスによる感染を、病院の背景、例えば手術、熱傷患者及び臓器移植において治療有効量の本発明の抗ＷＴＡベーター－ＡＡＣを投与することにより予防する方法も企図する。

【０３２２】

当該技術分野で熟練の医師により決定される、細菌感染症のための治療を必要とする患者は、必要ではないが、患者が感染した細菌の種類について既に診断されていてよい。細菌感染症の患者は、数時間のうちに非常に迅速に悪化し得るため、バンコマイシンのような一又は複数の標準治療Ａｂｘとともに本発明の抗ＷＴＡ－ＡＡＣを入院時の患者に投与できる。診断結果が入手可能になり、感染における例えば黄色ブドウ球菌の存在が示された場合、患者に抗ＷＴＡ　ＡＡＣでの治療を継続できる。よって、細菌感染症又は具体的に黄色ブドウ球菌感染症を治療する方法の一実施態様では、患者に治療有効量の抗ＷＴＡベータＡＡＣを投与する。本発明の治療又は予防方法では、本発明のＡＡＣは、単独治療剤として、又は以下に記載するもののような他の薬剤とともに投与できる。本発明のＡＡＣは、前臨床モデルにおけるＭＲＳＡの治療において、バンコマイシンよりも優越性を示す。ＳＯＣに対するＡＡＣの比較は、例えば死亡率の低減により測定できる。治療される患者は、様々な測定可能な因子によりＡＡＣ治療に対する応答性について評価される。臨床医が患者における改善を評価するために用いる可能性がある兆候及び症状としては、例えば、以下のものが挙げられる：診断時に上昇しているならば白血球細胞カウントの正常化、診断時に上昇（発熱）しているならば体温の正常化、血液培養のクリアランス、紅斑及び膿の排出がより少ないことを含む創傷の目視による改善、換気されている患者における酸素の要求の低減又は換気の速度の低減のような換気装置の要求の低減、診断時に患者が喚起されているならば換気装置を完全に外すこと、診断時に薬物療法が必要であれば安定した血圧を支持するために使用する薬物療法がより少なくなること、診断時に異常であ

るならばクレアチニン又は肝臓機能試験の上昇のような終末器官不全を示唆する実験室値の異常の正常化、並びに放射線画像化（例えば以前に肺炎を示唆した胸部ｘ線が消散を示す）の改善。ＩＣＵでの患者では、これらの因子は少なくとも毎日測定される。発熱は、絶対好中球カウントを含む白血球カウント及び「左方移動」（活性感染に応答して増加した好中球の生成を示す芽細胞の出現）が消散したことの証拠とともに厳密にモニタリングされる。

【０３２３】

本発明の治療の方法の関係では、細菌感染症の患者は、当該技術分野で熟練した医師が評価して、治療の開始若しくは診断の前又は治療の開始若しくは診断時の値、兆候又は症状と比較して、先行する因子の少なくとも２つ以上において、著しく測定可能な改善があるならば、治療されたとみなされる。一部の実施態様では、上記の因子の３、４、５、６つ以上において測定可能な改善がある。一部の実施態様では、測定される因子における改善は、治療前の値と比較して少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又は１００％である。典型的に、患者の測定可能な改善が以下のものを含む場合に、患者は細菌感染症（例えば黄色ブドウ球菌感染症）が完全に治療されたとみなすことができる：ｉ）反復した血液又は組織培養（典型的には数回）において元々同定された細菌が成長しない、ｉｉ）発熱が正常化される、ｉｉｉ）ＷＢＣが正常化される、及びｉｖ）患者が有していた既存の合併性に鑑みて終末器官不全（肺、肝臓、腎臓、血管虚脱）が部分的又は完全に消散したことの証拠。

【０３２４】

用量決定

先行する態様の何れでも、感染患者の治療において、ＡＡＣの投与量は、通常、約０．００１から１０００ｍｇ／ｋｇ／日である。一実施態様では、細菌感染症の患者は、約１ｍｇ／ｋｇから約１００ｍｇ／ｋｇ、典型的に約５ｍｇ／ｋｇから約９０ｍｇ／ｋｇ、より具体的には１０ｍｇ／ｋｇから５０ｍｇ／ｋｇの範囲のＡＡＣの用量で治療される。ＡＡＣは、毎日（例えば５から５０ｍｇ／ｋｇ／日の単回用量）以下の頻度（例えば５、１２．５又は２５ｍｇ／ｋｇ／週の単回用量）で与えることができる。１用量は、２日にわたって、例えばある日に２５ｍｇ／ｋｇ及び次の日に２５ｍｇ／ｋｇに分けることができる。患者は、１－８週間の期間にわたって３日ごと（ｑ３Ｄ）、週１回から隔週（ｑＯＷ）で投与を受けることができる。一実施態様では、患者に本発明のＡＡＣをＩＶにより週１回、２－６週にわたって標準治療（ＳＯＣ）とともに投与して、ｓｔａｐｈ　Ａ感染症のような細菌感染症を治療する。治療の長さは、患者の状態又は感染の程度により、例えば無併発の菌血症について２週間又は心内膜炎を併発する菌血症について６週間要求される。

【０３２５】

一実施態様では、ＡＡＣは、２．５から１００ｍｇ／ｋｇの初期用量で１から７日間連続、その後に０．００５から１０ｍｇ／ｋｇの維持用量で１カ月間１から７日ごとに１回投与される。

【０３２６】

投与の経路

細菌感染症を治療するために、本発明のＡＡＣは、上記の投与量の何れかで、静脈内（ｉ．ｖ．）又は皮下投与できる。一実施態様では、ＷＴＡ－ＡＡＣは、静脈内投与される。具体的な実施態様では、ｉ．ｖ．により投与されるＷＴＡ－ＡＡＣは、ＷＴＡ－ベータＡＡＣであり、より具体的には、ＷＴＡ－ベータ抗体は、図１４、図１５Ａ、図１５Ｂ、図１６Ａ及び図１６Ｂに開示するアミノ酸配列を有するＡｂの群から選択されるものである。

【０３２７】

併用療法

ＡＡＣは、患者を治療する医師が決定して適切である一又は複数のさらなる、例えば第２の治療剤又は予防剤とともに投与してよい。

【０３２８】
一実施態様では、本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物と組み合わせて投与される第２の抗生物質は、以下の構造クラスから選択される：（ｉ）アミノ配糖体、（ｉｉ）ベータラクタム、（ｉｉｉ）マクロライド／環状ペプチド、（ｉｖ）テトラサイクリン、（ｖ）フルオロキノリン／フルオロキノロン、（ｖｉ）及びオキサゾリジノン。Ｓｈａｗ，Ｋ．及びＢａｒｂａｃｈｙｎ，Ｍ．（２０１１）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１２４１：４８－７０；Ｓｕｔｃｌｉｆｆｅ，Ｊ．（２０１１）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１２４１：１２２－１５２を参照されたい。

【０３２９】
一実施態様では、本発明の抗体－抗生物質コンジュゲート化合物と組み合わせて投与される第２の抗生物質は、クリンダマイシン、ノボビオシン、レタパムリン、ダプトマイシン、ＧＳＫ－２１４０９４４、ＣＧ－４００５４９、シタフロキサシン、テイコプラニン、トリクロサン、ナフチリドン、ラデゾリド、ドキソルビシン、アンピシリン、バンコマイシン、イミペネム、ドリペネム、ゲムシタビン、ダルババンシン及びアジスロマイシンから選択される。

【０３３０】
これらのさらなる治療剤又は予防剤のさらなる例は、抗炎症薬（例えば非ステロイド系抗炎症薬（ＮＳＡＩＤ；例えばケトプロフェン、ジクロフェナク、ジフルニサル、エトドラク、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、ケトプロフェン、メクロフェナム酸、メフェナム酸、メロキシカム、ナブメトン、ナプロキセンナトリウム、オキサプロジン、ピロキシカム、スリンダク、トルメチン、セレコキシブ、ロフェコキシブ、アスピリン、サリチル酸コリン、サルサレート並びにサリチル酸ナトリウム及びマグネシウム）、及びステロイド（例えばコルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロン））、抗菌剤（例えばアジスロマイシン、クラリスロマイシン、エリスロマイシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、アモキシシリン、メトロニダゾール、ペニシリンＧ、ペニシリンＶ、メチシリン、オキサシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、ナフシリン、アンピシリン、カルベニシリン、チカルシリン、メズロシリン、ピペラシリン、アズロシリン、テモシリン、セファロチン、セファピリン、セフラジン、セファロリジン、セファゾリン、セファマンドール、セフロキシム、セファレキシン、セフプロジル、セファクロール、ロラカルベフ、セフォキシチン、セフメタゾール、セフォタキシム、セフチゾキシム、セフトリアキソン、セフォペラゾン、セフタジジム、セフィキシム、セフポドキシム、セフチブテン、セフジニル、セフピロム、セフェピム、ＢＡＬ５７８８、ＢＡＬ９１４１、イミペネム、エルタペネム、メロペネム、アズトレオナム、クラブラン酸、スルバクタム、タゾバクタム、ストレプトマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、ピューロマイシン、ゲンタマイシン、トブラマイシン、アミカシン、ネチルマイシン、スペクチノマイシン、シソマイシン、ジベカシン、イセパマイシン、テトラサイクリン、クロロテトラサイクリン、デメクロサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、メタサイクリン、ドキシサイクリン、テリスロマイシン、ＡＢＴ－７７３、リンコマイシン、クリンダマイシン、バンコマイシン、オリタバンシン、ダルババンシン、テイコプラニン、キヌプリスチン及びダルホプリスチン、スルファニルアミド、パラ－アミノ安息香酸、スルファジアジン、スルフイソキサゾール、スルファメトキサゾール、スルファタリジン、リネゾリド、ナリジキシン酸、オキソリニン酸、ノルフロキサシン、ペフロキサシン、エノキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、テマフロキサシン、ロメフロキサシン、フレロキサシン、グレパフロキサシン、スパルフロキサシン、トロバフロキサシン、クリナフロキサシン、モキシフロキサシン、ゲミフロキサシン、シタフロキサシン、ダプトマイシン、ガレノキサシン、ラモプラニン、ファロペネム、ポリミキシン、チゲサイクリン、ＡＺＤ２５６３又はトリメトプリム）、ＡＡＣが標的にするＡｇと同じ又は異なる抗原に対する抗体を含む抗菌抗体、血液凝固阻害剤（例えばアブシキシマブ、アスピリン、シロスタゾール、クロピドグレル、ジピリダモール、エプチフィバチド、チクロピ

ジン又はチロフィバン）、抗凝固剤（例えばダルテパリン、ダナパロイド、エノキサパリン、ヘパリン、チンザパリン又はワルファリン）、解熱剤（例えばアセトアミノフェン）、又は脂質低下剤（例えばコレスチラミン、コレスチポール、ニコチン酸、ゲムフィブロジル、プロブコール、エゼチミブ又はスタチン、例えばアトルバスタチン、ロスバスタチン、ロバスタチン、シンバスタチン、プラバスタチン、セリバスタチン及びフルバスタチン）である。一実施態様では、本発明のＡＡＣは、黄色ブドウ球菌（メチシリン耐性及びメチシリン感受性株を含む）に対する標準治療（ＳＯＣ）と組み合わせて投与される。ＭＳＳＡは、通常、典型的に、ナフシリン又はオキサシリンで治療され、ＭＲＳＡは、典型的に、バンコマイシン又はセファゾリンで治療される。

【０３３１】

これらのさらなる薬剤は、ＡＡＣの投与の１４日、７日、１日、１２時間若しくは１時間以内、又はＡＡＣと同時に投与してよい。さらなる治療剤は、ＡＡＣと同じ又は異なる薬学的組成物に存在してよい。異なる薬学的組成物に存在する場合、異なる投与の経路を用いてよい。例えば、ＡＡＣを静脈内又は皮下投与し、第２の薬剤を経口投与してよい。

【０３３２】

医薬製剤

本発明は、ＡＡＣを含む薬学的組成物、及びＡＡＣを含む薬学的組成物を用いる細菌感染症を治療する方法も提供する。このような組成物は、適切な賦形剤、例えば、バッファー、酸、塩基、糖類、希釈剤、流動促進剤、保存剤などを含む、当該技術分野で公知であり本明細書に記載される薬学的に許容される賦形剤（担体）をさらに含んでよい。本発明の方法及び組成物は、単独又は感染性疾患を治療するための他の従来の方法及び／又は薬剤と組み合わせて用いてよい。一態様では、本発明は、本発明の少なくとも１つの抗体及び／又はその少なくとも１つの抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）を含む医薬製剤をさらに提供する。一部の実施態様では、医薬製剤は、１）本発明の抗体及び／又はそのＡＡＣと、２）薬学的に許容される担体とを含む。一部の実施態様では、医薬製剤は、１）本発明の抗体及び／又はそのＡＡＣと、任意選択的に２）少なくとも１種のさらなる治療剤とを含む。

【０３３３】

本発明の抗体又はＡＡＣを含む医薬製剤は、所望の純度を有する抗体又はＡＡＣを、任意選択的な生理的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤（Remington’s Pharmaceutical Sciences 第16版，Osol，A.編(1980)）と水性溶液又は凍結乾燥若しくはその他の乾燥製剤の形で混合することにより、貯蔵のために調製される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、採用される投与量及び濃度にてレシピエントに対して非毒性であり、バッファー、例えばリン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン及び他の有機酸、アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤、保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロライド、ベンザルコニウムクロライド、ベンゼトニウムクロライド）、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール、アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、３－ペンタノール及びｍ－クレゾール）、低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド、タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン、アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン、グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物、ＥＤＴＡのようなキレート剤、糖類、例えばショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトール、塩形成対イオン、例えばナトリウム、金属錯体（例えばＺｎ－タンパク質錯体）並びに／あるいは非イオン性界面活性剤、例えばＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）又はポリエチレングリコール（ＰＥＧ）である。インビボ投与のために用いられる医薬製剤は、一般的に、滅菌されており、これは、滅菌濾過膜による濾過により容易に達成される。

【０３３４】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面間重合より調製されたマイ

クロカプセル剤、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチンマイクロカプセル剤及びポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル剤に、コロイド薬物送達系（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル剤）又はマイクロエマルジョンに封入してもよい。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ第１６版、Ｏｓｏｌ，Ａ．編（１９８０）に開示されている。

【０３３５】

持続放出調製物を調製してよい。適切な持続放出調製物としては、例えば、本発明の抗体又はＡＡＣを含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスであって、成形体の形、例えばフィルム又はマイクロカプセル剤の形であるマトリクスが挙げられる。持続放出マトリクスとしては、例えば、ポリエステル、ヒドロゲル（例えばポリ（メタクリル酸２－ヒドロキシエチル）又はポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９）、Ｌ－グルタミン酸とＬ－グルタミン酸γエチルとの共重合体、非分解性エチレン－ビニル酢酸、分解性乳酸－グリコール酸共重合体、例えばＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（商標）（乳酸－グリコール酸共重合体及び酢酸ロイプロリドから構成される注射用マイクロスフェア）、及びポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン－ビニル酢酸及び乳酸－グリコール酸のようなポリマーは１００日を超えて分子を放出できるが、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。カプセルに封入された抗体又はＡＡＣが体内に長期間残存する場合、これらは、３７℃にて水分への曝露の結果として変性又は凝集して、生物活性の喪失及び免疫原性の変化の可能性がある。関与する機序に依存して、安定化のために合理的な方策を講じることができる。例えば、凝集機序がチオ－ジスルフィド交換による分子間Ｓ－Ｓ結合の形成であると見出されたならば、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、水分含量をコントロールし、適当な添加剤を使用し、特定のポリマーマトリクス組成物を開発することにより達成してよい。

【０３３６】

抗体は、細胞／組織を標的にするための任意の適切な送達のための形に処方してよい。例えば、抗体は、様々な種類の脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤から構成される小胞であるリポソームとして処方してよく、リポソームは、哺乳動物に薬物を送達するために有用である。リポソームの成分は、通常、生体膜での脂質構成と同様の二重膜形成で構成される。抗体を含むリポソームは、Ｅｐｓｔｅｉｎら、（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８２：３６８８；Ｈｗａｎｇら、（１９８０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ７７：４０３０；ＵＳ４４８５０４５；ＵＳ４５４４５４５；国際公開第９７／３８７３１号；ＵＳ５０１３５５６に記載されるような当該技術分野で知られる方法により調製される。

【０３３７】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びＰＥＧ－誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を用いる逆相エバポレーション法により作製できる。リポソームを規定された孔サイズのフィルタを通して押し出すことにより、所望の直径を有するリポソームを得る。本発明の抗体のＦａｂ’断片は、Ｍａｒｔｉｎら、（１９８２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：２８６－２８８に記載されるように、ジスルフィド交換反応によりリポソームにコンジュゲートできる。リポソームは、任意選択的に、化学療法剤を含む（Gabizonら、 (1989) J. National Cancer Inst. 81(19):1484）。

【０３３８】

診断及び検出のための方法及び組成物

ある特定の実施態様では、本明細書に示す何れの抗体も、生物学的試料中のＭＲＳＡの存在を検出するために有用である。用語「検出する」は、本明細書で用いる場合、定量的及び定性的検出を包含する。「生物学的試料」は、例えば血液、血清、血漿、組織、痰、吸引液、ふき取り検体などを含む。

【０３３９】
一実施態様では、診断又は検出の方法で用いるための抗ＷＴＡ抗体が提供される。さらなる態様では、生物学的試料中のＷＴＡの存在を検出する方法が提供される。ある特定の実施態様では、方法は、生物学的試料を抗ＷＴＡ抗体と、本明細書に記載するようにして、抗ＷＴＡ抗体とＷＴＡとの結合を可能にする条件下で接触させることと、抗ＷＴＡ抗体と生物学的試料中のＷＴＡとの間で複合体が形成されたかを検出することとを含む。このような方法は、インビトロ又はインビボ法であってよい。一実施態様では、抗ＭＲＳＡ抗体を用いて、抗ＭＲＳＡ抗体を用いる治療に適格な対象を選択し、例えば、この場合、ＭＲＳＡが患者の選択のためのバイオマーカーである。

【０３４０】
例示的な一実施態様では、抗ＷＴＡ抗体をインビボで用いて、例えば感染症の診断、予後予測若しくは段階決定、適切な治療方針の決定、又は治療に対する感染症の応答のモニタリングを目的として、例えばインビボ画像化により、対象におけるＭＲＳＡ陽性感染症を検出する。当該技術分野で知られるインビボ検出の１つの方法は、例えばｖａｎ　Ｄｏｎｇｅｎら、（２００７）Ｔｈｅ　Ｏｎｃｏｌｏｇｉｓｔ１２：１３７９－１３８９及びＶｅｒｅｌら、（２００３）Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４４：１２７１－１２８１に記載されるような免疫－陽電子放出型断層撮影法（免疫－ＰＥＴ）である。このような実施態様では、標識された抗Ｓｔａｐｈ抗体を、Ｓｔａｐｈ陽性感染症であるか又は該感染症であることが疑われる対象に投与することと、対象において標識された抗Ｓｔａｐｈ抗体を検出することとを含む対象におけるＳｔａｐｈ陽性感染症を検出するための方法であって、標識された抗Ｓｔａｐｈ抗体の検出が、対象におけるＳｔａｐｈ陽性感染症を示す方法が提供される。ある特定のこのような実施態様では、標識された抗Ｓｔａｐｈ抗体は、陽電子放出体、例えば^{68}Ｇａ、^{18}Ｆ、^{64}Ｃｕ、^{86}Ｙ、^{76}Ｂｒ、^{89}Ｚｒ及び^{124}Ｉにコンジュゲートされた抗Ｓｔａｐｈ抗体を含む。特定の実施態様では、陽電子放出体は、^{89}Ｚｒである。

【０３４１】
さらなる実施態様では、診断又は検出の方法は、基材に固定化されている第１の抗Ｓｔａｐｈ抗体を、Ｓｔａｐｈの存在について試験する生物学的試料と接触させることと、基材を第２の抗Ｓｔａｐｈ抗体に曝露することと、第２の抗Ｓｔａｐｈ抗体が、第１の抗Ｓｔａｐｈ抗体と生物学的試料中のＳｔａｐｈとの複合体と結合したかを検出することとを含む。基材は、任意の支持媒体、例えばガラス、金属、セラミック、ポリマービーズ、スライド、チップ及び他の基材であってよい。ある特定の実施態様では、生物学的試料は、細胞又は組織（例えば癌性又は癌性の可能性がある結腸直腸、子宮内膜、膵臓又は卵巣組織を含む生検材料）を含む。ある特定の実施態様では、第１又は第２の抗Ｓｔａｐｈ抗体は、本明細書に記載する任意の抗体である。そのような実施態様では、第２の抗ＷＴＡ抗体は、抗ＷＴＡ抗体Ｓ４４９７、Ｓ４４６２、Ｓ６９７８、Ｓ４４８７又は本明細書に記載するものに由来する抗体であってよい。

【０３４２】
上記の実施態様の何れかにより診断又は検出され得る例示的障害としては、免疫組織化学（ＩＨＣ）又はインサイチューハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）のような試験を用いるＭＲＳＡ陽性感染症が挙げられる。一部の実施態様では、Ｓｔａｐｈ陽性感染症は、Ｓｔａｐｈ　ｍＲＮＡを検出する逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）アッセイに従ってＳｔａｐｈを発現する感染症である。一部の実施態様では、ＲＴ－ＰＣＲは、定量ＲＴ－ＰＣＲ（Francois P and Schrenzel J (2008). "Rapid Diagnosis and Typing of Staphylococcus aureus". Staphylococcus: Molecular Genetics. Caister Academic Press; Mackay IM編(2007)）及びリアルタイムＰＣＲ（"Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. Caister Academic Press）である。

【０３４３】
ある特定の実施態様では、標識された抗細胞壁タイコ酸（ＷＴＡ）抗体が提供される。標識としては、それらに限定されないが、直接検出される標識又は部分（例えば、蛍光性

、色素産生、高電子密度、化学発光及び放射活性標識）、並びに例えば酵素反応又は分子相互作用により間接的に検出される部分、例えば酵素又はリガンドが挙げられる。例示的標識としては、それらに限定されないが、放射性同位体^{32}Ｐ、^{14}Ｃ、^{125}Ｉ、^{3}Ｈ及び^{131}Ｉ、フルオロフォア、例えば希土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ（ＵＳ４７３７４５６）、ルシフェリン、２，３－ジヒドロフタラジンジオン類、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環式オキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、色素前駆体を酸化するために過酸化水素を用いる酵素、例えばＨＲＰ、ラクトペルオキシダーゼ又はミクロペルオキシダーゼとカップリングされたもの、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカルなどが挙げられる。別の実施態様では、標識は、陽電子放出体である。陽電子放出体としては、それらに限定されないが、^{68}Ｇａ、^{18}Ｆ、^{64}Ｃｕ、^{86}Ｙ、^{76}Ｂｒ、^{89}Ｚｒ及び^{124}Ｉが挙げられる。特定の実施態様では、陽電子放出体は、^{89}Ｚｒである。

【０３４４】

臨床的に、ＭＲＳＡ感染症の症状は、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌（ＭＳＳＡ）のものと同様であり、膿瘍及び蜂巣炎を含む。頻繁に、膿瘍は、中心壊死の領域を伴う。せつ（おでき）も、特にＭＲＳＡ大流行の関係において、一般的である。病変は、壊死中心に進行する一般的な発赤のために、クモ咬傷と誤って報告されることもある。さらに、感染症は、膿痂疹、毛包炎、深在性膿瘍、化膿性筋炎、骨髄炎、壊死性筋膜炎、ブドウ球菌毒性ショック症候群、肺炎及び敗血症として出現できる。深刻な全身性感染は、注射薬物使用、糖尿病又はその他の免疫無防備状態の経歴がある人の間でより一般的である。

【０３４５】

ＭＲＳＡ感染症の標準治療選択肢としては、伝統的な機械的オプション、例えば（ｉ）温浸漬及び圧定布、（ｉｉ）切開及び排膿、並びに（ｉｉｉ）感染の原因である外来デバイス（例えばカテーテル）の除去が挙げられる。より深刻な感染症、特に蜂巣炎を示すものについては、抗生物質（Ａｂｘ）が処方される。穏やかな感染症から中度の感染症については、抗生物質としては、トリメトプリム－スルファメトキサゾール（ＴＭＰ－ＳＭＸ）、クリンダマイシン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、テトラサイクリン、リファンピン、バンコマイシン、リネゾリドが挙げられる。典型的に、治療レジメンは、５－１０にわたって生じ、治療期間中及び期間後の両方で周期的な再検査及び評価が行われる。

【０３４６】

さらなる治療オプションとしては、患者が感染症の再発を経験するか又はＭＲＳＡ大流行が進行中の環境にいる背景において特に、除菌が挙げられる。除菌は、患者の鼻孔を阻害するフローラを除去する手順である。これは、２％ムピロシン軟膏をたっぷりと両方の外鼻孔に５－１０日間局所塗布し、グルコン酸クロルヘキシジン４％で５日間局所洗浄することにより行われる。

【０３４７】

製品

本発明の別の態様では、上記の障害の治療、予防及び／又は診断のために有用な物質を含む製品が提供される。製品は、容器と、容器上又は容器に付随するラベル又は添付文書とを含む。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、ＩＶ溶液バッグなどが挙げられる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックでできていてよい。容器は、それ自体又は障害を治療、予防及び／若しくは診断するために効果的な別の組成物と混合されている組成物を保持し、滅菌アクセスポート（例えば容器は、皮下注射針で穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってよい）を有していてよい。組成物中の少なくとも１つの活性薬剤は、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートである。ラベル又は添付文書は、組成物が選択された状態を治療するために用いられる

ことを示す。さらに、製品は、（ａ）組成物を含む第１の容器であって、組成物が本発明の抗体又はイムノコンジュゲートを含む第１の容器と、（ｂ）組成物を含む第２の容器であって、組成物が、さらなる細胞傷害性薬剤又は治療剤を含む第２の容器とを含んでよい。本発明のこの実施態様の製品は、特定の状態を治療するために組成物を用いることができることを示す添付文書をさらに含んでよい。あるいは又はさらに、製品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば静菌性の注射用水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液又はデキストローズ溶液を含む第２の（又は第３の）容器をさらに含んでよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針及びシリンジを含む市販及びユーザの観点から望ましい他の物質をさらに含んでよい。

【実施例】

【０３４８】

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上記の全般的な記載に鑑みて、様々な他の実施態様を実行できることが理解される。

【０３４９】

実施例１　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　５１

２－ニトロベンゼン－１，３－ジオール１を、水素ガスの下で、エタノール溶媒中のパラジウム／炭素触媒を用いて水素化して、２－アミノベンゼン－１，３－ジオール２を塩酸塩として単離した（図２３Ａ及び２３Ｂ）。ジクロロメタン／テトラヒドロフラン中のｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルクロリド及びトリエチルアミンで２をモノ保護することにより、２－アミノ－３－（ｔｅｒｔ－ブチルジメチルシリルオキシ）フェノール３を得た。室温にてトルエン中で酸化マンガン又は酸素ガスを用いる酸化的縮合によりリファマイシンＳ（ＣｈｅｍＳｈｕｔｔｌｅ　Ｉｎｃ．、Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ、ＵＳ７３４２０１１；ＵＳ７２７１１６５；ＵＳ７５４７６９２）を３と反応させて、ＴＢＳ－保護ベンゾキサジノリファマイシン４を得た。ピペリジン－４－アミン及び酸化マンガンを４と反応させることにより、ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）５を得た。

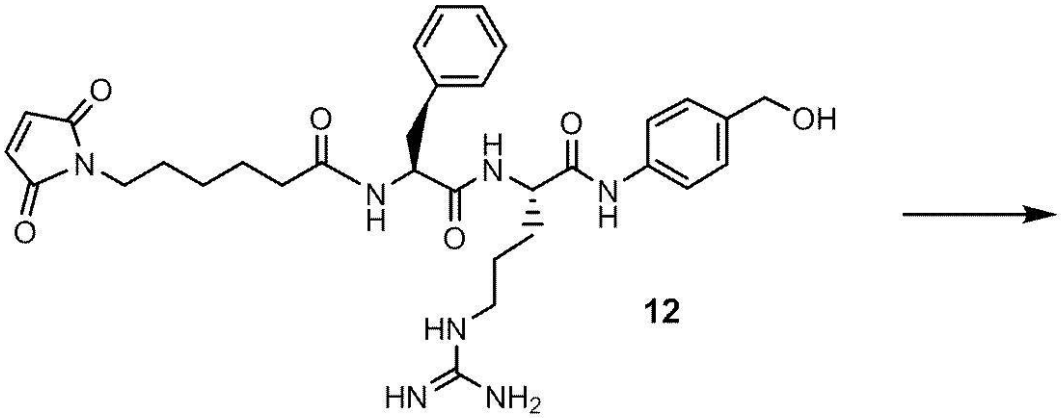
【０３５０】

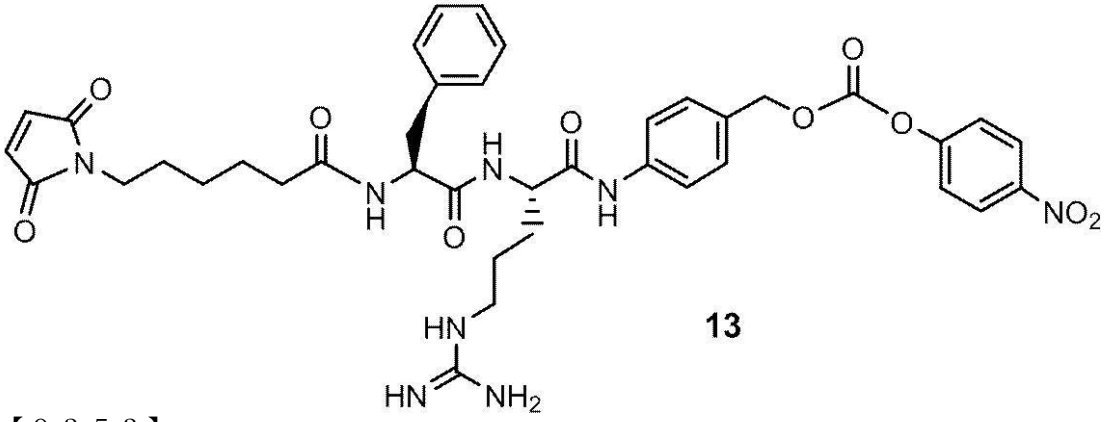
ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）５（０．０２ｍｍｏｌ）及び炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６（０．０２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（０．４ｍｌ）中で室温（ＲＴ）にて混合した。ここに、２．５等量のＮ，Ｎ’－ジイソプロピルエチルアミンを加えた。溶液を１時間から約１２時間まで撹拌し、ＬＣ／ＭＳによりモニタリングした。完了の際に、溶液をＤＭＦで希釈し、ＨＰＬＣに注入し、酸性条件下で精製して、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　５１を得た。Ｍ／Ｚ＝１４９８．９。収率４０％

【０３５１】

実施例２　ＭＣ－ｆｋ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　５２

実施例１の手順に従って、６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－５－グアニジノ－１－（４－（ヒドロキシメチル）フェニルアミノ）－１－オキソペンタン－２－イルアミノ）－１－オキソ－３－フェニルプロパン－２－イル）ヘキサンアミド１２を炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－フェニルプロパンアミド）－５－グアニジノペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル１３に変換した。





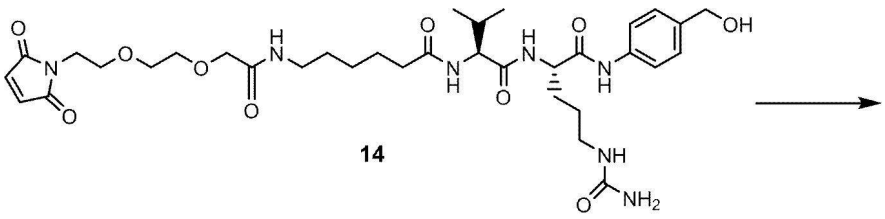
【０３５２】

ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）５（０．０２ｍｍｏｌ）及び１３（０．０２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（０．４ｍｌ）中で室温（ＲＴ）にて混合した。ここに、２．５等量のＮ，Ｎ’－ジイソプロピルエチルアミンを加えた。溶液を１時間から約１２時間まで撹拌し、ＬＣ／ＭＳによりモニタリングした。完了の際に、溶液をＤＭＦで希釈し、ＨＰＬＣに注入し、酸性条件下で精製して、ＭＣ－ｆｋ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　５２を得た。Ｍ／Ｚ＝１５４５．８。収率３２％

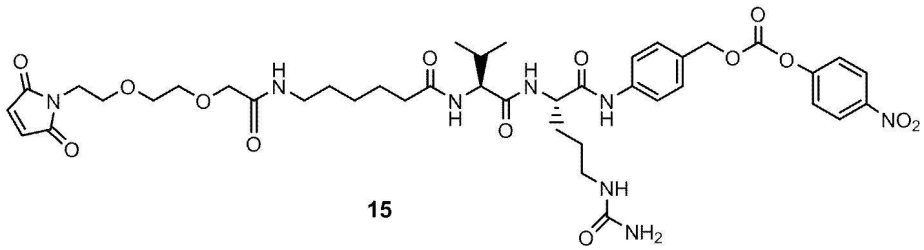
【０３５３】

実施例３　ＭＰ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　５３

実施例１の手順に従って、６－（２－（２－（２－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）エトキシ）エトキシ）アセトアミド）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（ヒドロキシメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）ヘキサンアミド１４を炭酸４－（（１７Ｓ，２０Ｓ）－１－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－１７－イソプロピル－８，１５，１８－トリオキソ－２０－（３－ウレイドプロピル）－３，６－ジオキサ－９，１６，１９－トリアザヘニコサンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル１５に変換した。



14



15

【０３５４】
ピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）５（０．０２ｍｍｏｌ）及び１５（０．０２ｍｍｏｌ）をＤＭＦ（０．４ｍｌ）中で室温（ＲＴ）にて混合した。ここに、２．５等量のＮ，Ｎ’－ジイソプロピルエチルアミンを加えた。溶液を１時間から約１２時間まで撹拌し、ＬＣ／ＭＳによりモニタリングした。完了の際に、溶液をＤＭＦで希釈し、ＨＰＬＣに注入し、酸性条件下で精製して、ＭＰ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐＢＯＲ　５３を得た。Ｍ／Ｚ＝１６４４．８、収率５７％
【０３５５】
実施例４　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　５４
Ｎ，Ｎ－ジメチルピペリジン－４－アミンとＴＢＳ－保護ベンゾキサジノリファマイシン４とを反応させることにより、ジメチルピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）７を得た（図２４）。
【０３５６】
あるいは、（５－フルオロ－２－ニトロ－１，３－フェニレン）ビス（オキシ）ビス（メチレン）ジベンゼン９を、水素ガスの下で、テトラヒドロフラン／メタノール溶媒中のパラジウム／炭素触媒を用いて水素化して、ベンジル基を除去して、２－アミノ－５－フルオロベンゼン－１，３－ジオール１０を得た。市販のリファマイシンＳ又はリファマイシンＳＶナトリウム塩（ＣｈｅｍＳｈｕｔｔｌｅ　Ｉｎｃ．、Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ）を２－アミノ－５－フルオロベンゼン－１，３－ジオール１０と、６０℃にて空気又はフェリシアン化カリウム中で酢酸エチル中の酸化的縮合により反応させて、フルオロベンゾキサジノリファマイシン１１を得た。フルオロをＮ，Ｎ－ジメチルピペリジン－４－アミンで置き換えることにより、ジメチルｐｉｐＢＯＲ　７を得た（図２５Ａ及び２５Ｂ）。
【０３５７】
国際公開第２０１２１１３８４７号；ＵＳ７６５９２４１；ＵＳ７４９８２９８；ＵＳ２００９０１１１７５６；ＵＳ２００９００１８０８６；ＵＳ６２１４３４５；Ｄｕｂｏｗｃｈｉｋら（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ　Ｃｈｅｍ．１３（４）：８５５－８６９の手順に従って調製した６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（ヒドロキシメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）ヘキサンアミド８（１．００９ｇ、１．７６２ｍｍｏｌ、１．０００、１００９ｍｇ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（６ｍＬ、７７ｍｍｏｌ、４４、５７００ｍｇ）に取った。ここに、塩化チオニル（１．１ｅｑｕｉｖ．、１．９３８ｍｍｏｌ、１．１００、２３１ｍｇ）のジクロロメタン（ＤＣＭ）溶液（１ｍＬ、１５．４４ｍｍｏｌ、８．７６５、１３２５ｍｇ）を少しずつ滴下添加した（１／２を１時間かけて加え、室温（ＲＴ）にて１時間撹拌し、次いで、残りの半分をさらに１時間かけて加

えた）。溶液は黄色のままであった。さらに０．６ｅｑの塩化チオニルを０．５ｍＬ　ＤＣＭ中の溶液として注意しながら滴下添加した。反応物は黄色のままであり、密閉して終夜ＲＴにて撹拌した。反応物をＬＣ／ＭＳにより８８％の生成物塩化ベンジル９までモニタリングした。さらに０．２２ｅｑの塩化チオニルを０．３ｍＬ　ＤＣＭ中の溶液として滴下添加した。反応が９２％塩化ベンジル９に近づいたときに、反応物はN_2を発して泡立った。濃度を０．３Ｍから０．６Ｍに低減した。生成物Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（クロロメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）－６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド９を０．６Ｍ溶液として冷蔵庫に貯蔵し、そのまま用いた。Ｍ／Ｚ　５９１．３、９２％収率。

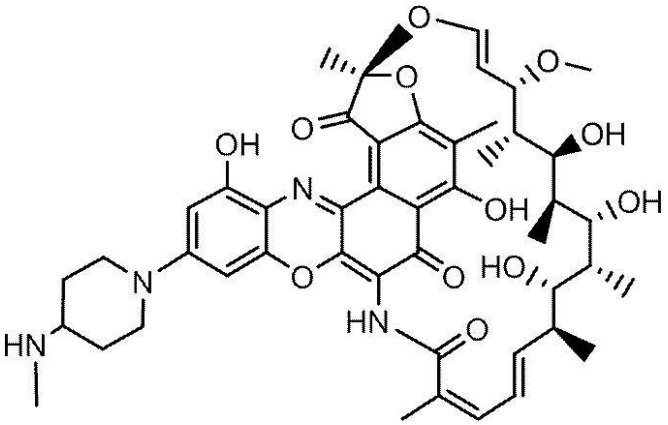
【０３５８】

フラスコ中で、Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（クロロメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）－６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド９（０．９ｍｍｏｌ）を０℃まで冷却し、ジメチルピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）７（０．７５ｇ、０．８１ｍｍｏｌ、０．４６、７５０ｍｇ）を加えた。混合物を別の１．５ｍＬのＤＭＦで希釈して、０．３Ｍに達した。空気開放下で３０分間撹拌し、Ｎ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（３．５ｍｍｏｌ、３．５ｍｍｏｌ、２．０、４６０ｍｇ）を加え、反応物を終夜、空気開放下で撹拌した。反応物を空気開放下で撹拌しながら、反応が進行しなくなるように見受けられるまで４日の期間にわたって０．２ｅｑのＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン塩基を４回加えた。反応物をＤＭＦで希釈し、いくつかのバッチでＨＰＬＣ（２０－６０％ＡＣＮ／ＦＡ· Ｈ２Ｏ）で精製して、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　５４を得た。Ｍ／Ｚ＝１４８２．８収率：３２％

【０３５９】

実施例５　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－モノメチルｐｉｐ，デスアセチルＢＯＲ　５５

実施例１の手順に従って、Ｎ－メチルピペリジン－４－アミンとＴＢＳ－保護デスアセチル，ベンゾキサジノリファマイシンとを酸化マンガンと反応させて、モノメチルピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）１６を得た。



16

【０３６０】

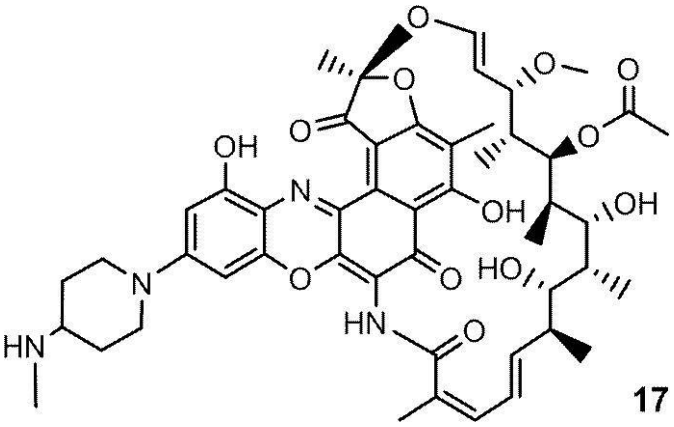
炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６と１６とを反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－モノメチルｐｉｐ，デスアセチルＢＯＲ　５５を２６％収率で得た（Ｍ／Ｚ＝１４５６．５）。

【０３６１】

実施例６　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－モノメチルｐｉｐＢＯＲ　５６

実施例１の手順に従って、Ｎ－メチルピペリジン－４－アミンとＴＢＳ－保護ベンゾキサジノリファマイシン４とを酸化マンガンと反応させて、モノメチルピペリジルベンゾキ

サジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）１７を得た。



17

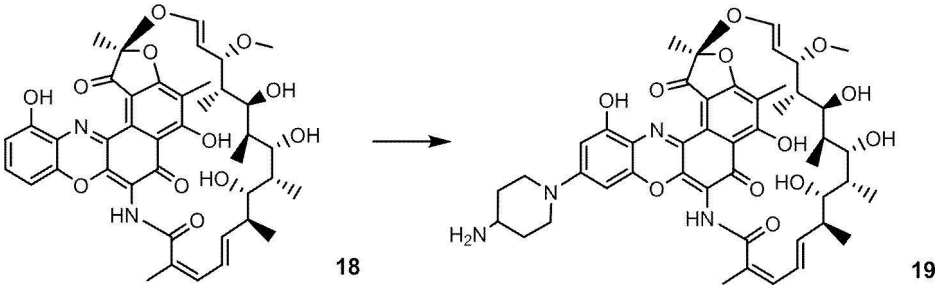
【０３６２】

炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６と１７とを反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－モノメチルｐｉｐＢＯＲ　５６を２５％収率で得た（Ｍ／Ｚ＝１４７１．０）。

【０３６３】

実施例７　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐ，デスアセチルＢＯＲ　５７

実施例１の手順に従って、ピペリジン－４－アミンとＴＢＳ－保護デスアセチル，ベンゾキサジノリファマイシン１８とを酸化マンガンと反応させて、ピペリジル，デスアセチルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐデスアセチルＢＯＲ）１９を得た。



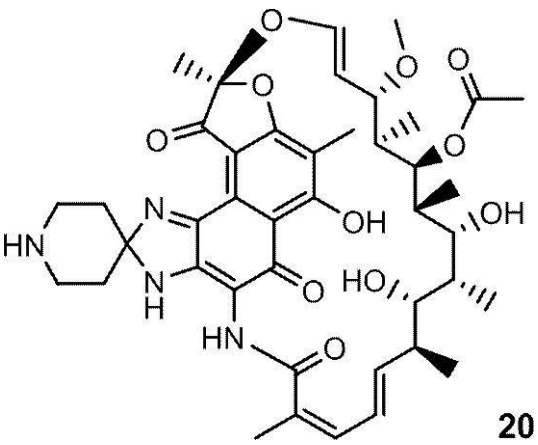
18　　19

【０３６４】

ピペリジル，デスアセチルベンゾキサジノリファマイシン１９（０．０２ｍｍｏｌ）と炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６（０．０２ｍｍｏｌ）とを反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐ，デスアセチルＢＯＲ　５７を得た。Ｍ／Ｚ＝１４５６．６。収率１３％

【０３６５】

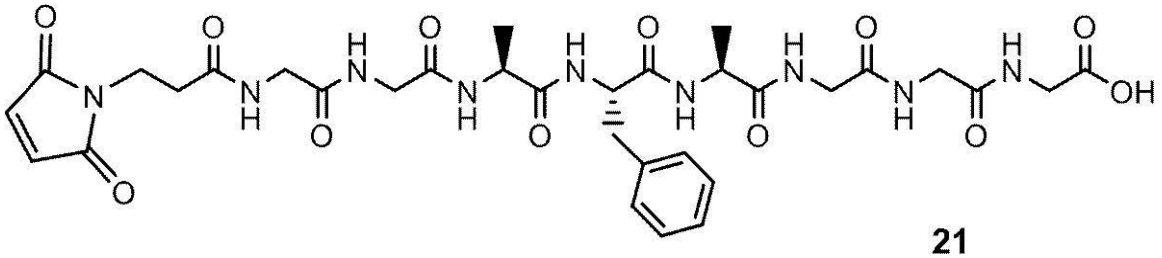
実施例８　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－リファブチン５８



20

【０３６６】
実施例１の手順に従って、デスイソブチルリファブチン２０（０．０２ｍｍｏｌ）と炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６（０．０２ｍｍｏｌ）とを反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－リファブチン５８を得た。Ｍ／Ｚ＝１３８９．６。収率２１％

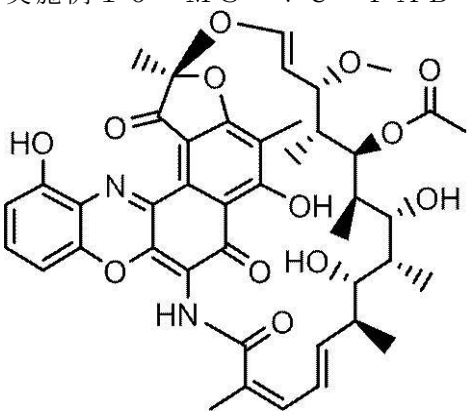
【０３６７】
実施例９　ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－ｐｉｐＢＯＲ（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）５９



21

実施例１の手順に従って、マレイミドペプチド２１をピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ｐｉｐＢＯＲ）５と標準的なアミド結合形成条件の下でカップリングさせて、ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－ｐｉｐＢＯＲ（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）５９を得た。Ｍ／Ｚ＝１６２６．０。収率１３％

【０３６８】
実施例１０　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｒｉｆ　６０



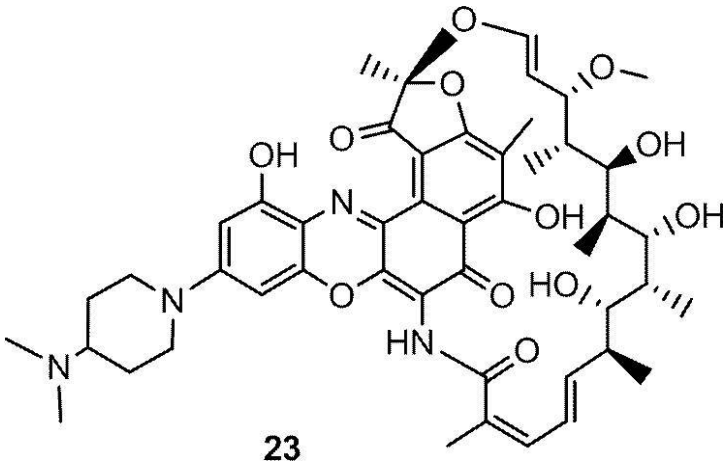
22

小さいバイアル中で、実施例４の手順により調製した０．０５ｍＬのＮ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（クロロメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）－６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド９の０．６Ｍ溶液を０℃まで冷却し、１ｅｑｕｉｖ．のベンゾキサジノリファマイシン２２を加え

、混合物を５分間撹拌した。この０℃の溶液に、K_2CO_3（１５ｅｑ）を加え、バイアルの側面を０．０５ｍＬのＤＭＦで洗浄した。反応物を空気開放下で室温まで１－４時間撹拌した。全ての９が消費されたときに、固体を濾別し、回収した濾液をＤＭＦで希釈した。ＨＰＬＣによる精製により、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｒｉｆ　６０を１１％収率で得た（Ｍ／Ｚ＝１３５６．９）。

【０３６９】

実施例１１　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐ，デスアセチルＢＯＲ　６１



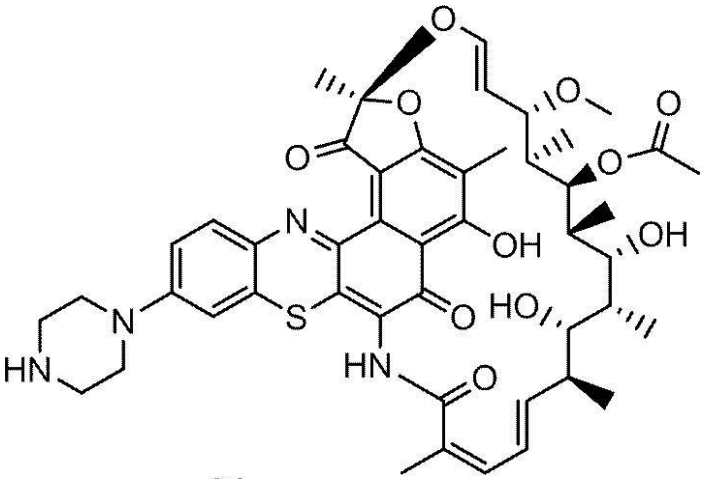
23

【０３７０】

実施例４の手順に従って、Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（クロロメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）－６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド９をジメチルピペリジル，デスアセチルベンゾキサジノリファマイシン（ジメチル，デスアセチルｐｉｐＢＯＲ）２３と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ジメチルｐｉｐ，デスアセチルＢＯＲ　６１を得た。Ｍ／Ｚ＝１４４０．６６

【０３７１】

実施例１２　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚＢＴＲ　６２



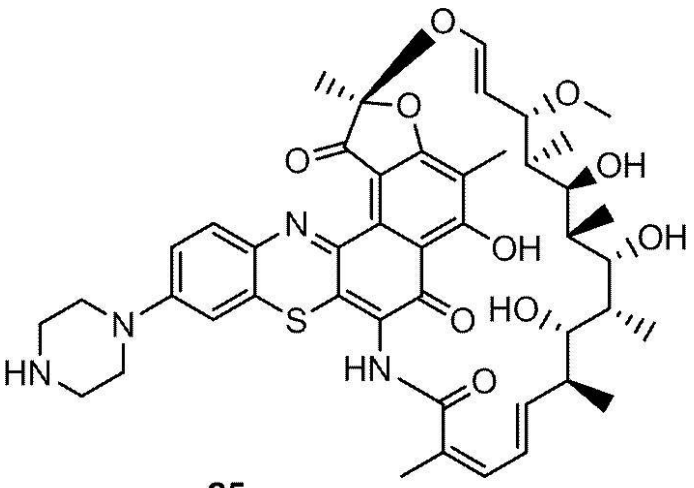
24

【０３７２】

実施例１の手順に従って、炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６をピペラジノベンズチアジノリファマイシン（ｐｉｐｅｒａｚＢＴＲ）２４と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚＢＴＲ　６２を得た。Ｍ／Ｚ＝１４８３．７

【０３７３】

実施例１３　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚ，デスアセチルＢＴＲ　６３



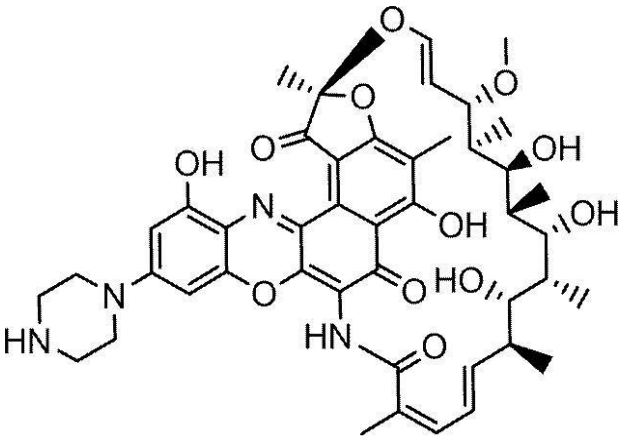
25

【０３７４】

実施例１の手順に従って、炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６をピペラジノ，デスアセチルベンズチアジノリファマイシン（ｐｉｐＢＴＲ）２５と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚ，デスアセチルＢＴＲ　６３を得た。Ｍ／Ｚ＝１４４１．６

【０３７５】

実施例１４　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚ，デスアセチルＢＯＲ　６４



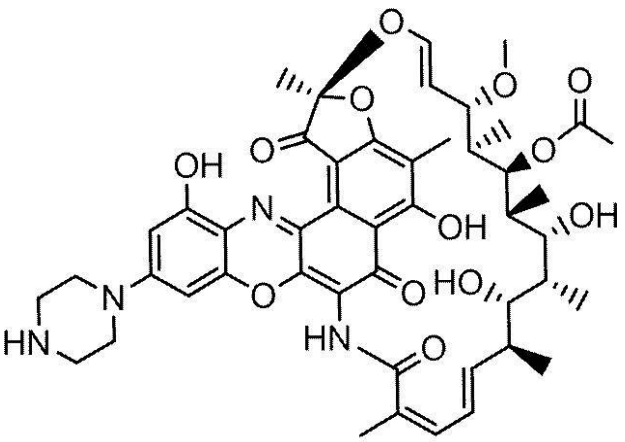
26

【０３７６】

実施例１の手順に従って、炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６をピペラジル，デスアセチルベンゾキサジノリファマイシン（デスアセチルｐｉｐＢＯＲ）２６と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚ，デスアセチルＢＯＲ　６４を得た。Ｍ／Ｚ＝１４４１．６

【０３７７】

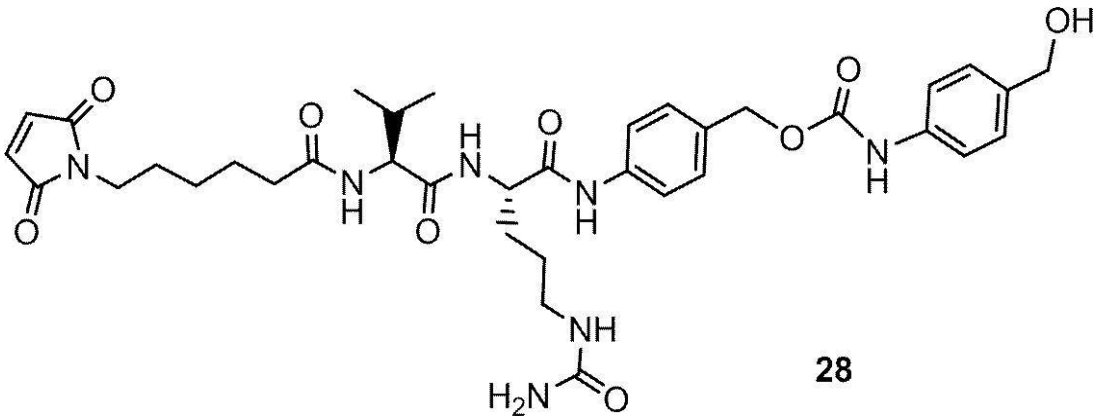
実施例１５　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ　６５



27

【０３７８】
　実施例１の手順に従って、炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６をピペラジルベンゾキサジノリファマイシン（ピペラジルＢＯＲ）２７と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ　６５を得た。Ｍ／Ｚ＝１４８２．７

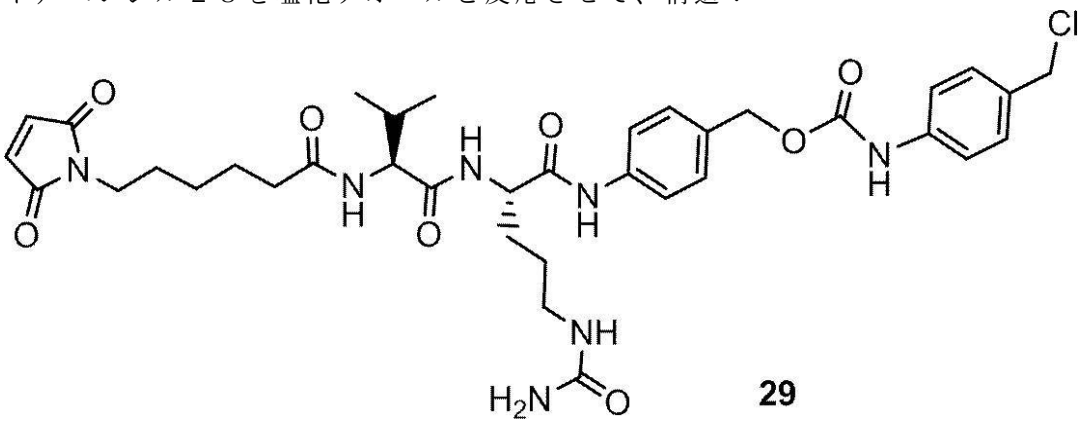
【０３７９】
実施例１６　ＭＣ－ｖｃ－ビスＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　６６
　バイアル中に、炭酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル４－ニトロフェニル６（１．５６ｇ、２．１１ｍｍｏｌ、１００質量％）をＤＭＦ（５５ｅｑｕｉｖ．、１１６ｍｍｏｌ、５５．０、８．５ｇ）に取り、ＲＴにて撹拌した。この濁った黄色の混合物に、（４－アミノフェニル）メタノール（ＰＡＢ、１．１ｅｑｕｉｖ．、２．３３ｍｍｏｌ、１．１０、２８６ｍｇ）及び１－ヒドロキシベンゾトリアゾール（０．３７ｅｑｕｉｖ．、０．７８２ｍｍｏｌ、０．３７０、１０６ｍｇ）を加えた後に、Ｎ，Ｎ’－ジイソプロピルエチルアミン（１ｅｑｕｉｖ．、２．１１ｍｍｏｌ、１．００、２７６ｍｇ）を加えた。反応物を２時間撹拌し、ＬＣ／ＭＳによりモニタリングした。さらに１等量のＮ，Ｎ’－ジイソプロピルエチルアミン（Ｈｕｎｉｇｓ塩基）及び１００ｍｇの（４－アミノフェニル）メタノールを加えた。反応物を終夜ＲＴにて密閉して撹拌した。約０．５Ｌのジエチルエーテルを滴下添加して、生成物を沈殿させた。エーテルをデカンテーションし、固体をＤＭＦに再溶解し、いくつかのバッチでＨＰＬＣで直接精製して、構造：



28

を有する４－（ヒドロキシメチル）フェニルカルバミン酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル２８（０．４３５ｇ）を２８％の全体的な単離収率で得た（Ｍ／Ｚ：７２２．５）。

【０３８０】
実施例４の手順に従って、４－（ヒドロキシメチル）フェニルカルバミン酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル２８を塩化チオニルと反応させて、構造：

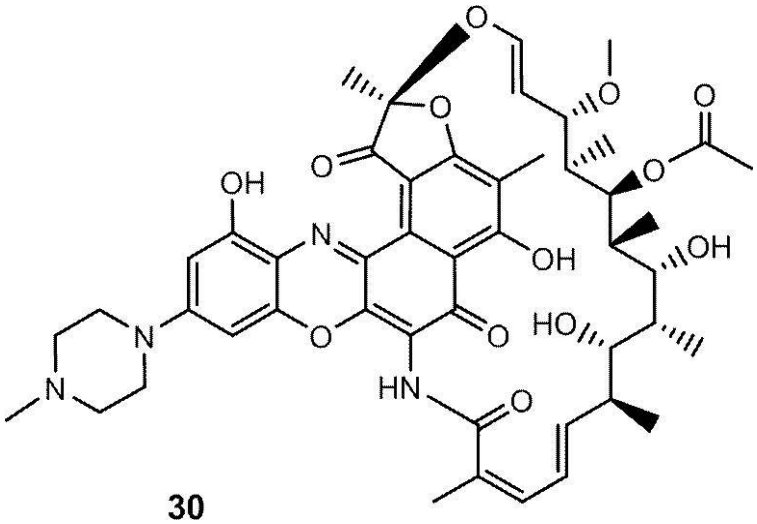


29

を有する４－（クロロメチル）フェニルカルバミン酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル２９を４７％の単離収率で得た（Ｍ／Ｚ：７４０．４）。

【０３８１】
実施例４の手順に従って、４－（クロロメチル）フェニルカルバミン酸４－（（Ｓ）－２－（（Ｓ）－２－（６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド）－３－メチルブタンアミド）－５－ウレイドペンタンアミド）ベンジル２９をジメチルピペリジルベンゾキサジノリファマイシン（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）７と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ビスＰＡＢ－ジメチルｐｉｐＢＯＲ　６６を５％収率で得た（Ｍ／Ｚ：１６３２．１）。

【０３８２】
実施例１７　ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－メチルｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ　６７



30

【０３８３】
実施例４の手順に従って、Ｎ－（（Ｓ）－１－（（Ｓ）－１－（４－（クロロメチル）フェニルアミノ）－１－オキソ－５－ウレイドペンタン－２－イルアミノ）－３－メチル－１－オキソブタン－２－イル）－６－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）ヘキサンアミド９をメチルピペラジノベンゾキサジノリファマイシン（メチルｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）３０と反応させて、ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－メチルｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ　６７を得た。Ｍ／Ｚ＝１４５４．６８

【０３８４】
実施例１８　細胞内ＭＲＳＡは、抗生物質から保護される
　本実施例は、ＭＲＳＡが細胞内でインビボにて生存できることの証拠を提供する。感染すると、細胞内ＭＲＳＡは、抗生物質治療（例えばＳＯＣバンコマイシン）から保護され、生存して、ある細胞から別の細胞に感染を移動できる。
【０３８５】
　細胞外細菌についてのＭＩＣ決定：細胞外細菌についてのＭＩＣを、トリプシン大豆ブロス中で抗生物質の２倍系列希釈を調製することにより決定した。抗生物質の希釈物は、９６ウェル培養皿にて１点につき４つの検体で作製した。ＭＲＳＡ（ＵＳＡ３００のＮＲＳ３８４株）を指数関数的に成長する培養物から取り、１×１０^{4}ＣＦＵ／ｍＬに希釈した。細菌を抗生物質の存在下で１８－２４時間振盪しながら３７℃にて培養し、細菌の成長を、光学濃度（ＯＤ）を６３０ｎＭにて読み取ることにより決定した。ＭＩＣは、細菌成長を＞９０％阻害する抗生物質の用量として決定した。
【０３８６】
　細胞内細菌についてのＭＩＣ決定：細胞内ＭＩＣは、マウス腹腔マクロファージの内部に隔離された細菌について決定した。マクロファージを２４ウェル培養皿に４×１０^{5}細胞／ｍＬの密度でプレーティングし、マクロファージあたり１０－２０細菌の割合でＭＲＳＡ（ＵＳＡ３００のＮＲＳ３８４株）に感染させた。マクロファージ培養物を、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った成長培地で維持し、細胞外細菌の成長を阻害し、試験抗生物質を感染の１日後に成長培地に加えた。細胞内細菌の生存を、抗生物質添加の２４時間後に評価した。０．１％ウシ血清アルブミン及び０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘを補ったＨａｎｋｓ緩衝生理食塩水溶液でマクロファージを溶解し、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むリン酸緩衝生理食塩水溶液中で溶解物の系列希釈を作製した。生存細胞内細菌の数を、５％ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天プレート上にプレーティングすることにより決定した。
【０３８７】
　腹腔マクロファージの単離：腹腔マクロファージを、６－８週齢のＢａｌｂ／ｃマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ、ＣＡ）の腹膜から単離した。マクロファージの収率を増やすために、１ｍＬのチオグリコール酸塩培地（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）の腹腔内注射によりマウスを前処理した。チオグリコール酸塩培地は、水中で４％の濃度で調製し、オートクレーブにより滅菌し、使用前に２０日から６カ月間熟成させた。腹腔マクロファージは、チオグリコール酸塩での処置の４日後に、腹腔を冷リン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより採集した。マクロファージを、１０％胎児ウシ血清及び１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補った、抗生物質を含まないダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）に４×１０^{5}細胞／ウェルの密度にて２４ウェル培養皿にプレーティングした。マクロファージを終夜培養して、プレートに接着させた。このアッセイは、非食作用性細胞型における細胞内死滅を試験するためにも利用した。ＭＧ６３（ＣＲＬ－１４２７）及びＡ５４９（ＣＣＬ１８５）細胞株をＡＴＣＣから得て、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び１０％胎児ウシ血清を補ったＲＰＭＩ１６４０組織培養培地（ＲＰＭＩ－１０）で維持した。ＨＵＶＥＣ細胞をＬｏｎｚａから得て、ＥＧＭ内皮細胞完全培地（Ｌｏｎｚａ、Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、ＭＤ）で維持した。
【０３８８】
　オプソニン化したＭＲＳＡへのマクロファージの感染：ＭＲＳＡのＵＳＡ３００株（ＮＲＳ３８４）を、ＮＡＲＳＡレポジトリ（Ｃｈａｎｔｉｌｌｙ、Ｖｉｒｇｉｎｉａ）から得た。いくつかの実験は、黄色ブドウ球菌のＮｅｗｍａｎ株（ＡＴＣＣ２５９０４）を用いた。全ての実験において、細菌をトリプシン大豆ブロスで培養した。ＡＡＣでの細胞内死滅を評価するために、ＵＳＡ３００を指数関数的に成長する培養物から取り、ＨＢ（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び０．１％ウシ血清アルブミンを補ったＨａｎｋｓ平衡塩類溶液）で洗浄した。ＡＡＣ又は抗体をＨＢで希釈し、細菌と１時間インキュベートして、細菌との抗体の結合を可能にし（オプソニン化）、オプソニン化した細菌を用いて、マクロファ

ージあたり１０－２０細菌の割合で（ウェルあたり２５０μＬのＨＢ中に４×１０^{6}細菌）でマクロファージに感染させた。マクロファージを感染の直前に血清フリーＤＭＥＭ培地で予備洗浄し、５％ＣＯ$_{2}$の湿潤組織培養インキュベータ中で３７℃でのインキュベーションにより感染させて、細菌の食作用を可能にした。２時間後に、感染ミックスを除去し、通常成長培地（１０％胎児ウシ血清、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳを補ったＤＭＥＭ）に置き換え、ゲンタマイシンを５０μｇ／ｍｌで加えて、細胞外細菌の成長を妨げた。インキュベーション期間の最後に、マクロファージを血清フリー培地で洗浄し、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ（細胞内細菌に損傷を与えることなくマクロファージを溶解する）を補ったＨＢで細胞を溶解した。いくつかの実験では、培養上清への細胞質乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）の放出を、ＬＤＨ細胞傷害性検出キット（製品１１６４４７９３００１、Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｃｏｒｐ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）を用いて検出することにより、マクロファージの生存率を培養期間の最後に評価した。上清を回収し、製造者の使用説明に従って直ちに分析した。０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０（細菌の凝集を阻害するため）を補ったリン酸緩衝生理食塩水溶液中で溶解物の系列希釈を作製し、生存細胞内細菌の総数を、５％ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上にプレーティングすることにより決定した。

【０３８９】

ＭＲＳＡ感染腹膜細胞の作製。６－８週齢の雌性Ａ／Ｊマウス（ＪＡＸ（商標）マウス、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を、１×１０^{8}ＣＦＵのＵＳＡ３００のＮＲＳ３８４株に腹腔注射により感染させた。腹腔洗浄液を感染の１日後に採集し、０．１％ＢＳＡを補ったＨＥＰＥＳバッファー（ＨＢバッファー）で希釈した５０μｇ／ｍＬのリゾスタフィンで３０分間、３７℃にて感染腹膜細胞を処理した。腹膜細胞を次いで、２回、氷冷ＨＢバッファーで洗浄した。腹膜細胞を、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び１０％胎児ウシ血清及び５μｇ／ｍＬバンコマイシンを補ったＲＰＭＩ１６４０組織培養培地で１×１０^{6}細胞／ｍＬに希釈した。好中球死滅に供していない細胞外細菌についてのコントロールとして、一次感染からの遊離ＭＲＳＡを終夜、４℃にてリン酸緩衝生理食塩水溶液中に貯蔵した。

【０３９０】

腹膜細胞から骨芽細胞への感染の移動：ＭＧ６３骨芽細胞株をＡＴＣＣ（ＣＲＬ－１４２７）から得て、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び１０％胎児ウシ血清を補ったＲＰＭＩ１６４０組織培養培地（ＲＰＭＩ－１０）で維持した。骨芽細胞を２４ウェル組織培養プレートにプレーティングし、培養して、コンフルエントな層を得た。実験の日に、骨芽細胞をＲＰＭＩ（補充物なし）で１回洗浄した。ＭＲＳＡ又は感染腹膜細胞を完全ＲＰＭＩ－１０で希釈し、感染の直前にバンコマイシンを５μｇ／ｍＬで加えた。腹膜細胞を骨芽細胞に１×１０^{6}腹膜細胞／ｍＬで加えた。細胞の試料を０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－ｘで溶解して、感染時の細胞内生細菌の実際の濃度を決定した。全ての感染についての実際の力価を、５％ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天上に細菌の系列希釈をプレーティングすることにより決定した。

【０３９１】

ＭＧ６３骨芽細胞を、４ウェルガラスチャンバスライドにプレーティングし、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び１０％胎児ウシ血清を補ったＲＰＭＩ１６４０組織培養培地（ＲＰＭＩ－１０）で、コンフルエントな層を形成するまで培養した。感染の日に、ウェルを血清フリー培地で洗浄し、感染腹膜細胞の懸濁物又は５μｇ／ｍＬのバンコマイシンを補った完全ＲＰＭＩ－１０で希釈したＭＲＳＡのＵＳＡ３００株に感染させた。感染の１日後に、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、２％パラホルムアルデヒドを用いてＰＢＳ中で室温にて３０分間固定した。ウェルを３回ＰＢＳで洗浄し、０．１％サポニンを含むＰＢＳで３０分間、室温にて透過にした。

【０３９２】

免疫蛍光：２０μｇ／ｍＬのウサギ抗Ｓｔａｐｈ　２０９２０（ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）の後に抗ウサギローダミン（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅ

ａｒｃｈ、７１１－０２６－１５２）で染色することにより、ＭＲＳＡを同定した。コレラ毒素ベータサブユニット－ビオチン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）の後にストレプトアビジンＣｙ５（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ）で、腹膜細胞の細胞膜を染色した。腹膜細胞とのコレラ毒素の結合は、抗ＣＤ１１ｂ Ａｌｅｘａ４８８クローンＭ１／７０（ＢＤ ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で同時染色することにより確認した。ＤＡＰＩ含有Ｐｒｏｌｏｎｇ Ｇｏｌｄ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ ＣＡ）を用いてスライドをマウントした。Ｌｅｉｃａ ＳＰＥ共焦点顕微鏡を用いてスライドを観察した。画像を一連のＺスタックとして収集し、コンパイルして、示すような最大投影画像を作製した。

【０３９３】

哺乳動物細胞内部での黄色ブドウ球菌の生存は、抗生物質療法の存在下での持続的感染を可能にする、生存可能な適所を提供する。黄色ブドウ球菌は、好中球、マクロファージ、骨芽細胞及び上皮細胞を含むいくつかの哺乳動物細胞型の内部に感染して生存できる（Garzoni, C.及びW. L. Kelley (2009) Trends Microbiol 17(2): 59-65）。細胞内ＭＲＳＡが抗生物質から保護されるかを直接試験するために、いくつかの臨床的に承認された抗生物質を、標準細菌成長培地で培養した細胞外ＭＲＳＡを死滅させる能力について、マウスのマクロファージの内部に隔離された細胞内ＭＲＳＡを死滅させる能力とともに比較した（表１）。マウスの腹腔マクロファージをこの分析のために選択した。なぜなら、これらの細胞は、黄色ブドウ球菌に対する自然免疫応答の天然成分である遺伝子的に正常な初代細胞型であるからである。分析により、これらの細胞は、インビトロで容易に感染して培養されることが確認された。ＭＲＳＡは、マクロファージへの感染の６日後まで細胞内で生存できる（KuBICa, M., K. Guzikら(2008) PLoS One 3(1): e1409）。抗生物質の細胞内効果を試験するために、マクロファージにＭＲＳＡを感染させ、抗生物質の細胞への取り込みが乏しいためにファゴリソソーム内部で不活性であることが知られている（Vaudaux, P.及びF. A. Waldvogel (1979) Antimicrob Agents Chemother 16(6): 743-749）抗生物質であるゲンタマイシンの存在下で培養した。試験抗生物質を、臨床的に達成可能な血清レベル（血清Ｃｍａｘとして表１に示す）を含むように選択した範囲の用量で、（ゲンタマイシンとともに）培養培地に感染の１日後に加えた。この分析により、細胞外ＭＲＳＡは低用量のバンコマイシン、ダプトマイシン、リネゾリド又はリファンピシンによる成長阻害に対して液体培養において感受性が高いが、４つ全ての抗生物質は、マクロファージの内部に隔離された細胞内ＭＲＳＡの同じ株を死滅させることができなかったことが明らかになった。著しいことに、結核のような細胞内感染を治療するための最良の抗生物質の１つであることが報告されているリファンピシンでさえ、実験の期間及び用量範囲での細胞内ＭＲＳＡを最小限で死滅させた。

表1 いくつかの抗生物質の最小阻止濃度(MIC)

抗生物質(Abx)	細胞外 MRSA MIC (μg/mL)	細胞内 MRSA MIC (μg/mL)	血清Cmax (μg/mL)
バンコマイシン	1	>100	10-40
ダプトマイシン	4	>100	80
リネゾリド	0.3	>20	10
リファンピシン	0.004	>20	20

【０３９４】
上記のデータにより、細胞内細菌が、それらが細胞内部に隔離されている期間中は抗生物質から保護されることが確認された。しかし、ＭＲＳＡは、細胞から細胞への直接移動により隣接細胞に感染できず、感染細胞の大部分は最終的に溶解して細胞内細菌を放出するため真の細胞内病原体とは考えられていない。よって、細菌が隣接細胞により直ちに取り込まれたとしても、一旦放出されると細胞内プールが細胞外抗生物質に少なくとも一過的に必ず曝露される可能性が残っていた。マクロファージによる遊離ＭＲＳＡの取り込みは１５から９０分の間を要し（データは示さず）、このことは、細菌が抗生物質への短期間の曝露に抵抗できるならば、死亡する細胞から新しい宿主へと移動することにより細胞内適所において保護されたままになり得ることを示唆する。抗生物質への短期間の曝露がＭＲＳＡを死滅させるために十分であるかを決定するために、ＭＲＳＡ感染症の現在の標準治療処置であるバンコマイシン、及びリファンピンを試験した。ＭＲＳＡを、活発に成長している培養物から取り、１×１０^{6}細菌／ｍＬまで通常成長培地で希釈した。予期される最小阻止濃度（ＭＩＣ）の２倍と１０倍の間の２種の用量で抗生物質を加えた。３０分から５時間の間の様々な時間にて試料を取り出し、抗生物質を遠心分離及び希釈により除去した。培養物中の生存細菌の総数を、寒天プレート上にプレーティングすることにより決定した。

【０３９５】
図１は、活発に分裂するＭＲＳＡに対するバンコマイシン（ｖａｎｃｏ）及びリファンピシン（Ｒｉｆａ）についての死滅の時間の比較を示す。抗生物質の存在下でＴＳＢ培地中でＭＲＳＡを５時間培養した。記載する時間にて、培養物の試料を採取し、抗生物質を遠心分離により除去した。生存細菌の総数を、各時点にてプレーティングにより決定した。バンコマイシンは、２μｇ／ｍＬ（白抜きの四角）及び２０μｇ／ｍＬ（塗りつぶした四角）で試験した。リファンピンは、０．０２μｇ／ｍＬ（白抜きの三角）及び０．２μｇ／ｍＬ（塗りつぶした三角）で試験した。これらのデータ（図１）は、両方の抗生物質は細菌成長を効果的に阻害でき、５時間までに生存細菌の１００倍の喪失が観察されたが、細菌は、５時間の観察期間中に徐々に死滅され、９０％の細菌が、抗生物質処理の最初の２時間の間に生存したままであり、宿主細胞による可能性のある取り込みのために十分な時間を与えたことを明らかにした。

【０３９６】
ＭＲＳＡの細胞内貯蔵を、バンコマイシンの存在下で、許容性の細胞内適所への感染の移動についてアッセイした。黄色ブドウ球菌は、骨芽細胞の内部で生存でき、黄色ブドウ球菌の細胞内貯蔵は、黄色ブドウ球菌への慢性感染が抗生物質治療に対して頑強に抵抗することが知られている状態である骨髄炎の患者において観察されている（Thwaites及びGant、(2011) Nature Reviews Microbiology 9:215-222; Ellingtonら、 (2006) J. Orthopedic Research 24(1): 87-93; Bosseら、 (2005) J. Bone and Joint Surgery、 87(6): 1343-1347）。骨芽細胞株ＭＧ６３を用いるインビトロアッセイを開発した。なぜなら、この細胞株は、細胞内黄色ブドウ球菌を担持できることが報告されたからである（Garzoni及びKelly、(2008) Trends in Microbiology）。このアッセイにより、ＭＲＳＡがＭＧ６３細胞に感染でき、インビトロにおいて６日間まで感染ＭＧ６３細胞から生存細胞内細菌を回収できることが確認された。細胞内黄色ブドウ球菌のプールを作製するために、ＭＲＳＡの腹腔注射により感染させたマウスから腹膜細胞を採集した（図２）。

【０３９７】
図２は、バンコマイシンの存在下での感染腹膜細胞から骨芽細胞への感染の移動を示す。細胞内黄色ブドウ球菌のプールを作製するために、Ａ／ＪマウスをＭＲＳＡに感染させ、感染腹膜細胞を感染の１日後に採取した。同様に作製した細胞は、インビボ感染モデルにおいて感染を移動できる生存細胞内細菌を担持することが報告されている（GreshamらJ Immunol 2000; 164:3713-3722）。感染腹膜細胞は、主に好中球及びマクロファージの混合物からなり、細胞のおよそ１０％は、細胞内細菌を担持した。細胞をリゾスタフィンで処理して細胞外細菌を除去し、５μｇ／ｍＬのバンコマイシンを補った培養培地に懸濁し

た。感染に用いた腹膜細胞の試料を溶解して、感染開始時の生存細胞内ＭＲＳＡの厳密な用量を決定し、様々な用量の遊離細胞外ＭＲＳＡも比較のためにバンコマイシンを含む培地で希釈した。腹膜細胞（細胞内ＭＲＳＡ）又は遊離の細菌（細胞外ＭＲＳＡ）を、次いで、ＭＧ６３骨芽細胞の単層に加え、４時間（白抜きのバー）又は１日（塗りつぶしたバー）培養した。各ウェル中の生存細胞内細菌の総数を、細胞溶解物を寒天プレート上にプレーティングすることにより決定した。細胞内ＭＲＳＡは、細胞外ＭＲＳＡコントロールと比較して、バンコマイシンから保護された。３×１０^{4}の細胞内細菌に感染させたウェルは、８，７５０細胞内細菌（感染用量の約三分の一）を感染の１日後に生じたが、同様の用量の遊離ＭＲＳＡでの感染が、感染の１日後に３７５細胞内細菌だけを生じたため、細胞外細菌は効率的に死滅した。

【０３９８】

免疫蛍光顕微鏡観察も、腹膜細胞からＭＧ６３骨芽細胞への感染の移動を証明した。腹膜細胞をマウスからＭＲＳＡへの感染の１日後に回収し、リゾスタフィンで処理して、何れの夾雑細胞外細菌も死滅させた（細胞内感染）。遊離のＭＲＳＡを活発に成長している培養物から取り、ＰＢＳで洗浄した（細胞外感染）。細胞内及び細胞外感染試料中の生存細菌の総数を、寒天プレート上にプレーティングすることにより確認し、５μｇ／ｍＬのバンコマイシンを補った培地に両方の試料を懸濁した直後に、チャンバスライドで培養したＭＧ６３骨芽細胞のコンフルエントな層に加えた。感染の１日後に、ＭＧ６３細胞を洗浄して細胞外細菌を除去し、透過にし、抗黄色ブドウ球菌抗体で染色して、細胞内ＭＲＳＡ及び腹膜細胞膜に優先的に結合するコレラ毒素を同定した。全ての細胞核をＤＡＰＩで同時染色して、ＭＧ６３単層がインタクトであることを確認した。スライドは、共焦点顕微鏡観察により調べた。

【０３９９】

腹膜細胞に感染したウェルは、ＭＧ６３細胞のコンフルエントな単層を含んでおり、腹腔マクロファージは、ＭＧ６３層の頂部で明確に目視可能であった。マクロファージの多くは明らかにＭＲＳＡに感染しており、このことは、単一着色画像における赤い細菌のクラスタ又は重畳画像における白色の粒子として目視可能であった。感染マクロファージに加えて、ＭＧ６３細胞とのみ結合する細菌の明確な例が観察された。これらの感染ＭＧ６３細胞も、遊離のＭＲＳＡに感染したウェルにおいて目視可能であった。遊離のＭＲＳＡへの感染は、ＭＧ６３細胞における感染と同様のレベルを達成するために、かなりより高い接種量が必要であった。

【０４００】

上記の結果は、遊離のＭＲＳＡ及び細胞内ＭＲＳＡがともにバンコマイシンの存在下で生存でき、ＭＧ６３細胞に感染できることを確立した。細胞内感染からの細菌は、これらの条件下で遊離の細菌よりも著しく良好にバンコマイシン治療を生存できた。３×１０^{4}ＣＦＵの細胞内細菌への感染は、感染の１日後に８．７×１０^{3}ＣＦＵの細胞内細菌を生じた。同様の用量の遊離の細菌への感染は、感染の１日後に３７５細胞内細菌だけを生じ、このことは、細胞内細菌が、遊離の細菌よりも２０倍までより良好に生存できることを示した。全ての感染用量では、ウェルを感染の４時間後に採集した場合に対して１日後に採集した場合に、より多くの細胞内細菌（１．５から６倍の間）が回収された。バンコマイシンは遊離のＭＲＳＡに加えた場合に成長を完全に阻害するため（図１）、これらのデータは、培養培地中でのバンコマイシンへの一定の曝露に関わらず、ＭＲＳＡがある時点で複製されることを示唆した。ＭＲＳＡはマウスのマクロファージの内部で著しく複製しないが（我々の未発表の観察結果）、黄色ブドウ球菌がファゴリソソームを免れることができ、非食作用性細胞型の細胞質内で複製できることのかなりの証拠がある（Jarry, T. M., G. Memmiら(2008) Cell Microbiol 10(9): 1801-1814）。まとめて、上記の観察結果は、バンコマイシンへの一定の曝露の下でさえ、遊離のＭＲＳＡは細胞に感染でき、細胞内ＭＲＳＡはある細胞から別の細胞へ移動できることを示唆する。これらの観察結果は、一定の抗生物質療法の存在下で生じ得る感染の維持及び広がりさえの可能性のある機序を明らかにする。

【０４０１】
実施例１９　インビボ感染モデル。
　腹膜炎モデル。７週齢の雌性Ａ／Ｊマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を、５×１０^{7}ＣＦＵのＵＳＡ３００での腹腔注射により感染させた。マウスを感染の２日後に屠殺し、腹膜を５ｍＬの冷リン酸緩衝生理食塩水溶液（ＰＢＳ）でさっと流した。腎臓を５ｍＬのＰＢＳ中で、静脈内感染モデルについて以下に記載するようにしてホモジナイズした。腹腔洗浄液を５分間、１，０００ｒｐｍ、４℃にて卓上遠心分離機で遠心分離した。上清を細胞外細菌として回収し、腹膜細胞を含む細胞ペレットを細胞内画分として回収した。細胞を５０μｇ／ｍＬのリゾスタフィンで２０分間、３７℃にて処理して、夾雑細胞外細菌を死滅させた。腹膜細胞を３回、氷冷ＰＢＳで洗浄して、分析前にリゾスタフィンを除去した。細胞内ＣＦＵを計数するために、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘを含むＨＢ（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ及び０．１％ウシ血清アルブミンを補ったＨａｎｋｓ平衡塩類溶液）中で腹膜細胞を溶解し、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むＰＢＳ中で溶解物の系列希釈を作製した。
【０４０２】
　静脈内感染モデル：７週齢の雌性マウスを全てのインビボ実験のために用い、感染を、尾静脈への静脈内注射により行った。Ａ／Ｊマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂ）を２×１０^{6}ＣＦＵの用量で感染させた。Ｂａｌｂ／ｃマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ、ＣＡ）を２×１０^{7}ＣＦＵの用量で感染させた。競合ヒトＩｇＧの役割を調べる研究のために（ＳＣＩＤ　ＩＶＩＧモデル）、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｈｏｌｌｉｓｔｅｒ、ＣＡ）を、＞１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定血清レベルを達成するように最適化された投与レジメンを用いて、ガンマＧａｒｄ　Ｓ／Ｄ　ＩＧＩＶ免疫グロブリン（ＡＳＤ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、Ｂｒｏｏｋｓ　ＫＹ）で再構成した。ＩＧＩＶをマウスあたり３０ｍｇの初期静脈内用量で投与した後に、６時間後に腹腔内注射により１５ｍｇ／マウスの第２の用量を投与し、その後、３日連続で腹腔内注射によりマウスあたり１５ｍｇの１日用量を投与した。ＩＧＩＶの最初の投与の４時間後に、リン酸緩衝生理食塩水で希釈した２×１０^{7}ＣＦＵのＭＲＳＡの静脈内注射によりマウスを感染させた。バンコマイシンを受けるマウスを、研究の期間にわたって１日２回、感染の６から２４時間の間に開始する１００ｍｇ／ｋｇのバンコマイシンの腹腔内注射で処置した。実験的治療剤（ＡＡＣ、抗ＭＲＳＡ抗体又は遊離のジメチル－ｐｉｐＢＯＲ抗生物質）をリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、単一静脈内注射で感染の３０分から２４時間後に投与した。全てのマウスを感染後４日目に屠殺し、腎臓を５ｍＬのリン酸緩衝生理食塩水中に採集した。ＧｅｎｔｌｅＭＡＣＳ　Ｄｉｓｓｏｃｉａｔｏｒ（商標）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）を用いて組織試料をホモジナイズした。５％ヒツジ脱線維素血液を含むトリプシン大豆寒天にＰＢＳ　０．０５％Ｔｗｅｅｎ中の組織ホモジネートの系列希釈をプレーティングすることにより、マウスあたり回収された細菌の総数（２つの腎臓）を決定した。
【０４０３】
実施例２０　カテプシン／カスパーゼ放出アッセイ
　カテプシンＢでの処置の後にＡＡＣから放出される活性抗生物質の量を定量するために、カテプシンバッファー（２０ｍＭ酢酸ナトリウム、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、５ｍＭ　Ｌ－システイン）でＡＡＣを２００μｇ／ｍＬに希釈した。このアッセイの目的のために出典明示により援用されるＤｕｂｏｗｃｈｉｋら（２００２）Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．１３：８５５－８６９の８６３頁を参照されたい。カテプシンＢ（ウシ脾臓から、ＳＩＧＭＡ　Ｃ７８００）を１０μｇ／ｍＬで加え、試料を１時間、３７℃にてインキュベートした。コントロールとして、ＡＡＣをバッファー単独中でインキュベートした。１０容積の細菌成長培地であるトリプシン大豆ブロスｐＨ７．４（ＴＳＢ）を加えることにより、反応を停止した。活性抗生物質の全放出量を見積もるために、反応混合物の系列希釈を９６ウェルプレートにおいてＴＳＢ中で１点につき４つの検体で作製し、黄色ブドウ球菌のＵＳ

Ａ３００株を各ウェルに２×１０^{3}ＣＦＵ／ｍＬの最終密度で加えた。培養物を終夜、３℃にて振盪しながらインキュベートし、プレートリーダーを用いて６３０ｎＭにて吸光度を読み取ることにより、細菌成長を測定した。

【０４０４】

実施例２１　抗ＷＴＡ抗体の生成

抗体作製、スクリーニング及び選択

略語：ＭＲＳＡ（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）、ＭＳＳＡ（メチシリン感受性黄色ブドウ球菌）、ＶＩＳＡ（バンコマイシン中間体耐性黄色ブドウ球菌）、ＬＴＡ（リポタイコ酸）、ＴＳＢ（トリプシン大豆ブロス）、ＣＷＰ（細胞壁調製物）。

【０４０５】

ＵＳ８，２８３，２９４：「Ｍｅｔｈｏｄ ｆｏｒ ｃｌｏｎｉｎｇ ｃｏｇｎａｔｅ ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」；Ｍｅｉｊｅｒ ＰＪらＪｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ３５８：７６４－７７２（２００６）；及びＬａｎｔｔｏ ＪらＪ Ｖｉｒｏｌ．８５（４）：１８２０－３３（２０１１年２月）に記載されるように抗体の重鎖及び軽鎖の同族のペアリングを保存するＳｙｍｐｌｅｘ（商標）技術（Ｓｙｍｐｈｏｇｅｎ、Ｌｙｎｇｂｙ、Ｄｅｎｍａｒｋ）を用いて、黄色ブドウ球菌感染後の患者からの末梢Ｂ細胞からヒトＩｇＧ抗体をクローニングした。血漿及びメモリー細胞を、組換え完全長ＩｇＧレパートリーのための遺伝子的供給源として用いた。個別の抗体クローンは、Ｍｅｉｊｅｒ ＰＪらＭｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ５２５：２６１－２７７、ｘｉｖ．（２００９）に記載されるようにして、哺乳動物のトランスフェクションにより発現させた。完全長ＩｇＧ１抗体を含む上清を７日後に採集し、一次スクリーニングにおいて間接的ＥＬＩＳＡにより抗原結合についてスクリーニングするために用いた。ＵＳＡ３００又はＷｏｏｄ４６株の黄色ブドウ球菌株からの細胞壁調製物とのポジティブなＥＬＩＳＡ結合を示すｍＡｂのライブラリーを作製した。抗体を、その後、２００ｍｌの一過性トランスフェクションで生成し、プロテインＡクロマトグラフィー（ＭａｂＳｅｌｅｃｔ ＳｕＲｅ、ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）を用いてさらなる試験のために精製した。より大規模の抗体生成のために、抗体をＣＨＯ細胞で生成した。ＶＬ及びＶＨをコードするベクターをＣＨＯ細胞にトランスフェクトし、ＩｇＧを細胞培養培地からプロテインＡアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

表7:Abを単離するために用いた抗原のリスト

Ag	説明	販売者/供給源	コーティング
WTA	Staph Aからの細胞壁タイコ酸(WTA)。Cat.No.R84500(2mg/バイアル)、ロットno.5E14909。	Meridian Life Sciences	2μg/ml
PGN	黄色ブドウ球菌からのペプチドグリカン;Cat no.77140、ロットno.1396845	Sigma	2μg/ml
CW #1	CW USA300、RPMI、鉄欠乏。定常状態	Genentech, 100x	
CW #3	CW USA300、TSB。定常状態	Genentech, 500X	
CW #4	CW Wood46、TSB。定常状態	Genentech, 500X	

【０４０６】

ＣＷ＃１及びＣＷ＃３は、ＥＬＩＳＡコーティングを作製する際に常に一緒に混合した。

【０４０７】

図６は、ＥＬＩＳＡによる抗体の一次スクリーニングについてまとめる。全て（４５６９以外）は、ＵＳＡ３００　細胞壁プレップ混合物（９６：４の割合での鉄欠乏：ＴＳＢ）を用いてスクリーニングしたときに単離された。全てのＧｌｃＮＡｃベータ（６２５９以外）、ＳＤＲ及びＰＧＮ（４４７９）ｍＡｂも、一次スクリーニングにおいてＰＧＮ及びＷＴＡについてポジティブであった。全てのＧｌｃＮＡｃアルファは、ＵＳＡ３００

ＣＷミックスを用いる結合についてスクリーニングすることによってのみ見出された。４５６９（ＬＴＡ特異的）は、Ｗｏｏｄ４６　ＣＷＰに対してスクリーニングすることにより見出された。

【０４０８】

エクスビボフローサイトメトリーを用いるライブラリーからの抗ＷＴＡ　ｍＡｂの選択

このライブラリー内の各ｍＡｂを３つの選択基準について検索した：（１）高い抗生物質送達に好ましい可能性がある、対応する同族抗原の高い発現を示す、ＭＲＳＡ表面とのｍＡｂ結合の相対的強度、（２）感染中のインビボでのＭＲＳＡ表面での同族抗原の安定発現を示す、多様な感染組織から単離されたＭＲＳＡとのｍＡｂ結合の一貫性、及び（３）同族表面抗原の発現の保存を示す、臨床的黄色ブドウ球菌株のパネルとのｍＡｂ結合能力。このために、フローサイトメトリーを用いて、様々な感染組織から及び異なる黄色ブドウ球菌株からの黄色ブドウ球菌との反応性について、ライブラリー中のｍＡｂのこれらの予め選択された培養上清の全てを試験した。

【０４０９】

ライブラリー中の全てのｍＡｂを、ＭＲＳＡ　ＵＳＡ３００に感染させたマウスからの感染腎臓、脾臓、肝臓及び肺から、並びにウサギ心内膜炎モデルにおいてＵＳＡ３００ＣＯＬに感染させたウサギからの心臓又は腎臓内のＭＲＳＡと結合する能力について分析した。様々な感染組織からの黄色ブドウ球菌を認識する抗体の能力は、広い多様性の異なる黄色ブドウ球菌臨床感染において治療抗体が活性である可能性を上昇させる。細菌を、器官の採集の際に直ちに、すなわち継代培養なしで分析して、インビトロ培養条件により引き起こされる表現型の変化を妨げた。我々は、いくつかの黄色ブドウ球菌表面抗原が、インビトロ培養中に発現されながら、感染組織において発現を喪失したことを以前に観察していた。このような抗原に対する抗体は、感染を治療するために有用である可能性が低い。このｍＡｂライブラリーを様々な感染組織に対して分析する間に、著しい数の抗体についてこの観察結果が確認され、これらの抗体は、培養からの黄色ブドウ球菌細菌との著しい結合を示したが、試験した感染組織の全てからの細菌との結合がなかった。いくつかの抗体は、全てではないがいくつかの試験した感染組織からの細菌と結合した。よって、本発明では、我々は、試験した全ての感染条件からの細菌を認識できる抗体を選択した。評価したパラメータは、（１）抗原存在量の尺度としての相対的蛍光強度、（２）抗原発現の安定性の尺度としてのポジティブに染色された器官の数、及び（３）同族表面抗原の発現の保存を示す、臨床黄色ブドウ球菌株のパネルとのｍＡｂ結合能力であった。試験抗体の蛍光強度は、無関係の抗原、例えばＩｇＧ１　ｍＡｂ抗ヘルペスウイルスｇＤ：５２３７（以下で参照する）に対するアイソタイプコントロール抗体と比べて決定した。ＷＴＡ－ベータに対するｍＡｂは、最高の抗原存在量を示しただけでなく、試験し、上に明記した全ての感染組織からのＭＲＳＡとの非常に一貫した結合も示した。

【０４１０】

さらに、本発明者らは、ＴＳＢ中でインビトロで培養した以下の黄色ブドウ球菌株：ＵＳＡ３００（ＭＲＳＡ）、ＵＳＡ４００（ＭＲＳＡ）、ＣＯＬ（ＭＲＳＡ）、ＭＲＳＡ２５２（ＭＲＳＡ）、Ｗｏｏｄ４６（ＭＳＳＡ）、Ｒｏｓｅｎｂａｃｈ（ＭＳＳＡ）、Ｎｅｗｍａｎ（ＭＳＳＡ）及びＭｕ５０（ＶＩＳＡ）と結合するこれらのｍＡｂの能力を試験した。抗ＷＴＡアルファｍＡｂはそうではないが、抗ＷＴＡベータｍＡｂは、これらの株の全てと反応性であることが見出された。異なる株との結合の分析は、ＷＴＡベータがＷＴＡアルファよりも保存され、よって、ＡＡＣのためにより適切であることを示した。

【０４１１】

実施例２２　黄色ブドウ球菌上の細胞壁タイコ酸に対する特異性を有する抗体の特徴づけｉ）ＡｂのＷＴＡ特異性の確認

４０ｍｇのペレットにした黄色ブドウ球菌株を、３０％ラフィノース、１００μｇ／ｍｌのリゾスタフィン（Ｃｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｃａｎｔｏｎ、ＭＡ）及びＥＤＴＡフリープロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ、Ｐｌｅａｓａｎｔｏｎ、ＣＡ）を補った１ｍＬの１０ｍＭトリス－ＨＣｌ（ｐＨ７．４）と３０分間、３７℃にてインキュベー

トすることにより、黄色ブドウ球菌野生型（ＷＴ）株及びＷＴＡを欠く黄色ブドウ球菌ミュータント株（ΔＴａｇＯ；ＷＴＡ－ヌル株）からの細胞壁調製物（ＣＷＰ）を作製した。溶解物を１１，６００×ｇで５分間遠心分離し、細胞壁成分を含む上清を回収した。イムノブロット分析のために、タンパク質を４－１２％トリス－グリシンゲルで分離し、ニトロセルロース膜（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）に移した後に、ＷＴＡに対する記載する試験抗体又はＰＧＮ及びＬＴＡに対するコントロール抗体を用いてブロッティングした。

【０４１２】

イムノブロッティングは、ＷＴＡに対する抗体が、ＷＴ黄色ブドウ球菌からのＷＴ細胞壁調製物と結合したが、ＷＴＡを欠くΔＴａｇＯ株からの細胞壁調製物と結合しなかったことを示す。ペプチドグリカン（抗ＰＧＮ）及びリポタイコ酸（抗ＬＴＡ）に対するコントロール抗体は、両方の細胞壁調製物とよく結合する。これらのデータは、ＷＴＡに対する試験抗体の特異性を示す。

【０４１３】

ｉｉ）ＭＲＳＡ表面とのｍＡｂ結合の程度を決定するためのフローサイトメトリー

感染組織からの全細菌上の表面抗原発現を、以下のプロトコールを用いるフローサイトメトリーにより分析した。感染マウス組織からの細菌の抗体染色のために、６－８週齢の雌性Ｃ５７Ｂｌ／６マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ、Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ、ＭＡ）に、ＰＢＳ中の10^{8}ＣＦＵの対数期増殖ＵＳＡ３００を静脈内注射した。マウス器官を感染の２日後に採集した。Ｔａｔｔｅｖｉｎ　Ｐ．らＡｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ａｇｅｎｔｓ　ａｎｄ　ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ　５４：６１０－６１３（２０１０）に以前に記載されたようにして、ウサギ感染性心内膜炎（ＩＥ）を確立した。ウサギに、５×10^{7}ＣＦＵの定常期増殖ＭＲＳＡ株ＣＯＬを静脈内注射し、心臓疣贅を１８時間後に採集した。３０ｍｇ／ｋｇのバンコマイシンでの処置は、７×10^{7}ＣＦＵの定常期での感染の１８ｈ後に、ｂ．ｉ．ｄ．、静脈内で与えた。

【０４１４】

マウス又はウサギ細胞を溶解するために、ｇｅｎｔｌｅＭＡＣＳ細胞解離器（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を用いてＭチューブ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）中で組織をホモジナイズした後に、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ－Ｘ１００（Ｔｈｅｒｍｏ）、１０μｇ／ｍＬのＤＮアーゼＩ（Ｒｏｃｈｅ）及びＣｏｍｐｌｅｔｅ　Ｍｉｎｉプロテアーゼ阻害剤カクテル（Ｒｏｃｈｅ）を含むＰＢＳ中で１０分間、ＲＴにてインキュベートした。懸濁物を４０ミクロンフィルタ（ＢＤ）に通し、０．１％ＩｇＧフリーＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ）及び１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．４を補った、フェノールレッドを含まないＨＢＳＳ（ＨＢバッファー）で洗浄した。細菌懸濁物を、次いで、ＨＢバッファー中で３００μｇ／ｍＬのウサギＩｇＧ（Ｓｉｇｍａ）と１時間、室温（ＲＴ）にてインキュベートして、非特異的ＩｇＧ結合をブロックした。ｒＦ１又はアイソタイプコントロールＩｇＧ１　ｍＡｂ抗ヘルペスウイルスｇＤ：５２３７（Nakamura GRら，J Virol 67: 6179-6191 (1993)）を含む２μｇ／ｍＬの一次抗体で、次いで、蛍光性抗ヒトＩｇＧ二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｗｅｓｔ　Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ）で細菌を染色した。マウス又はウサギの器官デブリを細菌と区別できるようにするために、２０μｇ／ｍＬマウスｍＡｂ　７０２抗黄色ブドウ球菌ペプチドグリカン（Ａｂｃａｍ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ）及び蛍光色素標識された抗マウスＩｇＧ二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ）を用いて二重染色を行った。細菌を洗浄し、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ（ＢＤ）により分析した。フローサイトメトリー分析中に、細菌は、二重蛍光プロットからのｍＡｂ　７０２でのポジティブ染色についてゲートで制御した。

【０４１５】

ｉｉｉ）黄色ブドウ球菌との結合親和性及びＭＲＳＡ上の抗原密度の測定

表８は、Ｎｅｗｍａｎ－ΔＳＰＡ株と結合するＭＲＳＡ抗体の平衡結合分析、及び細菌上の抗原密度を示す。

表8

MRSA抗体	特異性	aveK$_D$,nM（n=2）	抗原密度、aveSites/細菌
4497	b-WTA	2.5	50,000
4462	b-WTA	3.1	43,000
6263	b-WTA	1.4	22,000
6297	b-WTA	1.1	21,000
7578	a-WTA	0.4	16,000
rF1	SDR-glyco	0.3	1600

【０４１６】
Ｋ$_D$及び抗原密度は、以下のアッセイ条件下で放射性リガンド細胞結合アッセイを用いることにより導いた：ＤＭＥＭ＋２．５％マウス血清結合バッファー、２ｈｒ、室温（ＲＴ）での溶液結合、及び４００，０００細菌／ウェルを用いる。
【０４１７】
Ａｂ６２６３は、配列が非常に類似するため、６０７８のようである。ＣＤＲ　Ｈ３中の２番目の残基（Ｇに対してＲ）以外は、他のＬ及びＨ鎖ＣＤＲ配列は全て同一である。
【０４１８】
実施例２３　ＷＴＡ抗体ミュータントの操作
まとめると、抗ＷＴＡベータＡｂのそれぞれのＶＨ領域をクローニングし、ヒトＨ鎖ガンマ１定常領域と結合させ、ＶＬをカッパ定常領域と結合させて、ＩｇＧ１としてＡｂを発現させた。いくつかの場合では、以下に記載するようにある特定の位置で野生型配列を改変して、抗体安定性を改善した。システイン操作Ａｂ（チオＭａｂ）を、次いで、作製した。
【０４１９】
ｉ．可変領域と定常領域との結合
上記のヒト抗体ライブラリーから同定されたＷＴＡベータＡｂのＶＨ領域をヒトγ１定常領域と結合させて、完全長ＩｇＧ１　Ａｂを作製した。Ｌ鎖は、カッパＬ鎖であった。
【０４２０】
ｉｉ．安定性変異体の作製
図１４（特に図１５Ａ、１５Ｂ、１６Ａ、１６Ｂを参照されたい）中のＷＴＡ　Ａｂを操作して、ある特定の特性（例えば脱アミド、アスパラギン酸異性化、酸化又はＮ－結合型糖鎖付加を回避する）を改善し、アミノ酸置き換え後の抗原結合の保持及び化学安定性について試験した。重鎖又は軽鎖をコードするクローンの一本鎖ＤＮＡを、大腸菌ＣＪ２３６細胞で成長したＭ１３ＫＯ７ファージ粒子から、ＱＩＡｐｒｅｐ　Ｓｐｉｎ　Ｍ１３キット（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて精製した。配列：
５’－ＣＣＣＡＧＡＣＴＧＣＡＣＣＡＧＣＴＧＧＡＴＣＴＣＴＧＡＡＴＧＴＡＣＴＣＣＡＧＴＴＧＣ－３’（配列番号１５２）
５’－ＣＣＡＧＡＣＴＧＣＡＣＣＡＧＣＴＧＣＡＣＣＴＣＴＧＡＡＴＧＴＡＣＴＣＣＡＧＴＴＧＣ－３’（配列番号１５３）
５’ＣＣＡＧＧＧＴＴＣＣＣＴＧＧＣＣＣＣＡＷＴＭＧＴＣＡＡＧＴＣＣＡＳＣＷＫＣＡＣＣＴＣＴＴＧＣＡＣＡＧＴＡＡＴＡＧＡＣＡＧＣ－３’（配列番号１５４）、及び
５’－ＣＣＴＧＧＣＣＣＣＡＧＴＣＧＴＣＡＡＧＴＣＣＴＣＣＴＴＣＡＣＣＴＣＴＴＧＣＡＣＡＧＴＡＡＴＡＧＡＣＡＧＣ－３’（配列番号１５５）（ＩＵＰＡＣコード）
を有する５’リン酸化合成オリゴヌクレオチドを用いて、Ｋｕｎｋｅｌ，Ｔ．Ａ．（１９８５）．Ｒａｐｉｄ　ａｎｄ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｍｕｔａｇｅｎｅｓｉｓ　ｗｉｔｈｏｕｔ　ｐｈｅｎｏｔｙｐｉｃ　ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ．Ｐ

ｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ａｃａｄｅｍｙ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ ＵＳＡ ８２（２）：４８８-４９２に記載されるような方法に従う部位特異的突然変異誘発により記載されるようなオリゴヌクレオチド特異的部位突然変異誘発により、抗体をコードするクローンを変異させた。変異ＤＮＡを用いて大腸菌ＸＬ１－Ｂｌｕｅ細胞（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を形質転換し、５０μｇ／ｍｌカルベニシリンを含むルリアブロスプレートにプレーティングした。コロニーを個別に採取し、５０μｇ／ｍｌカルベニシリンを含む液体ルリアブロス培地で成長させた。ミニプレップＤＮＡを配列決定して、変異の存在を確認した。

【０４２１】

Ａｂ６０７８について、ＶＨ中の２番目のアミノ酸ｍｅｔ（ｍｅｔ－２）は、酸化されやすい。よって、ｍｅｔ－２をＩｌｅ又はＶａｌに変異させて、残基の酸化を回避した。ｍｅｔ－２の改変は結合親和性に影響する可能性があるため、ＥＬＩＳＡによりＳｔａｐｈ ＣＷＰとの結合についてミュータントを試験した。

【０４２２】

ＣＤＲ Ｈ３「ＤＧ」又は「ＤＤ」モチーフがイソアスパラギン酸に変換されやすいことが見出された。Ａｂ４４９７は、ＣＤＲ Ｈ３の９６位及び９７位にＤＧを含み（図１８Ｂを参照されたい）、安定性のために改変した。ＣＤＲ Ｈ３は、一般的に、抗原結合のために重要であるため、抗原結合及び化学安定性についていくつかのミュータントを試験した（図１８Ａを参照されたい）。ミュータントＤ９６Ｅ（ｖ８）は、野生型Ａｂ４４９７（図１８Ａ；図１８Ｂ）と同様に抗原との結合を保持し、安定で、イソアスパラギン酸を形成しない。

【０４２３】

Ｓｔａｐｈ ＣＷＰ ＥＬＩＳＡ

６０７８抗体ミュータントの分析のために、１×１０^{9}細菌／ｍｌからなるリゾスタフィン処理ＵＳＡ３００ΔＳＰＡ黄色ブドウ球菌細胞調製物（ＷＴ）を０．０５炭酸ナトリウムｐＨ９．６中で１／１００に希釈し、３８４ウェルＥＬＩＳＡプレート（Ｎｕｎｃ；Ｎｅｐｔｕｎｅ、ＮＪ）を４℃にて終夜のインキュベーション中にコーティングした。プレートをＰＢＳ＋０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し、ＰＢＳ＋０．５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）での２時間のインキュベーション中にブロックした。この及び後続の全てのインキュベーションは、穏やかに撹拌しながら室温で行った。抗体試料を試料／標準物質希釈バッファー（ＰＢＳ、０．５％ＢＳＡ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０、０．２５％ＣＨＡＰＳ、５ｍＭ ＥＤＴＡ、０．３５Ｍ ＮａＣｌ、１５ｐｐｍプロクリン（ｐＨ７．４））で希釈し、洗浄したプレートに加え、１．５－２時間インキュベートした。プレートと結合した抗黄色ブドウ球菌抗体を、アッセイバッファー（ＰＢＳ、０．５％ＢＳＡ、１５ｐｐｍプロクリン、０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０）で４０ｎｇ／ｍＬに希釈したペルオキシダーゼ－コンジュゲートヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）Ｆ（ａｂ’）２断片（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ；Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ、ＰＡ）との１時間のインキュベーション中に検出した。最終洗浄の後に、テトラメチルベンジジン（ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）を加え、５－１０分間発色させ、１Ｍリン酸を用いて反応を停止した。マイクロプレートリーダーを用いて、プレートを６２０ｎｍの参照とともに４５０ｎｍで読み取った。

【０４２４】

ｉｉｉ．Ｃｙｓ操作ミュータント（チオＭａｂ）の作製

以前に教示され、以下に記載するようにして、Ｈ鎖（ＣＨ１において）又はＬ鎖（Ｃκ）に所定の位置にてシステインを導入することにより完全長チオＭａｂを生成して、抗体のリンカー－抗生物質中間体へのコンジュゲーションを可能にした。Ｈ及びＬ鎖を、次いで、別々のプラスミドにクローニングし、Ｈ及びＬをコードするプラスミドを２９３細胞にコトランスフェクトし、該細胞においてＨ及びＫを発現してインタクトなＡｂを組み立てた。Ｈ及びＬ鎖はともに、同じ発現プラスミドにクローニングすることもできる。Ｈ鎖のそれぞれに１つずつ２つの操作されたＣｙｓ、若しくはＬ鎖のそれぞれに１つずつ２つ

の操作されたＣｙｓを有するＩｇＧ１を作製するか、又はｃｙｓミュータント鎖と野生型鎖の所望の組み合わせを発現させることによりそれぞれ操作されたＣｙｓを有する２つのＨ鎖と２つのＬ鎖との組み合わせ（ＨＣＬＣＣｙｓ）を作製した。

【０４２５】

図１５Ａ及び１５Ｂは、６０７８ＷＴ、及びＨＣ　ＣｙｓとＬＣ　Ｃｙｓとの組み合わせを有するミュータントＡｂを示す。６０７８ミュータントは、終夜培養物からのプロテインＡ欠損ＵＳＡ３００　Ｓｔａｐｈ　Ａと結合する能力についても試験した。図１９に示すＦＡＣＳ解析の結果から、ミュータントＡｂは、６０７８ＷＴ（未改変）抗体と同様に、ＵＳＡ３００と結合した。ミュータントにおけるアミノ酸の改変は、Ｓｔａｐｈ　Ａとの結合を損なわなかった。ｇＤは、非特異的ネガティブコントロール抗体である。

【０４２６】

実施例２４　抗ＷＴＡ抗体－抗生物質コンジュゲートの調製

抗細胞壁タイコ酸抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）表３を、表２からのものを含むリンカー－抗生物質中間体に抗ＷＴＡ抗体をコンジュゲートすることにより調製した。コンジュゲーションの前に、国際公開第２００４／０１０９５７号（その教示は、この目的のために出典明示により援用されている）に記載される方法に従う標準的な方法を用いて、抗ＷＴＡ抗体をＴＣＥＰで部分的に還元した。部分的に還元した抗体を、例えばＤｏｒｏｎｉｎａら（２００３）Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２１：７７８－７８４及びＵＳ２００５／０２３８６４９Ａ１に記載される方法に従う標準的な方法を用いて、リンカー－抗生物質中間体にコンジュゲートした。簡単に述べると、部分的に還元した抗体をリンカー－抗生物質中間体と混合して、抗体の還元されたシステイン残基へのリンカー－抗生物質中間体のコンジュゲーションを可能にした。コンジュゲーション反応を終了させ、ＡＡＣを精製した。各ＡＡＣの抗生物質負荷量（抗体あたりの抗生物質部分の平均数）を決定し、これは、単一システインミュータント部位で操作された抗細胞壁タイコ酸抗体について、約１から約２の間であった。

【０４２７】

コンジュゲーションのためのチオＭａｂの還元／酸化：ＣＨＯ細胞で発現させた完全長システイン操作モノクローナル抗体（チオＭａｂ-Junutulaら，2008b Nature Biotech.，26(8):925-932；Dornanら(2009) Blood 114(13):2721-2729；ＵＳ７５２１５４１；ＵＳ７７２３４８５；国際公開第２００９／０５２２４９号、Shenら(2012) Nature Biotech.，30(2):184-191；Junutulaら(2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52）を、約２０－４０倍過剰のＴＣＥＰ（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩又はＤＴＴ（ジチオスレイトール）を用いて、２ｍＭ　ＥＤＴＡを含む５０ｍＭトリスｐＨ７．５中で３時間、３７℃又は終夜、室温にて還元した（Getzら(1999) Anal. Biochem. Vol273:73-80;Soltec Ventures、Beverly、MA）。還元したチオＭａｂを希釈し、１０ｍＭ酢酸ナトリウム、ｐＨ５中でＨｉＴｒａｐ　Ｓカラムに載せ、０．３Ｍ塩化ナトリウムを含むＰＢＳで溶出した。あるいは、１／２０容積の１０％酢酸を加えることにより抗体を酸性にし、１０ｍＭコハク酸塩ｐＨ５で希釈し、カラムに載せ、次いで、１０カラム容積のコハク酸塩バッファーで洗浄した。カラムは、５０ｍＭトリスｐＨ７．５、２ｍＭ　ＥＤＴＡで溶出した。

【０４２８】

溶出した還元チオＭａｂを、１５倍過剰モルのＤＨＡＡ（デヒドロアスコルビン酸）又は２００ｎＭ硫酸銅（$CuSO_4$）水溶液で処理した。鎖間ジスルフィド結合の酸化は、約３時間以上で完了した。周囲空気酸化も効果的であった。再酸化した抗体を２０ｍＭコハク酸ナトリウムｐＨ５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ中で透析し、－２０℃にて凍結貯蔵した。

【０４２９】

リンカー－抗生物質中間体とのチオ－Ｍａｂのコンジュゲーション：脱ブロック化し、再酸化したチオ－抗体（チオＭａｂ）を、６－８倍過剰モルの表２のリンカー－抗生物質中間体（２０ｍＭの濃度にてＤＭＳＯストックから）と５０ｍＭトリス、ｐＨ８中で、反

応混合物のＬＣ－ＭＳ分析により決定して反応が完了するまで（１６－２４時間）反応させた。

【０４３０】

粗抗体－抗生物質コンジュゲート（ＡＡＣ）を次いで、２０ｍＭコハク酸ナトリウム、ｐＨ５で希釈した後にカチオン交換カラムに供した。カラムを少なくとも１０カラム容積の２０ｍＭコハク酸ナトリウム、ｐＨ５で洗浄し、抗体をＰＢＳで溶出した。ゲル濾過カラムを用いて、２０ｍＭ　Ｈｉｓ／酢酸塩、ｐＨ５中にＡＡＣを２４０ｍＭショ糖とともに処方した。ＡＡＣは、タンパク質濃度を決定するためのＵＶ分光法、凝集分析のための分析ＳＥＣ（サイズ排除クロマトグラフィー）及びＬＣ－ＭＳにより、リジンＣエンドペプチダーゼでの処理の前後に特徴を明らかにした。

【０４３１】

サイズ排除クロマトグラフィーは、０．２５ｍＭ塩化カリウム及び１５％ＩＰＡを含む０．２Ｍリン酸カリウムｐＨ６．２中、０．７５ｍｌ／分の流速でＳｈｏｄｅｘ　ＫＷ８０２．５カラムを用いて行った。ＡＡＣの凝集状態は、２８０ｎｍでの溶出ピーク面積吸光度の積分により決定した。

【０４３２】

ＬＣ－ＭＳ分析を、Ａｇｉｌｅｎｔ　ＱＴＯＦ　６５２０　ＥＳＩ装置を用いて行った。例として、この化学を用いて作製したＡＡＣを、トリス、ｐＨ７．５中の１：５００ｗ／ｗエンドプロテイナーゼＬｙｓＣ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で３０分間、３７℃にて処理した。得られた切断断片を、８０℃に加熱した１０００Ａ、８ｕｍ　ＰＬＲＰ－Ｓカラムに載せ、５分間で３０％Ｂから４０％Ｂまでの勾配を用いて溶出した。移動相Ａ：０．０５％ＴＦＡを含むH_2O。移動相Ｂ：０．０４％ＴＦＡを含むアセトニトリル。流速：０．５ｍｌ／分。タンパク質溶出は、２８０ｎｍでのＵＶ吸光度検出により、エレクトロスプレーイオン化及びＭＳ分析の前にモニタリングした。非コンジュゲートＦｃ断片、残存非コンジュゲートＦａｂ及び抗生物質－Ｆａｂのクロマトグラフィー分解が、通常、達成された。得られたｍ／ｚスペクトルを、Ｍａｓｓ　Ｈｕｎｔｅｒ（商標）ソフトウェア（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を用いてデコンボリューションして、抗体断片の質量を算出した。

【０４３３】

実施例２５　切断を担うプロテアーゼとしてのスタホパインＢの同定及び精製

Ｗｏｏｄ４６の３リットルの終夜培養物からの上清を濃縮し、ＴＦＦ（１０ｋＤａ）を用いて５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７にバッファー交換した。試料をＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＦＦに載せ、５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７中の０－３００ｍＭ　ＮａＣｌの勾配を用いて、タンパク質をクロマトグラフィーにより分離した。図２７のチオＦＡＢＳ４４９７－ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－（ｐｉｐＢＯＲ）（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）とインキュベートし、ＬＣ－ＭＳ分析により予期される部位でのリンカーの切断を評価することにより、活性画分を同定した。活性画分をプールし、２Ｍの濃度まで硫酸アンモニウムを補った。タンパク質は、５０ｍＭトリスｐＨ７．５中の２－０Ｍ硫酸アンモニウムの勾配を用いて、フェニルＳｅｐｈａｒｏｓｅ上で疎水性相互作用クロマトグラフィーによりさらに精製した。ここでもまた、ツール化合物を用いて活性画分を同定した。これらの画分をプールし、５０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ５．５中、０－１Ｍ　ＮａＣｌの塩勾配を用いてモノＱでさらに精製した。このクロマトグラフィー工程からの活性画分を以前と同様にして同定し、プールし、ＰＢＳ中のサイズ排除クロマトグラフィーに供した。活性画分を同定し、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより目的の単一タンパク質を含むことを決定した。

【０４３４】

Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ精製からの濃縮した活性画分の特徴を明らかにして、活性を担うプロテアーゼのクラスを同定した。プロテアーゼは、Ｎ－エチルマレイミドにより阻害されることが見出され、このことは、酵素がシステインプロテアーゼである可能性があることを示した。黄色ブドウ球菌の既知の分泌システインプロテアーゼについて再検討した

後に、スタホパインBが、ＲＥＰＬｉスクリーニングにおいて観察された特異性と同様の基質特異性を有することが同定された（Kalinska, M., T. Kantykaら(2012). Biochimie 94(2): 318）。精製スタホパインBを購入し（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）、図２７からのチオＦＡＢ　Ｓ４４９７－ＭＣ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－（ｐｉｐＢＯＲ）（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）とインキュベートした。スタホパインBは、Ｗｏｏｄ４６上清から精製された活性プロテアーゼと同じ部位でリンカーを切断することがわかった。スタホパインB及び培養上清から精製した活性プロテアーゼを、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）４８８　Ｃ$_5$マレイミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｉｎｃ．）とインキュベートして、活性部位システインを標識した。試料をＳＤＳ－ＰＡＧＥに泳動して、プロテアーゼをスタホパインBと同定した。ＳＥＣ精製からの活性画分のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８とともに又はなしで、精製スタホパインBと一緒に泳動した。

【０４３５】

Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ精製についての濃縮活性画分は、プロテオミクス質量分析によっても分析した。１０マイクログラムの画分Ｂ１１、Ｂ１２及びＣ０２、並びに１０マイクログラムの活性画分１、２、３、並びに１０マイクログラムの不活性画分をＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動した。バンドを切り出し、トリプシンによる終夜消化に供した。消化された試料をＬＣ－ＭＳ／ＭＳにより分析し、タンデム質量分析の結果を、Ｍａｓｃｏｔ検索アルゴリズムを用いるデータベース検索に供した。スタホパインBは、活性画分中に存在するシステインプロテアーゼについての最上位のヒットであった。これもまたシステインプロテアーゼである自己溶菌酵素も最上位ヒットとして現れたが、ネガティブコントロールである不活性画分にユニークペプチドが最高の存在量で出現したため、自己溶菌酵素はこの考慮から除外した。Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ精製からの活性画分の質量分析プロテオミクス分析は、スタホパインBの高い存在量を示す。Ｔレストル（Ｔ　ｒｅｓｔｌｅ）データを黄色ブドウ球菌タンパク質についてフィルタにかけ、活性画分１中のペプチドの数によって順位付けした。

【０４３６】

活性プロテアーゼを、Ｗｏｏｄ４６黄色ブドウ球菌培養上清から精製した。細胞を終夜、３７℃にて３リットルのＴＳＢ中で成長させた。１０，０００×ｇで１０分間の遠心分離により細胞を除去した。上清を回収し、２つの０．２２ｕｍフィルタに通した。次に、これを濃縮し、１０ｋＤ膜を用いるＴＦＦを用いて５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７にバッファー交換した。試料を３００ｍｌの容積まで１０倍に濃縮した。試料をＱ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＦＦ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＡＢ）に載せ、５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ７中の０－３００ｍＭ　ＮａＣｌの勾配を用いて、タンパク質をクロマトグラフィーにより分離した。活性画分をプールし、硫酸アンモニウムを２Ｍの濃度まで補った。５０ｍＭトリスｐＨ７．５中の２－０Ｍ硫酸アンモニウムの勾配を用いて、フェニルＳｅｐｈａｒｏｓｅ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　ＡＢ）上で疎水性相互作用クロマトグラフィーによりタンパク質をさらに精製した。活性画分をプールし、５０ｍＭ酢酸ナトリウムｐＨ５．５中、０－１Ｍ　ＮａＣｌの塩勾配を用いてモノＱでさらに精製した。このクロマトグラフィー工程からの活性画分を以前と同様にして同定し、プールし、ＰＢＳ中のサイズ排除クロマトグラフィー（Ｚｅｎｉｘ－１５０、Ｓｅｐａｘ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に供した。

【０４３７】

我々の目的の活性プロテアーゼを含む画分を同定するために、各画分からの１００ｕｌを９６ウェルプレートに移し、ここでこれを２５ｕｇのチオＦＡＢ　４４９７　ｍａｌ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－ＤＮＡ３１（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）とインキュベートした。各クロマトグラフィー工程からの画分を活性について分析し、タンパク質濃度に関わらず１００ｕｌを用いた。試料を終夜３７℃にてインキュベートし、その後、ＬＣ－ＭＳにより分析して、リンカー－抗生物質のプロテアーゼ切断が生じた画分を

同定した。Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＦＦクロマトグラフィーからのプールした活性画分を測定して、全タンパク質濃度１４ｍｇ／ｍｌを有するようにした。２００μｇのプールを２ｍｇ／ｍｌにＰＢＳで希釈して、最終０．１ｍＭの濃度にてＮ－エチルマレイミド（ＮＥＭ、Ｓｉｇｍａ）と又はＮ－エチルマレイミドなしでインキュベートした。試料を室温にて１時間インキュベートした。２５ｕｇのチオＦＡＢ　４４９７　ｍａｌ－ＧＧＧＡＦＡＧＧＧ－ＤＮＡ３１（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）を両方の試料に加え、３７℃にて２時間インキュベートした。２時間にて、試料をＬＣ－ＭＳにより分析して、リンカー－抗生物質のプロテアーゼ切断が生じたかを同定した。ＳＥＣからの約５０ｕｌの活性画分を、タンパク質濃度に関わらず０．１ｍＭ　Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８　C_5マレイミド（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）と標識のためにインキュベートした。５ｕＭのチオＦＡＢコンジュゲートを５０ｎＭプロテアーゼと１００ｕｌの最終容積でインキュベートすることにより、精製プロテアーゼを用いる切断アッセイを行った。アッセイは、ＰＢＳ　ｐＨ７．２、４ｍＭ　Ｌ－Ｃｙｓ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ又は１００ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ５、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、４ｍＭ　Ｌ－Ｃｙｓ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡの何れかにおいて行った。試料を２時間、３７℃にてインキュベートした。２時間にて、１％ＴＦＡを用いて１：１に希釈することにより、切断反応を停止した。試料をその後、ＬＣ－ＭＳに供して、パーセントリンカー切断を決定した。パーセント切断は、切断される種及びインタクトな種のA_{280}クロマトグラムを積分することにより決定した。抗生物質又はリンカーのＣ末端に付加した発色団部分は著しい疎水性を付加したため、インタクトなリンカーを有するチオＦＡＢ及び切断されるリンカーを有するチオＦＡＢは、ベースライン分離される。

【０４３８】

濃縮画分のプロテオミクス分析のために、Ｑ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ（登録商標）（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）精製からの１０マイクログラムの濃縮活性画分を、４－１２％ビス－トリスゲル（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）に載せた。ゲルレーン全体を切り出し、先頭から最後までを１１のバンドに分けた。５０％アセトニトリル／５０ｍＭ重炭酸アンモニウムでゲルバンドを脱染色し、ジチオスレイトール（５０ｍＭ最終濃度）で３０分間、５０℃にて還元し、ヨードアセトアミド（５０ｍＭ最終濃度）で室温にて暗所で３０分間アルキル化した。試料を、次いで、３７℃にて終夜、５０ｍＭ重炭酸アンモニウム中の０．０２μｇ／μｌトリプシン（Ｐｒｏｍｅｇａ）で消化した。消化した試料を１００μｍ内径のキャピラリーカラム（ＮａｎｏＡｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣカラム、１００μｍ×１００ｍｍ、１．７μｍ、ＢＥＨ１３０　Ｃ１８、Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐ）に注入し、ＮａｎｏＡｃｑｕｉｔｙ　ＵＰＬＣシステム（Ｗａｔｅｒｓ　Ｃｏｒｐ）でキャピラリー逆相クロマトグラフィーにより分離した。試料を水中の０．１％トリフルオロ酢酸に載せ、２－９０％バッファーＢの勾配（ここで、バッファーＡは、０．１％ギ酸／２％アセトニトリル／９８％水であり、バッファーＢは、０．１％ギ酸／２％水／９８％アセトニトリルである）で、１．００μｌ／分にて、４５分間の全分析時間で溶出した。ペプチドは、ＬＴＱ－Ｏｒｂｉｔｒａｐ　ＸＬ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）質量分析計に直接溶出され、１．４ｋＶのスプレー電圧でＡＤＶＡＮＣＥソース（Ｍｉｃｈｒｏｍ－Ｂｒｕｋｅｒ）を用いてイオン化した。質量分析データは、ｍ／ｚ４００での６０，０００Ｍ／ΔＭの分解能にてＯｒｂｉｔｒａｐにおけるフルＭＳスキャン（３７５－１６００ｍ／ｚ）と、その後の、リニアイオントラップにおいてＬＣ勾配を通して反復されるサイクルにおいて、フルＭＳスキャンにおいて検出される上位８つの最も多く存在するイオンの衝突誘起解離（ＣＩＤ）とを含む方法を用いて収集した。タンデム質量分析の結果を、黄色ブドウ球菌タンパク質及び一般的な実験室夾雑物を含む、連結した標的－デコイデータベースであるＵｎｉｐｒｏｔ　ｖｅｒ　２０１０＿１２に対してＭａｓｃｏｔ（登録商標）検索アルゴリズムバージョン２．３．０２（Ｍａｔｒｉｘ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いるデータベース検索に供した。トリプシン特異性、システインカルバミドメチル化（＋５７．０２１５Ｄａ）及びメチオニン酸化（＋１５．９９５Ｄａ）の様々な修飾を用いてデータを検索して、２つの誤った切断、２０ｐｐｍの前駆

体イオン質量及び０．５Ｄａフラグメントイオン質量誤差範囲を明らかにした。ペプチドスペクトルマッチは、１％の偽発見率（ＦＤＲ）までの線形判別アルゴリズム（ＬＤＡ）を用いてフィルタにかけた。

【０４３９】

実施例２６　チオＦＡＢ　ＦＲＥＴペプチド及びＡＡＣのスタホパイン切断

５μＭのチオＦＡＢ　４４９７　ＭＰ－ＬＡＦＧＡ－ＱＳＹ７（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）及びチオＦＡＢ　４４９７　ＭＰ－ＬＡＦＡＡ－ＱＳＹ７（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）（図３０）を、ＰＢＳ　ｐＨ　７．２、４ｍＭ　Ｌ－Ｃｙｓ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ中の５０ｎＭのプロテアーゼと２時間、３７℃にてインキュベートした。２時間にて、１％ＴＦＡを用いて１：１に希釈することにより、切断反応を停止した。試料をその後、ＬＣ－ＭＳに供して、パーセントリンカー切断を決定した。試験した全てのプロテアーゼは、２つのリンカーを切断したが、程度及び場所は様々であった（表４）。スタホパインＡ及びスタホパインＢは、同じ部位：ＭＰ－ＬＡＦＧ↓Ａ－ＱＳＹ７（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）及びＭＰ－ＬＡＦＡ↓Ａ－ＱＳＹ７（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）にてリンカーを切断した。スタホパインＢは、試験した濃度にて両方のリンカーの１００％切断を達成する。カテプシンＢも、これらの条件下で両方のリンカーについて１００％切断を達成したが、切断部位は混合していた。カテプシンＢは、ｍａｌ－ＬＡＦＧＡ－ＱＳＹ７（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）をＭＰ－ＬＡＦＧ↓Ａ－ＱＳＹ７（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）でのみ切断したが、これは、ｍａｌ－ＬＡＦＡＡ－ＱＳＹ７（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）をＭＰ－ＬＡＦＡ↓Ａ－ＱＳＹ７（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）及びＭＰ－ＬＡＦＡＡ↓－ＱＳＹ７（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）の両方で切断した。スタホパインＡによるＭＰ－ＬＡＦＡＡ－ＱＳＹ７（配列番号１３６として開示する「コアペプチド」）切断は２３％であったが、ｍ　ＭＰ－ＬＡＦＧＡ－ＱＳＹ７（配列番号１３５として開示する「コアペプチド」）の切断は、３８％であった。

【０４４０】

５μＭのＡＡＣ－１９３を、ＰＢＳ　ｐＨ７．２、４ｍＭ　Ｌ－Ｃｙｓ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡ又は１００ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ５、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、４ｍＭ　Ｌ－Ｃｙｓ、２．５ｍＭ　ＥＤＴＡの何れかにおいて５０ｎＭのプロテアーゼと２時間、３７℃にてインキュベートした。２時間にて、１％ＴＦＡを用いて１：１に希釈することにより、切断反応を停止した。試料をその後、ＬＣ－ＭＳに供して、パーセントリンカー切断を決定した。最適化されたリンカー－抗生物質は、試験した全てのプロテアーゼにより効率的に切断された。スタホパインＡ及びスタホパインＢによる切断の際に、遊離のピペラジノ－リファマイシンが放出された。スタホパインＢは、ｐＨ５及び７．２の両方で１００％切断を達成した。スタホパインＡは、ｐＨ５にて１００％切断、及びｐＨ７．２にて６４％切断を示した。

【０４４１】

実施例２７　抗体－抗生物質コンジュゲート、チオ－Ｓ４４９７　ＬＣ　ｖ８－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－２１５は、黄色ブドウ球菌をインビトロで阻害する：

１×１０^{8}定常期Ｗｏｏｄ４６細菌を、１００μｇ／ｍＬのチオ－Ｓ４４９７　ＬＣ　ｖ８－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－２１５又はチオ－Ｓ４４９７－ＨＣ－Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢＣ－（ｐｉｐｅｒａｚＢＯＲ）ＡＡＣ－１２６を含む１０μＬのＨＢバッファー（０．１％ウシ血清アルブミンを補ったＨａｎｋｓ平衡塩類溶液）に懸濁した。後者は、バリン－シトルリン（ｖｃ）カテプシンＢ切断可能リンカーを用いて、同じ抗生物質を送達する。

【０４４２】

１時間後に、９０μＬのＨＢ、又は９０ｕＬのカテプシンＢ（２０ｍＭ酢酸ナトリウム

、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、５ｍＭ　Ｌ－システインｐＨ５中の１０μｇ／ｍＬのカテプシンＢ）を加えることにより試料を１０倍に希釈し、３７℃にてさらに３時間インキュベートした。活性抗生物質の放出は、細菌とのＡＡＣのインキュベーションがその後の細菌成長を阻害できたかを決定することにより推断した。細菌／ＡＡＣ懸濁物をトリプシン大豆寒天プレート上に直接スポットし、３７℃にて終夜のインキュベーションの後に細菌成長を視覚化した。活性薬物は、ＭＣ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）リンカー－抗生物質中間体とコンジュゲートしたＡＡＣから放出される。

【０４４３】

ＡＡＣなしでインキュベートした細菌は良好に成長し、カテプシンＢ処理により影響されなかった。カテプシンＢにより切断可能なリンカーであるバリン－シトルリン（ｖｃ）を含むＡＡＣ－１２６で処理した細菌は、ＨＢバッファー単独中でのインキュベーションの後に良好に成長したが、ＡＡＣ－１２６＋カテプシンＢでの処理後に成長できず、活性抗生物質を放出するために酵素処理が必要であることを示した。これとは対照的に、スタホパインにより切断可能なリンカーＬＡＦＧ（配列番号１２８）を含むＡＡＣ－２１５とインキュベートした細菌は、ＨＢバッファー単独でのインキュベーションの後に成長できず、細菌懸濁物が、スタホパインにより切断可能なリンカーＡＡＣから活性抗生物質を放出するのに十分な酵素活性を含んでいたことを示唆した。

【０４４４】

実施例２８　抗体－抗生物質コンジュゲート、チオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ｖ１－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－１９３は、マクロファージアッセイにおいて細胞内ＭＲＳＡを死滅させる：

黄色ブドウ球菌のＵＳＡ３００株を、様々な用量（１００μｇ／ｍＬ、１０μｇ／ｍＬ、１μｇ／ｍＬ又は０．１μｇ／ｍＬ）のＳ４４９７抗体単独、チオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ＷＴ（ｖ８）（配列番号１３７）、ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－１９２、又はチオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ｖ１－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）ＡＡＣ－１９３とインキュベートして、細菌とのＡＡＣの結合を可能にした（図３１）。

Ｓ４４９７　ＨＣ　ＷＴ（ｖ８）　　４４６ａａ

ＥＶＱ　ＬＶＥ　ＳＧＧ　ＧＬＶ　ＱＰＧ　ＧＳＬ　ＲＬＳ　ＣＳＡ　ＳＧＦ　ＳＦＮ
ＳＦＷ　ＭＨＷ　ＶＲＱ　ＶＰＧ　ＫＧＬ　ＶＷＩ　ＳＦＴ　ＮＮＥ　ＧＴＴ　ＴＡＹ
ＡＤＳ　ＶＲＧ　ＲＦＩ　ＩＳＲ　ＤＮＡ　ＫＮＴ　ＬＹＬ　ＥＭＮ　ＮＬＲ　ＧＥＤ
ＴＡＶ　ＹＹＣ　ＡＲＧ　ＤＧＧ　ＬＤＤ　ＷＧＱ　ＧＴＬ　ＶＴＶ　ＳＳＡ　ＳＴＫ
ＧＰＳ　ＶＦＰ　ＬＡＰ　ＳＳＫ　ＳＴＳ　ＧＧＴ　ＡＡＬ　ＧＣＬ　ＶＫＤ　ＹＦＰ
ＥＰＶ　ＴＶＳ　ＷＮＳ　ＧＡＬ　ＴＳＧ　ＶＨＴ　ＦＰＡ　ＶＬＱ　ＳＳＧ　ＬＹＳ
ＬＳＳ　ＶＶＴ　ＶＰＳ　ＳＳＬ　ＧＴＱ　ＴＹＩ　ＣＮＶ　ＮＨＫ　ＰＳＮ　ＴＫＶ
ＤＫＫ　ＶＥＰ　ＫＳＣ　ＤＫＴ　ＨＴＣ　ＰＰＣ　ＰＡＰ　ＥＬＬ　ＧＧＰ　ＳＶＦ
ＬＦＰ　ＰＫＰ　ＫＤＴ　ＬＭＩ　ＳＲＴ　ＰＥＶ　ＴＣＶ　ＶＶＤ　ＶＳＨ　ＥＤＰ
ＥＶＫ　ＦＮＷ　ＹＶＤ　ＧＶＥ　ＶＨＮ　ＡＫＴ　ＫＰＲ　ＥＥＱ　ＹＮＳ　ＴＹＲ
ＶＶＳ　ＶＬＴ　ＶＬＨ　ＱＤＷ　ＬＮＧ　ＫＥＹ　ＫＣＫ　ＶＳＮ　ＫＡＬ　ＰＡＰ
ＩＥＫ　ＴＩＳ　ＫＡＫ　ＧＱＰ　ＲＥＰ　ＱＶＹ　ＴＬＰ　ＰＳＲ　ＥＥＭ　ＴＫＮ
ＱＶＳ　ＬＴＣ　ＬＶＫ　ＧＦＹ　ＰＳＤ　ＩＡＶ　ＥＷＥ　ＳＮＧ　ＱＰＥ　ＮＮＹ
ＫＴＴ　ＰＰＶ　ＬＤＳ　ＤＧＳ　ＦＦＬ　ＹＳＫ　ＬＴＶ　ＤＫＳ　ＲＷＱ　ＱＧＮ
ＶＦＳ　ＣＳＶ　ＭＨＥ　ＡＬＨ　ＮＨＹ　ＴＱＫ　ＳＬＳ　ＬＳＰ　ＧＫ（配列番号１３７）

【０４４５】

１時間のインキュベーションの後に、オプソニン化した細菌をマウスのマクロファージに供給し、３７℃にて２時間インキュベートして、食作用を可能にした。食作用が完了した後に、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地に感染ミックスを置き換

えて、何れの残存細胞外細菌も死滅させ、生存細胞内細菌の総数を、マクロファージ溶解物の系列希釈をトリプシン大豆寒天プレートにプレーティングすることにより２日後に決定した（図３１）。スタホパインにより切断可能なＡＡＣは、カテプシンＢにより切断可能なＡＡＣと比較して同様の力価で細胞内ＵＳＡ３００を死滅させることができた。灰色の破線は、アッセイの検出限界（１０ＣＦＵ／ウェル）を示す。

【０４４６】

実施例２９　ＡＡＣは、抗体の抗原特異的結合により抗生物質死滅を黄色ブドウ球菌に向ける：

黄色ブドウ球菌のＷｏｏｄ４６株を選択した。なぜなら、これは、ＩｇＧ抗体のＦｃ領域と結合する分子であるプロテインＡを発現しないからである。黄色ブドウ球菌のＷｏｏｄ４６株を、１０μｇ／ｍＬ又は０．５μｇ／ｍＬのＳ４４９７抗体、カテプシンＢにより切断可能なリンカーを含むアイソタイプコントロール－ＡＡＣ、チオ－トラスツズマブＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチル－ｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ－１０１、チオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ＷＴ（ｖ８），ＬＣ　Ｖ２０５Ｃ－ＭＣ－ｖｃ－ＰＡＢ－（ジメチルｐｉｐＢＯＲ）ＡＡＣ－１９２、スタホパインにより切断可能なリンカーを含むアイソタイプコントロール－ＡＡＣ、チオ－トラスツズマブＨＣ　Ａ１１８Ｃ－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）、又はチオ－Ｓ４４９７　ＨＣ　ｖ１－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－１９３と１時間インキュベートして、細菌とのＡＡＣの結合を可能にした（図３２）。ＡＡＣの非特異的結合を制限するために、オプソニン化した細菌を遠心分離し、１回洗浄し、バッファーに再懸濁した後にマウスのマクロファージに供給した。食作用が完了した後に、５０μｇ／ｍＬのゲンタマイシンを補った通常成長培地に感染ミックスを置き換えて、何れの残存細胞外細菌も死滅させ、生存細胞内細菌の総数を、マクロファージ溶解物の系列希釈をトリプシン大豆寒天プレートにプレーティングすることにより２日後に決定した（図３２）。スタホパインにより切断可能なリンカーを含むＡＡＣ、ＡＡＣ－１９３は、全て検出可能な細胞内細菌を死滅させることができたが、アイソタイプコントロールＡＡＣは、活性を示さなかった。マクロファージアッセイは、スタホパインにより切断可能なＡＡＣが細胞内細菌を死滅させることができることを証明する。抗体－抗生物質コンジュゲート、チオ－Ｓ４４９７　ＬＣ　ｖ８－ＭＰ－ＬＡＦＧ－ＰＡＢＣ－（ピペラジノＢＯＲ）（配列番号１２８として開示する「コアペプチド」）ＡＡＣ－２１５は、ＭＲＳＡ感染モデルにおいてインビボで有効である：

【０４４７】

血清中で少なくとも１０ｍｇ／ｍＬのヒトＩｇＧの一定レベルを生じるように最適化された投与レジメンを使用して、ＣＢ１７．ＳＣＩＤマウスをヒトＩｇＧで再構成した。マウスを４４９７抗体（５０ｍｇ／ｋｇ）、スタホパインにより切断可能なリンカーを有するＡＡＣ－２１５（５０ｍｇ／ｋｇ）又はアイソタイプコントロール、スタホパインにより切断可能なリンカーを含む抗ｇＤ　ＡＡＣ（５０ｍｇ／ｋｇ）で処置した。マウスに単回用量のＡＡＣ－２１５を感染後１日目に静脈内注射により与えた。全てのマウスを感染後４日目に屠殺し、２つの腎臓（図３３）又は心臓（図３４）における生存細菌の総数を、プレーティングにより決定した。スタホパインにより切断可能なリンカーを含むＡＡＣ－２１５での処置は、試験した８匹のマウスのうち６匹において細菌負荷を検出限界未満に低減させたが、アイソタイプコントロールＡＡＣは、限定された活性を示した。破線は、アッセイの検出限界を示す（３３３ＣＦＵ／マウス）。

【０４４８】

実施例３０　黄色ブドウ球菌の成長及びプロテアーゼ活性プロファイリング：

黄色ブドウ球菌株Ｗｏｏｄ４６（ＡＴＣＣ１０８３２）を、トリプシン大豆ブロス（ＴＳＢ）中で振盪しながら終夜、３７℃にて培養した。培養物を１０，０００×ｇで１０分間遠心分離した。上清を回収し、２つの０．２２ｕｍフィルタを通した。

【０４４９】

黄色ブドウ球菌プロテアーゼ活性プロファイリング：１５０ｍｌの培養上清を、ＴＦＦ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｐｅｌｌｉｃｏｎ ＸＬ Ｃａｓｓｅｔｔｅ Ｂｉｏｍａｘ １０ｋＤａ）を用いて最終全タンパク質濃度１ｍｇ／ｍｌの最終容積３８ｍｌまで濃縮し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）にバッファー交換した。Ｗｏｏｄ４６上清のプロテアーゼ活性アッセイを、Ｒａｐｉｄエンドペプチダーゼプロファイリングライブラリー又はＲＥＰＬｉ（Ｍｉｍｏｔｏｐｅｓ、Ｖｉｃｔｏｒｉａ、Ａｕｓｔｒａｌｉａ）を用いて行った。ライブラリーは、５１２の群に配置された９６ウェルフォーマットで３３７５の内部消光蛍光発生ペプチドからなった。ライブラリーペプチドは、配列ＭＣＡ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｘａａ－Ｙａａ－Ｚａａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－ＤＰＡ－Ｌｙｓ－Ｌｙｓ（配列番号１３２）（ここで、ＭＣＡは、７－メトキシクマリン－４－酢酸（蛍光性ドナー）に相当し、ＤＰＡは、$Ｎ^{ｂ}$－（２，４－ジニトロフェニル）－Ｌ－２，３－ジアミノプロピオン酸（蛍光性アクセプター）に相当する）を含む。５ｎｍｏｌのＦＲＥＴペプチドを含むウェルを、５ｕｌの５０％アセトニトリル（Ｓｉｇｍａ）で可溶化した。５０μｌ（マイクロリットル）の濃縮Ｗｏｏｄ４６上清と５０ｕｌのＰＢＳとを各ウェルに加えた。プレートを３７℃にてインキュベートし、０、３０、６０、１４０及び１７０分にて蛍光測定値を得た。蛍光データは、Ｔｅｃａｎ Ｓａｐｈｉｒｅ^{2}、励起λ３２０ｎｍ／放出λ４００ｎｍで得た。終点蛍光強度倍数変化を、$Ｆ_{最終}$／$Ｆ_{初期}$として算出した。

【０４５０】

基質切断部位を、ＥＳＩソースを用いて、Ａｇｉｌｅｎｔ Ｑ－ＴＯＦを用いて行うＬＣ－ＭＳにより決定した。各ウェルからの１０ｕｌを、Ａｇｉｌｅｎｔ １２６０ ＨＰＬＣシステムを用いるＷａｔｅｒｓ Ｘｂｒｉｄｇｅ ＯＳＴ Ｃ１８ ２．５ｕｍカラム（４．６×５０ｍｍ）での逆相クロマトグラフィーに注入して分離した。２－９０％バッファーＢの勾配（ここで、バッファーＡは、０．０５％トリフルオロ酢酸／９９．９５％水であり、バッファーＢは、０．０４％トリフルオロ酢酸／９９．９６％アセトニトリルである）で、５００μｌ／分にて、２０分間の全分析時間で試料を溶出した。ペプチドは、Ｑ－ＴＯＦ質量分析計に直接溶出された。切断生成物は、観察された分子量と、それぞれの可能な部位での切断に相当する算出された質量との比較に基づいて割り当てた。

【０４５１】

実施例３１　マレイミドＦＲＥＴペプチドリンカーの合成：

図２６のマレイミドＦＲＥＴペプチド、（ＭＰ－Ｌｙｓ（ＴＡＭＲＡ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）を、ＰＳ３ペプチド合成機（Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）を用いて標準的なＦｍｏｃ固相化学により合成した。０．１ｍｍｏｌのＦｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｂｏｃ）－Ｒｉｎｋアミド樹脂（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）を用いてＣ末端カルボキサミドを作製した。Ｆｍｏｃ－Ｌｙｓ（Ｍｔｔ）－ＯＨ（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）を最初のＮ末端残基に付加して、Ｍｔｔ基の除去の後にさらなる側鎖化学を可能にした。３％トリイソプロピルシラン（ＴＩＳ）を含むジクロロメタン中の１％ＴＦＡでの３０分間の３回連続の洗浄によりＭｔｔ基を除去した後に、蛍光性アクセプター、５（６）－カルボキシテトラメチルローダミン又はＴＡＭＲＡ（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）を、樹脂上のこの側鎖アミンと結合させた。２０時間反応させた。この工程の後に、ＤＭＦ中の２０％ピペリジンにより末端Ｆｍｏｃ基を除去し、ＨＢＴＵによりマレイミド－プロピオン酸（Ｂａｃｈｅｍ ＡＧ）とカップリングさせた。９５：２．５：２．５トリフルオロ酢酸（ＴＦＡ）／ＴＩＳ／水（ｖ／ｖ／ｖ）を用いて２時間、室温にて穏やかに振盪しながら、ＴＡＭＲＡ標識された中間体ペプチドを樹脂から切断した。切断溶液を濾過し、窒素流の下でエバポレートして、ＴＦＡを除去した。水とアセトニトリルとの混液に溶解した粗中間体を、ＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘからのＪｕｐｉｔｅｒ ５μ Ｃ４カラム（５μｍ、１０ｍｍ×２５０ｍｍ）を用いる逆相ＨＰＬＣによるさらなる精製に供した。凍結乾燥の後に、精製中間体を、次いで、１０ｅｑ．のＮＨＳ－フルオレセイン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）と、５０／５０リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）／ジメチルホルムアミド（ＤＭＦ）（ｖ／ｖ）中で２０時間反応させ

て、Ｃ末端リジンでの遊離のアミンを標識した。ＦＲＥＴペプチドを次いで精製し、上記のようにして凍結乾燥させた。全ての反応混合物及び最終生成物は、ＬＣ－ＭＳにより分析して確認した。

【０４５２】

リンカーの固体相合成：記載する全てのリンカーは、ＰＳ３ペプチド合成機（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．）で、標準的なＦｍｏｃ固相化学を用いて合成した。０．１ｍＭのＦｍｏｃ－アミノ酸－Ｗａｎｇ樹脂（Ｎｏｖａｂｉｏｃｈｅｍ）を全てのリンカーについて用いて、Ｃ末端カルボキシルを作製した。リンカーを上記のようにして精製した。ＱＳＹ７アミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）結合は、精製リンカーを１．１倍過剰モルのＱＳＹ７アミン、１．１倍過剰モルのＨＡＴＵ、及び２．２倍過剰モルのＤＩＥＡとＤＭＦ中で終夜、室温にて反応させることにより達成した。リンカー－ＱＳＹ７種を、次いで、上記のようにして精製した。全ての反応混合物及び最終生成物は、ＬＣ－ＭＳにより分析して確認した。

【０４５３】

実施例３２　細胞ベースのＦＲＥＴ切断アッセイ：

Ｗｏｏｄ４６及びＵＳＡ３００の培養物は、ＴＳＢ中の１：２００希釈の終夜培養物（２０ｍｌ中に０．１ｍｌ）を接種し、振盪しながら３７℃にてインキュベートした。株を対数増殖期まで培養し、トリプシン大豆ブロス（ＴＳＢ）に10^8細胞／ｍｌ及び10^7細胞／ｍｌの細胞密度でプレーティングした。２μＭの最終ＦＲＥＴペプチド濃度でチオＭＡＢ　ＦＲＥＴペプチドコンジュゲートをウェルに加えた。プレートを３７℃にてインキュベートし、蛍光を経時的に、励起λ４９５ｎｍ／放出λ５１８ｎｍで２１０分間モニタリングした。

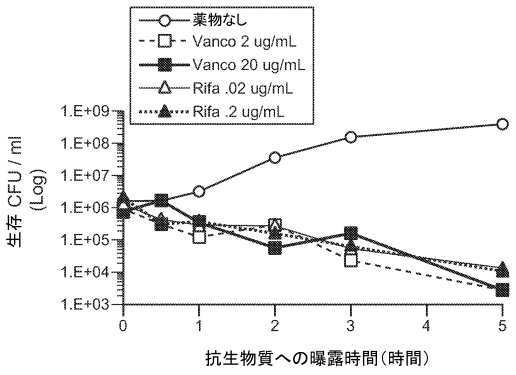
【０４５４】

濃縮活性上清によるチオＦＡＢ　ＦＲＥＴペプチド及びチオＦＡＢ　ｍａｌ－ＧＧＡＦＡＧＧＧ－ＤＮＡ３１（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）の切断：ＭＰ－Ｌｙｓ（ＴＡＭＲＡ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｌｙｓ（フルオレセイン）（配列番号１２５として開示する「コアペプチド」）又はＭＰ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ａｌａ－Ｐｈｅ－Ａｌａ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－（ｐｉｐＢＯＲ）ＬＡ－５９（配列番号１２６として開示する「コアペプチド」）の何れかとコンジュゲートしたチオＦＡＢ　Ｓ４４９７を、上記のようにして処理した濃縮Ｗｏｏｄ４６上清とインキュベートした。チオＦＡＢ　Ｓ４４９７及び上清は、ＰＢＳ中で、ミリグラムベースで１：１（２５μｇのチオＦＡＢ　Ｓ４４９７と２５μｇのタンパク質性上清）で混合した。試料を２時間、３７℃にてインキュベートした。２時間にて、０．１％ＴＦＡを用いて１：１に希釈することにより、反応を停止した。試料をＬＣ－ＭＳにより分析して、切断の量及び切断生成物を決定した。

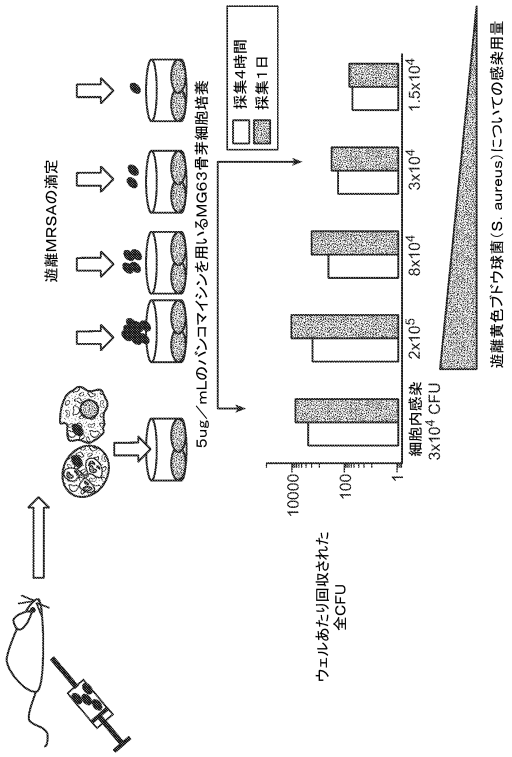
【０４５５】

上記の発明を、明確な理解を目的として説明及び例によりいくらか詳細に説明したが、説明及び例は、本発明の範囲を限定すると解釈されない。本明細書で引用する全ての特許及び科学文献の開示は、それらの全体が出典明示により明示的に援用されている。

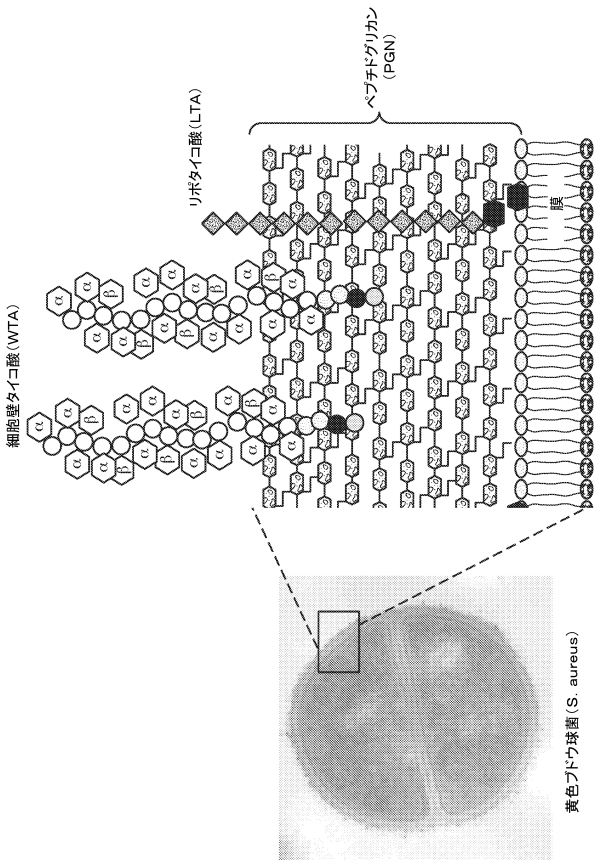
【図１】


薬物なし
Vanco 2 ug/mL
Vanco 20 ug/mL
Rifa .02 ug/mL
Rifa .2 ug/mL
生存 CFU / ml (Log)
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
0
1
2
3
4
5
抗生物質への曝露時間（時間）

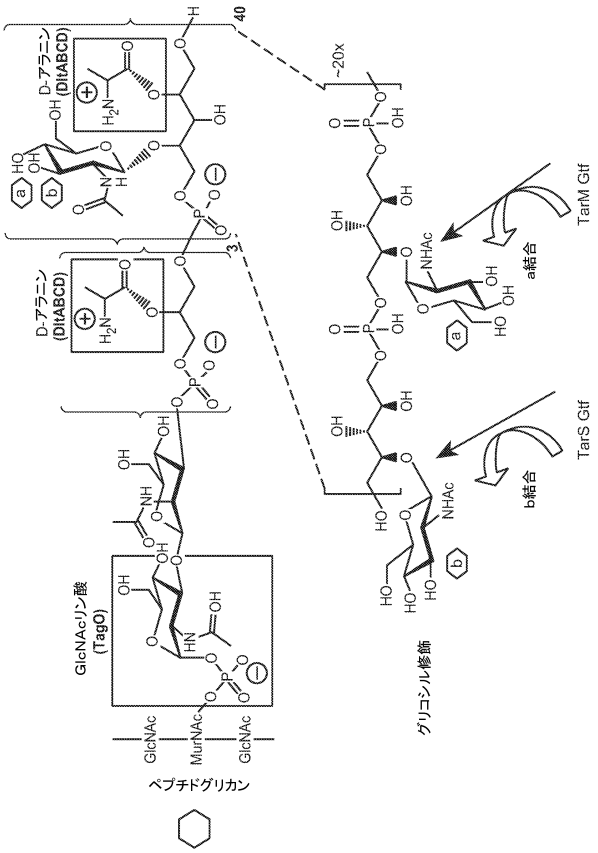
【図２】


遊離MRSAの滴定
5ug／mLのバンコマイシンを用いるMG63骨芽細胞培養
採集4時間
採集1日
ウェルあたり回収された全CFU
10000
100
1
細胞内感染 3x10^4 CFU
2x10^5
8x10^4
3x10^4
1.5x10^4
遊離黄色ブドウ球菌（S. aureus）についての感染用量

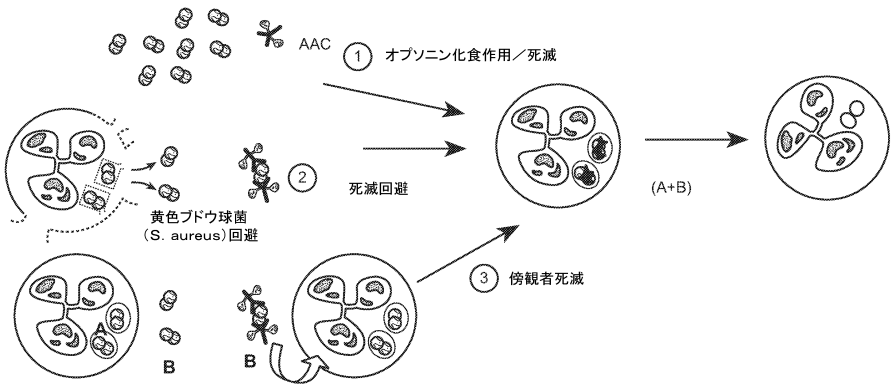
【図３】


細胞壁タイコ酸（WTA）
リポタイコ酸（LTA）
ペプチドグリカン（PGN）
膜
黄色ブドウ球菌（S. aureus）

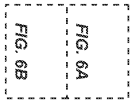
【図４】


D-アラニン (DltABCD)
D-アラニン (DltABCD)
GlcNAcリン酸 (TagO)
GlcNAc
MurNAc
GlcNAc
ペプチドグリカン
~20x
a結合
b結合
TarM Gtf
TarS Gtf
グリコシル修飾

【図５】



【図６】



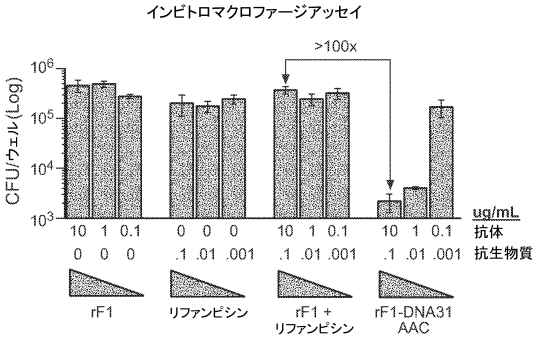
【図６Ａ】

抗体	抗原	GlcNAc	KD(nM)	抗原密度 Ave部位 細菌	ドナー	供給源 細胞	一次スクリーニングAg（ELISA）におけるコーティングとの結合
4497	WTA	ベータ	2.5	50	327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
4462	WTA	ベータ	3.1	43	326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
4450	WTA	ベータ			326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
4487	WTA	ベータ			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6078	WTA	ベータ			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6263	WTA	ベータ	1.4	22,000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6297	WTA	ベータ	1.1	21,000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6239	WTA	ベータ			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6292	WTA	ベータ			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6232	WTA	ベータ			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6259	WTA	ベータ			350	PB/PC	CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6253	WTA	ベータ			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6265	WTA	ベータ			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）

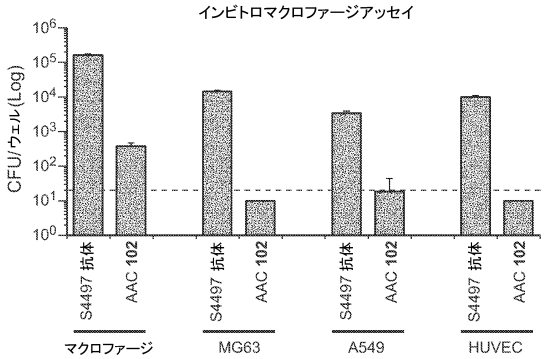
【図６Ｂ】

4461(7574)	WTA	アルファ			326	sMBC	CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
4624(7578)	WTA	アルファ	0.4	16	326	sMBC	CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
4399	WTA	アルファ			326	sMBC	CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6267	WTA	アルファ			350	PB/PC	CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
rF1	SDRタンパク質	?	0.3	1600			
4516(7577)	SDRタンパク質	?			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6234	SDRタンパク質	?			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
6060	SDRタンパク質	?			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）
4569	LTA	?			327	PB/PC	CW Wood46 stat TSB
4479	PGN				327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 stat（96:4比率での鉄depl:TSB）

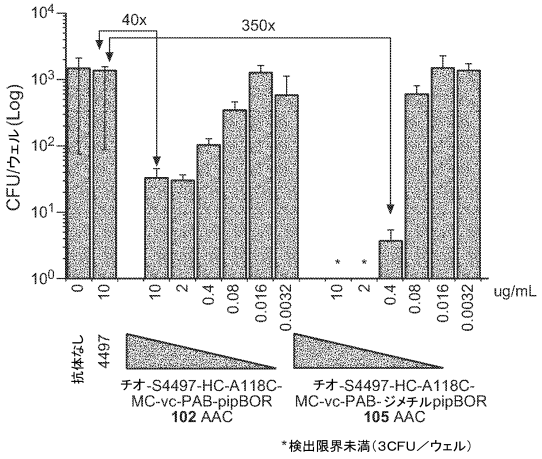
【図７Ａ】



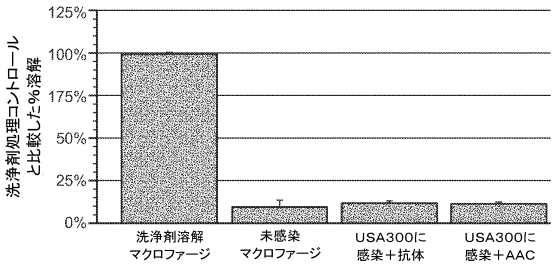
【図７Ｂ】



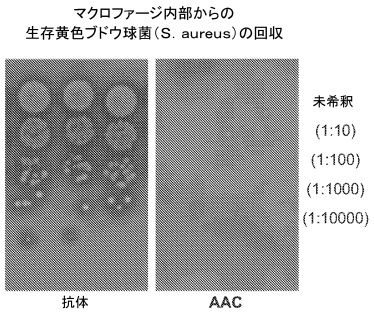
【図７Ｃ】



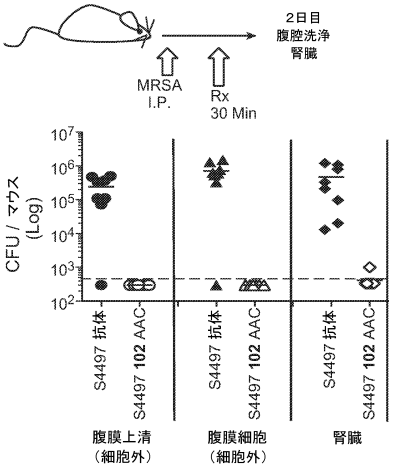
【図７Ｄ】



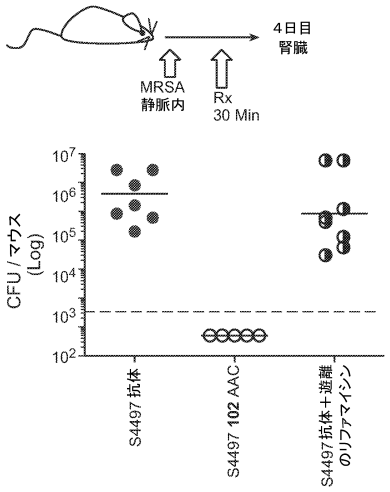
【図７Ｅ】



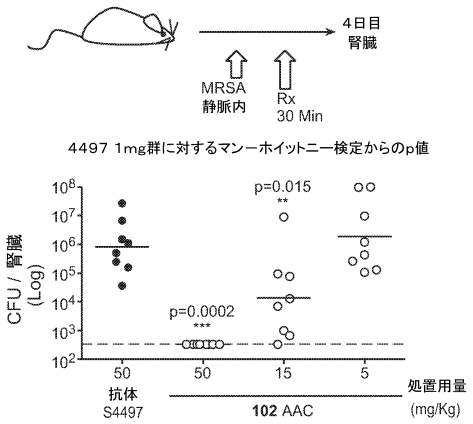
【図８Ａ】



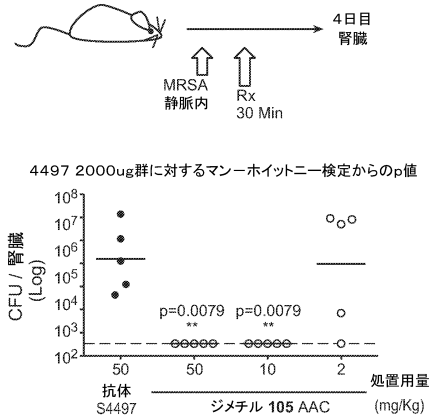
【図８Ｂ】



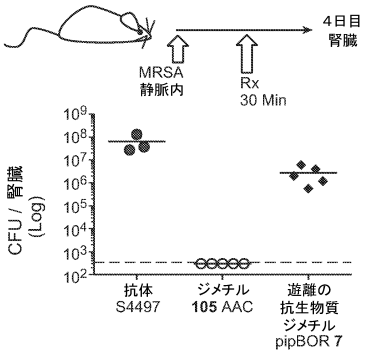
【図９Ａ】



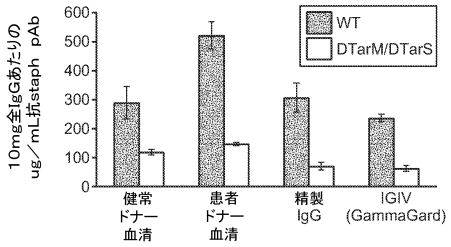
【図９Ｂ】



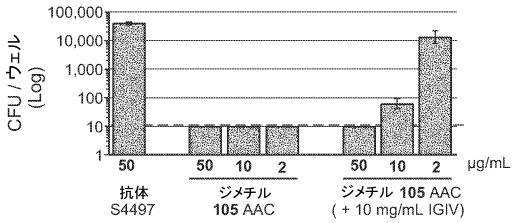
【図９Ｃ】



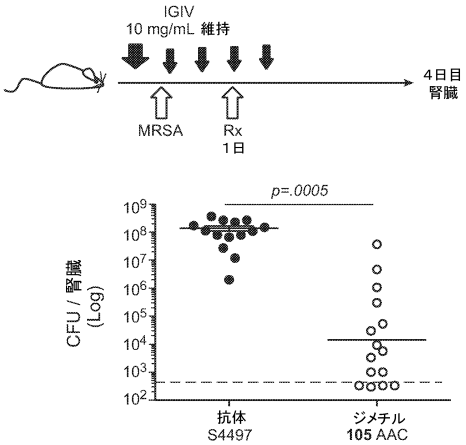
【図１０Ａ】



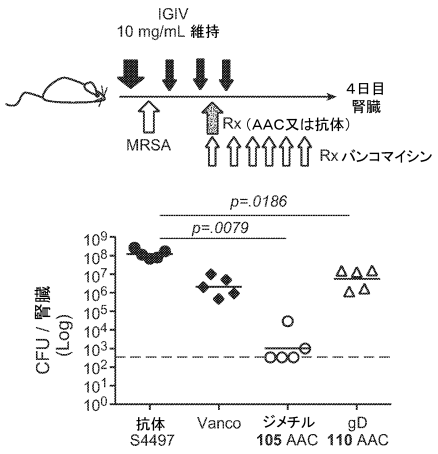
【図１０Ｂ】



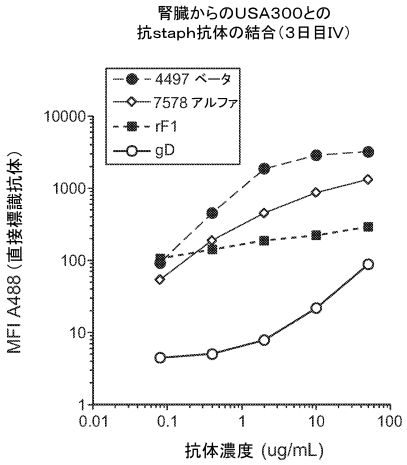
【図１０Ｃ】



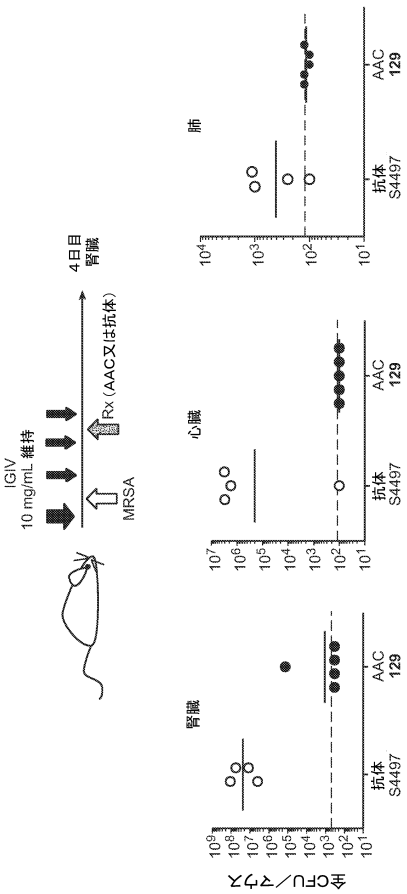
【図１１Ａ】



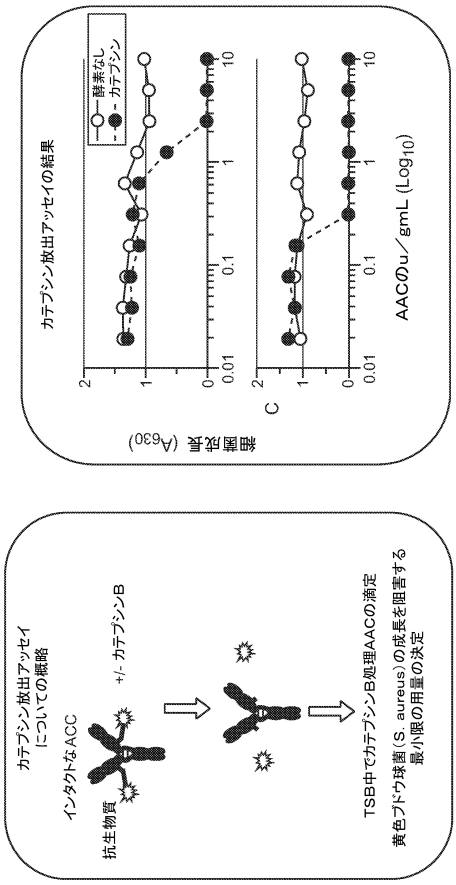
【図１１Ｂ】



【図１１Ｃ】



【図１２】



【図１４】

抗体	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
6078	RASQTISGWLA (配列番号33)	KASTLES (配列番号34)	QQYKSYSFN (配列番号35)	SYDIN (配列番号36)	WMNANSGNTGYAQKFQG (配列番号37)	SSILVRGALGRYFDL (配列番号38)
6263	RASQTISGWLA (配列番号39)	KASTLES (配列番号40)	QQYKSYSFN (配列番号41)	SYDIN (配列番号42)	WMNANSGNTGYAQKFQG (配列番号43)	SSILVRGALGRYFDL (配列番号44)
4450	RASQFVSRTSLA (配列番号45)	ETSSRAT (配列番号46)	HKYGSGPRT (配列番号47)	NYDFI (配列番号48)	WMNPNSYNTGYGQKFQG (配列番号49)	AVRGQLLSEY (配列番号50)
6297	RASQSVSSSYLA (配列番号51)	DASSRAT (配列番号52)	QKYGSTPRP (配列番号53)	SYDIN (配列番号54)	WMNPNSGNTNYAQRFQG (配列番号55)	ERWSKDTGHYYYYGMDV (配列番号56)
6239	RASLDITNHLA (配列番号57)	EASILQS (配列番号58)	EKCNSTPRT (配列番号59)	NYDIN (配列番号60)	WMNPSSGRTGYAPKFRG (配列番号61)	GGGYYDSSGNYHISGLDV (配列番号62)
6232	RASQSVGAIYLA (配列番号63)	GVSNRAT (配列番号64)	QLYTSSRALT (配列番号65)	AYAMN (配列番号66)	SITKNSDSLYYADSVKG (配列番号67)	LAARIMATDY (配列番号68)
6259	RASQGIRNGLG (配列番号69)	PASTLES (配列番号70)	LQDHNYPPT (配列番号71)	YYSMI (配列番号72)	SIDSSSRYLYYADSVKG (配列番号73)	DGDDILSVYRGSGRPFDY (配列番号74)
6292	RASQGIRNGLG (配列番号75)	PASTLES (配列番号76)	LQDHNYPPS (配列番号77)	YYSMI (配列番号78)	SIDSSSRYRYYTDSVKG (配列番号79)	DGDDILSVYQGSGRPFDY (配列番号80)
4462	RASQSVRTNVA (配列番号81)	GASTRAS (配列番号82)	LQYNTWPRT (配列番号83)	TNDMS (配列番号84)	TIIGIDDTTHYADSVRG (配列番号85)	NSGIYSF (配列番号86)
6265	RASQDIGSSLA (配列番号87)	ATSTLQS (配列番号88)	QQLNNYVHS (配列番号89)	DYAMG (配列番号90)	VVTGHSYRTHYADSVKG (配列番号91)	RIWSYGDDSFDV (配列番号92)
6253	RASQSIGDRLA (配列番号93)	WASNLEG (配列番号94)	QQYKSQWS (配列番号95)	SYAMN (配列番号96)	YISSIETIYYADSVKG (配列番号97)	DRLVDVPLSSPNS (配列番号98)
4497	KSSQSIFRTSRNKNLLN (配列番号99)	WASTRKS (配列番号100)	QQYFSPPYT (配列番号101)	SFWMH (配列番号102)	FTNNEGTTTAYADSVRG (配列番号103)	GDGGLDD (配列番号104)
4487	RASQFTNHYLN (配列番号105)	VASNLQS (配列番号106)	QQSYRTPYT (配列番号107)	SGYYN (配列番号108)	YILSGAHTDIKASLGS (配列番号109)	SGVYSKYSLDV (配列番号110)

6263は6078と同じCDR配列を有する。

【図１３Ａ】

カバット定義に従うCDR配列に下線を付す

軽鎖可変領域

CDR L1 - 接触
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4461	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	S	R	A	N	N	N	Y	Y	V	A	W	Y
4624	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	N	Q	N	L	L	-	S	S	S	N	N	N	Y	L	A	W	Y
4399	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	N	Q	N	V	L	A	S	S	N	D	K	N	Y	L	A	W	F
6267	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	N	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	L	A	W	Y

CDR L2 - 接触
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - カバット

カバット番号	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
4461	Q	H	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	F	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	N	S	L
4624	Q	Q	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
4399	Q	H	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	I	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
6267	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L

CDR L3 - 接触
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - カバット

カバット番号	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
4461	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
4624	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	A	N	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K
4399	R	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	N	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	F	N
6267	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	E

【図１５Ａ－１】

カバット定義に従うCDR配列に下線を付す

軽鎖

CDR L1 - 接触
CDR L1 - Chothia
CDR L1 - カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v2HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v2LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v3HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v3LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4HC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4LC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E
6078.v4HCLC-Cys	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y	Q	Q	K	P	A	E

CDR L2 - 接触
CDR L2 - Chothia
CDR L2 - カバット

カバット番号	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
6078	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v2HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v2LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v3HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v3LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4HC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4LC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	D	D	F	G

CDR L3 - 接触
CDR L3 - Chothia
CDR L3 - カバット
定常領域、EU番号

カバット番号	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
6078	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v2HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v2LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K

【図１３Ｂ】

カバット定義に従うCDR配列に下線を付す

重鎖可変領域

CDR H1 - 接触
CDR H1 - Chothia
CDR H1-カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
4461	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	R	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	S	F	T	D	Y	Y	M	H	W	V	R	Q	A	P	G
4624	Q	V	Q	L	Q	Q	S	R	V	E	V	K	R	P	G	T	S	V	K	V	S	C	K	T	S	G	Y	T	F	S	D	Y	Y	I	H	W	V	R	L	A	P	G
4399	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	T	S	V	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	D	Y	Y	I	H	W	V	R	L	A	P	G
6267	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	E	S	L	K	I	S	C	K	G	S	G	Y	S	F	T	S	Y	W	I	G	W	V	R	Q	M	P	G

CDR H2 - 接触
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - カバット

カバット番号	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
4461	Q	G	L	E	W	M	G	W	I	N	P	K	S	G	G	T	N	Y	A	Q	R	F	Q	G	R	V	T	M	T	G	D	T	S	I	S	A	A	Y	M	D	L	A
4624	Q	G	L	E	L	M	G	W	I	N	P	N	T	G	G	T	Y	Y	A	Q	K	F	R	D	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	A	T	A	Y	L	E	M	S
4399	Q	G	L	E	L	M	G	W	I	N	P	N	T	G	G	T	N	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	R	D	T	S	I	A	T	A	Y	M	E	L	S
6267	K	G	L	E	W	M	G	I	I	H	P	G	D	S	K	T	R	Y	S	P	S	F	Q	G	Q	V	T	I	S	A	D	K	S	I	S	T	A	Y	L	Q	W	N

CDR H3 - 接触
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - カバット

カバット番号	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	100k	100l	100m	100n	100o	100p	100q	100r	100s	100t	100u	101
4461	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	V	K	D	C	G	S	G	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D
4624	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	C	G	R	G	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D
4399	S	L	T	S	D	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	C	G	N	A	G	L	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D
6267	S	L	H	A	S	D	T	A	M	Y	Y	C	A	R	L	Y	C	S	G	G	S	C	Y	S	D	R	A	F	S	S	L	G	A	G	G	Y	Y	Y	Y	G	M	G

カバット番号	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
4461	F	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
4624	I	W	G	P	G	T	M	V	T	V	S	S
4399	I	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S
6267	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S	S

【図１５Ａ－２】

カバット番号	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126
6078.v3HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v3LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4HC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4LC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K
6078.v4HCLC-Cys	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K

EU番号	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	166	167	168
6078	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v2HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v2LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v3HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v3LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4HC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4LC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S
6078.v4HCLC-Cys	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S

EU番号	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
6078	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v2HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v2LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N
6078.v3HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v3LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N
6078.v4HC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N
6078.v4LC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N
6078.v4HCLC-Cys	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	C	T	K	S	F	N

EU番号	211	212	213	214
6078	R	G	E	C
6078.v2HC-Cys	R	G	E	C
6078.v2LC-Cys	R	G	E	C
6078.v3HC-Cys	R	G	E	C
6078.v3LC-Cys	R	G	E	C
6078.v4HC-Cys	R	G	E	C
6078.v4LC-Cys	R	G	E	C
6078.v4HCLC-Cys	R	G	E	C

【図１５Ａ－１】

重鎖

CDR H1 - 接触
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
6078	Q	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v2HC-Cys	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v2LC-Cys	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v3HC-Cys	E	I	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v3LC-Cys	E	I	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v4HC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v4LC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6078.v4HCLC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G

CDR H2 - 接触
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - カバット

カバット番号	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
6078	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v2HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v2LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v3HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v3LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4HCLC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S

【図１５Ｂ－２】

CDR H3 - 接触
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - カバット
Cons.

カバット番号	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	118	119
6078	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v2HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
6078.v2LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v3HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
6078.v3LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v4HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S
6078.v4LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S
6078.v4HCLC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S

EU番号	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
6078	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v2HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v2LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v3HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v3LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4HC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4LC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G
6078.v4HCLC-Cys	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G

EU番号	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
6078	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v2HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v2LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v3HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v3LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4HCLC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N

【図１５Ｂ－３】

EU番号	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245
6078	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v2HC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v2LC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v3HC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v3LC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4HC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4LC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P
6078.v4HCLC-Cys	E	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P

EU番号	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
6078	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v2HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v2LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v3HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v3LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4HC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4LC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A
6078.v4HCLC-Cys	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A

EU番号	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
6078	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HCLC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P

【図１５Ｂ－４】

EU番号	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371
6078	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G

EU番号	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413
6078	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HCLC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D

EU番号	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
6078	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v2HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v2LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v3HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v3LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v4HC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v4LC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6078.v4HCLC-Cys	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

【図１６Ａ－２】

EU番号	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
4497	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-HC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-LC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S
4497.v8-HCLC-Cys	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S

EU番号	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
4497	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-HC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-LC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P
4497.v8-HCLC-Cys	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P

EU番号	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
4497	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497.v8-HC-Cys	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497.v8-LC-Cys	C	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497.v8-HCLC-Cys	C	T	K	S	F	N	R	G	E	C

【図１６Ａ－１】

カバット定義に従うCDR配列に下線を付す

軽鎖

CDR H1 - 接触

CDR L1 - Chothia

CDR L1 - カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4497	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4497.v8-HC-Cys	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4497.v8-LC-Cys	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4497.v8-HCLC-Cys	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y

CDR L2 - 接触

CDR L2 - Chothia

CDR L2 - カバット

カバット番号	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
4497	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4497.v8-HC-Cys	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4497.v8-LC-Cys	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4497.v8-HCLC-Cys	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L

CDR L3 - 接触

CDR L3 - Chothia

CDR L3 - カバット

定常領域、EU番号

カバット番号	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
4497	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P
4497.v8-HC-Cys	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P
4497.v8-LC-Cys	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P
4497.v8-HCLC-Cys	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P

【図１６Ｂ－１】

重鎖

CDR H1 - 接触

CDR H1 - Chothia

CDR H1-カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
4497	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	S	A	S	G	F	S	F	N	S	F	W	M	H	W	V	R	Q	V	P	G
4497.v8-HC-Cys	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	S	A	S	G	F	S	F	N	S	F	W	M	H	W	V	R	Q	V	P	G
4497.v8-LC-Cys	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	S	A	S	G	F	S	F	N	S	F	W	M	H	W	V	R	Q	V	P	G
4497.v8-HCLC-Cys	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	S	A	S	G	F	S	F	N	S	F	W	M	H	W	V	R	Q	V	P	G

CDR H2 - 接触

CDR H2 - Chothia

CDR H2 - カバット

カバット番号	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
4497	K	G	L	V	W	I	S	F	T	N	N	E	G	T	T	T	A	Y	A	D	S	V	R	G	R	F	I	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	E	M	N
4497.v8-HC-Cys	K	G	L	V	W	I	S	F	T	N	N	E	G	T	T	T	A	Y	A	D	S	V	R	G	R	F	I	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	E	M	N
4497.v8-LC-Cys	K	G	L	V	W	I	S	F	T	N	N	E	G	T	T	T	A	Y	A	D	S	V	R	G	R	F	I	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	E	M	N
4497.v8-HCLC-Cys	K	G	L	V	W	I	S	F	T	N	N	E	G	T	T	T	A	Y	A	D	S	V	R	G	R	F	I	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	E	M	N

CDR H3 - 接触

CDR H3 - Chothia

CDR H3 -カバット

定常領域、EU番号

カバット番号	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127
4497	N	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	G	G	L	D	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P
4497.v8-HC-Cys	N	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	G	G	L	D	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	C	S	T	K	G	P	S	V	F	P
4497.v8-LC-Cys	N	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	G	G	L	D	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P
4497.v8-HCLC-Cys	N	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	E	G	G	L	D	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	C	S	T	K	G	P	S	V	F	P

【図１６Ｂ－２】

EU番号	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169
4497	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
4497.v8-HC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
4497.v8-LC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T
4497.v8-HCLC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T

EU番号	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211
4497	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-LC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HCLC-Cys	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V

EU番号	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253
4497	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I
4497.v8-HC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I
4497.v8-LC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I
4497.v8-HCLC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I

EU番号	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295
4497	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
4497.v8-HC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
4497.v8-LC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q
4497.v8-HCLC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q

EU番号	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337
4497	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S
4497.v8-HC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S
4497.v8-LC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S
4497.v8-HCLC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S

EU番号	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379
4497	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-HC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-LC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V
4497.v8-HCLC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V

【図１６Ｂ－３】

EU番号	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421
4497	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-HC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-LC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-HCLC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N

EU番号	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
4497	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497.v8-HC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497.v8-LC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497.v8-HCLC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

【図１７Ａ－１】

カバット定義に従うCDR配列に下線を付す

軽鎖

CDR L1 - 接触

CDR L1 - Chothia

CDR L1 - カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	T	I	S	G	W	L	A	W	Y
6263	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	T	I	S	G	W	L	A	W	Y
4450	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	F	.	.	.	.	.	V	S	R	T	S	L	A	W	F
6297	E	T	T	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	.	.	.	.	.	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y
6239	D	V	V	M	T	Q	S	S	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	L	.	.	.	.	.	.	D	I	T	N	H	L	A	W	Y
6232	E	I	V	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	.	.	.	.	.	V	G	A	I	Y	L	A	W	Y
6259	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	G	I	R	N	G	L	G	W	Y
6292	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	G	I	R	N	G	L	G	W	Y
4462	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	T	V	T	L	S	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S	V	R	T	N	V	A	W	Y
6265	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	F	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	L	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	D	I	G	S	S	L	A	W	Y
6253	E	T	T	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	S	I	G	D	R	L	A	W	Y
4497	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	F	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y
4487	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	.	.	.	.	.	.	F	T	N	H	Y	L	N	W	Y

CDR L2 - 接触

CDR L2 - Chothia

CDR L2 - カバット

カバット番号	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
6078	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L
6263	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L
4450	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	Y	E	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L
6297	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	V	L	I	Y	D	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L
6239	Q	Q	K	P	G	E	L	P	K	L	L	I	Y	E	A	S	I	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
6232	Q	Q	E	P	G	R	A	P	T	L	L	F	Y	G	V	S	N	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	C	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L
6259	Q	Q	T	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	P	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	D	R	D	F	T	L	T	I	T	S	L
6292	Q	Q	I	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	P	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	D	R	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4462	R	H	K	A	G	Q	A	P	M	I	L	V	S	G	A	S	T	R	A	S	G	A	P	A	R	F	S	G	S	G	Y	G	T	E	F	T	L	T	I	T	S	L
6265	Q	Q	R	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	A	T	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	F	G	T	E	F	T	L	T	I	S	T	L
6253	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	V	L	I	Y	W	A	S	N	L	E	G	G	V	P	S	R	F	S	G	T	G	S	G	T	E	F	A	L	T	I	S	G	L
4497	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	T	S	L
4487	Q	H	K	P	G	R	A	P	K	L	M	I	S	V	A	S	N	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	T	G	S	E	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L

【図１７Ａ－２】

CDR L3 - 接触

CDR L3 - Chothia

CDR L3 - カバット

定常領域、EU番号

カバット番号	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
6078	Q	P	D	D	F	G	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	.	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6263	Q	P	D	D	F	G	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	.	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
4450	E	P	E	D	F	A	N	Y	Y	C	H	K	Y	G	S	G	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	V	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6297	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	K	Y	G	S	T	P	.	R	P	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6239	Q	P	E	D	V	A	T	Y	Y	C	E	K	C	N	S	T	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6232	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	L	Y	T	S	S	R	A	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6259	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	H	N	Y	P	.	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6292	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	H	N	Y	P	.	P	S	F	S	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
4462	Q	S	E	D	F	A	V	Y	Y	C	L	Q	Y	N	T	W	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	V	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6265	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	N	N	Y	V	.	H	S	F	G	P	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
6253	Q	P	D	D	L	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Q	.	.	W	S	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
4497	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	.	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P
4487	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	Y	R	T	P	.	Y	T	F	G	Q	G	S	R	L	E	M	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P

EU番号	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
6078	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6263	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4450	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6297	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6239	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6232	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6259	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6292	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4462	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6265	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
6253	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4497	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E
4487	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E

【図１７Ａ－３】

CDR H3 - 接触
CDR H3 - Chothia
CDR H3 - カバット

カバット番号	82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	100i	100j	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
6078	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	.	.	.	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S
6263	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	G	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	.	.	.	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S
4450	S	L	T	S	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	A	V	R	G	Q	L	L	S	.	.	.	.	.	.	.	.	E	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6297	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	E	R	W	S	K	D	T	G	H	Y	Y	Y	Y	G	W	.	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
6239	S	L	T	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	G	G	Y	Y	D	S	S	G	N	Y	H	I	S	G	L	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
6232	S	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	T	L	A	A	R	I	M	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6259	G	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	D	D	I	L	S	V	Y	R	G	S	G	H	P	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6292	A	L	R	V	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	D	D	I	L	S	V	Y	Q	G	S	G	R	P	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
4462	S	L	R	V	E	D	T	A	L	Y	Y	C	V	K	N	S	G	I	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
6265	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	R	I	W	S	Y	G	D	D	S	F	.	.	.	.	.	.	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S
6253	S	L	R	D	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	R	L	V	D	V	F	L	S	S	F	.	.	.	.	.	N	S	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
4497	N	L	R	G	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	D	G	G	L	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	D	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
4487	S	V	T	A	A	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	S	G	V	S	K	Y	S	L	.	.	.	.	.	.	.	.	D	V	W	G	Q	G	T	T	V	T	V	S

定常領域、Eu番号付けシステムを用いた

カバット番号	113	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
6078	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6263	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4450	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6297	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6239	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6232	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6259	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6292	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4462	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6265	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
6253	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4497	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W
4487	S	A	S	T	K	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W

【図１７Ａ－３】

EU番号	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
6078	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6263	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4450	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6297	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6239	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6232	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6259	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6292	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4462	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6265	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6253	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4497	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4487	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S

EU番号	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
6078	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6263	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4450	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6297	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6239	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6232	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6259	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6292	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4462	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6265	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
6253	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4497	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
4487	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C
				*							

＊アスタリスクで印をつけた軽鎖Eu205位は、薬物コンジュゲーションのためにCysに変更できる。

【図１７Ｂ－３】

Eu番号	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
6078	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6263	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4450	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6297	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6239	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6232	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6259	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6292	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4462	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6265	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6253	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4497	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4487	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C

Eu番号	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
6078	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6263	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4450	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6297	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6239	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6232	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6259	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6292	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4462	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6265	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6253	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4497	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4487	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L

【図１７Ｂ－１】

重鎖

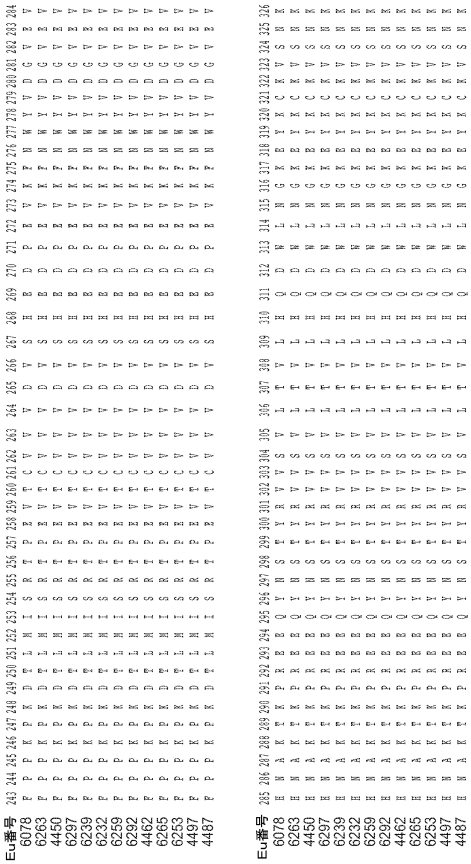
CDR H1 - 接触
CDR H1 - Chothia
CDR H1 - カバット

カバット番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
6078	Q	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6263	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
4450	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	V	K	P	G	A	S	L	K	V	S	C	K	A	S	G	Y	I	I	I	N	Y	D	F	I	W	V	R	Q	A	T	G
6297	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	R	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	P	G
6239	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	A	E	V	K	R	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	V	S	N	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
6232	Q	I	T	L	K	E	S	G	G	G	L	I	K	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	T	S	G	F	P	F	S	A	Y	A	M	N	W	V	R	Q	A	P	G
6259	E	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	L	V	K	P	G	E	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	D	Y	Y	S	M	I	W	V	R	Q	A	P	G
6292	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	G	G	L	V	N	P	G	E	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	N	Y	Y	S	M	I	W	V	R	Q	A	P	G
4462	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	G	G	L	E	Q	P	G	G	S	L	R	I	S	C	A	A	S	G	F	T	F	N	T	N	D	M	S	W	V	R	Q	A	P	G
6265	E	V	Q	L	V	Q	S	G	G	D	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	A	M	G	W	V	R	Q	A	P	G
6253	E	V	Q	L	V	Q	S	G	G	G	V	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	N	W	V	R	Q	A	P	G
4497	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	S	A	S	G	F	S	F	N	S	F	W	M	H	W	V	R	Q	V	P	G
4487	Q	M	Q	L	Q	E	S	G	P	G	L	V	K	P	S	E	T	L	S	L	S	C	S	V	S	G	A	S	A	S	S	G	Y	Y	N	W	V	R	Q	T	P	G

CDR H2 - 接触
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - カバット

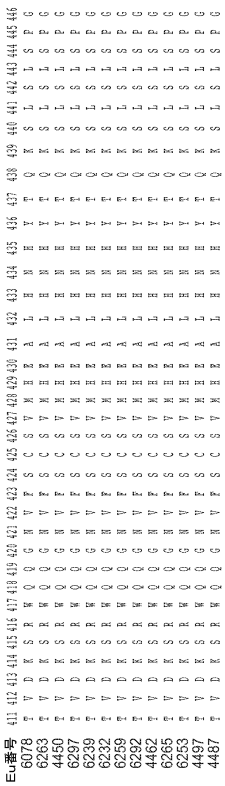
カバット番号	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
6078	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6263	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
4450	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	P	N	S	Y	N	T	G	Y	G	Q	K	F	Q	G	R	V	T	M	T	W	D	S	S	M	S	T	A	Y	M	E	L	S
6297	Q	G	L	E	W	M	G	W	M	N	P	N	S	G	N	T	N	Y	A	Q	R	F	Q	G	R	L	T	M	T	K	N	T	S	I	N	T	A	Y	M	E	L	S
6239	Q	G	L	E	W	M	G	W	M	N	P	S	S	G	R	T	G	Y	A	P	K	F	R	G	R	V	T	M	T	R	S	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6232	R	G	L	E	W	V	S	S	I	T	K	N	S	D	S	L	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	G	N	S	L	Y	L	Q	M	N
6259	K	G	L	E	W	V	S	S	I	D	S	S	S	R	Y	L	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	Q	N	S	L	Y	L	Q	M	S
6292	K	G	L	E	W	V	S	S	I	D	S	S	S	R	Y	R	Y	Y	T	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	Q	N	S	L	Y	L	Q	M	S
4462	K	G	L	Q	W	V	S	T	I	I	G	I	D	D	T	T	H	Y	A	D	S	V	R	G	R	F	T	V	S	R	D	T	S	K	N	M	V	Y	L	Q	M	N
6265	K	G	L	E	W	L	S	V	V	T	G	H	S	Y	R	T	H	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	I	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	F	L	Q	M	N
6253	K	G	L	E	W	V	S	Y	I	S	.	S	I	E	T	I	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	S	L	Y	L	Q	M	N
4497	K	G	L	V	W	I	S	F	T	N	N	E	G	T	T	T	A	Y	A	D	S	V	R	G	R	F	I	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	E	M	N
4487	G	G	L	E	W	I	A	Y	I	L	.	S	G	A	H	T	D	I	K	A	S	L	G	S	R	V	A	V	S	V	D	T	S	K	N	Q	V	T	L	R	L	S

【図１７Ｂ－４】

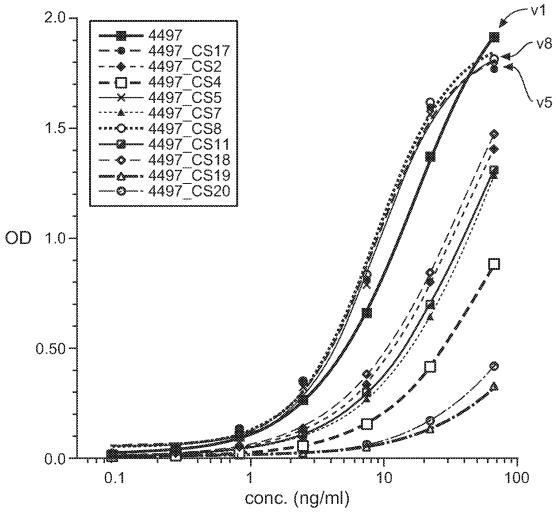


【図１７Ｂ－５】

【図１７Ｂ－６】



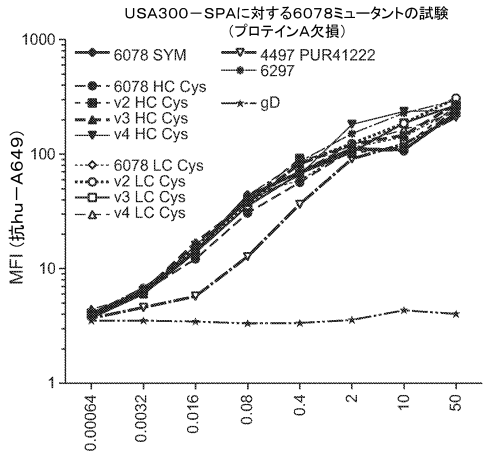
【図１８Ａ】



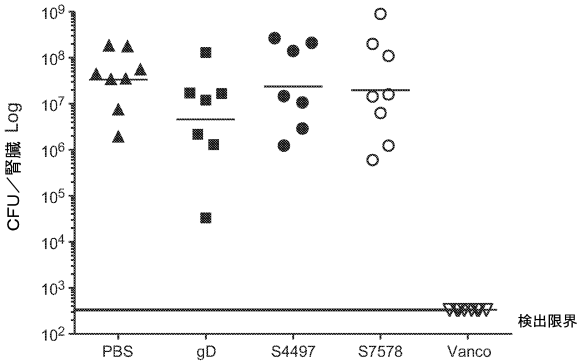
【図１８Ｂ】

	93	94	95	96	97	98	99	101	102	ELISA
WT (v1)	A	R	G	D	G	G	L	D	D	+++
v7				D	G				E	+
v2				D	G				Y	+
v4				D	A				D	+
v19				D	A				E	+/-
v8				E	G				D	+++
v20				E	G				E	+/-
v5				A	G				D	++
v11				A	G				E	+
v18				A	G				Y	+

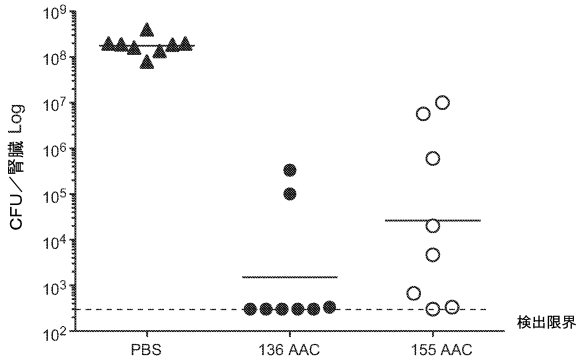
【図１９】



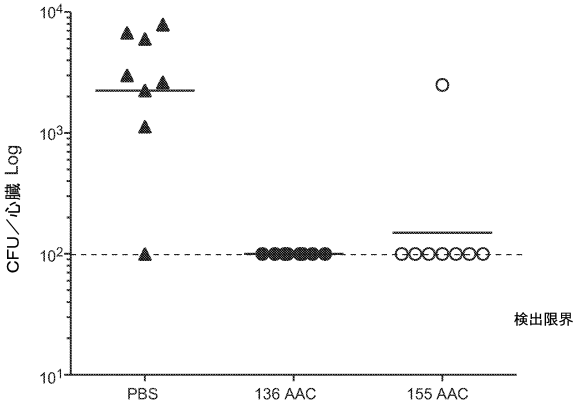
【図２０】



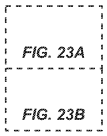
【図２１】



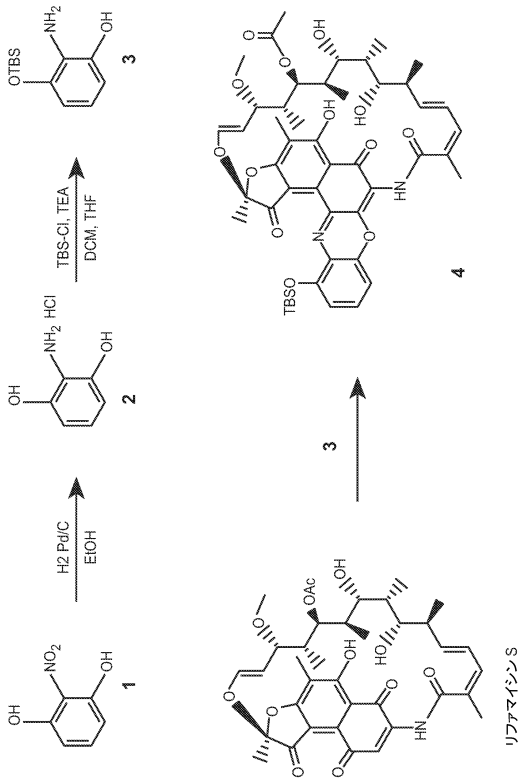
【図２２】



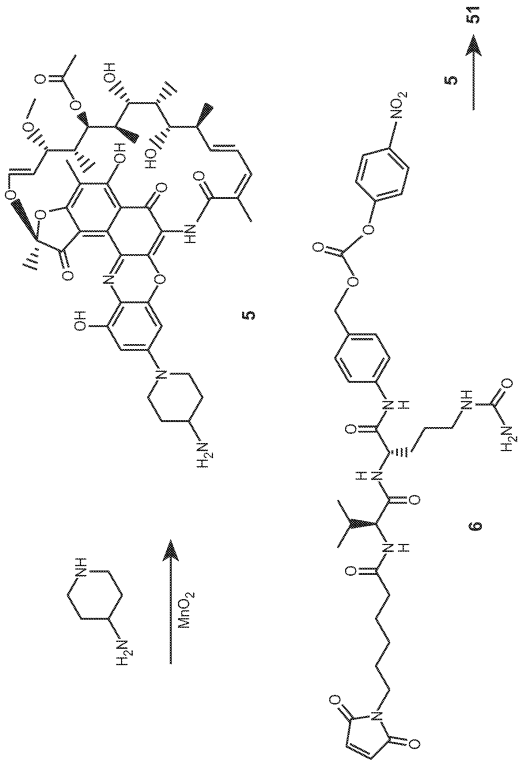
【図２３】



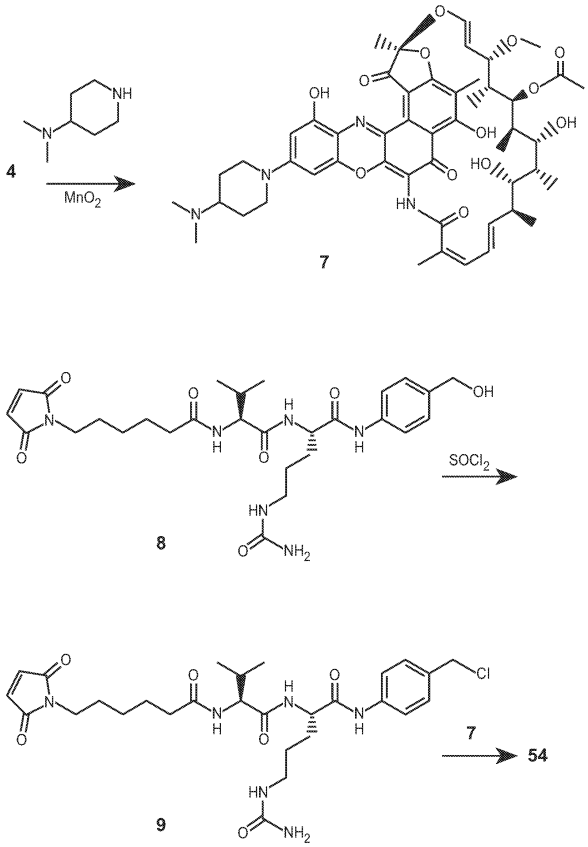
【図２３Ａ】



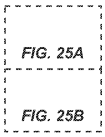
【図２３Ｂ】



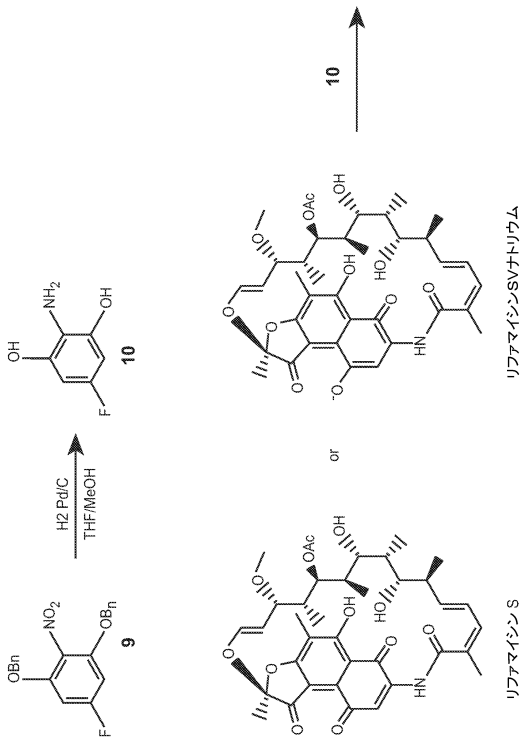
【図２４】



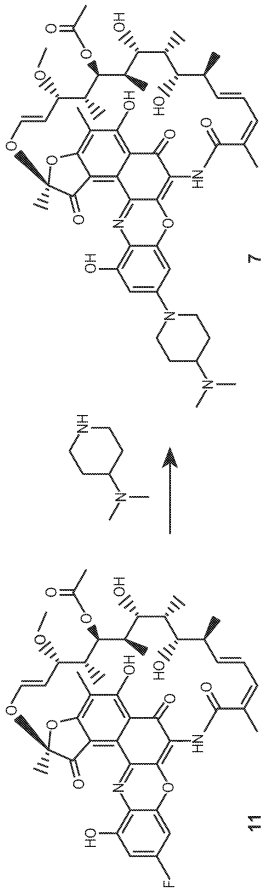
【図２５】



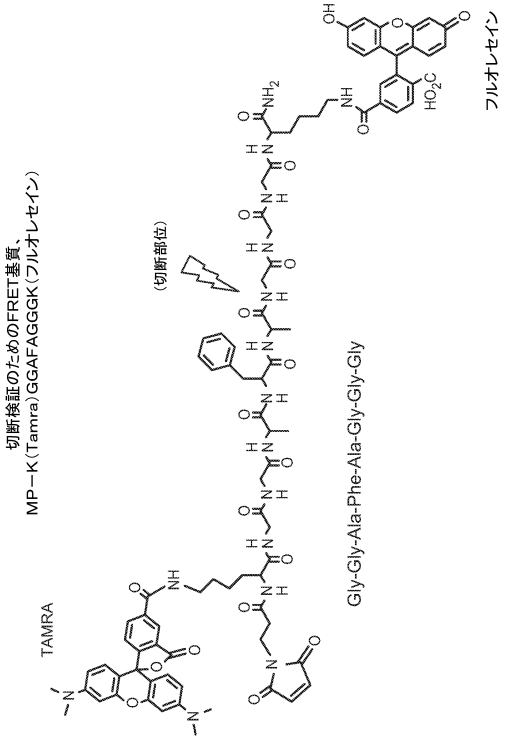
【図２５Ａ】



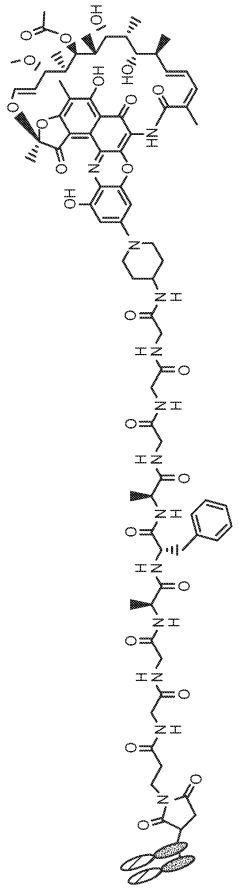
【図２５Ｂ】



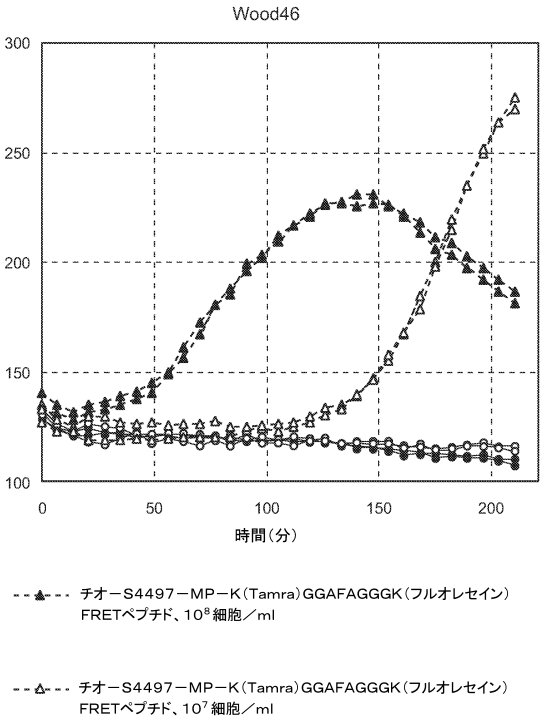
【図２６】



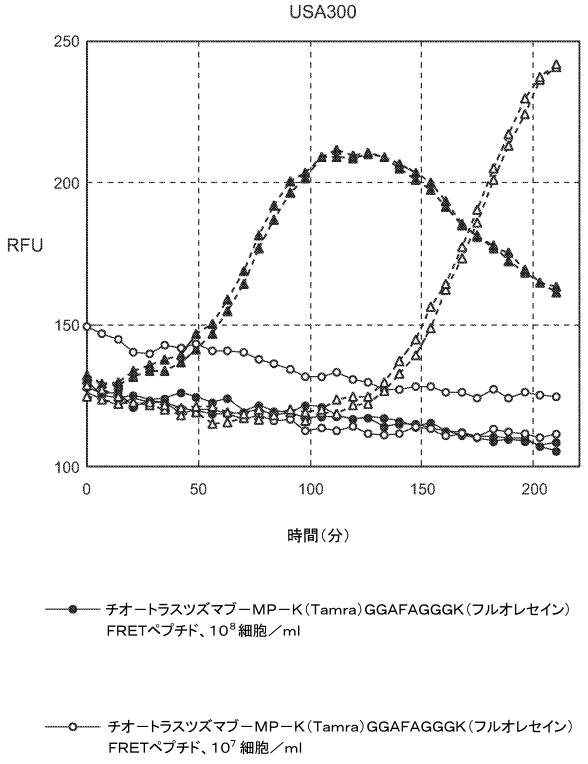
【図２７】



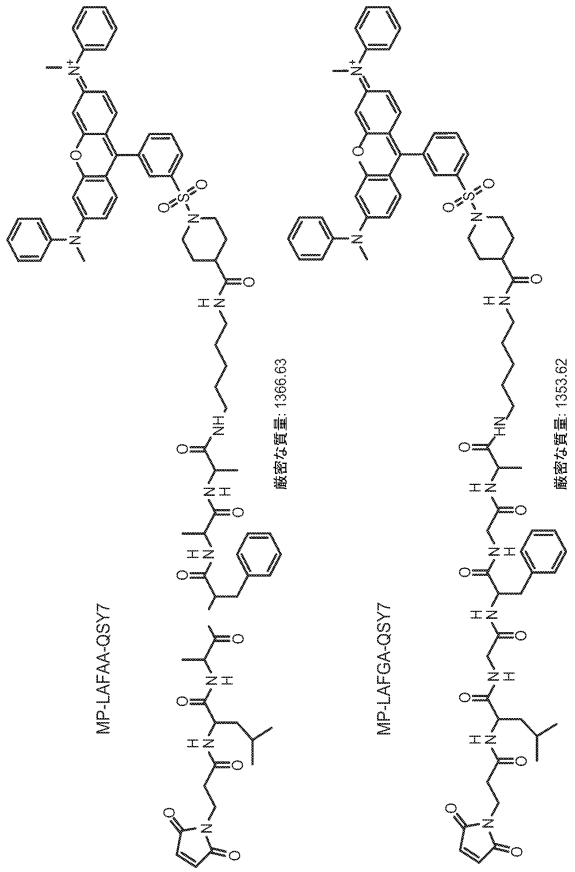
【図２８】



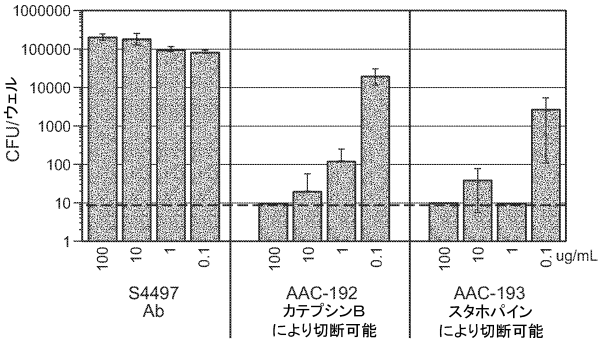
【図２９】



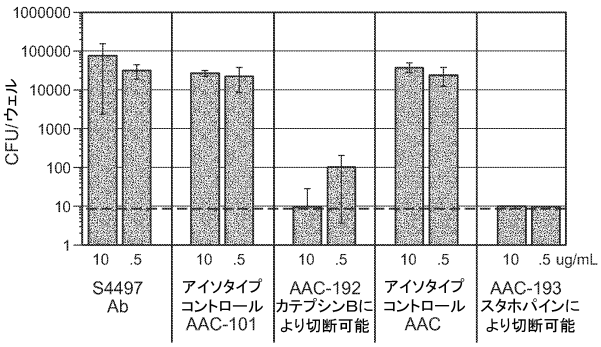
【図３０】



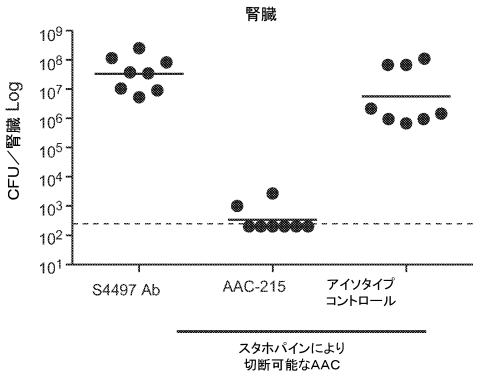
【図３１】



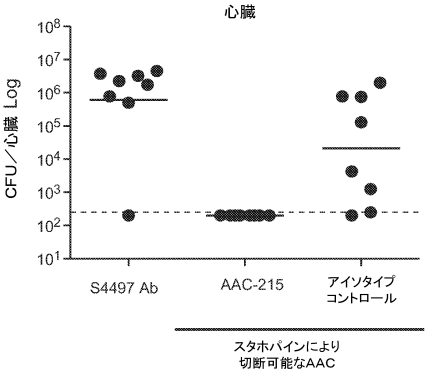
【図３２】



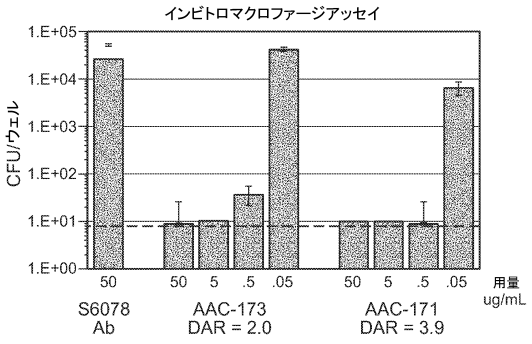
【図３３】



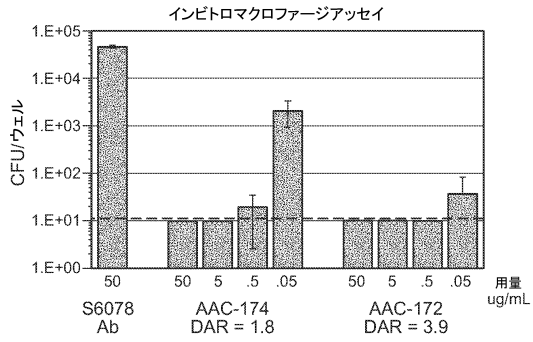
【図３４】



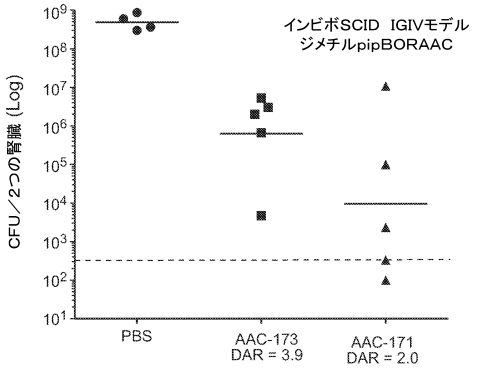
【図３５】



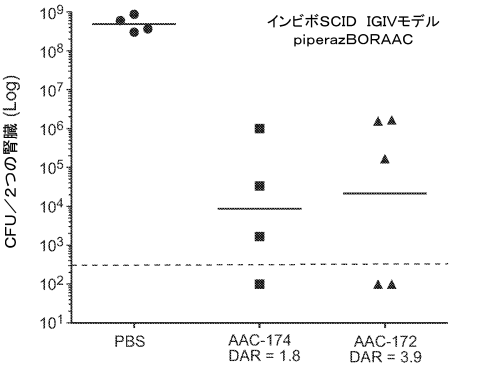
【図３６】



【図３７】



【図３８】



【配列表】

0006469094000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
Ａ６１Ｐ	*17/02*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	17/02	
Ａ６１Ｋ	*31/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/395	
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ
Ａ６１Ｋ	*45/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｌ
Ａ６１Ｋ	*31/7052*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	
Ａ６１Ｋ	*31/7048*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7052	
Ａ６１Ｋ	*38/12*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7048	
Ａ６１Ｋ	*31/4709*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/12	
Ａ６１Ｋ	*31/085*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4709	
Ａ６１Ｋ	*31/4375*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/085	
Ａ６１Ｋ	*31/422*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4375	
Ａ６１Ｋ	*31/704*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/422	
Ａ６１Ｋ	*31/43*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/704	
Ａ６１Ｋ	*31/407*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/43	
Ａ６１Ｋ	*31/7068*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/407	
Ｃ０７Ｋ	*5/062*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7068	
			Ｃ０７Ｋ	5/062	

(31)優先権主張番号 61/829,466
(32)優先日 平成25年5月31日(2013.5.31)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 PCT/US2014/039113
(32)優先日 平成26年5月22日(2014.5.22)
(33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

(72)発明者 ダルウィーシュ, マーティン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 フライゲア, ジョン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 ハゼンボス, ウーター
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 リー, ビョン－チョル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 レハール, ソフィー エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 マリアザサン, サンジーヴ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １, シー／オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
(72)発明者 モリサキ, ジョン ヒロシ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー

ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　ピロー，　トーマス　エイチ.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー
ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　スターバン，　レアンナ
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー
ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　ヴァンドレン，　リチャード
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー
ウェイ　１，　シー／オー　ジェネンテック，　インコーポレイテッド
(72)発明者　コェフォード，　クラウス
デンマーク国　ディーケー－２８００　リュンビュー，　エレクトロヴァイ　ビルディング　３７５，　シー／オー　シンフォジェン　エー／エス
(72)発明者　ストランド，　マウヌス
デンマーク国　ディーケー－２８００　リュンビュー，　エレクトロヴァイ　ビルディング　３７５，　シー／オー　シンフォジェン　エー／エス
(72)発明者　アナスン，　ピーダ　エス.
デンマーク国　ディーケー－２７２０　バンレーセ，　オーダルスヴァイ　２１エー

審査官　市島　洋介

(56)参考文献　特表２００６－５１４６３６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００５／０８１７１１（WO，Ａ1）
特表２００９－５０５９７４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ０７Ｋ　１／００－１９／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）