

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6527508号  
(P6527508)

(45) 発行日 令和1年6月5日 (2019. 6. 5)

(24) 登録日 令和1年5月17日 (2019. 5. 17)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 Z N A N

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006. 01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 14 (全 111 頁)

(21) 出願番号 特願2016-519326 (P2016-519326)  
 (86) (22) 出願日 平成26年10月1日 (2014. 10. 1)  
 (65) 公表番号 特表2016-539083 (P2016-539083A)  
 (43) 公表日 平成28年12月15日 (2016. 12. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/071028  
 (87) 国際公開番号 W02015/049280  
 (87) 国際公開日 平成27年4月9日 (2015. 4. 9)  
 審査請求日 平成29年9月25日 (2017. 9. 25)  
 (31) 優先権主張番号 61/885, 302  
 (32) 優先日 平成25年10月1日 (2013. 10. 1)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 506042265  
 メディミュン リミテッド  
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ  
 ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ  
 ランタ パーク, ミルステイン ビルディ  
 ング  
 (74) 代理人 110002572  
 特許業務法人平木国際特許事務所  
 (72) 発明者 バリー, サイモン ティー  
 イギリス国 エスケー10 4ティージー  
 チェシャー マックルズフィールド, アル  
 ダリー パーク, アルダリー, アストラ  
 ゼネカ アールアンドディー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】  $\alpha V \beta 6$  を過剰発現する癌を治療及び診断する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

悪性腫瘍を有する動物の生存を増大させるための組成物であって、前記組成物は、治療有効用量の V 6 抗体、及び、治療有効用量の H E R 2 抗体を含み、ここで

該 V 6 抗体は重鎖及び軽鎖を含み、該 V 6 抗体の重鎖可変領域がアミノ酸配列 GGSISSGGYYWSのCDR1を含み、アミノ酸配列YIYYSGRTYNNPSLKSのCDR2を含み、アミノ酸配列VATGRADYHFYAMDVのCDR3を含み、かつ、該 V 6 抗体の軽鎖可変領域がアミノ酸配列SGDVLAKKSARのCDR1を含み、アミノ酸配列KDSERPSのCDR2を含み、アミノ酸配列YSAADNNLVのCDR3を含み；及び

該 H E R 2 抗体は、トラスツズマブであり、

前記悪性腫瘍が V 6 及びHER2を過剰発現する悪性腫瘍である、前記組成物。

【請求項 2】

動物における腫瘍細胞の増殖を阻害するための組成物であって、前記組成物は、治療有効用量の V 6 抗体、及び、治療有効用量の H E R 2 抗体を含み、ここで

該 V 6 抗体は重鎖及び軽鎖を含み、該 V 6 抗体の重鎖可変領域がアミノ酸配列 GGSISSGGYYWSのCDR1を含み、アミノ酸配列YIYYSGRTYNNPSLKSのCDR2を含み、アミノ酸配列VATGRADYHFYAMDVのCDR3を含み、かつ、該 V 6 抗体の軽鎖可変領域がアミノ酸配列SGDVLAKKSARのCDR1を含み、アミノ酸配列KDSERPSのCDR2を含み、アミノ酸配列YSAADNNLVのCDR3を含み；及び

該 H E R 2 抗体は、トラスツズマブであり、

10

20

前記腫瘍細胞が V 6 及び HER2 を過剰発現する腫瘍細胞である、前記組成物。

【請求項 3】

動物における腫瘍容積を低減させるための組成物であって、治療有効用量の V 6 抗体、及び、治療有効用量の HER2 抗体を含み、ここで

該 V 6 抗体は重鎖及び軽鎖を含み、該 V 6 抗体の重鎖可変領域がアミノ酸配列 GGSISSGGYYWS の CDR1 を含み、アミノ酸配列 YIYYSGRTYNNPSLKS の CDR2 を含み、アミノ酸配列 VATGRADYHFYAMDV の CDR3 を含み、かつ、該 V 6 抗体の軽鎖可変領域がアミノ酸配列 SGDVLAKKSAR の CDR1 を含み、アミノ酸配列 KDSERPS の CDR2 を含み、アミノ酸配列 YSAADNNLV の CDR3 を含み；及び

該 HER2 抗体は、トラスツズマブであり、

前記腫瘍細胞が V 6 及び HER2 を過剰発現する腫瘍細胞である、前記組成物。

【請求項 4】

前記 V 6 抗体及び前記 HER2 抗体が、同時に投与される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 V 6 抗体及び前記 HER2 抗体が、順次投与される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記悪性腫瘍又は腫瘍細胞が、乳癌細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、肺癌細胞、大腸癌細胞、頭頸部癌細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、及び肝細胞癌細胞から選択される腫瘍細胞を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記動物が、ヒトである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 HER2 抗体が、トラスツズマブであり、さらに、該 V 6 抗体が、配列番号 75 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号 77 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記乳癌細胞又は卵巣癌細胞が、トラスツズマブ治療に対して耐性である、請求項 6 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 V 6 抗体及び / 又は HER2 抗体が、モノクローナル抗体であり、場合により、モノクローナル抗体が、完全ヒトモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 HER2 抗体が、トラスツズマブであり、さらに、前記 V 6 抗体が 35 ナノモル (nM) 未満の  $K_d$  で V 6 に結合する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 12】

V 6 及び HER2 が阻害され、場合により、V 6、HER2、HER3、及び B6 の少なくとも 1 つのレベルが下方制御される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

V 6 及び / 又は HER2 の少なくとも 1 つの下流標的のレベルが下方制御される、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

Akt2 及び Smad2 の少なくとも 1 つのレベルが下方制御される、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 1 】

当該技術分野は、一部の態様において、 V 6 を過剰発現する癌を治療及び診断する方法に関する。一部の実施形態では、当該技術分野は、 V 6 及び H E R 2 を過剰発現する癌を治療及び診断する方法に関する。一部の実施形態では、併用療法戦略が使用される。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 2 】

乳癌の最も侵襲性且つ浸潤性のサブタイプの一部は、 H E R 1 ~ H E R 4 を含む受容体の受容体チロシンキナーゼファミリーのメンバーである、ヒト表皮増殖因子受容体 2 ( H E R 2 ) を過剰発現するものである。 H E R 2 は、乳癌の 2 5 ~ 3 0 % において過剰発現され、より浸潤性の表現型を乳癌細胞に付与することを担うが、実際の機構は十分にわかっていない。 H E R 2 から下流シグナル伝達を阻止するヒト化抗体トラスツズマブの導入によって、 H E R 2 陽性 ( H E R 2 + ) 乳癌患者の再発及び致死率が減少した。残念ながら、患者の 7 0 % 超が、デノボ ( d e n o v o ) を有するか、又はトラスツズマブに対する耐性を発生し、そのため、これらの患者は、分子特異的治療の選択肢がないままになっている。従って、 H E R 2 + 乳癌を有する女性患者のための改善された療法を見出すことが早急に求められている。

10

## 【 0 0 0 3 】

いくつかの研究は、 H E R 2 + 乳癌における耐性機構として P 1 3 K / A k t 経路の異常調節を示している。しかし、 A k t は、多くの非癌関連経路に参与していることから、阻害は、多くのオフターゲット及び恐らく望ましくない作用を招く恐れがあり、そのため、より癌特異的な標的が要望される。従って、どのようにして H E R 2 が実際に侵入を促進し、且つどのようにして P I 3 K シグナル伝達の上方制御がトラスツズマブ耐性を促進するかについての別の機構をみいださなければならない。

20

## 【 0 0 0 4 】

インテグリンは、一部の細胞表面タンパク質を含む細胞外タンパク質のヘテロ二量体膜貫通細胞表面受容体である。これらは、細胞外環境を、細胞内細胞骨格及びシグナル伝達機構と一体化し、細胞挙動を調節する時空間メッセージを伝達する。従って、インテグリンは、接着、移動、増殖、生存及び分化を含むほとんどの正常な細胞プロセスの中心的要素である。インテグリン発現及び又はシグナル伝達の異常調節は、上皮細胞のみによるプロセスの不適切な調節を通じた癌の発生と相関しており、通常、創傷治癒、発生、慢性炎症及び癌に起こるように、組織リモデリングを受ける細胞上にしか検出することができない。しかし、特定の癌、特に乳癌への、 V 6 などのインテグリンの関与はまだ解明されていない。

30

## 【 0 0 0 5 】

V 6 は、乳癌においてより侵襲性の表現型を促進し得るため、トラスツズマブ耐性を有する患者についての一部の実施形態では、新たな治療標的を提供することが現在明らかにされている。

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

40

## 【 0 0 0 6 】

従って、限定はされないが、乳癌及びトラスツズマブに対して耐性の乳癌を含む、 V 6 阻害に対して感受性の癌細胞を検出及び治療することが 1 つの目的である。また、限定はされないが、乳癌及びトラスツズマブに対して耐性の乳癌を含む、 V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の癌細胞を検出及び治療することも目的である。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 7 】

一態様は、動物における悪性腫瘍を治療する方法であり、この方法は、それを必要とする前記動物に、以下：

a . V 6 に特異的に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標

50

的化結合剤；及び

b．任意選択で、併用療法薬  
を治療有効用量で投与するステップを含む。

【 0 0 0 8 】

別の態様は、腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であり、この方法は、腫瘍細胞に、以下：

a． V 6 に特異的に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標  
的化結合剤；及び

b．任意選択で、併用療法薬  
を治療有効用量で投与するステップを含む。

【 0 0 0 9 】

さらに別の態様は、トラスツズマブ耐性腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であり、この方法は、前記細胞に、以下：

a． V 6 に特異的に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標  
的化結合剤；及び

b． H E R 2 に特異的に結合して、 H E R 2 へのリガンドの結合を阻害する H E R 2 標  
的化結合剤  
を治療有効用量で投与するステップを含む。

【 0 0 1 0 】

また別の態様は、患者における V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を診断  
する方法を包含し、この方法は、 V 6 及び H E R 2 の発現レベルを測定することにより、  
V 6 及び H E R 2 を過剰発現する腫瘍細胞の存在又は非存在について、患者試料  
を分析するステップを含み、 V 6 及び H E R 2 がいずれも過剰発現されていれば、患者  
は、 V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断される。

【 0 0 1 1 】

さらに別の実施形態は、患者における V 6 阻害に対して感受性の癌を診断及び治療  
する方法を包含し、この方法は、 V 6 レベルを測定することにより、 V 6 を過剰  
発現する癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、 V  
6 が過剰発現されていれば、患者は、 V 6 阻害に対して感受性の癌を有すると診断  
されるステップと、診断された患者に、以下：

a． V 6 に特異的に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標  
的化結合剤  
を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【 0 0 1 2 】

さらに、一実施形態は、患者における H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を診断及び治  
療する方法を包含し、この方法は、 V 6 及び H E R 2 のレベルを測定することにより、  
V 6 及び H E R 2 を過剰発現する乳癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を  
分析するステップであって、 V 6 及び H E R 2 がいずれも過剰発現されていれば、患者  
は、 V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断されるステップと、  
診断された患者に、以下：

a． H E R 2 に特異的に結合して、 H E R 2 へのリガンドの結合を阻害する H E R 2 標  
的化結合剤  
を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【 0 0 1 3 】

別の実施形態は、患者における V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を診断  
及び治療する方法を包含し、この方法は、 V 6 及び H E R 2 のレベルを測定すること  
により、 V 6 及び H E R 2 を過剰発現する乳癌細胞の存在又は非存在について、患者  
試料を分析するステップであって、 V 6 及び H E R 2 がいずれも過剰発現されていれ  
ば、患者は、 V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断されるステ  
ップと、診断された患者に、以下：

a． V 6 に特異的に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標

10

20

30

40

50

的化結合剤；及び

b．H E R 2 に特異的に結合して、H E R 2 へのリガンドの結合を阻害する H E R 2 標的化結合剤

を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【 0 0 1 4 】

さらに別の態様は、患者試料における V 6 阻害に対して感受性の癌を治療する方法を包含し、この方法は、患者試料が、V 6 を過剰発現する癌細胞を含有するか否かを決定するための試験を要請するステップと、患者試料が、V 6 を過剰発現する癌細胞を含有していれば、以下：

a．V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤 10

を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【 0 0 1 5 】

また別の態様は、患者試料における V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を治療する方法を包含し、この方法は、患者試料が、V 6 及び H E R 2 を過剰発現する癌細胞を含有するか否かを決定するための試験を要請するステップと、患者試料が、V 6 及び H E R 2 を過剰発現する癌細胞を含有していれば、以下：

a．V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

b．H E R 2 に特異的に結合して、H E R 2 へのリガンドの結合を阻害する H E R 2 標的化結合剤 20

を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態は、V 6 を阻害することにより治療することができる患者において、V 6 阻害に対して感受性の癌を診断する方法を包含し、この方法は、以下：

a．対象からの生体試料を取得するステップ；

b．試料に、V 6 に特異的に結合する V 6 標的化結合剤を適用するステップであって、V 6 の存在によって、V 6 標的化結合剤 - V 6 複合体が形成されるステップ；

c．ステップ b ) の複合体が、V 6 過剰発現を示すレベルで検出される場合、侵襲性形態の乳癌を診断するステップ 30

を含む。

【 0 0 1 7 】

別の態様は、V 6 及び H E R 2 を阻害することによって治療することができる患者において、V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を診断する方法を包含し、この方法は、以下：

a．対象からの生体試料を取得するステップ；

b．試料に、V 6 に特異的に結合する V 6 標的化結合剤を適用するステップであって、V 6 の存在によって、V 6 標的化結合剤 - V 6 複合体が形成されるステップ； 40

c．任意選択で、試料に、H E R 2 に特異的に結合する H E R 2 標的化結合剤を適用するステップであって、H E R 2 の存在によって、H E R 2 結合剤 - H E R 2 複合体が形成されるステップ；並びに

d．ステップ b ) 及び c ) の複合体が、V 6 及び H E R 2 過剰発現を示すレベルで検出される場合、侵襲性形態の乳癌を診断するステップ 50

を含む。

【 0 0 1 8 】

別の目的及び利点は、以下に行う説明に一部を記載し、一部は、その説明から明らかになるか、又は実施によって理解され得る。これらの目的及び利点は、添付する特許請求の範囲で具体的に指摘される要素及び組み合わせを用いて、実現及び達成されるであろう。

## 【 0 0 1 9 】

以上の概要及び以下の詳細な説明はいずれも、例示及び説明のために過ぎず、特許請求の範囲を限定するものではないことを理解すべきである。

## 【 0 0 2 0 】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する添付の図面は、１つ（複数）の実施形態を例示し、説明と一緒に、本明細書に記載する原理を説明する上で役立つ。

本発明はまた、以下に関する。

## [項目 1]

動物における悪性腫瘍を治療する方法であって、それを必要とする前記動物に、以下：

a . V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

b . 任意選択で、併用療法薬を治療有効用量で投与するステップを含む方法。

## [項目 2]

腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、前記腫瘍細胞に、以下：

a . V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

b . 任意選択で、併用療法薬を治療有効用量で投与するステップを含む方法。

## [項目 3]

V 6 が過剰発現される、項目 1 又は 2 に記載の方法。

## [項目 4]

前記併用療法薬が投与される、項目 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5]

前記 V 6 標的化結合剤及び前記併用療法薬が、同時に投与される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6]

前記 V 6 標的化結合剤及び前記併用療法薬が、順次投与される、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 7]

前記悪性腫瘍が、乳癌細胞、卵巣癌細胞、膵臓癌細胞、肺癌細胞、大腸癌細胞、頭頸部癌細胞、食道癌細胞、胃癌細胞、及び肝細胞癌細胞から選択される腫瘍細胞を含む、項目 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 8]

前記動物が、ヒトである、項目 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 9]

前記併用療法薬が、HER2 に特異的に結合して、HER2 へのリガンドの結合を阻害する HER2 標的化結合剤である、項目 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 10]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、HER-2 阻害剤、トラスツズマブ、Herc e p t i n（登録商標）、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクッス、ドセタセル、EGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤、ゲフィチニブ、AZD9291、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、TNF 変換酵素阻害剤、放射線照射、5-フルオロウラシル、セツキシマブ、PI3K 阻害剤、ATK 阻害剤、AZD5363、MK2206、ラパログ、エベロリムス AZD2014、PI3K 阻害剤、PI3K 阻害剤、AZD8186、GSK2636771、SAR260301、PanPI3K 阻害剤、GDC0941、GDC0942、MEK/RAF 阻害剤、ベムラファニブ、RAF 阻害剤、セルエメチニブ、MEK 阻害剤、トラメチニブ、MEK 阻害剤、PD-1 阻害剤、PDL1 阻害剤、又は CTLA4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 1 1]

前記腫瘍細胞が、乳癌細胞である、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 1 2]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、HER-2 阻害剤、トラスツズマブ、Herceptin (登録商標)、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクッス、ドセタキセル、EGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤、ゲフィチニブ、AZD9291、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、TNF 変換酵素阻害剤、放射線照射、5 - フルオロウラシル、セツキシマブ、PI3K 阻害剤、ATK 阻害剤、AZD5363、MK2206、ラパログ、エベロリムスAZD2014、PI3K 阻害剤、PI3K 阻害剤、AZD8186、GSK2636771、SAR260301、PanPI3K 阻害剤、GDC0941、GDC0942、MEK/RAF 阻害剤、ベムラファニブ、RAF 阻害剤、セルエメチニブ、MEK 阻害剤、トラメチニブ、MEK 阻害剤、PD-1 阻害剤、PDL1 阻害剤、又はCTLA4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

## [項目 1 3]

前記腫瘍細胞が、卵巣癌細胞である、項目 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 1 4]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、HER-2 阻害剤、トラスツズマブ、Herceptin (登録商標)、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクッス、ドセタキセル、EGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤、ゲフィチニブ、AZD9291、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、TNF 変換酵素阻害剤、放射線照射、5 - フルオロウラシル、セツキシマブ、PI3K 阻害剤、ATK 阻害剤、AZD5363、MK2206、ラパログ、エベロリムスAZD2014、PI3K 阻害剤、PI3K 阻害剤、AZD8186、GSK2636771、SAR260301、PanPI3K 阻害剤、GDC0941、GDC0942、MEK/RAF 阻害剤、ベムラファニブ、RAF 阻害剤、セルエメチニブ、MEK 阻害剤、トラメチニブ、MEK 阻害剤、PD-1 阻害剤、PDL1 阻害剤、又はCTLA4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

## [項目 1 5]

前記乳癌細胞が、トラスツズマブ治療に対して耐性である、項目 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

## [項目 1 6]

前記卵巣癌細胞が、トラスツズマブ治療に対して耐性である、項目 1 ~ 1 0、1 3 又は 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 1 7]

前記HER2 標的化結合剤が、トラスツズマブである、項目 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 1 8]

前記 V 6 標的化結合剤が、sc264RADである、項目 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

## [項目 1 9]

V 6 及びHER2 を阻害する、項目 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 2 0]

V 6、HER2、HER3、及びB6 の少なくとも 1 つのレベルが下方制御される、項目 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 2 1]

V 6 及び/又はHER2 の少なくとも 1 つの下流標的のレベルが下方制御される、項目 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 2 2]

Akt2 及びSmad2 の少なくとも 1 つのレベルが下方制御される、項目 1 ~ 2 1 の

50

いずれか一項に記載の方法。

[項目 2 3]

前記標的の全レベルが下方制御される、項目 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 4]

前記標的のホスホレベルが下方制御される、項目 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 5]

2 種以上の V 6 標的化結合剤が使用される、項目 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 6]

2 種以上の併用療法薬が使用される、項目 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 7]

前記腫瘍細胞が、膵臓癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 8]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、HER-2 阻害剤、トラスツズマブ、Herceptin (登録商標)、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクセス、ドセタキセル、EGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤、ゲフィチニブ、AZD9291、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、TNF 変換酵素阻害剤、放射線照射、5 - フルオロウラシル、セツキシマブ、PI3K 阻害剤、ATK 阻害剤、AZD5363、MK2206、ラパログ、エベロリムス AZD2014、PI3K 阻害剤、PI3K 阻害剤、AZD8186、GSK2636771、SAR260301、PanPI3K 阻害剤、GDC0941、GDC0942、MEK/RAF 阻害剤、ベムラファニブ、RAF 阻害剤、セルエメチニブ、MEK 阻害剤、トラメチニブ、MEK 阻害剤、PD-1 阻害剤、PDL1 阻害剤、又は CTLA4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 2 9]

前記腫瘍細胞が、肺癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 0]

前記肺癌細胞が、腺癌細胞、扁平上皮癌細胞、又は小細胞肺癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 又は 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 1]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、HER-2 阻害剤、トラスツズマブ、Herceptin (登録商標)、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクセス、ドセタキセル、EGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤、ゲフィチニブ、AZD9291、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、TNF 変換酵素阻害剤、放射線照射、5 - フルオロウラシル、セツキシマブ、PI3K 阻害剤、ATK 阻害剤、AZD5363、MK2206、ラパログ、エベロリムス AZD2014、PI3K 阻害剤、PI3K 阻害剤、AZD8186、GSK2636771、SAR260301、PanPI3K 阻害剤、GDC0941、GDC0942、MEK/RAF 阻害剤、ベムラファニブ、RAF 阻害剤、セルエメチニブ、MEK 阻害剤、トラメチニブ、MEK 阻害剤、PD-1 阻害剤、PDL1 阻害剤、又は CTLA4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 2 6、2 9 又は 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 2]

前記腫瘍細胞が、大腸癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 3]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、HER-2 阻害剤、トラスツズマブ、Herceptin (登録商標)、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクセス、ドセタキセル、EGFR 阻害剤、VEGFR 阻害剤、ゲフィチニブ、AZD9291、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、TNF 変換酵素阻害剤、放射線照射、5 - フルオロウラシル、セツキシマブ、

10

20

30

40

50



P I 3 K 阻害剤、A T K 阻害剤、A Z D 5 3 6 3、M K 2 2 0 6、ラパログ、エベロリムス A Z D 2 0 1 4、P I 3 K 阻害剤、P I 3 K 阻害剤、A Z D 8 1 8 6、G S K 2 6 3 6 7 7 1、S A R 2 6 0 3 0 1、P a n P I 3 K 阻害剤、G D C 0 9 4 1、G D C 0 9 4 2、M E K / R A F 阻害剤、ベムラファニブ、R A F 阻害剤、セルエメチニブ、M E K 阻害剤、トラメチニブ、M E K 阻害剤、P D - 1 阻害剤、P D L 1 阻害剤、又は C T L A 4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 2 6 又は 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 4]

前記腫瘍細胞が、頭頸部癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 5]

前記併用療法薬が、トラスツズマブ、H E R - 2 阻害剤、トラスツズマブ、H e r c e p t i n (登録商標)、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノクセス、ドセタキセル、E G F R 阻害剤、V E G F R 阻害剤、ゲフィチニブ、A Z D 9 2 9 1、エルロチニブ、プラチナ系細胞傷害剤、プラチナ系トリプレット、トリプレット化学療法薬、ソラファニブ、T N F 変換酵素阻害剤、放射線照射、5 - フルオロウラシル、セツキシマブ、P I 3 K 阻害剤、A T K 阻害剤、A Z D 5 3 6 3、M K 2 2 0 6、ラパログ、エベロリムス A Z D 2 0 1 4、P I 3 K 阻害剤、P I 3 K 阻害剤、A Z D 8 1 8 6、G S K 2 6 3 6 7 7 1、S A R 2 6 0 3 0 1、P a n P I 3 K 阻害剤、G D C 0 9 4 1、G D C 0 9 4 2、M E K / R A F 阻害剤、ベムラファニブ、R A F 阻害剤、セルエメチニブ、M E K 阻害剤、トラメチニブ、M E K 阻害剤、P D - 1 阻害剤、P D L 1 阻害剤、又は C T L A 4 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 2 6 又は 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

[項目 3 6]

前記腫瘍細胞が、食道癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 7]

前記併用療法薬が、放射線照射又は化学療法薬から選択される、項目 1 ~ 2 6 又は 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 8]

前記腫瘍細胞が、胃癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 3 9]

前記併用療法薬が、トリプレット化学療法薬である、項目 1 ~ 2 6 又は 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 4 0]

前記腫瘍細胞が、肝細胞癌細胞である、項目 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 1]

前記併用療法薬が、ソラファニブ及び T A C E ( T N F 変換酵素) 阻害剤から選択される、項目 1 ~ 2 6 又は 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 2]

トラスツズマブ耐性腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であって、前記細胞に、以下：

a . V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

b . H E R 2 に特異的に結合して、H E R 2 へのリガンドの結合を阻害する H E R 2 標的化結合剤  
を治療有効用量で投与するステップを含む方法。

40

[項目 4 3]

前記 H E R 2 標的化結合剤が、トラスツズマブである、項目 4 2 に記載の方法。

[項目 4 4]

前記 V 6 標的化結合剤が、s c 2 6 4 R A D である、項目 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 4 5]

前記 V 6 標的化結合剤が、モノクローナル抗体である、項目 1 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

50

## [項目 4 6]

前記 V 6 標的化結合剤が、完全ヒトモノクローナル抗体である、項目 1 ~ 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 4 7]

前記 V 6 標的化結合剤が、HT29 細胞の TGF- $\beta$  LAP 媒介性接着の 99% 超を阻害する、項目 1 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 4 8]

前記 V 6 標的化結合剤が、0.070  $\mu$ g/ml 未満の IC50 で、HT29 細胞の TGF- $\beta$  LAP 媒介性接着を阻害する、項目 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 4 9]

前記 V 6 標的化結合剤が、35 ナノモル (nM) 未満の Kd で、V 6 に結合する、項目 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 0]

前記 V 6 標的化結合剤が、25 ナノモル (nM) 未満の Kd で、V 6 に結合する、項目 1 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 1]

前記 V 6 標的化結合剤が、10 ナノモル (nM) 未満の Kd で、V 6 に結合する、項目 1 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 2]

前記 V 6 標的化結合剤が、60 ピコモル (pM) 未満の Kd で、V 6 に結合する、項目 1 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 3]

前記 V 6 標的化結合剤が、モノクローナル抗体 sc264RAD、sc264RAD/ADY、sc188SDM、sc133、sc133TMT、sc133WDS、sc133TMT/WDS、sc188、sc254、sc264 又は sc298 である、項目 1 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 4]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 14 のアミノ酸 98 ~ 102 を有する少なくとも VH CDR3 を含む、項目 1 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 5]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 22 のアミノ酸 99 ~ 113 を有する少なくとも VH CDR3 を含む、項目 1 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 6]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 26 のアミノ酸 99 ~ 117 を有する少なくとも VH CDR3 を含む、項目 1 ~ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 7]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 30 のアミノ酸 99 ~ 114 を有する少なくとも VH CDR3 を含む、項目 1 ~ 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 8]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 38 のアミノ酸 97 ~ 113 を有する少なくとも VH CDR3 を含む、項目 1 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 5 9]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 14 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 0]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 22 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 1]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 26 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## [項目 6 2]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 3 0 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 3]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 3 8 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 4]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 7 1 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 5]

前記 V 6 標的化結合剤が、配列番号 7 5 の配列を有する重鎖ポリペプチドを含む、項目 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 6]

前記 V 6 標的化結合剤が、以下：

- a . C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む重鎖可変領域と；
- b . C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域と

を含む単離されたヒトモノクローナル抗体を含み、

前記重鎖可変領域 C D R 3 配列は、配列番号 1 4、配列番号 2 2、配列番号 2 6、配列番号 3 0 又は配列番号 3 8、配列番号 7 1、配列番号 7 6、配列番号 7 9 及びこれらの保存的配列修飾物から選択されるアミノ酸配列を含み、

前記軽鎖可変領域 C D R 3 配列は、配列番号 1 6、配列番号 2 4、配列番号 2 8、配列番号 3 2 又は配列番号 4 0、配列番号 8 5、配列番号 9 3、及びこれらの保存的配列修飾物から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 ~ 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 7]

前記 V 6 標的化結合剤が、V 6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、以下：

- a . 配列番号 7 7 の配列を含む軽鎖配列、
- b . 配列番号 2 4 の配列を含む軽鎖配列、
- c . 配列番号 4 0 の配列を含む軽鎖配列；及び
- d . 配列番号 2 8 の配列を含む軽鎖配列

から選択される軽鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 8]

前記 V 6 標的化結合剤が、V 6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、配列番号 7 7 を含む前記軽鎖配列を含む、項目 1 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 6 9]

前記 V 6 標的化結合剤が、V 6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、配列番号 2 4 を含む前記軽鎖配列を含む、項目 1 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 7 0]

前記 V 6 標的化結合剤が、V 6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、以下：

- a . 配列番号 7 5 の配列を含む重鎖配列、
- b . 配列番号 2 2 の配列を含む重鎖配列、
- c . 配列番号 3 8 の配列を含む重鎖配列；及び
- d . 配列番号 2 6 の配列を含む重鎖配列

から選択される重鎖可変領域を含む、項目 1 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 7 1]

前記 V 6 標的化結合剤が、V 6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、配列番号 7 5 を含む軽鎖配列を含む、項目 1 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

## [項目 7 2]

前記 V 6 標的化結合剤が、V 6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は

10

20

30

40

50

、配列番号 22 を含む軽鎖配列を含む、項目 1 ~ 71 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 73]

前記 V6 標的化結合剤が、V6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、以下：

- a . 配列番号 77 の配列を含む軽鎖配列及び配列番号 75 の配列を含む重鎖配列、
- b . 配列番号 24 の配列を含む軽鎖配列及び配列番号 22 の配列を含む重鎖配列、
- c . 配列番号 40 の配列を含む軽鎖配列及び配列番号 38 の配列を含む重鎖配列；並びに

d . 配列番号 28 の配列を含む軽鎖配列及び配列番号 26 の配列を含む重鎖配列から選択される重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含む、項目 1 ~ 72 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 74]

前記 V6 標的化結合剤が、V6 に結合する単離された抗体を含み、前記抗体は、以下：

- a . 配列番号 75 の重鎖可変領域 CDR1、CDR2、及び CDR3 配列と；
  - b . 配列番号 77 の軽鎖可変領域 CDR1、CDR2、及び CDR3 配列と
- を含む、項目 1 ~ 73 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 75]

患者における V6 及び HER2 阻害に対して感受性の乳癌を診断する方法であって、V6 及び HER2 の発現レベルを測定することにより、V6 及び HER2 を過剰発現する腫瘍細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップを含み、V6 及び HER2 がいずれも過剰発現されていれば、前記患者は、V6 及び HER2 阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断される方法。

20

[項目 76]

患者における V6 阻害に対して感受性の癌を診断及び治療する方法であって、V6 のレベルを測定することにより、V6 を過剰発現する癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、V6 が過剰発現されていれば、前記患者は、V6 阻害に対して感受性の癌を有すると診断されるステップと、前記診断された患者に、以下：

- a . V6 に特異的に結合して、V6 へのリガンドの結合を阻害する V6 標的化結合剤を治療有効用量で投与するステップとを含む方法。

30

[項目 77]

HER2 のレベルを測定するステップも含み、HER2 が過剰発現されていれば、前記患者は、HER2 阻害に対して感受性の癌を有すると診断される、項目 76 に記載の方法。

[項目 78]

患者における HER2 阻害に対して感受性の乳癌を診断及び治療する方法であって、V6 及び HER2 のレベルを測定することにより、V6 及び HER2 を過剰発現する乳癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、V6 及び HER2 がいずれも過剰発現されていれば、前記患者は、V6 及び HER2 阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断されるステップと、前記診断された患者に、以下：

40

- a . HER2 に特異的に結合して、HER2 へのリガンドの結合を阻害する HER2 標的化結合剤を治療有効用量で投与するステップとを含む方法。

[項目 79]

患者における V6 及び HER2 阻害に対して感受性の乳癌を診断及び治療する方法であって、V6 及び HER2 のレベルを測定することにより、V6 及び HER2 を過剰発現する乳癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、V6 及び HER2 がいずれも過剰発現されていれば、前記患者は、V6 及び

50

HER2 阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断されるステップと、前記診断された患者に、以下：

a. V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

b. HER2 に特異的に結合して、HER2 へのリガンドの結合を阻害する HER2 標的化結合剤

を治療有効用量で投与するステップとを含む方法。

[項目 8 0]

患者試料における V 6 阻害に対して感受性の癌を治療する方法であって、患者試料が、V 6 を過剰発現する癌細胞を含有するか否かを決定するための試験を要請するステップと、前記患者試料が、V 6 を過剰発現する癌細胞を含有していれば、以下：

10

a. V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤

を治療有効用量で投与するステップとを含む方法。

[項目 8 1]

患者試料における V 6 及び HER2 阻害に対して感受性の乳癌を治療する方法であって、患者試料が、V 6 及び HER2 を過剰発現する癌細胞を含有するか否かを決定するための試験を要請するステップと、前記患者試料が、V 6 及び HER2 を過剰発現する癌細胞を含有していれば、以下：

a. V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

20

b. HER2 に特異的に結合して、HER2 へのリガンドの結合を阻害する HER2 標的化結合剤

を治療有効用量で投与するステップとを含む方法。

[項目 8 2]

前記発現レベルが、タンパク質発現を測定することにより測定される、項目 7 5 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 8 3]

前記発現レベルが、mRNA 発現を測定することにより測定される、項目 7 5 ~ 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

30

[項目 8 4]

前記 V 6 発現レベルが、ITGB6 の mRNA 発現を測定することにより測定される、項目 8 3 に記載の方法。

[項目 8 5]

前記 V 6 発現レベルが増大する、項目 8 3 又は 8 4 に記載の方法。

[項目 8 6]

V 6 を阻害することにより治療することができる患者において、V 6 阻害に対して感受性の癌を診断する方法であって、以下：

a. 対象からの生体試料を取得するステップ；

b. 前記試料に、V 6 に特異的に結合する V 6 標的化結合剤を適用するステップであって、V 6 の存在によって、V 6 標的化結合剤 - V 6 複合体が形成されるステップ；

40

c. ステップ b) の前記複合体が、V 6 過剰発現を示すレベルで検出される場合、侵襲性形態の乳癌を診断するステップを含む方法。

[項目 8 7]

V 6 及び HER2 を阻害することによって治療することができる患者において、V 6 及び HER2 阻害に対して感受性の乳癌を診断する方法であって、以下：

a. 対象からの生体試料を取得するステップ；

b. 前記試料に、V 6 に特異的に結合する V 6 標的化結合剤を適用するステッ

50

プであって、 V 6 の存在によって、 V 6 標的化結合剤 - V 6 複合体が形成されるステップ；

c . 任意選択で、前記試料に、 H E R 2 に特異的に結合する H E R 2 標的化結合剤を適用するステップであって、 H E R 2 の存在によって、 H E R 2 結合剤 - H E R 2 複合体が形成されるステップ；並びに

d . ステップ b ) 及び c ) の前記複合体が、 V 6 及び H E R 2 過剰発現を示すレベルで検出される場合、侵襲性形態の乳癌を診断するステップを含む方法。

[項目 8 8]

V 6 及び / 又は H E R 2 が、腫瘍細胞染色の程度及び / 又は腫瘍細胞染色の強度により検出される、項目 7 5 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

[項目 8 9]

V 6 及び / 又は H E R 2 が、 0 = 0 %、 1 = < 2 5 %、 2 = 2 5 ~ 5 0 %、 3 = > 5 0 % ~ 7 5 %、及び 4 = > 7 5 % であるスコアリングシステムを用いて、前記腫瘍細胞染色の程度により検出される、項目 7 5 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9 0]

V 6 及び / 又は H E R 2 が、 0 = 陰性、 1 = 弱、 2 = 中、 3 = 強の腫瘍細胞染色スコアの強度により検出される、項目 7 5 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9 1]

スコアリングにおいて、前記腫瘍細胞染色の程度のスコアと前記染色の強度のスコアとが合計されるとき、前記 V 6 は、それが 5 の最終スコアを有する場合に、過剰発現されると判定される、項目 7 5 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

20

[項目 9 2]

スコアリングにおいて、前記腫瘍細胞染色の程度のスコアと前記染色の強度のスコアとが合計されるとき、前記 H E R 2 は、それが 5 の最終スコアを有する場合に、過剰発現されると判定される、項目 7 5 ~ 9 1 のいずれか一項に記載の方法。

[項目 9 3]

各サンプルが、 2 人以上の病理学者によってスコアリングされ、且つ前記スコアが平均される、項目 7 5 ~ 9 2 のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

30

【 0 0 2 1 】

【図 1】「インテグリン V 6 及び H E R 2 の高度共発現によって、乳癌患者における低い生存率が予測される」と題される。インテグリン V 6 発現状態による Kaplan・マイヤー ( K a p l a n - M e i e r ) 曲線。チェックマークは、分析の時点でまだ生存していた患者又は打ち切られた患者を示す。P 値は全てログランク検定を指す。6 . 2 G 2 抗体 ( B i o g e n I d e c ) を用いて、インテグリン V 6 について免疫組織化学的に染色した (茶色の染色) ( A ) 正常組織及び ( B ) 癌性乳癌組織切片。インテグリン V 6 状態 (高い発現は赤色、低い発現は黒色) によるロンドン ( C ) 及びノッティンガム ( D ) からの乳癌患者の 2 つのコホートにおける全生存率。腫瘍において低発現に対する、高インテグリン V 6 を有する患者の P 値は < 0 . 0 0 0 0 1 である。 ( E ) インテグリン V 6 状態による総合ロンドン及びノッティンガム患者コホートからの H E R 2 + 患者の全生存率。低腫瘍に対する、高インテグリン V 6 状態を有する患者の P 値は < 0 . 0 0 1 である。 ( F ) インテグリン V 6 状態による M E T A B R I C コホートからの H E R 2 + 患者の全生存率。高い I T G B 6 を発現する腫瘍を有する患者の生存率は、低い発現の腫瘍に対して、有意に低い ( P 値 = 0 . 0 0 3 )。図 1 0 及び 1 1 も参照されたい。

40

【図 2 A】「乳癌細胞株浸潤は、インテグリン V 6 及び H E R 2 の両方に依存性である」と題される。 ( A ) フローサイトメトリーにより評価される乳癌細胞株パネルにおけるインテグリン V 6 及び H E R 2 の発現。アイソタイプ対照は黒、インテグリン V 6 は青、 H E R 2 発現は赤でそれぞれ示す (分析した細胞株の全パネルについては図 1

50

2を参照のこと)。

【図2B-D】「乳癌細胞株浸潤は、インテグリン  $\alpha_6$  及びHER2の両方に依存性である」と題される。(B)様々なレベルのインテグリン  $\alpha_6$  及びHER2を発現する乳癌細胞株のトランスウェル浸潤アッセイ。 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルを接種し、72時間後に、浸潤した細胞の数を計数した。(C)及び(D)乳癌細胞株浸潤は、インテグリン  $\alpha_6$  依存性である。細胞をIgG若しくは  $\alpha_6$  遮断抗体 ( $\alpha_6$  抗体) ( $101 \text{ Jg/ml}$ ) のいずれかをを用いた30分間のインキュベーション(C)か、又は対照若しくはJ36 siRNA ( $201 \text{ JM}$ ) による72時間のトランスフェクション(D)のいずれかに供した後、前述のようにトランスウェル浸潤アッセイに付した。 $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。図7も参照されたい。

10

【図2E-F】「乳癌細胞株浸潤は、インテグリン  $\alpha_6$  及びHER2の両方に依存性である」と題される。(E)及び(F)乳癌細胞株浸潤はHER2依存性である。細胞を、IgG若しくはトラスツズマブ (TRA) ( $101 \text{ Jg/ml}$ ) で30分間前処置する(E)か、又は対照若しくはHER2 siRNA ( $201 \text{ JM}$ ) により72時間トランスフェクトした(F)後、トランスウェル浸潤アッセイに付した。 $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。図7も参照されたい。

【図2G】「乳癌細胞株浸潤は、インテグリン  $\alpha_6$  及びHER2の両方に依存性である」と題される。(G)細胞を、IgG、P6Ab、TRA (全て  $101 \text{ Jg/ml}$ )、又は遮断抗体の組み合わせで30分間前処置した後、トランスウェル浸潤アッセイに付した。全ての実験は、3回反復で実施し、代表的実験を表示する ( $n = 6 \pm \text{SD}$ )。  $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。図7も参照されたい。

20

【図3A-B】「HER2駆動浸潤は、インテグリン  $\alpha_6$  依存性である。インテグリン  $\alpha_6$  及びHER2を過剰発現する細胞株のトランスウェル浸潤アッセイ」と題される。 $\alpha_6$  遮断抗体 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) (A)又はトラスツズマブ (TRA) ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) (B)の存在及び非存在下、IgG、HRG ( $1 \mu\text{M}$ ) で細胞を30分間前処置した後、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルをトランスウェル浸潤アッセイに接種した。72時間後に、浸潤した細胞の数を計数した。全ての実験は、3回反復で実施し、代表的実験を表示する ( $n = 6 \pm \text{SD}$ )。  $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。

【図3C】「HER2駆動浸潤は、インテグリン  $\alpha_6$  依存性である。インテグリン  $\alpha_6$  及びHER2を過剰発現する細胞株のトランスウェル浸潤アッセイ」と題される。(C)MCF10.CA1a (CA1a)細胞株の器官型浸潤。IgG、 $\alpha_6$  遮断抗体若しくはTRA ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) で細胞を30分間前処置するか、又は  $\alpha_6$  若しくはHER2に対する siRNAで72時間トランスフェクト ( $20 \mu\text{M}$ ) した後、接種した。 $5 \times 10^4$ 細胞をコラーゲン: MRC5/hTERT線維芽細胞を含有するマトリゲルのゲルの上部に接種した。5~7日のインキュベーション後、ゲルを生理食塩水中に固定した。ゲルをパラフィン包埋し、切断してから、切片をH&E染色に付した。倍率バー =  $10 \mu\text{M}$ 。ヒストグラムによって、前述の処置による各細胞の浸潤を浸潤指数として定量する。実験は、3回反復で実施し ( $n = 2$ /実験)、代表的実験を表示する。 $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。

30

40

【図4A-C】「乳癌異種移植片成長は、 $\alpha_6$  依存性である」と題される。(A)ヒトBT-474腫瘍を有するマウスをIgG (黒)、264RAD (青)、トラスツズマブ (TRA) (赤)又は264RAD+TRA (緑) ( $10 \text{ mg/kg}$ ; i.p.) で、連続2週間にわたり週2回処置した。データは、平均腫瘍体積  $\pm \text{SEM}$  ( $n = 4$ マウス/群)として表示する。腫瘍が  $100 \text{ mm}^3$ に達したら、処置を開始した。(B)ヒトHER2-18腫瘍を有するマウスを(A)のように処置した。(C)(A)に概説した処置後の代表的BT-474及びHER2-18異種移植片の写真画像。倍率バー =  $5 \text{ mm}$ 。 $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。

【図4D】「乳癌異種移植片成長は、 $\alpha_6$  依存性である」と題される。(D)BT-474異種移植片タンパク質発現。異種移植片を(A)のように処置してから、採取し、

50

タンパク質を抽出した後、免疫ブロッティングに付した。プロットを、表示タンパク質についてプロブした。

【図4E】「乳癌異種移植片成長は、V6依存性である」と題される。(E)光学密度( $n = 3$ つの個別の腫瘍 $\pm$ SEM)により決定した(D)に示すプロットからの相対タンパク質発現のヒストグラム。 $*P = 0.05$ 、 $**P = 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 。

【図4F】「乳癌異種移植片成長は、V6依存性である」と題される。(F及びG)(D及びE)に概説したとおりのHER2-18異種移植片タンパク質発現及び定量。

【図4G】「乳癌異種移植片成長は、V6依存性である」と題される。(F及びG)(D及びE)に概説したとおりのHER2-18異種移植片タンパク質発現及び定量。

【図5A-D】「264RADは、トラスツズマブの抗腫瘍性を増強すると共に、ヒト異種移植片MCF-7/HER2-18細胞増殖を阻害し、生存を延長して、SCIDマウスにおけるV6、HER2、HER3、Akt2及びSmad2を低減する」と題される。ヒトMCF-7/HER2-18腫瘍を有するマウスをIgG(黒)、264RAD(青)、トラスツズマブ(TRA)(赤)又は264RAD+TRA(緑)(10mg/kg; i.p.)で、連続6週間にわたり週2回処置した。データは、平均腫瘍体積 $\pm$ SEM( $n > 5$ マウス/群)として表示する。いずれか1つの寸法で腫瘍が4mmに達したとき(A)、及び腫瘍が200mm<sup>3</sup>に達したとき( $n > 6$ マウス/群)(B)、処置を開始した。(C)カプラン・マイヤー生存プロットは、(B)に示すより大きな腫瘍の試験からのマウスの生存率を示す。(D)(A)での処置マウスからの腫瘍を表示の標的についての免疫ブロッティングにより分析した(併用療法で処置した異種移植片は根絶されたため、分析のために入手できなかった)。アクチン免疫プロットは、等しいタンパク質投入を示す。

【図5E】「264RADは、トラスツズマブの抗腫瘍性を増強すると共に、ヒト異種移植片MCF-7/HER2-18細胞増殖を阻害し、生存を延長して、SCIDマウスにおけるV6、HER2、HER3、Akt2及びSmad2を低減する」と題される。(E)(D)からのタンパク質発現レベルの変化を定量するヒストグラム(アクチン補正)。

【図5F】「264RADは、トラスツズマブの抗腫瘍性を増強すると共に、ヒト異種移植片MCF-7/HER2-18細胞増殖を阻害し、生存を延長して、SCIDマウスにおけるV6、HER2、HER3、Akt2及びSmad2を低減する」と題される。(F)HER2-18腫瘍異種移植片におけるV6発現の免疫組織化学的分析。異種移植片を固定し、切断した後、(A)に概説した6週間の処置後、又は264RAD+トラスツズマブ(264RAD+TRA)による2週間の処置後に、P6発現について染色した。倍率バー=101JM。

【図6A-D】「インテグリンV6及びHER2の高度共発現によって、乳癌患者の低い長期生存率が予測される」と題される。インテグリンV6発現状態によるカプラン・マイヤー曲線。チェックマークは、分析の時点でまだ生存していた患者又は打ち切られた患者を示す。P値は全てログランク検定を指す。インテグリンV6状態によるロンドン(A)及びノッティンガム(B)コホートからの乳癌患者の15年全生存率。腫瘍における低発現(黒)に対する、高いインテグリンV6(赤)を有する患者のP値は、それぞれ、 $P = 0.006$ 及び $P = 0.002$ である。(C)インテグリンV6状態による総合ロンドン及びノッティンガム患者コホートからのHER2陽性患者の15年全生存率。低腫瘍に対する、高インテグリンV6状態を有する患者のP値は $< 0.001$ である。(D)ITGB6遺伝子状態によるMETABRICコホートからのHER2陽性患者の15年全生存率。低発現腫瘍に対する、高インテグリンV6状態を有する患者のP値は、 $P = 0.048$ である。

【図7A-C】(A)264RADは、HER2-18及びCA1a細胞において浸潤を阻害する上で、1005V6遮断抗体と同程度に有効である。インテグリンV6及びHER2を過剰発現する細胞を、IgG、又はV6遮断抗体1005又は264

10

20

30

40

50



RAD (10  $\mu$ g/ml) で30分間前処置した後、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルをトランスウェル浸潤アッセイに接種した。72時間後、浸潤した細胞を計数した。全ての実験は、3回反復で実施し、代表的実験を表示する ( $n = 6 \pm SD$ )。\*P = 0.05、\*\*P = 0.01、\*\*\*P < 0.001。(B) 増殖は、7日間にわたり、V6及び/又はHER抗体遮断により影響されなかった。0.5 ~  $2 \times 10^3$ 細胞/ウェルを接種してから24時間後に、二重チャコール処理済FCS培地中で48時間増殖させた。48時間後、IgG、又はV6遮断抗体264RAD、トラスツズマブ (TRA) (全て10  $\mu$ g/ml) 又は遮断抗体の組み合わせで細胞を7日間処置した。7日後、細胞をMTSアッセイに付し、「増殖」(ミトコンドリア活性を表す)を7日目のIgG処置細胞と比較してプロットした。全ての実験は、3回反復で実施し、代表的実験を表示する ( $n = 6 \pm SD$ )。(C) V6及びHER2は、細胞膜に共局在化する。MCF-7/HER2-18 (HER2-18) 及びMCF10.CA1a (CA1a) 細胞をV6 (赤) (1005、Millipore) 及びHER2 (緑) (Cell Signaling Technology) 抗体で、それぞれAlexa-488及びAlexa647の二次コンジュゲートと共に標識した。DAPI (青) を用いて、核染色を実施した。試料をZeiss LSM710共焦点顕微鏡で画像化した。倍率バー = 10  $\mu$ M。

【図8】「浸潤は、TGF 依存性であり、V6の遮断が、TGF リガンド又はTGF RIIの存在又は非存在下、浸潤をインビトロで阻害する」と題される。インテグリン V6及びHER2を過剰発現する細胞株のトランスウェルマトリゲル浸潤アッセイ。細胞を72時間TGF RII siRNA処置に付した後、TGF (5 ng/ml) の存在又は非存在下、264RAD (10  $\mu$ g/ml) で処置し、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルをトランスウェル浸潤アッセイに接種した。72時間後、浸潤した細胞を計数した。全ての実験は、3回反復で実施し、代表的実験を表示する ( $n = 6 \pm SD$ )。\*P = 0.05、\*\*P = 0.01、\*\*\*P < 0.001。

【図9】「インテグリン V6依存性浸潤はAkt2を介する」と題される。インテグリン V6及びHER2を過剰発現する細胞株のトランスウェル浸潤アッセイ。対照又はAkt1、Akt2若しくはAkt1+2 siRNA (20 nM) で72時間のトランスフェクションのために細胞を前処置した(A)後、 $5 \times 10^4$ 細胞/ウェルをトランスウェル浸潤アッセイに接種した。72時間後に、浸潤した細胞の数を計数した。全ての実験は、3回反復で実施し、代表的実験を表示する ( $n = 6 \pm SD$ )。siRNAタンパク質ノックダウンの代表的免疫プロットを挿入。\*P = 0.05、\*\*P = 0.01。(B) MCF10.CA1a (CA1a) 細胞株の器官型浸潤。細胞を(A)と同様に前処置した後、接種した。 $5 \times 10^4$ 細胞をコラーゲン:MRC5/hTERT線維芽細胞を含有するマトリゲルのゲルの上部に接種した。5~7日のインキュベーション後、ゲルを生理食塩水中に固定した。ゲルをパラフィン包埋し、切断してから、切片をH&E染色に付した。倍率バー = 10  $\mu$ M。ヒストグラムによって、前述の処置による浸潤を浸潤指数として定量する。実験は、3回反復で実施し ( $n = 2$  / 実験)、代表的実験を表示する。\*P = 0.05、\*\*P = 0.01。

【図10】「乳癌患者のロンドン及びノッティンガムコホートの臨床病理学的特徴」と題される表である。

【図11】「乳癌における従来の予後指標とV6との関連」と題される表である。

【図12】「乳癌細胞株のパネルにおけるV6及びHER2発現及び受容体状態」と題される表である。Neve et al (2006) 及びSubik et al (2010) により定義される分子サブタイプ及び受容体状態。マトリゲルを通した浸潤によって決定される浸潤性向。平均蛍光強度 (MFI) としてフローサイトメトリーにより決定される発現: 0 ~ 10 = -, 11 ~ 25 = +, 26 ~ 50 = ++, 51 ~ 100 = +++、> 100 = ++++、ND、未確定。

【図13】乳癌におけるV6及びHER2発現の試験で使用される抗体のリストである。

【図14】精製済モノクローナル抗体が、V6に結合して、それとGST-LAPペ

10

20

30

40

50

プチドとの結合を阻止し得る能力を示す線グラフである。

【図15A - B】分子mAb濃度の関数としての平均した幾何平均蛍光（GMF）のプロットを示す線グラフであり、ヒト V<sub>6</sub> 抗原を安定して発現するK562細胞への1つの抗体の結合親和性を推定するために用いた。図15Aには、mAb188についての親和性データを示す。図15Bは、mAb264RADについての親和性データを示す。

【図16A - B】精製済モノクローナル抗体が、V<sub>6</sub> インテグリンを安定して発現する293細胞において補体依存性細胞傷害を媒介する能力を示す棒グラフである。

【図16C - E】精製済モノクローナル抗体が、V<sub>6</sub> インテグリンを安定して発現する293細胞において補体依存性細胞傷害を媒介する能力を示す棒グラフである。

【図17】Detroit-562鼻咽頭細胞株を用いて、抗体264RAD、133及び188SDMが腫瘍増殖を阻害する能力を示す棒グラフである。

【図18】264RADと264RAD/ADYとの活性の比較を示す棒グラフである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

配列表

実施形態は、表1に列举する具体的抗 V<sub>6</sub> 抗体を包含する。この表は、対応する重鎖及び軽鎖遺伝子の可変ドメインの配列番号と共に、各抗 V<sub>6</sub> 抗体の識別番号を記載する。各抗体には、識別番号が付与され、これは、「sc」の文字と、これに続く数字を含む。

【0023】

【表1】

表1

mAb ID 番号	配列	配列 番号
sc 49	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	1
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	2
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	3
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	4
sc 58	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	5
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	6
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	7
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	8
sc 97	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	9
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	10
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	11
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	12
sc 133	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	13
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	14
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	15
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	16
sc 161	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	17
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	18
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	19
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	20

mAb ID 番号	配列	配列 番号
sc 188	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	21
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	22
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	23
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	24
sc 254	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	25
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	26
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	27
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	28
sc 264	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	29
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	30
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	31
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	32
sc 277	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	33
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	34
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	35
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	36
sc 298	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	37
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	38
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	39
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	40
sc 320	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	41
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	42
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	43
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	44
sc 374	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	45
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	46
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	47
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	48
sc 188 SDM	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	70
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	71
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	72
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	73
sc 264 RAD	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	74
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	75
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	76
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	77
sc 133 TMT	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	78
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	79
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	80
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	81
sc 133 WDS	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	82
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	83
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	84

10

20

30

mAb ID 番号	配列	配列 番号
sc 133 TMT/W DS	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	85
	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	86
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	87
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	88
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	89
sc 264 ADY	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	90
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	91
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	92
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	93
sc 264 RAD/A DY	重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	94
	重鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	95
	軽鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列	96
	軽鎖の可変領域をコードするアミノ酸配列	97

40

これから、本実施形態（例示的实施形態）を詳細に参照するが、その例を添付の図面に示す。可能である場合には、同じ又は類似部分を示すために図面全体を通じて同じ参照番号を使用する。

#### 【0025】

##### I. 定義

別に定義されない限り、本明細書で使用する科学及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上他の意味に解釈すべき場合を除いて、単数形の実語は、複数形を包含し、複数形の実語は、単数形を包含するものとする。一般に、本明細書に記載する細胞組織培養、分子生物学、タンパク質及びオリゴ若しくはポリヌクレオチド化学及びハイブリダイゼーションに関して、並びにそれらの技術において使用される名称は、当該技術分野において公知であり、且つ一般に用いられるものである。

10

#### 【0026】

組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、並びに組織培養及び形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）のために、標準的技術が使用される。酵素反応及び精製技術は、製造者の仕様書に従い、又は当該技術分野において一般に達成されるように、又は本明細書に記載されるように実施する。前述の技術及び手順は、一般に、当該技術分野において公知の従来の方法に従い、且つ、本明細書全体を通じて引用及び論述する様々な概略的及び具体的参照文献に記載されているように、実施する。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001))（これは、本明細書によって参照により援用される）を参照されたい。本明細書に記載する分析化学、合成有機化学、並びに医学及び薬化学に関して、並びにその実験手順及び技術において使用される名称は、当該技術分野において公知であり、且つ一般に用いられるものである。化学的合成、化学的分析、医薬調製、製剤化、及び送達、並びに患者の治療のために、標準的技術が使用される。

20

#### 【0027】

本開示に従い使用されるように、下記の実語は、別に指示されない限り、以下の意味を有すると理解される。

30

#### 【0028】

本明細書で使用されるとき、実語「及び／又は」は、2つの指定される特徴又は成分の各々を他方と共に、又は他方なしで具体的に開示するものとして理解すべきである。例えば、「A及び／又はB」は、(i) A、(ii) B、及び(iii) A及びBの各々が、本明細書において個別に記載されているのと全く同様に、各々の具体的開示として理解すべきである。

#### 【0029】

アンタゴニストは、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、低分子量化合物、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、RNA干渉(RNAi)、アンチセンス、組換えタンパク質、抗体、又はこれらのコンジュゲート若しくは融合タンパク質であってよい。RNAiについて詳しくは、Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. (Pharmacol Rev. 2003 Dec; 55(4): 629-48. Review.) を、またアンチセンスについては、Opalinska JB, Gewirtz AM. (Sci STKE. 2003 Oct 28; 2003(206): pe47.) を参照されたい。

40

#### 【0030】

「V6」の疾患関連異常活性化又は発現は、任意の異常な、望ましくない、又は病的細胞接着、例えば、腫瘍関連細胞接着であってよい。細胞接着関連疾患としては、限定はされないが、白血病、多発性骨髄腫又はリンパ腫などの非固形腫瘍、並びにまた、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞（肝臓）癌、膠芽腫、甲状腺、胆管、

50

骨、胃 ( g a s t r i c )、脳 / C N S、頭頸部、肝臓系、胃 ( s t o m a c h )、前立腺、乳房、腎臓、精巣、卵巣、皮膚、子宮頸部、肺、筋肉、ニューロン、食道、膀胱、肺、子宮、陰門、内膜、腎臓、大腸、脾臓、胸膜 / 腹膜、唾液腺、及び表皮の癌腫などの固形腫瘍が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

化合物とは、約 2 0 0 0 ダルトン未満の分子量を有する任意の低分子量化合物を指す。

【 0 0 3 2 】

用語「 V 6 」は、 V 鎖及び 6 鎖から構成されるヘテロ二量体インテグリン分子を指す。

【 0 0 3 3 】

用語「中和する」は、抗体などの標的化結合剤に関して述べるとき、標的抗原の活性を消失させるか、又は有意に低下させる前記標的化結合剤の能力に関する。従って、「中和」抗 V 6 抗体は、 V 6 の活性を消失させるか、又は有意に低下させることができる。中和 V 6 抗体は、例えば、T G F L A P がインテグリン V 6 に結合するのを阻止することにより作用し得る。この結合の阻止により、 V 6 媒介性細胞接着が有意に、又は完全に消失する。理想的には、 V 6 に対する中和抗体は、細胞接着を阻害する。

【 0 0 3 4 】

本明細書で使用されるとき、用語「単離されたポリヌクレオチド」は、その天然に存在する環境から単離されたポリヌクレオチドを意味する。かかるポリヌクレオチドは、ゲノム、c D N A、又は合成のいずれであってもよい。一部の実施形態では、単離されたポリヌクレオチドは、それらが天然で結合するポリヌクレオチドの全部又は一部と結合していない。単離されたポリヌクレオチドは、天然で連結していない別のポリヌクレオチドと作動可能に連結していてもよい。さらに、単離されたポリヌクレオチドは、より大きな配列の一部として天然に存在しないものでもよい。

【 0 0 3 5 】

本明細書で言及されるとき、用語「単離されたタンパク質」は、その天然に存在する環境から単離されたタンパク質を意味する。かかるタンパク質は、ゲノム D N A、c D N A、組換え D N A、組換え R N A、若しくは合成起原又はこれらのいくつかの組み合わせのいずれに由来するものであってもよく、その起原、又は供給源のために、「単離されたタンパク質」は、( 1 ) 天然に存在するタンパク質と結合していない、( 2 ) 同じ供給源由来の他のタンパク質を含まない、例えば、マウスタンパク質を含まない、( 3 ) 異なる種由来の細胞によって発現される、又は( 4 ) 天然に存在しない。

【 0 0 3 6 】

用語「ポリペプチド」は、本明細書において、或るポリペプチド配列の天然タンパク質、断片、又は類似体を指す一般名称として用いられる。従って、天然タンパク質、断片、又は類似体は、ポリペプチド属の種である。ポリペプチドは、ヒト重鎖免疫グロブリン分子及びヒト 軽鎖免疫グロブリン分子、並びに軽鎖免疫グロブリン分子 ( 例えば、若しくは 軽鎖免疫グロブリン分子 ) を有する重鎖免疫グロブリン分子、及びその逆を含む組み合わせにより形成される抗体分子、並びにその断片及び類似体を含んでもよい。ポリペプチドはまた、単独でヒト重鎖免疫グロブリン分子又はその断片を含んでもよい。

【 0 0 3 7 】

用語「天然に存在する」は、本明細書において或る対象物に適用して使用されるとき、対象物を天然に見出すことができることを指す。例えば、天然の供給源から単離することができる生物 ( ウイルスを含む ) 中に存在し、実験室又はその他において人間により意図的に修飾されていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【 0 0 3 8 】

本明細書で使用されるとき、用語「作動可能に連結した」は、そのように表現される要素の位置を指し、かかる位置は、これらの要素が、その意図される様式で機能することを可能にする関係にある。例えば、コード配列に「作動可能に連結した」制御配列は、コー

10

20

30

40

50

ド配列の発現が、制御配列と適合可能な条件下で達成されるように連結される。

【 0 0 3 9 】

用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書において言及されるとき、長さが少なくとも 10 塩基のヌクレオチド、リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドのいずれか又はいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾形態、又は RNA - DNA ヘテロ二本鎖のポリマー形態を意味する。この用語は、DNA の一本鎖及び二本鎖形態を包含する。

【 0 0 4 0 】

本明細書において言及される用語「オリゴヌクレオチド」は、天然、及び非天然の連結により互いに連結された天然に存在するヌクレオチド、並びに修飾されたヌクレオチドを包含する。オリゴヌクレオチドは、一般に 200 塩基以下の長さを有するポリヌクレオチドサブセットである。オリゴヌクレオチドは、長さが 10 ~ 60 塩基であってもよく、別の実施形態では、これらは、12、13、14、15、16、17、18、19、又は 20 ~ 40 塩基の長さであってもよい。オリゴヌクレオチドは、通常、例えば、プローブの場合、一本鎖であるが；オリゴヌクレオチドは、例えば、遺伝子突然変異体の構築に使用する場合、二本鎖であってもよい。オリゴヌクレオチドは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドのいずれであってもよい。

【 0 0 4 1 】

本明細書において言及される用語「天然に存在するヌクレオチド」は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを包含する。本明細書で言及される用語「修飾されたヌクレオチド」は、修飾又は置換された糖類などを有するヌクレオチドを包含する。本明細書で言及される用語「オリゴヌクレオチド連結」は、本明細書において、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート (phosphoranyl adate)、ホスホロアミデートなどのオリゴヌクレオチド連結を包含する。例えば、以下を参照されたい：L a P l a n c h e e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 1 4 : 9 0 8 1 ( 1 9 8 6 ) ; S t e c e t a l . , J . A m . C h e m . S o c . 1 0 6 : 6 0 7 7 ( 1 9 8 4 ) ; S t e i n e t a l . , N u c l . A c i d s R e s . 1 6 : 3 2 0 9 ( 1 9 8 8 ) ; Z o n e t a l . , A n t i - C a n c e r D r u g D e s i g n 6 : 5 3 9 ( 1 9 9 1 ) ; Z o n e t a l . , O l i g o n u c l e o t i d e s a n d A n a l o g u e s : A P r a c t i c a l A p p r o a c h , p p . 8 7 - 1 0 8 ( F . E c k s t e i n , E d . , O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s , O x f o r d E n g l a n d ( 1 9 9 1 ) ) ; S t e c e t a l . , 米 国 特 許 第 5 , 1 5 1 , 5 1 0 号 明 細 書 ; U h l m a n n a n d P e y m a n C h e m i c a l R e v i e w s 9 0 : 5 4 3 ( 1 9 9 0 ) ( これらの開示内容は、本明細書によって参照により援用される ) 。オリゴヌクレオチドは、必要に応じて、検出のための標識を含むことができる。

【 0 0 4 2 】

本明細書において言及される用語「選択的にハイブリダイズする」は、検出可能に、且つ特異的に結合することを意味する。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、及びそれらの断片は、非特異的な核酸との検出可能な結合の感知できる量を最小にする、ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で核酸の鎖に選択的にハイブリダイズする。高いストリジェンシー条件を用いて、当技術分野では公知であり、本明細書で論じられる選択的なハイブリダイゼーション条件を達成することができる。一般に、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、又は抗体断片と、目的の核酸配列との間の核酸配列の相同性は、少なくとも 80 % であり、より典型的には、相同性は少なくとも 85 %、90 %、95 %、99 %、及び 100 % と増加する。

【 0 0 4 3 】

用語「CDR 領域」又は「CDR」は、K a b a t e t a l . , 1 9 9 1 ( K a b a t , E . A . e t a l . , ( 1 9 9 1 ) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h E d i t i o n .

10

20

30

40

50

US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington) 及びその後の版により定義されるように、免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の高頻度可変領域を示すことを意図する。抗体は、典型的に、3つの重鎖CDRと3つの軽鎖CDRを含む。CDR又は複数のCDRという用語は、場合に応じて、抗体が認識する抗原又はエピトープに対する抗体の親和性による結合を担うアミノ酸残基の大部分を含有するこれらの領域の1つ若しくはいくつか、又は全部を示すために用いられる。

#### 【0044】

6つの短いCDR配列のうち、重鎖の第3CDR(HCDR3)は、より大きな可変性(主として、それをもたらす遺伝子の配置の機構に起因する、より大きな多様性)を有する。これは、2アミノ酸ほどの短いものでもよいが、知られている最長サイズは26である。また、CDR長さは、特定の基本的フレームワークにより収容され得る長さによっても変動し得る。機能に関して、HCDR3は、抗体の特異性の決定において部分的に役割を果たす(Segal et al., PNAS, 71: 4298-4302, 1974, Amit et al., Science, 233: 747-753, 1986, Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-917, 1987, Chothia et al., Nature, 342: 877-883, 1989, Caton et al., J. Immunol., 144: 1965-1968, 1990, Sharon et al., PNAS, 87: 4814-4817, 1990, Sharon et al., J. Immunol., 144: 4863-4869, 1990, Kabat et al., J. Immunol., 147: 1709-1719, 1991)。

#### 【0045】

本明細書で言及する用語「CDRのセット」は、CDR1、CDR2及びCDR3を含む。従って、HCDRのセットは、HCDR1、HCDR2及びHCDR3(HCDRは、可変重鎖CDRを指す)を指し、LCDRのセットは、LCDR1、LCDR2及びLCDR3(LCDRは、可変軽鎖CDRを指す)を指す。別に記載のない限り、「CDRのセット」は、HCDR及びLCDRを包含する。

#### 【0046】

2つのアミノ酸配列は、両配列間に、部分的又は完全な同一性がある場合、「相同的」である。例えば、85%相同性は、2つの配列が最大マッチングでアラインメントされたとき、85%のアミノ酸が同一であることを意味する。ギャップ(マッチしている2つの配列のいずれかにおける)が、マッチングを最大化するために許容され; 一部の実施形態では、5以下のギャップ長さが使用され、他の実施形態では、2以下のギャップ長さが使用される。或いは、この用語が本明細書において使用されるとき、2つのタンパク質配列(又は長さが少なくとも約30アミノ酸の、これら配列に由来するポリペプチド配列)は、これらが、突然変異データマトリックス及び6以上のギャップペナルティと共にプログラムALIGNを用いて、5を超える(標準偏差単位で)アラインメントスコアを有する場合には、相同的である。Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) and Supplement 2 to this volume, pp. 1-10を参照されたい。2つの配列又はそれらの部分は、ALIGNプログラムを用いて最適にアラインメントされるとき、それらのアミノ酸が50%以上同一である場合、相同的である。2つのオルソログな配列内における相同性の異なる領域があり得ることは認識されるべきである。例えば、マウス及びヒトオルソログの機能性部位は、非機能性領域より高度な相同性を有し得る。

#### 【0047】

用語「～に対応する」は、本明細書において、ポリヌクレオチド配列が、参照ポリヌクレオチド配列の全部又は一部分と相同的(すなわち、同一であり、進化的に厳密には関連

10

20

30

40

50

していない)であること、又はポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために用いられる。

【0048】

対比として、用語「～に相補的な」は、本明細書において、相補的な配列が、参照ポリヌクレオチド配列の全部又は一部分と相同的であることを意味するために用いられる。例示のために、ヌクレオチド配列「T A T A C」は、参照配列「T A T A C」に対応すると共に、参照配列「G T A T A」に対して相補的である。

【0049】

用語「配列同一性」は、2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸配列が、比較ウィンドウにわたって同一である(すなわち、ヌクレオチドごとに、又は残基ごとに)ことを意味する。用語「配列相同性の割合(%)」は、比較のウィンドウにわたって、最適にアラインメントされた2つの配列を比較し、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U、若しくはI)又はアミノ酸残基が両配列に存在する位置の数を決定して、一致した位置の数を取得し、一致した位置の数を、比較ウィンドウ(すなわちウィンドウサイズ)内の位置の総数で割り、得られた商に100を掛けて、配列同一性の割合(%)を得ることにより算出される。本明細書で使用されるとき、用語「実質的な同一性」は、ポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の特徴を表し、ここで、ポリヌクレオチド又はアミノ酸は、少なくとも18ヌクレオチド(6アミノ酸)位置の比較ウィンドウにわたり、多くの場合、少なくとも24~48ヌクレオチド(8~16アミノ酸)位置のウィンドウにわたり、参照配列と比較して、少なくとも85%の配列同一性、少なくとも90~95%の配列同一性、又は少なくとも99%の配列同一性を有する配列を含み、ここで、配列相同性の割合(%)は、参照配列を、比較ウィンドウにわたって参照配列の総計20%以下になる欠失又は付加を含み得る配列と比較することにより算出される。参照配列は、より大きい配列のサブセットであってよい。

【0050】

本明細書で使用されるとき、20種の一般的アミノ酸及びそれらの略語は、従来の使用法に従う。本明細書によって参照により援用される、Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))を参照されたい。20種の従来のアミノ酸の立体異性体(例えば、D-アミノ酸)(-、-二置換アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の特殊なアミノ酸などの非天然アミノ酸)もまた、本発明のポリペプチドの好適な成分であり得る。特殊なアミノ酸の例としては、以下: 4-ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタメート、-N, N, N-トリメチルリシン、-N-アセチルリシン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、-N-メチルアルギニン、並びに他の類似のアミノ酸及びイミノ酸(例えば4-ヒドロキシプロリン)が挙げられる。本明細書で使用するポリペプチド表記において、標準用法及び慣例に従い、左側方向がアミノ末端方向であり、右側方向がカルボキシ-末端方向である。

【0051】

同様に、他に明記されていない限り、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端は5'末端であり; 二重鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は5'方向と称される。新生RNA転写物の5'から3'への付加の方向は転写方向と称され; RNAと同一の配列を有するDNA鎖上の配列領域で、RNA転写物の5'末端の5'側は「上流配列」と称され、RNAと同一の配列を有するDNAストランド上の配列領域で、RNA転写物の3'末端の3'側は「下流配列」と称される。

【0052】

ポリペプチドに適用される場合、用語「実質的な同一性」とは、2つのペプチド配列が、プログラムGAP又はBESTFITなどにより最適にアラインメントされたとき、デフォルトギャップ重量を用いて、少なくとも80%配列同一性、少なくとも90%配列同



一性、少なくとも95%配列同一性、又は少なくとも99%配列同一性を共有することを意味する。同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換によって異なる。保存的アミノ酸置換は、類似の側鎖を有する残基の可換性を指す。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシンであり；脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリン及びトレオニンであり；アミド-含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギン及びグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リシン、アルギニン、及びヒスチジンであり；硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システイン及びメチオニンである。保存的アミノ酸置換基は、以下：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン-アスパラギン、及びアスパラギン-グルタミンである。

10

#### 【0053】

本明細書において論述される場合、抗体又は免疫グロブリン分子のアミノ酸配列におけるわずかな変化が考慮されるが、但し、アミノ酸配列の変化は、本明細書に記載の抗体又は免疫グロブリン分子と少なくとも約75%、少なくとも80%、90%、95%、又は約99%配列同一性を維持する。特に、保存的アミノ酸置換が考慮される。保存的置換は、関連する側鎖を有するアミノ酸のファミリー内で起こるものである。遺伝的にコードされたアミノ酸は、大まかに以下：(1)酸性=アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩；(2)塩基性=リシン、アルギニン、ヒスチジン；(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び(4)非荷電極性=グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンのファミリーに区分される。一実施形態では、ファミリーは、以下：セリン及びトレオニンは、脂肪族-ヒドロキシファミリーであり；アスパラギン及びグルタミンは、アミド含有ファミリーであり；アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシンは、脂肪族ファミリーであり；また、フェニルアラニン、トリプトファン、及びチロシンは芳香族ファミリーである。例えば、イソロイシン又はバリンによるロイシンの、グルタミン酸塩によるアスパラギン酸塩の、セリンによるトレオニンの独立した置換、又は構造的に関連したアミノ酸によるアミノ酸の類似の置換は、とりわけ、置換がフレームワーク部位内のアミノ酸を含まない場合、結合機能又は得られる分子の特性に大きな作用を及ぼさないであろうと予想することは理にかなっている。

20

30

#### 【0054】

アミノ酸の変化が機能性ペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の特定の活性をアッセイすることにより、容易に決定することができる。アッセイは、本明細書に詳細に記載されている。抗体又は免疫グロブリン分子の断片又は類似体は、当業者によって容易に調製することができる。一実施形態において、断片又は類似体の好ましいアミノ-及びカルボキシ-末端は、機能性ドメインの境界付近に生じる。構造的及び機能的ドメインは、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データを、公開又はプロプライエタリ配列データベースと比較することにより、同定することができる。公知の構造及び/又は機能の他のタンパク質中に生じる配列モチーフ又は推定タンパク質コンフォメーションドメインを同定するために、コンピュータ計算比較方法が用いられる。公知の三次元構造に折り畳まれるタンパク質配列を同定する方法は公知である。Bowie et al., (1991) Science 253:164。従って、前述の例は、当業者が、本明細書に記載の抗体に基づいて構造的及び機能性ドメインを定義するために用いられ得る配列モチーフ及び構造的コンフォメーションを認識することができることを示している。

40

#### 【0055】

別の態様は、添付の配列表である表1に示す抗体、本明細書に記載の抗体のいずれかのVHドメイン、又は表8若しくは表29に示すHCDR(例えば、HCDR1、HCDR2、又はHCDR3)と、少なくとも約60、70、80、85、90、95、98若しくは約99%のアミノ酸配列同一性を有するVHドメインを含む、ターゲティング結合剤

50

又は抗体分子である。ターゲティング結合剤又は抗体分子はまた、任意選択で、添付の配列表である表 1 に示す抗体、本明細書に記載の抗体のいずれかの V L ドメイン、又は表 9 若しくは表 30 に示す L C D R (例えば、L C D R 1、L C D R 2、又は L C D R 3) と、少なくとも約 60、70、80、85、90、95、98 若しくは約 99% のアミノ酸配列同一性を有する V L ドメインも含み得る。2 つのアミノ酸配列の同一性 (%) を算出するために用いることができるアルゴリズムは、例えば、B L A S T (A l t s c h u l e t a l . , ( 1 9 9 0 ) J . M o l . B i o l . 2 1 5 : 4 0 5 - 4 1 0 )、F A S T A (P e a r s o n a n d L i p m a n ( 1 9 8 8 ) P N A S U S A 8 5 : 2 4 4 4 - 2 4 4 8 )、又は S m i t h - W a t e r m a n アルゴリズム (S m i t h a n d W a t e r m a n ( 1 9 8 1 ) J . M o l B i o l . 1 4 7 : 1 9 5 - 1 9 7 ) を含み、例えば、デフォルトパラメータを使用する。一部の実施形態では、前述のようなアミノ酸配列同一性を有するターゲティング結合剤又は抗体は、参照される抗体と実質的に同じ活性を呈示する。例えば、実質的に同じ活性は、参照抗体の活性と、約 50%、40%、30%、20%、10%、5%、2%、1% 又はそれ未満しか変わらない少なくとも 1 つの活性を含む。

#### 【0056】

抗原結合部位は、一般に、相補性決定領域 (C D R) と呼ばれる 6 つの表面ポリペプチドループにより形成される抗原結合インターフェースと共に、可変重鎖 (V H) 及び可変軽鎖 (V L) 免疫グロブリンドメインによって形成される。フレームワーク領域 (F R) と共に、各 V H (H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3) 及び各 V L (L C D R 1、L C D R 2、L C D R 3) に 3 つの C D R がある。

#### 【0057】

典型的に、V H ドメインは、V L ドメインと対を成して、抗体抗原結合部位を付与するが、抗原に結合させるために、V H 又は V L ドメインを単独で用いてもよい。V H ドメイン (例えば、表 1 からの) が V L ドメイン (例えば、表 1 からの) と対を成して、V H 及び V L ドメインの両方を含む抗体抗原結合部位を形成するようにしてもよい。本明細書に開示する他の V H 及び V L ドメインについても、同様の実施形態が提供される。他の実施形態では、表 8 又は表 29 に示す V H 鎖は、異種 V L ドメインと対を成す。軽鎖混雑 (l i g h t - c h a i n p r o m i s c u i t y) が当該技術分野において十分に確立されている。やはり、同様の実施形態が、本明細書に開示する他の V H 及び V L ドメインについても提供される。従って、親抗体又は表 9 若しくは表 30 の抗体鎖のいずれかの V H は、親抗体又は表 1 の抗体若しくは他の抗体のいずれかの V L と対を成し得る。

#### 【0058】

抗原結合部位は、開示する H 及び / 又は L C D R のセット内に 20、16、10、9 以下、例えば、1、2、3、4 若しくは 5 つものアミノ酸付加、置換、欠失、及び / 又は挿入を有する、親抗体又は表 1 中の抗体のいずれかの H 及び / 又は L C D R のセットを含んでもよい。或いは、抗原結合部位は、開示する H 及び / 又は L C D R のセット内に 20、16、10、9 以下、例えば、1、2、3、4 若しくは 5 つものアミノ酸置換を有する、親抗体若しくは表 1 の抗体のいずれかの H 及び / 又は L C D R のセットを含んでもよい。かかる修飾は、C D R のセット内の任意の残基で実施され得る。

#### 【0059】

一実施形態では、アミノ酸置換は：(1) タンパク質分解に対する感受性を低減させ、(2) 酸化に対する感受性を低減させ、(3) タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させ、(4) 結合親和性を変化させると共に、(4) かかる類似体の他の物理化学的若しくは機能的特性を付与又は修飾するものである。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々なムテインを含み得る。例えば、単一又は多重アミノ酸置換 (一実施形態では、保存的アミノ酸置換) を、天然に存在する配列において (一実施形態では、分子間接触を形成するドメイン外部のポリペプチドの部分において実施してもよい。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造的特徴を実質的に変化させるべきではない (例えば、置換アミノ酸は、親配列に存在するヘリックスを破壊、又は親配列を特徴付ける他の

タイプの二次構造を崩壊させる傾向があってはならない)。当該技術分野において認識されているポリペプチド二次及び三次構造の例は、*Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)) ; *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)) ; 及び Thornton et al. *Nature* 354 : 105 (1991) に記載されており、これらは各々、本明細書によって参照により援用される。

#### 【0060】

別の態様は、添付の配列表である表1に列挙する抗体、若しくは本明細書に記載する抗体のいずれかのVHドメイン、又は表8若しくは表29に示すHCDR(例えば、HCDR1、HCDR2、又はHCDR3)と、少なくとも約60、70、80、85、90、95、98若しくは約99%のアミノ酸配列同一性を有するVHドメインを含む、抗体分子である。抗体分子はまた、任意選択で、添付の配列表である表1に示す抗体、若しくは本明細書に記載する抗体のいずれかのVLドメイン、又は表9若しくは表30に示すLCDR(例えば、LCDR1、LCDR2、又はLCDR3)と、少なくとも60、70、80、85、90、95、98若しくは99%のアミノ酸配列同一性を有するVLドメインも含み得る。2つのアミノ酸配列の同一性(%)を算出するために用いることができるアルゴリズムは、例えば、BLAST(Altschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215 : 405 - 410)、FASTA(Pearson and Lipman (1988) *PNAS USA* 85 : 2444 - 2448)、又はSmith-Watermanアルゴリズム(Smith and Waterman (1981) *J. Mol. Biol.* 147 : 195 - 197)を含み、例えば、デフォルトパラメータを使用する。

#### 【0061】

アミノ酸配列が本明細書に記載され、V6のターゲティング剤及び抗体に使用することができるものを含むVH及びVLドメイン並びにCDRの変異体は、配列改変又は突然変異の方法、並びに所望の特徴を有する抗原ターゲティングのスクリーニング方法により、取得することができる。所望の特徴の例として、限定はされないが、以下のものが挙げられる：抗原に特異的な既知抗体に対する抗原の結合親和性の増大；活性がわかっている、抗原に特異的な既知抗体に対する抗原活性の中和の増大；特定のモル比で抗原に対する既知抗体若しくはリガンドとの指定競合能力；複合体を免疫沈降させる能力；指定エピトープに結合する能力；本明細書に記載するペプチド結合スキャンを用いて、例えば、線状及び/又は制約コンフォメーションにおいてスクリーニングされたペプチドを用いて、同定される線状エピトープ、例えば、ペプチド配列；非連続的残基によって形成される立体構造エピトープ；V6、又は下流分子の新たな生物活性を調節する能力。かかる方法は、本明細書にも記載される。

#### 【0062】

本明細書において、本明細書に開示される抗体分子の変異体を生成及び使用してもよい。構造/特性-活性関係への多変量データ分析技術の適用における計算化学に倣って(Wold, et al., *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics - Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984)、抗体の定量的活性-特性関係を、公知の数学的技法、例えば、統計学的回帰、パターン認識及び分類などを用いて導き出すことができる(Norman et al., *Applied Regression Analysis. Wiley-interscience; 3rd edition* (April 1998)) ; Kandel, Abraham & Backer, Eric. *Computer - Ass*

10

20

30

40

50

isted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995); Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000); Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999); Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002); Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery)。抗体の特性は、抗体配列、機能性及び三次元構造の経験及び理論モデル（例えば、予測接触残基又は計算物理化学的特性の分析）から導き出すことができ、これらの特性は、単独又は組み合わせて考えることができる。

10

20

#### 【0063】

VHドメイン及びVLドメインから構成される抗体抗原結合部位は、典型的に、ポリペプチドの6つのループによって形成される：3つは軽鎖可変ドメイン（VL）から、3つは重鎖可変ドメイン（VH）から。既知原子構造の抗体の分析によって、抗体の結合部位の配列及び三次元構造の間の関係が解明されている。これらの関係は、VHドメインにおける第3領域（ループ）を除いて、結合部位ループが、少数の主鎖コンフォメーション：標準構造の1つを有することを示している。特定のループ内に形成される標準構造は、そのサイズと、ループ及びフレームワーク領域の両方における重要な部位での特定の残基の存在によって決定されることがわかっている。

30

#### 【0064】

配列はわかっているが、三次元構造が未知の抗体において、そのCDRループの三次元構造を維持する上で重要な、従って、結合特異性を維持する残基の予測に、こうした配列-構造関係の研究を用いることができる。これらの予測は、リード最適化実験からのアウトプットと、上記予測を比較することにより、確認することができる。構造的アプローチでは、任意の無料で入手可能な又は市販のパッケージ（WAMなど）を用いて、抗体分子のモデルを作製することができる。次に、Insight II（Accelrys, Inc.）又はDeep Viewなどのタンパク質視覚化及び分析ソフトウェアパッケージを用いて、CDRの各位置で可能な置換を評価することができる。そして、この情報を用いて、活性に最小又は有益な作用をもたらす可能性がある置換を実施することができる。

40

#### 【0065】

CDR、抗体VH若しくはVLドメイン及び/又は結合剤のアミノ酸配列内に置換を実施するために必要な技術は、当該技術分野において一般に入手可能である。活性に最小又は有益な作用をもたらすと予測され得る、又は予測され得ない置換を用いて、変異型配列を作製して、これらを結合及び/若しくは中和する能力並びに/又は任意の他の要望される特性について試験することができる。

#### 【0066】

配列が本明細書に具体的に開示されるVH及びVLドメインのいずれかの可変ドメインアミノ酸配列変異体を、記載されるように使用してもよい。

50

## 【0067】

本明細書で使用されるとき、用語「ポリペプチド断片」は、アミノ - 末端及び / 又はカルボキシ - 末端欠失を有するが、残りのアミノ酸配列が、例えば、完全長 cDNA 配列から推定される天然に存在する配列における対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。断片は、典型的には、少なくとも約 5、6、8 又は 10 アミノ酸長、一実施形態では、少なくとも約 14 アミノ酸長、少なくとも約 20 アミノ酸長、少なくとも約 50 アミノ酸長、又は少なくとも約 70 アミノ酸長である。本明細書で使用されるとき、用語「類似体」は、推定アミノ酸配列の一部分と実質的な同一性を有すると共に、以下の特性の少なくとも 1 つを有する、少なくとも約 25 アミノ酸のセグメントからなるポリペプチドを指す：(1) 好適な結合条件下での V<sub>6</sub> に対する特異的結合、(2) 適切なりガンド / V<sub>6</sub> 結合を阻止する能力、又は (3) V<sub>6</sub> 活性を阻害する能力。典型的には、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に関して保存的アミノ酸置換 (又は付加若しくは欠失) を含む。類似体は、典型的には、少なくとも 20 アミノ酸長、少なくとも 50 アミノ酸長以上であり、また、多くの場合、天然に存在する完全長ポリペプチドと均等な長さを有し得る。

10

## 【0068】

ペプチド類似体は、通常、鑄型ペプチドのものと類似の特性を備える非ペプチド薬として、医薬品産業で用いられる。これらのタイプの非ペプチド化合物は、「ペプチドミメティクス (peptide mimetics)」又は「ペプチド模倣薬 (peptidomimetics)」と呼ばれる。本明細書によって参照により援用される、Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986); Veber and Freidinger, TINS p. 392 (1985); 並びに Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987)。かかる化合物が、多くの場合、コンピュータ化分子モデリングの支援により開発されている。治療的に有用なペプチドに構造的に類似するペプチドミメティクスは、均等な治療又は予防効果をもたらすために用いることができる。一般に、ペプチド模倣薬は、ヒト抗体などのパラダイムポリペプチド (すなわち、生化学的特性又は薬理学的活性を有するポリペプチド) に構造的に類似しているが、当該技術分野で公知の方法によって、 $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$  (シス及びトランス)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、及び  $CH_2SO-$  から選択される連結によって任意選択で置換される 1 つ又は複数のペプチド連結を有する。同じタイプの D - アミノ酸を有する共通配列の 1 つ又は複数のアミノ酸の系統的な置換 (例えば、L - リシンの代わりに D - リシン) を、より安定なペプチドを生成するために用いることができる。さらに、共有配列又は実質的に同一である共通配列変化を含む制約ペプチドは、当該技術分野において公知である方法 (本明細書によって参照により援用される、Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)) ; 例えば、ペプチドを環化させる分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することにより、生成することができる。

20

30

## 【0069】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、少なくとも 1 つの結合ドメインから構成され、結合ドメインを形成するポリペプチド鎖の折り畳みが、抗原の抗原決定基の特徴と相補的な内表面形状及び電荷分布の三次元結合空間を備えるポリペプチド又は一群のポリペプチドを指す。抗体は、典型的には四量体形態で、2 つの同一のポリペプチド鎖対を含み、各対は 1 つの「軽」鎖と 1 つの「重」鎖とを有する。各軽鎖 / 重鎖対の可変領域は、抗体結合部位を形成する。

40

## 【0070】

本明細書で使用されるとき、「標的化結合剤」とは、標的部位に結合し得る物質、例えば、抗体、又はその結合断片である。一実施形態において、標的化結合剤は、1 つの標的部位にのみ特異的である。他の実施形態において、標的化結合剤は、2 つ以上の標的部位に特異的である。一実施形態において、標的化結合剤はモノクローナル抗体であってもよ

50

く、標的部位は、エピトープであってもよい。以下に記載するように、標的化結合剤は、抗体の少なくとも1つの抗原結合部位を含んでもよく、その場合、前記ドメインは、異種タンパク質内に融合又は含有される。

#### 【0071】

抗体の「結合断片」は、組換えDNA技術により、又はインタクトな抗体の酵素的又は化学的開裂により生成される。結合断片としては、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、及び一本鎖抗体が挙げられる。「二重特異性」又は「二官能性」抗体以外の抗体は、同一のその結合部位の各々を有すると考えられている。抗体は、過剰量の抗体が、対抗受容体に結合した受容体の量を少なくとも約20%、40%、60%若しくは80%、及びより一般的には約85%超（インビトロ競合的結合アッセイで計測される）低減させる場合に、受容体の対抗受容体に対する接着を実質的に阻害する。

10

#### 【0072】

抗体は、単独で又は公知の技術によって提供される他のアミノ酸配列との組み合わせのいずれかで、オリゴクローナル、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDR-グラフト化抗体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、触媒抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、抗イディオタイプ抗体及び可溶性形態又は結合形態で標識化され得る抗体、並びにそれらの断片、変異体又は誘導体であってよい。抗体は、任意の種に由来するものであってよい。抗体という用語はまた、本明細書に記載の抗体の結合断片を含み；例示的な断片としては、Fv、Fab、Fab'、一本鎖抗体(scFv)、二量体可変領域(ダイアボディ)及びジスルフィド安定化可変領域(dsFv)が挙げられる。

20

#### 【0073】

全抗体の断片が、抗原に結合する機能を果たすことができることがわかっている。結合断片の例として、以下のものがある：(Ward, E. S. et al., (1989) Nature 341, 544-546) VL、VH、CL及びCH1ドメインから構成されるFab断片；(McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554)；VH及びCH1ドメインから構成されるFd断片；(Holt et al., (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490)；単一抗体のVL及びVHドメインから構成されるFv断片；(iv) VL又はVHドメインから構成されるdAb断片(Ward, E. S. et al., Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554, Holt et al., (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490]；(v) 単離されたCDR領域；(vi) F(ab')<sub>2</sub>断片、すなわち、2つの連結したFab断片を含む二価断片；(vii) VHドメイン及びVLドメインが、ペプチドリッカーによって連結され、これにより、2つのドメインが結合して、抗原結合部位を形成することが可能になる、一本鎖Fv分子(scFv)(Bird et al., (1988) Science, 242, 423-426, Huston et al., (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883)；(viii) 二重特異的一本鎖Fv二量体(PCT/US92/09965)及び(ix)「ダイアボディ」、すなわち、遺伝子融合により構築される多価若しくは多重特異性断片(国際公開第94/13804号パンフレット；Holliger, P. (1993) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, )。Fv、scFv又はダイアボディ分子は、VH及びVLドメインを連結するジスルフィド架橋の組みによって安定化することができる(Reiter, Y. et al., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996)。また、CH3ドメインに結合したscFvを含むミニボディも作製することができる(Hu, S. et al., (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061)。結合断片の他の例は、Fab'であり、これは、重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端での数個の残基の添加によってFab断片とは異なり、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステイン、及び

30

40

50

F a b ' - S H (定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持する F a b 断片である) などがある。

【 0 0 7 4 】

用語「エプトープ」は、免疫グロブリン又は T 細胞受容体に特異的に結合することができる任意のタンパク質決定因子を含む。エプトープ決定因子は、通常は、アミノ酸又は糖質側鎖などの分子の化学的に活性な表面集団からなり、また、常にではないが、特定の三次元構造的特徴、並びに特定の電荷特徴を有し得る。抗体は、解離定数が  $1 \mu\text{M}$ 、 $100 \text{ nM}$ 、又は  $10 \text{ nM}$  であるとき、抗原に特異的に結合するとされている。

【 0 0 7 5 】

用語「薬剤」は、本明細書では、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的な巨大分子、又は生物学的材料から作られた抽出物を意味するために使用される。

10

【 0 0 7 6 】

V<sub>6</sub> ヘテロ二量体ポリペプチドに関連して「活性な」又は「活性」は、天然 V<sub>6</sub> ポリペプチドの生物学的又は免疫学的活性を有する V<sub>6</sub> ヘテロ二量体ポリペプチドの一部分を指す。「生物学的」は、本明細書で使用されるとき、天然 V<sub>6</sub> ポリペプチドの活性によりもたらされる生物学的機能を指す。V<sub>6</sub> 生物活性は、例えば、V<sub>6</sub> 誘導性細胞接着を含む。

【 0 0 7 7 】

「哺乳動物」は、本明細書で使用されるとき、哺乳動物と見なされる任意の動物を指す。一実施形態では、哺乳動物はヒトである。

20

【 0 0 7 8 】

酵素、パパインでの抗体の消化は、抗原結合活性はないが、結晶化能力を有する「F a b」断片、及び「F c」断片としても知られる、2つの同一の抗原-結合断片をもたらす。酵素、ペプシンでの抗体の消化は、抗体分子の2つのアームが連結されたままであり、2抗原結合部位を含む、F ( a b ' )<sub>2</sub>断片をもたらす。F ( a b ' )<sub>2</sub>断片は、抗原を架橋する能力を有する。

【 0 0 7 9 】

「F v」は、本明細書で使用されるとき、抗原認識部位及び抗原-結合部位の両方を維持する抗体の最小断片を指す。

【 0 0 8 0 】

30

「F a b」は、本明細書で使用されるとき、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の C H 1 ドメインを含む抗体の断片を指す。

【 0 0 8 1 】

用語「m A b」は、モノクローナル抗体を指す。

【 0 0 8 2 】

「リボソーム」は、本明細書で使用されるとき、V<sub>6</sub> ポリペプチド又はかかる V<sub>6</sub> ポリペプチドに対する抗体を含み得る薬物の哺乳動物への送達に有用であり得る小さい媒体を指す。

【 0 0 8 3 】

「標識」又は「標識された」は、本明細書で使用されるとき、ポリペプチドに対する検出可能な部分、例えば、放射標識、蛍光標識、酵素標識、化学発光標識 ( c h e m i l u m i n e s c e n t l a b e l e d ) 又はビオチニル基の付加を指す。放射性同位元素又は放射性核種としては、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、<sup>15</sup>N、<sup>35</sup>S、<sup>90</sup>Y、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I を挙げることができ、蛍光標識としては、ローダミン、ランタニド蛍光体又は F I T C を挙げることができ、及び酵素標識としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼを挙げることができる。

40

【 0 0 8 4 】

別の標識は、例示として、限定はしないが、以下：酵素、例えば、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (「G 6 P D H」)、 $\alpha$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチルコリンステラーゼ、リゾチー

50

ム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ及びペルオキシダーゼ；色素が挙げられ；別の蛍光標識又は蛍光剤としては、フルオレセイン及びその誘導体、フルオロクロム、GFP（GFPは「緑色蛍光タンパク質」を表す）、ダンシル、ウンベリフェロン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o-フタルデヒド、及びフルオレスカミン；発蛍光団、例えば、ランタニドクリプテート及びキレート、例えば、ユウロピウムなど（Perkin Elmer and Cis Biointernational）；化学発光標識又は化学発光剤、例えば、イソルミノール、ルミノール及びジオキセタン；増感剤；補酵素；酵素基質；粒子、例えば、ラテックス又は炭素粒子；金属ゾル；量子；リポソーム；色素、触媒若しくは他の検出可能な基でさらに標識され得る細胞など；分子、例えば、ピオチン、ジゴキシゲニン又は5-プロモデオキシウリジン；毒素部分、例えば、以下：シュードモナス（Pseudomonas）外毒素（PE又はその細胞傷害性断片若しくは突然変異体）、ジプテリア（Diphtheria）毒素又はその細胞傷害性断片若しくは突然変異体、ボツリヌス毒素A、B、C、D、E若しくはF、リシン若しくはその細胞傷害性断片、例えば、リシンA、アブリン若しくはその細胞傷害性断片、サポリン若しくはその細胞傷害性断片、ヤマゴボウ（pokeweed）抗ウイルス毒素若しくはその細胞傷害性断片、及びプリオジン1若しくはその細胞傷害性断片の群から選択される毒素部分が挙げられる。

10

#### 【0085】

用語「医薬品又は薬物」は、本明細書で使用されるとき、患者に適切に投与されたときに所望の治療効果を誘導することが可能な化学的化合物又は組成物を指す。他の化学用語は、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms（Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco（1985））（本明細書によって参照により援用される）に例示されているように、当該技術分野における一般的使用法に従って使用される。

20

#### 【0086】

本明細書で使用されるとき、「実質的に純粋な」は、目的の種が主として存在する種である（すなわち、モル基準で、組成物中の他のいかなる個々の種よりも豊富にある）ことを意味し、しかも、実質的に純粋な画分は、目的の種が、存在する全巨大分子種の少なくとも約50パーセント（モル基準）を占める組成物であってもよい。概して、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する全巨大分子種の約80パーセント超、又は少なくとも約85%、90%、95%、及び99%超を含み得る。一態様において、目的の種は、ほぼ均質性（従来の検出方法では組成物中の混入種を検出することができない）まで精製され、ここで、組成物は、単一の巨大分子種からほぼ構成される。

30

#### 【0087】

用語「患者」は、ヒト及び獣医学対象を含む。

#### 【0088】

### II. 治療方法

#### A. V 6 過剰発現癌細胞の治療方法の概略

特定の癌における V 6 の役割が理解されているため、V 6 は、V 6 標的化結合剤を患者又は癌細胞に投与することによって、V 6 を阻害することが可能になり、これは、癌を治療するために、又は腫瘍細胞（限定はされないが、V 6 を過剰発現する癌細胞など）の増殖を阻害するために用いることができる。

40

#### 【0089】

V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤は、動物の悪性腫瘍（限定はされないが、乳癌など）を治療する方法に用いることができる。或いは、悪性腫瘍は、卵巣癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、頭頸部癌、食道癌、胃癌、及び肝細胞癌であってもよい。別の実施形態では、V 6 標的化結合剤は、限定はされないが、本パラグラフに記載する癌のタイプからの腫瘍細胞などの腫瘍細胞の増殖を阻害するために用いることができる。

#### 【0090】

50



一実施形態では、動物は、哺乳動物であってよい。別の実施形態では、動物はヒトであってよい。

#### 【0091】

かかる治療において、1つ又は複数の V 6 標的化結合剤を用いることができる。このように、単数形「1つの(a)」の使用は、複数形を包含する。

#### 【0092】

かかる方法は、単独で用いてもよく、或いは、悪性腫瘍又は腫瘍細胞が V 6 を過剰発現するという診断と組み合わせて用いてもよい。

#### 【0093】

一実施形態では、かかる方法は、記載の用量範囲内で、セクションIVに記載する V 6 標的化結合剤を使用する。一実施形態では、V 6 標的化結合剤は、モノクローナル抗体である。別の実施形態では、これは、完全ヒトモノクローナル実施形態である。また別の実施形態では、これは、sc264RADである。

#### 【0094】

一実施形態では、V 6 の少なくとも1つの下流標的のレベルが下方制御される。一実施形態では、Akt2及びSmad2の少なくとも1つのレベルが下方制御される。一実施形態では、標的の総レベルが下方制御される。別の実施形態では、標的のホスホレベルが下方制御される。下方制御は、タンパク質のレベルを決定することにより測定されるか、又は下方制御は、mRNAのレベルを決定することにより測定され得る。下方制御及び/又は阻害は、治療前と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、若しくは100%の低減を含む。

#### 【0095】

一実施形態では、乳癌細胞は、トラスツズマブに対して耐性である。従って、一実施形態は、トラスツズマブ耐性腫瘍細胞の増殖を抑制する方法を包含し、この方法は、前記細胞に、V 6 に特異的に結合して、V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤を治療有効用量で投与するステップを含む。

#### 【0096】

#### B. 併用療法

悪性腫瘍を治療するために、又は腫瘍細胞の増殖を阻害するために、V 6 阻害剤を用いる場合、V 6 標的化結合剤は、単独療法として投与してもよく、或いは、従来の外科手術又は放射線療法若しくは化学療法との併用療法において投与してもよい。かかる併用治療は、治療の個々の要素の同時、連続的、又は個別の投与方法により達成することができる。投与が連続的又は個別である場合、第2要素を投与する時間差は、併用の有益な効果を喪失しないようにすべきである。

#### 【0097】

V 6 標的化結合剤に加えて、1種又は複数の併用療法薬を用いてもよく；同様に、1種又は複数の V 6 標的化結合剤を用いてもよい。このように、単数形「1つの(a)」の使用は、複数形を包含する。かかる併用製剤は、記載の投薬量範囲内の本明細書に記載される V 6 標的化結合剤と、承認された投薬量範囲内の併用療法薬を使用する。

#### 【0098】

#### 1. 乳癌の併用療法

併用療法は、乳癌腫瘍の治療において、又は乳癌腫瘍細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

#### 【0099】

かかる方法は、単独で用いてもよく、或いは、方法は、悪性腫瘍又は腫瘍細胞が、V 6 を過剰発現する、HER2を過剰発現する、又は V 6 及びHER2を過剰発現するという診断と組み合わせて用いてもよい。

#### 【0100】

かかる方法は、単独で用いてもよく、或いは、方法は、悪性腫瘍又は腫瘍細胞が、V

10

20

30

40

50

6を過剰発現するという診断と組み合わせて用いてもよい。

【0101】

一実施形態では、乳癌細胞は、トラスツズマブに対して耐性である。従って、一実施形態は、トラスツズマブ耐性腫瘍細胞の増殖を抑制する方法を含み、この方法は、前記細胞に、V6に特異的に結合して、V6へのリガンドの結合を阻害するV6標的化結合剤と、HER2に特異的に結合して、HER2へのリガンドの結合を阻害するHER2標的化結合剤とを治療有効用量で投与するステップを含む。

【0102】

一実施形態では、併用療法薬は、トラスツズマブであってよい。別の実施形態では、併用療法薬は、HER2に特異的に結合して、HER2へのリガンドの結合を阻害するHER2標的化結合剤である。

10

【0103】

別の実施形態では、併用療法薬は、ゲムシタピン、ドセタキセル、EGFR阻害剤、HER-2阻害剤（限定はされないが、トラスツズマブ又はHerceptin（登録商標））、PI3K阻害剤（ATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206など）、ラパログ（例えば、エペロリムス）、AZD2014、PI3K阻害剤、PI3K阻害剤（AZD8186、GSK2636771、SAR260301）、PanPI3K阻害剤（GDC0941、GDC0942））、MEK/RAF阻害剤（例えば、ベムラファニブ（RAF阻害剤）、セルエメチニブ（MEK阻害剤）、トラメチニブ（MEK阻害剤）など）、PD-1阻害剤、PDL1阻害剤、又はCTLA4阻害剤であってもよい。

20

【0104】

一実施形態では、V6及び/又はHER2の少なくとも1つの下流標的のレベルが下方制御される。一実施形態では、Akt2及びSmad2の少なくとも1つのレベルが下方制御される。一実施形態では、標的の総レベルが下方制御される。別の実施形態では、標的のホスホレベルが下方制御される。下方制御は、タンパク質のレベルを決定することにより測定され得るか、又は下方制御は、mRNAのレベルを決定することにより測定され得る。下方制御は、治療前と比較して、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、若しくは100%の低減を含む。

30

【0105】

2. 卵巣癌の併用療法

併用療法は、卵巣癌腫瘍の治療において、又は卵巣癌腫瘍細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0106】

かかる方法は、単独で用いてもよく、或いは、方法は、悪性腫瘍又は腫瘍細胞が、V6を過剰発現する、HER2を過剰発現する、又はV6及びHER2を過剰発現するという診断と組み合わせて用いてもよい。

【0107】

かかる方法は、単独で用いてもよく、或いは、方法は、悪性腫瘍又は腫瘍細胞が、V6を過剰発現するという診断と組み合わせて用いてもよい。

40

【0108】

一実施形態では、卵巣癌細胞は、トラスツズマブに対して耐性である。従って、一実施形態は、トラスツズマブ耐性腫瘍細胞の増殖を抑制する方法を含み、この方法は、前記細胞に、V6に特異的に結合して、V6へのリガンドの結合を阻害するV6標的化結合剤と、HER2に特異的に結合して、HER2へのリガンドの結合を阻害するHER2標的化結合剤とを治療有効用量で投与するステップを含む。

【0109】

一実施形態では、併用療法薬は、トラスツズマブであってよい。

【0110】

50

別の実施形態では、併用療法薬は、ゲムシタピン、ドセタキセル、EGFR阻害剤、HER-2阻害剤（限定はされないが、トラスツズマブ又はHerceptin（登録商標）など）、PI3K阻害剤（ATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206など）、ラパログ（例えば、エベロリムス）、AZD2014、PI3K阻害剤、PI3K阻害剤（AZD8186、GSK2636771、SAR260301）、PanPI3K阻害剤（GDC0941、GDC0942）、MEK/RAF阻害剤（例えば、ベムラファニブ（RAF阻害剤）、セルエメチニブ（MEK阻害剤）、トラメチニブ（MEK阻害剤）など）、PD-1阻害剤、PDL1阻害剤、又はCTLA4阻害剤であってもよい。

【0111】

10

### 3．膵臓癌の併用療法

併用療法は、膵臓癌腫瘍の治療において、又は膵臓癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0112】

一実施形態では、併用療法薬は、ゲムシタピン、アブラキサン、フォルフィリノックス（5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、及びロイコボリンを用いる併用療法アプローチ）、EGFR阻害剤、HER-2阻害剤（限定はされないが、トラスツズマブ又はHerceptin（登録商標）など）、PI3K阻害剤（ATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206など）、ラパログ（例えば、エベロリムスなど）、AZD2014、PI3K阻害剤、PI3K阻害剤（AZD8186、GSK2636771、SAR260301）、PanPI3K阻害剤（GDC0941、GDC0942）、MEK/RAF阻害剤（例えば、ベムラファニブ（RAF阻害剤）、セルエメチニブ（MEK阻害剤）、トラメチニブ（MEK阻害剤）、PD-1阻害剤、PDL1阻害剤、又はCTLA4阻害剤であってもよい。

20

【0113】

### 4．肺癌の併用療法

併用療法は、肺癌腫瘍の治療において、又は肺癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。一実施形態では、癌は、腺癌、扁平上皮癌、又は小細胞肺癌であってもよい。

【0114】

30

一実施形態では、併用療法薬は、ゲフィチニブ（Iressa（登録商標））、AZD9291、エルロチニブ（Tarceva（登録商標））、プラチナ系細胞傷害剤、ドセタキセル、PI3K阻害剤（ATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206など）、ラパログ（例えば、エベロリムスなど）、AZD2014、PI3K阻害剤、PI3K阻害剤（AZD8186、GSK2636771、SAR260301）、PanPI3K阻害剤（GDC0941、GDC0942）、MEK/RAF阻害剤（ベムラファニブ（RAF阻害剤）、セルエメチニブ（MEK阻害剤）、トラメチニブ（MEK阻害剤）、PD-1阻害剤、PDL1阻害剤、又はCTLA4阻害剤であってもよい。

【0115】

### 5．大腸癌の併用療法

40

併用療法は、大腸癌腫瘍の治療において、又は大腸癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0116】

一実施形態では、併用療法薬は、ゲムシタピン、フォルフィリノックス、ドセタキセル、プラチナ系トリプレット、5-フルオロウラシル、セツキシマブ（Erbix（登録商標））、ラパログ（例えば、エベロリムスなど）、ATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206など）、ラパログ（例えば、エベロリムスなど）、AZD2014、PI3K阻害剤、PI3K阻害剤（AZD8186、GSK2636771、SAR260301）、PanPI3K阻害剤（GDC0941、GDC0942）、MEK/RAF阻害剤（ベムラファニブ（RAF阻害剤）、セルエメチニブ（MEK阻害剤）

50

、トラメチニブ（MEK阻害剤）、PD-1阻害剤、PDL1阻害剤、又はCTLA4阻害剤であってもよい。

【0117】

#### 6．頭頸部癌の併用療法

併用療法は、頭頸部癌の治療において、又は頭頸部癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0118】

一実施形態では、併用療法薬は、ゲムシタビン、プラチナ系細胞傷害剤、ドセタキセル、放射線照射、セツキシマブ（Erbix（登録商標））、PI3K阻害剤（ATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206など）、ラパログ（例えば、エベロリムスATK阻害剤（例えば、AZD5363、MK2206）など、ラパログ（例えば、エベロリムスなど）、AZD2014、PI3K阻害剤、PI3K阻害剤（AZD8186、GSK2636771、SAR260301）、PanPI3K阻害剤（GDC0941、GDC0942））、MEK/RAF阻害剤（例えば、ベムラファニブ（RAF阻害剤）、セルエメチニブ（MEK阻害剤）、トラメチニブ（MEK阻害剤）、PD-1阻害剤、PDL1阻害剤、又はCTLA4阻害剤であってもよい。

【0119】

#### 7．食道癌の併用療法

併用療法は、食道癌の治療において、又は食道癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0120】

一実施形態では、併用療法薬は、放射線又は標準的化学療法薬であってよく、これらは、以下のセクションII.B.10にさらに詳しく記載する。

【0121】

#### 8．胃癌の併用療法

併用療法は、胃癌の治療において、又は胃癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0122】

一実施形態では、併用療法薬は、トリプレット化学療法薬（パクリタキセル、シスプラチン、及びS-1）であってよい。

【0123】

#### 9．肝細胞癌の併用療法

併用療法は、肝細胞癌の治療において、又は肝細胞癌細胞の増殖を阻害するために使用することができる。

【0124】

一実施形態では、併用療法薬は、ソラファニブ又はTACE（TNF変換酵素）阻害剤であってよい。

【0125】

#### 10．併用療法一般

本明細書に定義する抗腫瘍治療は、単独療法として適用してもよく、或いは、本明細書に記載する化合物に加えて、従来の外科手術又は放射線療法若しくは化学療法を含んでもよい。

【0126】

化合物は、そのみの単剤として、又は他の臨床的に関連する薬剤若しくは技術と併用のいずれかで本明細書に記載の方法に用いることができる。例えば、本明細書に定義する抗癌治療は、単独療法として投与してもよく、或いは、本明細書に記載する化合物に加えて、従来の外科手術又は放射線療法若しくは化学療法との併用療法を含んでもよい。かかる放射線療法は、以下の放射線のカテゴリの1つ又は複数を含み得る：

(i) 電磁放射を用いた外照射療法、及び電磁放射を用いた術中放射線療法；

(ii) 内部照射療法若しくは小線源治療；例えば、組織内放射線療法若しくは管腔内

10

20

30

40

50

放射線療法；又は

( i i i ) 限定はされないが、ヨウ素 1 3 1 及びストロンチウム 8 9 を含む、全身照射療法。

【 0 1 2 7 】

かかる化学療法薬は、以下の抗腫瘍剤のカテゴリーの 1 つ又は複数を含み得る。

【 0 1 2 8 】

腫瘍内科学で用いられる抗増殖 / 抗腫瘍薬及びこれらの組み合わせ、例えば、DNA アルキル化剤（例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド、ナイトロジェンマスタード、メルファラン、クロラムブシル、プスルファン、テモゾラミド及びニトロソ尿素）；抗代謝物（例えば、ゲムシタビン、フルダラビン、カベシタビン並びに抗葉酸剤、例えば、5 - フルオロウラシル及びペメトレキセドのようなフルオロピリミジン、テガフル、ラルチトレキセド、メトトレキセド、シトシンアラビノシド、及びヒドロキシ尿素）；抗腫瘍抗生物質（例えば、アドリマイシンのようなアントラシクリン、ブレオマイシン、ドキソルピシン、リボソームドキソルピシン、ダウノマイシン、エビルピシン、イダルピシン、ミトマイシン - C、ダクチノマイシン及びミトラマイシン）；並びにトポイソメラーゼ阻害剤（例えば、エトポシド及びテニポシドのようなエピポドフィロトキシン、アムサクリン、トポテカン、カンプトテシン及びイリノテカン）；DNA 修復機構の阻害剤、例えば、CHK キナーゼ；DNA 依存性タンパク質キナーゼ阻害剤；ポリ（ADP - リボース）ポリメラーゼの阻害剤（PARP 阻害剤、例えば、オラパリブなど）；並びにHsp90 阻害剤、例えば、タネスピマイシン及びレタスピマイシン。

【 0 1 2 9 】

細胞周期を通じた進行を阻害する化合物、例えば、抗有糸分裂剤（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン及びビノレルビンのようなビンカルアルカロイド；イキサベピロン及びパツピロンのようなエポチロン；タキソール及びドセタキセルのようなタキソイド；ボロ様キナーゼ阻害剤；Eg5 タンパク質阻害剤のようなキネシンモータータンパク質の阻害剤）；オーロラキナーゼ阻害剤（例えば、AZD1152、PH739358、VX-680、MLN8054、R763、MP235、MP529、VX-528 及びAX39459）；CDK2 及び / 又はCDK4 阻害剤などのサイクリン依存性キナーゼ阻害剤；並びにCENP - E 阻害剤などのセントロメアタンパク質の阻害剤。

【 0 1 3 0 】

ホルモン依存性増殖を改変する細胞増殖抑制剤、例えば、抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン、フルベストラント、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン及びヨードキシフェン）、抗アンドロゲン薬（例えば、エンザルタミド、ビカルタミド、フルタミド、ニルタミド及び酢酸シプロテロン）；LHRHアンタゴニスト若しくはLHRHアンタゴニスト（例えば、ゴセレリン、ロイプロレリド及びブセレリン）；プロゲステロン（例えば、酢酸メゲストロール）；アロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール、レトロゾール、ボラゾール及びエキセメスタン）；並びにフィナステリドなどの5 - レダクターゼの阻害剤；酢酸アピラテロンなどのCYP17A1 阻害剤。

【 0 1 3 1 】

抗浸潤薬、例えば、AZD0530、ダサチニブ若しくはBMS - 354825 のようなc - Src キナーゼファミリー阻害剤；ボスチニブ（SKI - 606）、マリマスタットのようなメタロプロテイナーゼ阻害剤；ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子受容体機能の阻害剤；ヘパラナーゼに対する抗体、FAK、すなわち接着斑キナーゼの阻害剤；MET 受容体キナーゼの低分子阻害剤（例えば、ポリチニブ）；MET 受容体キナーゼ又はMET リガンド肝細胞増殖因子に対する抗体（例えば、オナルツズマブ）。

【 0 1 3 2 】

腫瘍、腫瘍幹細胞、及び上皮細胞前駆体遊走（ケモカイン及びケモカイン受容体を含む）の阻害剤、例えば、SDF1、MCP - 1、CXCR2 及びCXCR4。

【 0 1 3 3 】

10

20

30

40

50

増殖因子シグナル伝達の阻害剤：例えば、かかる阻害剤は、増殖因子抗体及び増殖因子受容体抗体（例えば、抗 *erbB2* 抗体トラスツズマブ [*Herceptin*（商標）]、抗 *EGFR* 抗体パニツムマブ及びセツキシマブ [*Erbix*、*C255*] 並びに *Stern et al. Critical reviews in oncology / haematology*, 2005, Vol. 54, pp 11 - 29 に開示されている任意の増殖因子若しくは増殖因子受容体抗体）を含む；かかる阻害剤はまた、チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、表皮増殖因子ファミリー及びそれらの受容体の阻害剤（例えば、ゲフィチニブ、すなわち *ZD1839*、エルロチニブ、すなわち *OSI-774*、及び *CI1033* などの *EGFR* ファミリーチロシンキナーゼ阻害剤を含む；ラパチニブのような複合型 *EGFR* 及び *erbB2* チロシンキナーゼ阻害剤；アファタニブのような混合型 *erbB1/2* 阻害剤；並びに *HKI-272* のような *EGFR* 及び *Her2* の不可逆的阻害剤、*AZD9291* のような *EGFR* の不可逆的阻害剤；肝細胞増殖因子ファミリー及びそれらの受容体の阻害剤；低分子キナーゼ阻害剤、並びにインスリン様増殖因子及びインスリン様増殖因子受容体に対する抗体などの、インスリン増殖因子ファミリーの阻害剤；イマチニブ及び／又はニロチニブ（*AMN107*）などの血小板由来増殖因子ファミリー及びそれらの受容体の阻害剤；*c-kit* 阻害剤、*AnLK* 阻害剤、*Flt3* キナーゼ阻害剤、*c-ab1* キナーゼ阻害剤、及び *CSF-1R* 若しくは *TRK* キナーゼの阻害剤。

10

#### 【0134】

シグナル伝達キナーゼ、例えば、*FGFR*（例えば、*AZD4547*）、*PIM*（例えば、*AZD1208*）、*MEK*（例えば、セルメチニブ（*AZD6244*）、*AKT*（例えば、*AZD5363*）の阻害剤、*TOR* キナーゼ（*TORC1* 及び *TORC2* など、例えば、*AZD2014*）の阻害剤；並びに *PI3K* - 、 *PI3K* - 若しくは *PI3K* - などのアイソフォームを含む *PI3* キナーゼの阻害剤（例えば、*AZD8186*）；*Ras* 若しくは *Raf* キナーゼなどのセリン／トレオニンキナーゼの阻害剤（例えば、ソラフェニブ若しくはベムラフェニブ）；*PKC*、*SGK*、*PI4K* 若しくは *PIP5K*、*JAK*、*STAT*（その阻害剤が *AZD9150* である *STAT3* を含む）及び *IRAK4* の阻害剤；*ATR* 阻害剤（例えば、*AZD6738*）又は *ATM* 阻害剤；イマチニブ若しくはニロチニブのような *ABL* 阻害剤、イブルチニブのような *BTB* 阻害剤、フォスタマチニブのような *SYK* 阻害剤、及びサイクリン依存性キナーゼ阻害剤；チピファルニブ（*R115777*）及びロナファルニブ（*SCH66336*）のようなファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤。

20

30

#### 【0135】

抗血管新生薬、例えば、血管内皮細胞増殖因子の作用を阻害するもの〔例えば、抗血管内皮細胞増殖因子抗体バサズマブ（*Avastin*（商標））並びに、例えば、バンデタニブ（*ZD6474*）、ソラフェニブ、バタラニブ（*PTK787*）、スニチニブ（*SU11248*）、アキシチニブ（*AG-013736*）、パゾパニブ（*GW786034*）及びセジラニブ（*AZD2171*）などの *VEGF* 受容体チロシンキナーゼ阻害剤；国際特許出願国際公開第 97/22596 号パンフレット、同第 97/30035 号パンフレット、同第 97/32856 号パンフレット、及び同第 98/13354 号パンフレットに開示されるものなどの化合物；並びに他の機構により作用する化合物（例えば、リノミド、インテグリン  $\alpha_v\beta_3$  機能の阻害剤及びアンジオスタチン）〕、又はアンジオポエチン及びそれらの受容体（*Tie-1* 及び *Tie-2*）の阻害剤、*PLGF* の阻害剤、デルタ様リガンド（*DLL-4*）の阻害剤。

40

#### 【0136】

血管障害剤、例えば、コンプレスタチン *A4* 並びに国際特許出願国際公開第 99/02166 号パンフレット、同第 00/40529 号パンフレット、同第 00/41669 号パンフレット、同第 01/92224 号パンフレット、同第 02/04434 号パンフレット、及び同第 02/08213 号パンフレットに開示されている化合物。

#### 【0137】

50

エンドセリン受容体アンタゴニスト、例えば、ジボテンタン（Z D 4 0 5 4）若しくはアトラセンタン。

【 0 1 3 8 】

アンチセンス療法薬、例えば、上に挙げた標的に対するもの、例えば、I S I S 2 5 0 3、抗 r a s アンチセンス、オブリメルソン（o b l i m e r s e n）ナトリウム、抗 2 アンチセンス、又は X I A P に対するアンチセンス、例えば、A E G 3 5 1 5 6。

【 0 1 3 9 】

遺伝子療法アプローチ、例えば、異常 p 5 3 又は異常 B R C A 1 若しくは B R C A 2 のような異常遺伝子を置換するアプローチ、G D E P T（遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法）；シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼ若しくは細菌性ニトロレダクターゼ酵素を用いたものなどのアプローチ；並びに、多剤耐性遺伝子療法などの化学療法又は放射線療法に対する患者の忍容性を高めるためのアプローチ。

【 0 1 4 0 】

免疫療法アプローチ、例えば、患者の腫瘍細胞の免疫原性を高めるためのエキスピバ及びインビバアプローチ、例えば、インターロイキン 2、インターロイキン 4 若しくは顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子などのサイトカインによるトランスフェクション；T 細胞アネルギー若しくは調節 T 細胞機能を低減するアプローチ；腫瘍に対する T 細胞応答を増強するアプローチ、例えば、C T L A 4（例えば、イピリムマブ及びトレメリムマブ）、B 7 H 1、P D - 1（例えば、B M S - 9 3 6 5 5 8）に対する阻止抗体、並びに C D 1 3 7 に対するアゴニスト抗体；サイトカイントランスフェクト樹状細胞のようなトランスフェクト免疫細胞を用いたアプローチ；サイトカイントランスフェクト腫瘍細胞株を用いたアプローチ、腫瘍関連抗原に対する抗体を用いたアプローチ、並びに標的細胞型を欠失させる抗体（例えば、リツキシマブのような非結合抗 C D 2 0 抗体、放射標識抗 C D 2 0 抗体ベキサル及びゼバリン、及び抗 C D 5 4 抗体キャンパス（C a m p a t h））；抗イディオタイプ抗体を用いたアプローチ；ナチュラルキラー細胞機能を増強するアプローチ；並びに抗体 - 毒素コンジュゲート（例：抗 C D 3 3 抗体マイロターゲット（M y l o t a r g））を使用するアプローチ；モキセツムマブパストクスのような免疫毒素；トール様受容体 7 若しくはトール様受容体 9 のアゴニスト。

【 0 1 4 1 】

アポトーシス誘導アプローチ、例えば、細胞死受容体 4 若しくは細胞死受容体 5 に対する抗体、又は細胞死受容体 4 及び細胞死受容体 5 の両方に結合する交差反応性抗体；並びに X I A P 及び c I A P 1 及び c I A P 2 の阻害剤；F A S に対する抗体。

【 0 1 4 2 】

サイトカイン治療、例えば、腫瘍壊死因子、並びに組換え T r a i l タンパク質、及び T r a i l タンパク質の低分子若しくはタンパク質ミメティクス；F A S 若しくは T w e a k リガンド、又はこれらのリガンドの模倣物。

【 0 1 4 3 】

プロテオソーム媒介タンパク質分解の阻害剤、例えば、限定はされないが、V e l c a d e（商標）のようなプロテオソーム阻害剤、ユビキチンリガーゼの阻害剤、ユビキチンプロテアーゼの阻害剤、タンパク質 N E D D 化（N e d d y l a t i o n）の阻害剤、及びタンパク質 S U M O 化の阻害剤；或いは、

【 0 1 4 4 】

ロイコボリンのような効力増強剤。

【 0 1 4 5 】

別の実施形態によれば、上に挙げたものから選択される抗腫瘍薬と組み合わせて v 6 結合剤を含むキットが提供される。特定の実施形態では、キットはさらに、癌の治療又は腫瘍細胞の増殖の阻害における前記化合物の使用についての説明も含む。

【 0 1 4 6 】

さらに別の実施形態によれば、以下：

a）第 1 単位用量形態での V 6 標的化結合剤；

10

20

30

40

50

b) 第2単位用量形態の前述したものから選択される抗腫瘍薬；及び  
c) 前記第1及び第2用量形態を含有する容器手段  
を含むキットが提供される。

【0147】

III. 診断方法

一実施形態では、患者において、V6及びHER2阻害に感受性の乳癌を診断する方法は、V6及びHER2の発現レベルを測定することにより、V6及びHER2を過剰発現する腫瘍細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップを含み、V6及びHER2がいずれも過剰発現されていれば、患者は、V6及びHER2阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断される。阻害に対して感受性とは、腫瘍又は癌細胞進行の任意のパラメータの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、若しくは100%の改善を包含し、これは、限定はされないが、患者及び/若しくは実験室での実験のいずれかにおける腫瘍増殖、腫瘍サイズ、腫瘍侵襲、若しくは腫瘍浸潤の低減、並びに/又は患者及び/若しくは実験モデルのいずれかにおける生存の延長；並びに/又は下流分子メッセンジャーからのシグナル伝達の減少を含む。

10

【0148】

別の実施形態では、患者におけるV6阻害に対して感受性の癌を診断及び治療する方法は、V6のレベルを測定することにより、V6を過剰発現する癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、V6が過剰発現されていれば、患者は、V6阻害に対して感受性の癌を有すると診断されるステップと、診断された患者に、V6に特異的に結合して、V6へのリガンドの結合を阻害するV6標的化結合剤を治療有効用量で投与するステップとを含む。

20

【0149】

別の態様では、本方法はまた、HER2のレベルを測定するステップを含み、HER2が過剰発現されていれば、患者は、HER2阻害に対して感受性の癌を有すると診断される。

【0150】

別の実施形態では、患者におけるHER2阻害に対して感受性の乳癌を診断及び治療する方法は、V6及びHER2のレベルを測定することにより、V6及びHER2を過剰発現する乳癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、V6及びHER2がいずれも過剰発現されていれば、患者は、V6及びHER2阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断されるステップと、診断された患者に、HER2に特異的に結合して、HER2へのリガンドの結合を阻害するHER2標的化結合剤を治療有効用量で投与するステップとを含む。

30

【0151】

別の実施形態は、患者におけるV6及びHER2阻害に対して感受性の乳癌を診断及び治療する方法を包含し、この方法は、V6及びHER2のレベルを測定することにより、V6及びHER2を過剰発現する乳癌細胞の存在又は非存在について、患者試料を分析するステップであって、V6及びHER2がいずれも過剰発現されていれば、患者は、V6及びHER2阻害に対して感受性の乳癌を有すると診断されるステップと、診断された患者に、V6に特異的に結合して、V6へのリガンドの結合を阻害するV6標的化結合剤と、HER2に特異的に結合して、HER2へのリガンドの結合を阻害するHER2標的化結合剤とを治療有効用量で投与するステップとを含む。

40

【0152】

一実施形態は、患者試料中のV6阻害に対して感受性の癌を治療する方法をさらに包含し、この方法は、患者試料が、V6を過剰発現する癌細胞を含有するか否かを決定するための試験を要請するステップと、患者試料が、V6を過剰発現する癌細胞を含有していれば、V6に特異的に結合して、V6へのリガンドの結合を阻害する

50



V 6 標的化結合剤を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【0153】

一実施形態は、患者試料中の V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を治療する方法を包含し、この方法は、患者試料が、 V 6 及び H E R 2 を過剰発現する癌細胞を含有するか否かを決定するための試験を要請するステップと、患者試料が、 V 6 及び H E R 2 を過剰発現する癌細胞を含有していれば、以下：

a . V 6 に特異的に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する V 6 標的化結合剤；及び

b . H E R 2 に特異的に結合して、 H E R 2 へのリガンドの結合を阻害する H E R 2 標的化結合剤

を治療有効用量で投与するステップとを含む。

【0154】

一実施形態では、発現レベルは、タンパク質発現を測定することによって測定する。一方法では、 V 6 及び / 又は H E R 2 は、腫瘍細胞染色の程度及び / 又は腫瘍細胞染色の強度により検出される。一実施形態では、 V 6 及び / 又は H E R 2 は、 0 = 0 %、 1 = < 25 %、 2 = 25 ~ 50 %、 3 = > 50 % ~ 75 %、及び 4 = > 75 % であるスコアリングシステムを用いて、腫瘍細胞染色の程度により検出される。別の実施形態では、

V 6 及び / 又は H E R 2 は、 0 = 陰性、 1 = 弱、 2 = 中、 3 = 強の腫瘍細胞染色スコアの強度により検出される。一実施形態では、スコアリングにおいて、腫瘍細胞染色の程度のスコアと染色の強度のスコアを合計されるとき、 V 6 は、それが 5 の最終スコアを有する場合に、過剰発現されると判定される。別の実施形態では、スコアリングにおいて、腫瘍細胞染色の程度のスコアと染色の強度のスコアを合計されるとき、 H E R 2 は、それが 5 の最終スコアを有する場合に、過剰発現されると判定される。一実施形態では、各サンプルは、 2 人以上の病理学者によってスコアリングし、スコアを平均する。

【0155】

一方法では、 I H C 試料を V 6 について染色した後、独立した病理学者スコアリングシステムを用いて、腫瘍を 0 ~ 7 の染色強度等級（陽性パーセンテージについての 0 ~ 4、続いて強度パーセンテージについての 0 ~ 3 から構成）で腫瘍を分類することにより、 V 6 陽性について分類することができる。この等級から、 5、 6、 7 のスコアは、強度に a v b 6 陽性と見なされた（ 2 つの腫瘍コホート全体の総サンプルの約 15 . 1 % 及び 16 % ）。これは、 2 人の独立した病理学者によって実施された。 a v b 6 インテグリンを過剰発現する腫瘍は、強度及び細胞陽性パーセンテージの両方を組み込んだ等級化病理スコアリングシステムを用いて、決定することができる。内部対照と比較して各スコアリング強度を代表する参照試料を用いて、スコアリングシステムを試料セットから試料セットへと移していく。或いは、閾値を設定するために、参照試料を用いて自動化イメージング技術を使用することもできる。これらのプラットフォームは、一般に、パターン認識ソフトウェアと組み合わせた、カラーデコンボリューションアルゴリズム、ポジティブピクセルカウントを含む。かかるプラットフォームの例として、 A p e r i o G e n i e（商標）及び D e f i n i e n s（商標）自動化画像定量パッケージがある。

【0156】

別の実施形態では、発現レベルは、 m R N A 発現を測定することによって測定する。例えば、 V 6 発現レベルは、 6 サブユニットの遺伝子である I T G B 6 の m R N A 発現を測定することによって測定する。 q R T - P C R、 F l u i d i g m、 N a n o s t r i n g、 R N A s e q（例えば、 I l l u m i n a）、 A f f y m e t r i x 遺伝子プロファイリングなどの様々な技術は、当業者が、 R N A レベルを測定するその一般的知識を用いて使用することができ、これらは、好適なスコアリングレベルを確立するために、 I H C 分析に対して較正してよい。

【0157】

V 6 を阻害することにより治療することができる患者において V 6 阻害に対して感受性の癌を診断する方法であって、以下：

- a . 対象からの生体試料を取得するステップ ;
- b . 試料に、 V 6 に特異的に結合する V 6 標的化結合剤を適用するステップであって、 V 6 の存在によって、 V 6 標的化結合剤 - V 6 複合体が形成されるステップ ;
- c . ステップ b ) の複合体が、 V 6 過剰発現を示すレベルで検出される場合、侵襲性形態の乳癌を診断するステップを含む方法。

## 【 0 1 5 8 】

V 6 及び H E R 2 を阻害することにより治療することができる患者において V 6 及び H E R 2 阻害に対して感受性の乳癌を診断する方法であって、以下 :

- a . 対象からの生体試料を取得するステップ ;
- b . 試料に、 V 6 に特異的に結合する V 6 標的化結合剤を適用するステップであって、 V 6 の存在によって、 V 6 標的化結合剤 - V 6 複合体が形成されるステップ ;
- c . 任意選択で、試料に、 H E R 2 に特異的に結合する H E R 2 標的化結合剤を適用するステップであって、 H E R 2 の存在によって、 H E R 2 標的化結合剤 - H E R 2 複合体が形成されるステップ ; 並びに
- d . ステップ b ) 及び c ) の複合体が、 V 6 及び H E R 2 過剰発現を示すレベルで検出される場合、侵襲性形態の乳癌を診断するステップを含む方法。

## 【 0 1 5 9 】

V 6 標的化結合剤と V 6 の複合体又は H E R 2 標的化結合剤と H E R 2 の複合体は、当該技術分野において公知の方法により検出することができる。一実施形態では、前述したように、腫瘍細胞染色の程度及び / 又は強度を用いてよい。別の実施形態では、標的化結合剤が抗体であれば、過剰発現を測定するために E L I S A アッセイを用いてよい。或いは、免疫組織化学分析を用いてもよい。或いはまた、複合体を検出するために、 F M A T 大共焦点 ( m a c r o c o n f o c a l ) スキャニングを用いてもよい。

## 【 0 1 6 0 】

I V . V 6 標的化結合剤のさらに詳細な説明

いくつかの実施形態は、 V 6 インテグリン ( V 6 ) に結合する標的化結合剤に関する。一部の実施形態では、結合剤は、 V 6 に結合して、 V 6 へのリガンドの結合を阻害する。一実施形態では、標的化結合剤は、モノクローナル抗体、又はその結合断片である。別の実施形態では、抗体は、 V 6 鎖にのみ結合し、しかも、 V 6 へのリガンドの結合を阻害することができる。

## 【 0 1 6 1 】

別の実施形態は、完全ヒト抗 V 6 抗体、及び治療に有用な抗体製剤を含む。一実施形態では、抗 V 6 抗体製剤は、望ましい治療特性、例えば、 V 6 に対する強力な結合親和性、 T G F β L A P 媒介細胞接着をインビトロで阻害する能力などを有する。

## 【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態は、抗 V 6 抗体の完全にヒトの単離された結合断片も含む。一実施形態では、結合断片は、完全ヒト抗 V 6 抗体に由来する。例示的断片として、以下により詳しく記載するように、 F v 、 F a b ' 又は他の公知の抗体断片が挙げられる。いくつかの実施形態はまた、 V 6 に対する完全ヒト抗体を発現する細胞も含む。細胞の例として、ハイブリドーマ、又は組換えにより作製された細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞、 C H O 細胞の変異体 ( 例えば、 D G 4 4 ) 及び V 6 に対する抗体を産生する N S 0 細胞が挙げられる。 C H O 細胞の変異体に関するさらなる情報は、 A n d e r s e n a n d R e i l l y ( 2 0 0 4 ) C u r r e n t O p i n i o n i n B i o t e c h n o l o g y 1 5 , 4 5 6 - 4 6 2 に見出すことができ、これは、その全体が本明細書によって参照により援用される。

## 【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

50

さらに、いくつかの実施形態は、V 6 関連疾患又は障害を治療するためにこれらの抗体を使用する方法を含む。V 6 関連疾患又は障害は、V 6 の異常活性化又は発現のために起こるあらゆる状態であってよい。かかる疾患の例として、V 6 が、そのリガンドと異常に相互作用して、これにより、細胞接着又は細胞シグナル伝達特性を改変するものがある。この細胞接着又は細胞シグナル伝達特性における改変は、腫瘍性疾患を招き得る。他の V 6 関連疾患又は障害としては、炎症性障害、肺疾患、線維症に関連する疾患、及び調節異常 TGF- $\beta$  に関連するあらゆる疾患が挙げられる。

#### 【0164】

一例では、V 6 関連疾患は、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞（肝臓）癌、甲状腺腫瘍、胃癌（gastric cancer）（胃癌（stomach cancer））、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、膠芽腫、子宮内膜癌、腎臓癌、結腸癌、膵臓癌、食道癌、頭頸部癌、中皮腫、肉腫、胆管（胆管癌）、小腸腺癌、小児悪性疾患及び類表皮癌などの腫瘍性疾患である。

#### 【0165】

別の例では、V 6 関連疾患は、炎症性疾患、例えば、炎症性腸疾患；全身性エリテマトーデス；関節リウマチ；若年性慢性関節炎；脊椎関節症；全身性硬化症、例えば、強皮症；特発性炎症性筋疾患、例えば、皮膚筋炎、多発筋炎；シェーグレン症候群；全身性脈管炎；類肉腫症；甲状腺炎、例えば、グレーブス病、橋本甲状腺炎、若年性リンパ性甲状腺炎、萎縮性甲状腺炎；免疫媒介性腎疾患、例えば、糸球体腎炎、尿細管間質性腎炎；中枢及び末梢神経系の脱髄疾患、例えば、多発性硬化症、特発性神経障害；肝胆道系疾患、例えば、A、B、C、D、E 型肝炎及び他の非肝炎性（nonhepatotropic）ウイルスなどの感染性肝炎；自己免疫性慢性活性肝炎；原発性胆汁性肝硬変症；肉芽腫性肝炎及び硬化性胆管炎；炎症性及び線維形成性肺疾患（例：嚢胞性線維症）；グルテン過敏性腸疾患；自己免疫又は免疫媒介性皮膚疾患、例えば、水疱性皮膚疾患、多形性紅斑及び接触性皮膚炎、乾癬；肺のアレルギー性疾患、例えば、好球性肺炎、特発性肺線維症、アレルギー性結膜炎及び過敏性肺炎、移植片拒絶反応及び移植片対宿主疾患を含む移植関連疾患である。

#### 【0166】

また別の例では、V 6 関連疾患は、腎臓又は肺線維症などの線維症である。

#### 【0167】

さらに別の例では、V 6 関連疾患は、異常調節 TGF- $\beta$  に関連し、癌及び結合組織（線維形成）障害が挙げられる。

#### 【0168】

他の実施形態は、とりわけ、生体試料中の V 6 の量を定量するための診断アッセイを含む。アッセイキットは、かかる抗体を検出するための標識と共に、抗 V 6 抗体を含むことができる。これらの診断アッセイは、V 6 関連疾患又は V 6 障害をスクリーニングするのに有用であり、かかる疾患として、限定はされないが、腫瘍性疾患、例えば、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肝細胞（肝臓）癌、膠芽腫、並びに、甲状腺、胃、前立腺、乳房、卵巣、膀胱、肺、子宮、腎臓、結腸、及び膵臓、唾液腺、及び大腸の癌腫が挙げられる。

#### 【0169】

別の態様は、アンタゴニストが V 6 に結合する V 6 の生物活性のアンタゴニストである。一実施形態では、アンタゴニストは、抗体などの標的化結合剤である。アンタゴニストは、以下：

i) V 6 のみ；

ii) V 6；若しくは

iii) V 6 / リガンド複合体、

又はこれらの組み合わせに結合し得る。一実施形態では、抗体は、インビトロ及びインビボで V 6 の生物活性に拮抗することができる。抗体は、完全ヒトモノクローナル抗体、例えば、sc264RAD、sc264RAD / ADY、sc188SDM、sc13

10

20

30

40

50

3、s c 1 3 3 T M T、s c 1 3 3 W D S、s c 1 3 3 T M T / W D S、s c 1 8 8、s c 2 5 4、s c 2 6 4 若しくはs c 2 9 8又はこれらの変異体から選択することができる。

【 0 1 7 0 】

一実施形態では、V 6の生物活性のアンタゴニストは、V 6に結合して、これにより、T G F L A P 媒介性細胞接着を防止し得る。

【 0 1 7 1 】

一実施形態は、完全ヒトモノクローナル抗体：c 2 6 4 R A D、s c 2 6 4 R A D / A D Y、s c 1 8 8 S D M、s c 1 3 3、s c 1 3 3 T M T、s c 1 3 3 W D S、s c 1 3 3 T M T / W D S、s c 1 8 8、s c 2 5 4、s c 2 6 4又はs c 2 9 8と同じ1つ又は複数のエピトープに結合する抗体である。

10

【 0 1 7 2 】

一実施形態では、標的化結合剤は、100ナノモル(nM)未満の $K_d$ でV 6に結合する。標的化結合剤は、約35ナノモル(nM)未満の $K_d$ で結合し得る。標的化結合剤は、約25ナノモル(nM)未満の $K_d$ で結合し得る。標的化結合剤は、約10ナノモル(nM)未満の $K_d$ で結合し得る。別の実施形態では、標的化結合剤は、約60ピコモル(pM)未満の $K_d$ で結合する。

【 0 1 7 3 】

一実施形態は、本明細書において前述した抗体の軽鎖及び/又は重鎖を産生する抗体分泌形質細胞である。一実施形態では、形質細胞は、完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖及び/又は重鎖を産生する。別の実施形態では、形質細胞は、完全ヒトモノクローナル抗体：c 2 6 4 R A D、s c 2 6 4 R A D / A D Y、s c 1 8 8 S D M、s c 1 3 3、s c 1 3 3 T M T、s c 1 3 3 W D S、s c 1 3 3 T M T / W D S、s c 1 8 8、s c 2 5 4、s c 2 6 4又はs c 2 9 8の軽鎖及び/又は重鎖を産生する。或いは、形質細胞は、完全ヒトモノクローナル抗体：s c c 2 6 4 R A D、s c 2 6 4 R A D / A D Y、s c 1 8 8 S D M、s c 1 3 3、s c 1 3 3 T M T、s c 1 3 3 W D S、s c 1 3 3 T M T / W D S、s c 1 8 8、s c 2 5 4、s c 2 6 4又はs c 2 9 8と同じ1つ又は複数のエピトープに結合する抗体を産生し得る。

20

【 0 1 7 4 】

別の実施形態は、前述したような抗体の軽鎖又は重鎖をコードする核酸分子である。一実施形態では、核酸分子は、完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖又は重鎖をコードする。また別の実施形態は、抗体：c 2 6 4 R A D、s c 2 6 4 R A D / A D Y、s c 1 8 8 S D M、s c 1 3 3、s c 1 3 3 T M T、s c 1 3 3 W D S、s c 1 3 3 T M T / W D S、s c 1 8 8、s c 2 5 4、s c 2 6 4又はs c 2 9 8から選択される完全ヒトモノクローナル抗体の軽鎖又は重鎖をコードする核酸分子である。

30

【 0 1 7 5 】

別の実施形態は、前述したような1つ又は複数の核酸分子を含むベクターであり、このベクターは、上に定義した抗体の軽鎖及び/又は重鎖をコードする。

【 0 1 7 6 】

また別の実施形態は、前述したようなベクターを含む宿主細胞である。或いは、宿主細胞は、2つ以上のベクターを含んでもよい。

40

【 0 1 7 7 】

さらに、一実施形態は、核酸分子が、抗体を産生するように発現される条件下で、宿主細胞を培養した後、抗体を回収することにより、抗体を生産する方法である。

【 0 1 7 8 】

一実施形態は、前述したような抗体をコードする少なくとも1つの核酸分子で、少なくとも1つの宿主細胞をトランスフェクトし、核酸分子を宿主細胞において発現させるステップ、及び抗体を単離するステップを含む。

【 0 1 7 9 】

別の態様は、V 6の生物活性に拮抗する方法であって、本明細書に記載するアンタ

50

ゴニストを投与するステップを含む方法を包含する。本方法は、 V 6 関連疾患又は障害の治療を必要とする動物を選択するステップ、及び動物に、 V 6 の生物活性のアンタゴニストを治療有効用量で投与するステップを含み得る。

【 0 1 8 0 】

別の態様は、 V 6 の生物活性に拮抗する方法であって、本明細書に記載する抗体を投与するステップを含む方法を包含する。本方法は、 V 6 関連疾患又は障害の治療を必要とする動物を選択するステップ、及び前記動物に、 V 6 の生物活性に拮抗する抗体を治療有効用量で投与するステップを含み得る。

【 0 1 8 1 】

別の態様によれば、哺乳動物における V 6 関連疾患又は障害を治療する方法であって、 V 6 の生物活性のアンタゴニストを治療有効用量で投与するステップを含む方法が提供される。本方法は、 V 6 関連疾患又は障害の治療を必要とする動物を選択するステップ、及び前記動物に、 V 6 の生物活性のアンタゴニストを治療有効用量で投与するステップを含み得る。

10

【 0 1 8 2 】

別の態様によれば、哺乳動物における V 6 関連疾患又は障害を治療する方法であって、 V 6 の生物活性に拮抗する抗体を治療有効用量で投与するステップを含む方法が提供される。本方法は、 V 6 関連疾患又は障害の治療を必要とする動物を選択するステップ、及び前記動物に、 V 6 の生物活性に拮抗する抗体を治療有効用量で投与するステップを含み得る。抗体は、単独で投与することもでき、又は別の抗体又は化学療法薬若しくは放射線療法と組み合わせて投与することができる。

20

【 0 1 8 3 】

別の態様によれば、哺乳動物における癌を治療する方法であって、 V 6 の生物活性のアンタゴニストを治療有効用量で投与するステップを含む方法が提供される。本方法は、癌の治療を必要とする動物を選択するステップ、及び前記動物に、 V 6 の生物活性に拮抗するアンタゴニストを治療有効用量で投与するステップを含み得る。アンタゴニストは、単独で投与することもでき、又は別の抗体又は化学療法薬若しくは放射線療法と組み合わせて投与することができる。

【 0 1 8 4 】

別の態様によれば、哺乳動物における癌を治療する方法であって、 V 6 の生物活性に拮抗する抗体を治療有効用量で投与するステップを含む方法が提供される。本方法は、癌の治療を必要とする動物を選択するステップ、及び前記動物に、 V 6 の生物活性に拮抗する抗体を治療有効用量で投与するステップを含み得る。抗体は、単独で投与することもでき、又は別の抗体又は化学療法薬若しくは放射線療法と組み合わせて投与することができる。

30

【 0 1 8 5 】

別の態様によれば、 V 6 関連疾患又は障害の治療のための薬剤の製造のための V 6 の生物活性のアンタゴニストの使用が提供される。

【 0 1 8 6 】

別の態様によれば、 V 6 関連疾患又は障害の治療のための薬剤の製造のための V 6 の生物活性に拮抗する抗体の使用が提供される。

40

【 0 1 8 7 】

一実施形態は、 V 6 インテグリンのみに、又はそれに一部依存する腫瘍を有する患者における V 6 に拮抗する上での使用に特に好適である。

【 0 1 8 8 】

別の実施形態は、 V 6 関連疾患又は障害をスクリーニングするために哺乳動物組織、細胞、又は体液中の V 6 を検出するアッセイキットを包含する。このキットは、 V 6 に結合する抗体と、存在する場合は、 V 6 と抗体との反応を示す手段とを含む。抗体は、モノクローナル抗体であってよい。一実施形態では、 V 6 に結合する抗体を標識する。別の実施形態では、抗体は、非標識一次抗体であり、キットはさらに、一次

50

抗体を検出する手段も含む。一実施形態では、この手段は、抗免疫グロブリンである標識二次抗体を含む。一態様では、抗体は、フルオロクロム、酵素、放射性核種及び放射線不透過性材料から選択されるマーカで標識する。

【0189】

抗 V 6 抗体に関するさらに別の実施形態、特徴などを以下にさらに詳しく記載する。

【0190】

A. ヒト抗体及び抗体のヒト化

ヒト抗体では、マウス又はラットの可変領域及び/又は定常領域を有する抗体に関連する問題のいくつかが回避される。かかるマウス又はラット由来のタンパク質の存在は抗体の急速なクリアランスをもたらすことがあり、又は患者による抗体に対する免疫応答の発生をもたらすことがある。マウス又はラット由来の抗体の利用を避けるため、機能的ヒト抗体遺伝子座をげっ歯類、他の哺乳動物又は動物に導入して、そのげっ歯類、他の哺乳動物又は動物に完全ヒト抗体を産生させることにより、完全ヒト抗体を生成することができる。

【0191】

完全ヒト抗体を生成する1つの方法は、XenoMouse（登録商標）系統のマウスを使用することによるもので、これは、ヒト重鎖遺伝子座と軽鎖遺伝子座との最大でも1000kbサイズ未満の生殖系列配置の断片を含むように操作されたマウスである。Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997) 及び Green and Jakobovits J. Exp. Med. 188:483-495 (1998) を参照のこと。XenoMouse（登録商標）株は Amgen, Inc. (Fremont, CA) から入手可能である。

【0192】

XenoMouse（登録商標）系統のマウスの産生については、1990年1月12日に出願された米国特許出願第07/466,008号明細書、1990年11月8日に出願された同第07/610,515号明細書、1992年7月24日に出願された同第07/919,297号明細書、1992年7月30日に出願された同第07/922,649号明細書、1993年3月15日に出願された同第08/031,801号明細書、1993年8月27日に出願された同第08/112,848号明細書、1994年4月28日に出願された同第08/234,145号明細書、1995年1月20日に出願された同第08/376,279号明細書、1995年4月27日に出願された同第08/430,938号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/464,584号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/464,582号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/463,191号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/462,837号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/486,853号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/486,857号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/486,859号明細書、1995年6月5日に出願された同第08/462,513号明細書、1996年10月2日に出願された同第08/724,752号明細書、1996年12月3日に出願された同第08/759,620号明細書、2001年11月30日に出願された米国特許出願公開第2003/0093820号明細書、並びに米国特許第6,162,963号明細書、同第6,150,584号明細書、同第6,114,598号明細書、同第6,075,181号明細書、及び同第5,939,598号明細書、並びに日本特許第3,068,180 B2号公報、同第3,068,506 B2号公報、及び同第3,068,507 B2号公報においてさらに考察及び詳述されている。また、1996年6月12日に付与公開された欧州特許第0,463,151 B1号明細書、1994年2月3日に公開された国際公開第94/02602号パンフレット、1996年10月31日に公開された国際公開第96/34096号パンフレット、1998年6月11日に公開された国際公開第98/24893号パンフレット、2000年12月21日に公開された国際公

10

20

30

40

50

開第00/76310号パンフレットも参照のこと。上記に列挙される特許、出願、及び文献の各々の開示は、本明細書によって全体として参照により援用される。

【0193】

代替的な手法では、GenPharm International, Inc. を含む他の者らが、「ミニ遺伝子座」の手法を利用している。このミニ遺伝子座手法では、外因性Ig遺伝子座が、Ig遺伝子座の部分片（個々の遺伝子）を包含することにより模倣される。従って、1つ以上のV<sub>H</sub>遺伝子、1つ以上のD<sub>H</sub>遺伝子、1つ以上のJ<sub>H</sub>遺伝子、μ定常領域、及び通常第2の定常領域（任意選択で定常領域）が、動物に挿入されるコンストラクト中に形成される。この手法については、Surani et al. に対する米国特許第5,545,807号明細書、並びに各々がLonberg and Kay に対する米国特許第5,545,806号明細書、同第5,625,825号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,770,429号明細書、同第5,789,650号明細書、同第5,814,318号明細書、同第5,877,397号明細書、同第5,874,299号明細書、及び同第6,255,458号明細書、Krimpenfort and Berns に対する米国特許第5,591,669号明細書及び同第6,023,010号明細書、Berns et al. に対する米国特許第5,612,205号明細書、同第5,721,367号明細書、及び同第5,789,215号明細書、並びにChoi and Dunn に対する米国特許第5,643,763号明細書、及びGenPharm International社の1990年8月29日に出願された米国特許出願第07/574,748号明細書、1990年8月31日に出願された同第07/575,962号明細書、1991年12月17日に出願された同第07/810,279号明細書、1992年3月18日に出願された同第07/853,408号明細書、1992年6月23日に出願された同第07/904,068号明細書、1992年12月16日に出願された同第07/990,860号明細書、1993年4月26日に出願された同第08/053,131号明細書、1993年7月22日に出願された同第08/096,762号明細書、1993年11月18日に出願された同第08/155,301号明細書、1993年12月3日に出願された同第08/161,739号明細書、1993年12月10日に出願された同第08/165,699号明細書、1994年3月9日に出願された同第08/209,741号明細書（これらの開示は本明細書によって参照により援用される）に記載されている。また、欧州特許第0 546 073 B1号明細書、国際公開第92/03918号パンフレット、国際公開第92/22645号パンフレット、国際公開第92/22647号パンフレット、国際公開第92/22670号パンフレット、国際公開第93/12227号パンフレット、国際公開第94/00569号パンフレット、国際公開第94/25585号パンフレット、国際公開第96/14436号パンフレット、国際公開第97/13852号パンフレット、及び国際公開第98/24884号パンフレット及び米国特許第5,981,175号明細書（これらの開示は本明細書によって全体として参照により援用される）も参照のこと。さらに、Taylor et al., 1992、Chen et al., 1993、Tuaille et al., 1993、Choi et al., 1993、Lonberg et al., (1994)、Taylor et al., (1994)、及びTuaille et al., (1995)、Fishwild et al., (1996)（これらの開示は本明細書によって全体として参照により援用される）を参照のこと。

【0194】

Kirinはまた、マウスからのヒト抗体の生成も実証しており、ここではマイクロセル融合を用いて大きい染色体片、又は染色体全体が導入されている。欧州特許第773288号明細書及び同第843 961号明細書（これらの開示は本明細書によって参照により援用される）を参照のこと。加えて、KirinのTcマウスをMedarexのミニ遺伝子座（Humab）マウスと異種交配して生まれたKM（商標）マウスが生成さ

10

20

30

40

50

れている。このようなマウスは、KirinマウスのヒトIGHトランスクロモソームとGenpharmマウスの鎖トランスジーンとを有する(Ishida et al., Cloning Stem Cells, (2002) 4: 91-102)。

【0195】

ヒト抗体はまた、インビトロ方法によって得られてもよい。好適な例としては、限定はされないが、ファージディスプレイ(CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Symphogen、Alexion(旧Proliferon)、Affimed)、リボソームディスプレイ(CAT)、酵母ディスプレイなどが挙げられる。

【0196】

#### B. 抗体の調製

本明細書に記載するとおりの抗体は、以下に記載するとおり、XenoMouse(登録商標)技術を利用して調製した。ここで、かかるマウスはヒト免疫グロブリン分子及び抗体の産生能を有し、マウス免疫グロブリン分子及び抗体の産生が欠損している。これを実現するために利用される技術は、本明細書の背景技術の節に開示される特許、出願、及び文献に開示されている。しかしながら、特に、マウス及びそこからの抗体のトランスジェニック産生の実施形態が、1996年12月3日に開示された米国特許出願第08/759,620号明細書及び1998年6月11日に公開された国際公開第98/24893号パンフレット及び2000年12月21日に公開された国際公開第00/76310号パンフレット(これらの開示は本明細書によって参照により援用される)に開示されている。また、Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156(1997)(この開示は本明細書によって参照により援用される)も参照のこと。

【0197】

かかる技術を用いることで、様々な抗原に対する完全ヒトモノクローナル抗体が産生されている。本質的に、XenoMouse(登録商標)系統のマウスを目的の抗原(例えばV6)で免疫し、過免疫マウスからリンパ細胞(B細胞など)を回収し、回収したリンパ球を骨髓系細胞株と融合して不死化ハイブリドーマ細胞株を調製する。これらのハイブリドーマ細胞株をスクリーニング及び選択することにより、目的の抗原に特異的な抗体を産生したハイブリドーマ細胞株を同定する。本明細書には、V6に特異的な抗体を産生する複数のハイブリドーマ細胞株の産生方法が提供される。さらに、本明細書には、かかる細胞株によって産生される抗体の特性決定が、かかる抗体の重鎖及び軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列解析を含めて提供される。

【0198】

或いは、骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマを生成するのではなく、B細胞を直接アッセイしてもよい。例えば、過免疫XenoMouse(登録商標)マウスからCD19+B細胞を単離し、増殖させて抗体分泌形質細胞に分化させることができる。次に細胞上清からの抗体を、ELISAにより、V6免疫原に対する反応性についてスクリーニングする。この上清はまた、V6上の機能的に関連性のあるドメインに結合する異なる抗体をさらにマッピングするため、V6の断片に対する免疫活性についてスクリーニングされてもよい。抗体はまた、他の関連するヒトインテグリンに対してスクリーニングされても、並びに種間交差反応性を決定するため、ラット、マウス、及び非ヒト霊長類、例えばカニクイザルのV6オルソログに対してスクリーニングされてもよい。目的の抗体が入ったウェルからのB細胞の不死化は、個別的なウェル又はプールされたウェルのいずれかから融合によりハイブリドーマを作製することによるか、又はEBVを感染させるか、若しくは公知の不死化遺伝子でトランスフェクトし、次に好適な培地に播くことによるなど、様々な方法で行われ得る。或いは、次に所望の特異性で単一の形質細胞を分泌する抗体が、V6特異的溶血プラークアッセイを用いて単離される(例えば、Babcock et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48(1996)を参照)。溶解の標的とされる細胞は、V6抗原で被

10

20

30

40

50



覆されたヒツジ赤血球 (SRBC) であってもよい。

【0199】

目的の免疫グロブリンを分泌する形質細胞を含むB細胞培養物及び補体の存在下では、プラーク形成が、特異的 V<sub>H</sub>6の媒介による目的の形質細胞を取り囲むヒツジ赤血球の溶解の指標となる。プラークの中心にある単一の抗原特異的形質細胞を単離することができ、その単一の形質細胞から、抗体の特異性をコードする遺伝情報が単離される。逆転写とそれに続くPCR(RT-PCR)を用いて、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNAをクローニングすることができる。次に、かかるクローニングされたDNAを、好適な発現ベクター、pcDNAなどのベクターカセット、又は免疫グロブリン (immunoglobulin) 重鎖及び軽鎖の定常ドメインを含むpcDNAベクターに、さらに挿入することができる。次に生成されたベクターを宿主細胞、例えば、HEK293細胞、CHO細胞にトランスフェクトして、転写の誘導、形質転換体の選択、又は所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切となるように修飾された従来の栄養培地で培養することができる。

10

【0200】

一般に、融合したハイブリドーマによって産生される抗体は、完全ヒト又は軽鎖を伴うヒトIgG2重鎖であった。本明細書に記載される抗体は、ヒトIgG4重鎖並びにIgG2重鎖を有する。抗体はまた、IgG1を含めた他のヒトアイソタイプの抗体であってもよい。抗体は高い親和性を有し、固相及び溶相の技法によって計測したとき典型的には約 $10^{-6}$ ~約 $10^{-12}$ M以下のK<sub>d</sub>を有した。少なくとも $10^{-11}$ MのK<sub>d</sub>を有する抗体がV<sub>H</sub>6の活性を阻害し得る。

20

【0201】

理解されるであろうとおり、抗体は、ハイブリドーマ細胞株以外の細胞株で発現することができる。特定の抗体をコードする配列を使用して好適な哺乳動物宿主細胞を形質転換することができる。形質転換は、例えばウイルスにおける(又はウイルスベクター中への)ポリヌクレオチドのパッケージング、及びそのウイルス(又はベクター)による宿主細胞の形質導入を含めた、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の方法によるか、又は米国特許第4,399,216号明細書、同第4,912,040号明細書、同第4,740,461号明細書、及び同第4,959,455号明細書(これらの特許は本明細書によって参照により本明細書に援用される)により例示されるとおりの、当該技術分野において公知のトランスフェクション手順によってもよい。用いられる形質転換手順は、形質転換する宿主に依存する。異種ポリヌクレオチドを哺乳動物細胞に導入する方法は当該技術分野において公知であり、デキストランの媒介によるトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレンの媒介によるトランスフェクション、プロトプラスト融合、電気穿孔、1つ又は複数のポリヌクレオチドのリポソーム封入、及び核へのDNAの直接的なマイクロインジェクションが含まれる。

30

【0202】

発現用の宿主として利用可能な哺乳動物細胞株は当該技術分野において公知であり、限定はされないが、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎(BHK)細胞、サル腎細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、HepG2)、ヒト上皮腎293細胞、及び多数の他の細胞株を含め、American Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞株が含まれる。細胞株の選択は、どの細胞株が高度に発現し、且つ構造的なV<sub>H</sub>6結合特性で抗体を産生するかを決定することによって行われ得る。

40

【0203】

mAbが、V<sub>H</sub>6活性(以下の実施例に示すとおり)を有意に中和する能力に基づいて、これらの抗体は、V<sub>H</sub>6発現によって起こる症状及び状態を治療するのに治療効果を有する。具体的実施形態において、本明細書に記載する抗体及び方法は、V<sub>H</sub>6誘導性細胞接着、又はV<sub>H</sub>6とそのリガンドの相互作用の結果として誘導されるシグナル伝達によって起こる症状の治療に関する。

50

## 【0204】

別の態様によれば、V 6の生物活性のアンタゴニストと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、アンタゴニストは、抗体を含む。別の態様によれば、V 6の生物活性のアンタゴニストと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物が提供される。一実施形態では、アンタゴニストは、抗体を含む。

## 【0205】

抗 V 6抗体は、患者試料中の V 6の検出に有用であり、従って、本明細書に記載する病態の診断薬として有用である。加えて、V 6活性（以下の実施例に示すとおり）を有意に阻害する能力に基づいて、抗 V 6抗体は、V 6発現によって起こる症状及び状態を治療するのに治療効果を有する。具体的実施形態において、本明細書における抗体及び方法は、V 6誘導性細胞接着によって起こる症状の治療に関する。さらに別の実施形態は、V 6関連疾患又は障害の治療を目的とする、本明細書に記載の抗体及び方法の使用を含み、かかる疾患又は障害として、黒色腫、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、神経膠腫、肝細胞（肝臓）癌、甲状腺腫瘍、胃癌（gastric cancer）（胃癌（stomach cancer））、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、膀胱癌、肺癌、膠芽腫、子宮内膜癌、腎臓癌、結腸癌、膵臓癌などの腫瘍性疾患が挙げられる。

10

## 【0206】

## C. 治療的投与及び製剤

実施形態は、疾患の治療薬として有用な抗 V 6抗体の無菌医薬製剤を含む。かかる製剤は、V 6インテグリンへのリガンドの結合を阻害し、これにより、例えば、組織 V 6が異常に増加した病態を有効に治療するであろう。抗 V 6抗体は、V 6活性を強力に阻害する適切な親和性を有し得ると共に、ヒトにおける低頻度の投与を可能にする適切な作用の持続時間を有し得る。長時間にわたる作用の持続は、皮下又は筋肉内注射などの代替的非経口経路による低頻度で、しかもより好都合な投与スケジュールを可能にする。

20

## 【0207】

抗 IGF - I / II 抗体の無菌医薬製剤が、本明細書に開示される方法において有用である。無菌製剤は、例えば、抗体を凍結乾燥及び再構成する前又はその後に無菌ろ過膜でろ過することにより作成することができる。抗体は通常、凍結乾燥形態で、又は溶液中に保存され得る。治療用抗体組成物は、概して、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針によって穿刺可能な栓などの、製剤の取り出しを可能にするアダプターを有する静脈内注射液バッグ又はバイアルに入れられる。

30

## 【0208】

抗体投与経路は、公知の方法、例えば、静脈内、腹腔内、脳内、筋肉内、眼内、動脈内、髄腔内、吸入又は病巣内経路、腫瘍部位への直接注入による、又は以下に記載するとおりの徐放システムによる注射又は注入に従う。抗体は、注入によって連続的に、又はボーラス注入により投与することができる。

## 【0209】

治療に使用する抗体の有効な量は、例えば、治療目的、投与経路、及び患者の状態に応じて変動し得る。従って、治療者は、最適な治療効果を達成するために、投薬量を滴定し、投与経路を修正することができる。一態様では、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで、抗体を投与する。この療法の進行は、従来のアッセイ又は本明細書に記載するアッセイによって容易にモニターされる。

40

## 【0210】

本明細書に記載されるとおりの抗体は、薬学的に許容可能な担体と共に混合物中に調製することができる。この治療組成物は、静脈内投与するか、又は任意選択で液体若しくは粉末エアロゾル（凍結乾燥）として、経鼻的若しくは経肺的に投与することができる。この組成物はまた、所望に応じて非経口的に又は皮下に投与されてもよい。全身投与される場合、治療組成物は、無菌、パイロジェンフリーで、且つ pH、等張性、及び安定性について妥当な考慮がなされた非経口的に許容可能な溶液中になければならない。これらの条件

50

は当業者に公知である。簡潔に言えば、本明細書に記載される化合物の投薬製剤は、所望の純度を有する化合物を薬学的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤と混合することにより、保管用又は投与用に調製される。かかる材料は、用いられる投薬量及び濃度で被投与者に非毒性であり、T R I S H C l、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩及び他の有機酸塩などの緩衝剤；アスコルビン酸などの抗酸化剤；ポリアルギニンなどの低分子量（約10残基未満）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など；ポリビニルピロリジノンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン酸、アスパラギン酸、又はアルギニンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、及びその他の、セルロース又はその誘導体、グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む炭水化物；E D T Aなどのキレート剤；マンニトール又はソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの対イオン及び/又はT W E E N、P L U R O N I C S又はポリエチレングリコールなどの非イオン性界面活性剤が含まれる。

10

#### 【0211】

注射用無菌組成物は、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20<sup>th</sup> ed, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2003))に記載されるとおりの従来の薬務に従い製剤化することができる。例えば、水又はゴマ油、ピーナッツ油、若しくは綿実油のような天然に存在する植物油などの薬学的に許容可能な担体、又はオレイン酸エチルなどのような合成脂肪媒体に活性化化合物を溶解又は懸濁することが望ましい場合もある。認められている薬務に従い緩衝剤、防腐剤、抗酸化剤などが組み込まれてもよい。

20

#### 【0212】

徐放性製剤の好適な例としては、ポリペプチドを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成形品、フィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例としては、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、Langer et al., J. Biomed Mater. Res., (1981) 15: 167 - 277及びLanger, Chem. Tech., (1982) 12: 98 - 105により記載されるとおりのポリ(2-メタクリル酸ヒドロキシエチル)、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号明細書、欧州特許第58,481号明細書）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸との共重合体（Sidman et al., Biopolymers, (1983) 22: 547 - 556）、非分解性エチレン酢酸ビニル（Langer et al., 前掲）、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）などの分解性乳酸-グリコール酸共重合体、及びポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133,988号明細書）が挙げられる。

30

#### 【0213】

エチレン酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日間以上にわたり分子を放出することが可能であるが、特定のハイドロゲルはそれより短い期間にわたりタンパク質を放出する。タンパク質は封入されると体内に長期間留まり、37の水分に曝露される結果として変性又は凝集すると、それにより生物活性が失われ、場合により免疫原性が変化し得る。関与する機構に応じてタンパク質安定化のための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集機構がジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見出される場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、含水量の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマーマトリックス組成物の開発により、安定化を実現することができる。

40

#### 【0214】

抗体はまた、哺乳動物、任意選択でヒトにおいて、非修飾抗体のそれより長い半減期（例えば、血清半減期）を有する抗体をも包含する。一実施形態では、前記抗体の抗体半減期は、15日超、20日超、25日超、30日超、35日超、40日超、45日超、2ヵ

50

月超、3ヵ月超、4ヵ月超、又は5ヵ月超である。哺乳動物、任意選択でヒトにおける本明細書に記載の抗体若しくはその断片の半減期の増加は、哺乳動物において前記抗体若しくは抗体断片のより高い血清力価をもたらす、従って、前記抗体若しくは抗体断片の投与の頻度を減じる、及び/又は投与する前記抗体若しくは抗体断片の濃度を低減する。インビボ半減期が増加した抗体又はその断片は、当業者には周知の技術により生成することができる。例えば、インビボ半減期が増加した抗体又はその断片は、FcドメインとFcRn受容体との相互作用に關与するアミノ酸残基を修飾（例えば、置換、欠失又は付加）することにより、生成することができる（例えば、国際公開第97/34631号パンフレット及び同第02/060919号パンフレット（本明細書によって全体として参照により援用される）を参照されたい）。インビボ半減期が増加した抗体又はその断片は、前記抗体又は抗体断片に、高分子量ポリエチレングリコール（PEG）などのポリマー分子を結合させることにより、生成することができる。PEGは、前記抗体又は抗体断片のN若しくはC末端へのPEGの部位特異的結合によって、又はリシン残基に存在するアミノ基を介したいずれかで、多機能リンカーと共に、又はなしで前記抗体又は抗体断片に結合させることができる。生物活性の喪失を最小限にする直鎖又は分岐状ポリマー誘導体化を使用する。PEG分子と抗体の適正な結合を確実にするために、結合の度合いをSDS-PAGE及び質量分析により綿密にモニターする。非反応PEGは、例えば、サイズ排除又はイオン交換クロマトグラフィーにより抗体-PEGコンジュゲートから分離することができる。

10

#### 【0215】

20

徐放性組成物にはまた、懸濁液中に結晶を維持することが可能な好適な製剤中に懸濁された抗体の結晶の配合物も含まれる。このような配合物は、皮下注入又は腹腔内注入されると徐放性の効果を生じ得る。他の組成物にはまた、リポソームに捕捉された抗体も含まれる。かかる抗体を含むリポソームは、それ自体公知の方法により調製される：米国特許第DE3,218,121号明細書；Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1985) 82: 3688-3692；Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1980) 77: 4030-4034；欧州特許第52,322号明細書；欧州特許第36,676号明細書；欧州特許第88,046号明細書；欧州特許第143,949号明細書；142,641号明細書；日本国特許出願第83-118008号明細書；米国特許第4,485,045号明細書及び同第4,544,545号明細書；及び欧州特許第102,324号明細書。

30

#### 【0216】

所与の患者のための抗体製剤の投薬量は、担当医師により、薬物の作用を変化させることがわかっている様々な因子、例えば、疾患の重症度及び種類、体重、性別、食事、投与時間及び経路、他の薬剤及びその他の関連する臨床的因子を考慮に入れて、決定される。治療に有効な投薬量は、インビトロ又はインビボ方法のいずれによって決定してもよい。

#### 【0217】

治療に使用する本明細書に記載の抗体の有効な量は、例えば、治療目的、投与経路、及び患者の状態に応じて変動し得る。従って、治療者は、最適な治療効果を達成するために、投薬量を滴定し、必要に応じて投与経路を修正することができる。典型的な1日投薬量は、前述した因子に応じて、約0.001mg/kg～100mg/kg以上までであってよい。典型的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に到達するまで、治療用抗体を投与する。この療法の進行は、従来のアッセイ又は本明細書に記載するアッセイによって容易にモニターされる。

40

#### 【0218】

本明細書における組成物及び方法に従う治療用エンティティの投与は、移動、送達、耐性などの向上をもたらすため製剤中に組み込まれる好適な担体、賦形剤、及び他の薬剤と共に投与され得ることは理解されるであろう。これらの製剤としては、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、脂質（カチオン性又はアニオン性）を含有す

50

る媒体 (Lipofectin (商標) など)、DNA コンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油及び油中水エマルジョン、エマルジョンカーボワックス (様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、及びカーボワックスを含有する半固体混合物が挙げられる。前述の混合物のいずれも治療及び療法に適切であり得るが、但し、製剤中の活性成分がその製剤により不活性化されないこと、及び製剤が投与経路に関して生理学的に適合性及び忍容性を有することを条件とする。製薬化学者に公知の製剤、賦形剤及び担体に関するさらなる情報については、Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32 (2): 210 - 8 (2000)、Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203 (1 - 2): 1 - 60 (2000)、Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery - some emerging concepts." J. Pharm. Sci. 89 (8): 967 - 78 (2000)、Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52: 238 - 311 (1998) 及びこれらの文献中の引用も参照のこと。

10

#### 【0219】

20

#### D. 他の治療薬の設計及び生成

本発明の実施形態に従い、且つ V 6 に関して本明細書において產生され、特性決定される抗体の活性に基づいて、抗体部分以外の他の治療法の設計が促進される。かかる治療法として、限定はされないが、高度抗体治療薬、例えば、二重特異性抗体、免疫毒素、及び放射性標識治療薬、単ドメイン抗体、ペプチド治療薬の生成、新規スカフォールド中の V 6 結合ドメイン、遺伝子療法、特にイントラボディ、アンチセンス治療薬、及び小分子が挙げられる。

#### 【0220】

補体結合が望ましい属性である高度抗体治療薬の生成に関して、例えば、二重特異性抗体、免疫毒素、放射性標識の使用による細胞の殺傷のための補体への依存を回避することが可能である。

30

#### 【0221】

以下: (i) 1つは V 6 に対する特異性を有し、もう1つは第2分子に対する特異性を有し、互いに結合した2つの抗体、(ii) V 6 に対して特異的な1つの鎖と、第2分子に対して特異的な第2鎖を有する単一抗体、又は(iii) V 6 及び他方の分子に対する特異性を有する単一抗体を含む、二重特異性抗体を生成することができる。かかる二重特異性抗体は、公知の技術; 例えば、(i) 及び(ii) に関しては、例えば、Fanger et al., Immunol. Methods 4: 72 - 81 (1994) 並びにWright 及び Harris (前掲) を、また、(iii) に関しては、例えば、Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51 - 52 (1992) をそれぞれ参照されたい。いずれの場合も、第2の特異性は、限定はされないが、CD16 若しくはCD64 (例えば、Deo et al., Immunol. Today 18: 127 (1997) を参照) 又はCD89 (例えば、Valerius et al., Blood 90: 4485 - 4492 (1997)) などの重鎖活性化受容体に対してもたすことができる。

40

#### 【0222】

免疫毒素に関して、抗体は、当該技術分野において公知の技術を使用して、免疫毒素として作用するように修飾することができる。例えば、Vitetta Immunol. Today 14: 252 (1993) を参照されたい。また、米国特許第5,194,594号明細書も参照されたい。また、放射性標識抗体の調製に関しても、かかる修飾抗

50

体は、当該技術分野において公知の技術を使用して容易に調製することができる。例えば、Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) を参照されたい。また、米国特許第4,681,581号明細書、同第4,735,210号明細書、同第5,101,827号明細書、同第5,102,990号明細書 (RE 35,500)、同第5,648,471号明細書、及び同第5,697,902号明細書も参照されたい。

#### 【0223】

抗原結合部位は、フィブロネクチン若しくはシトクロムBなどの非抗体タンパク質スカフォールド上のCDRの配置によって (Haan & Maggos (2004) BioCentury, 12(5): A1-A6; Koide et al., (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151; Nygren et al., (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469)、又はタンパク質スカフォールド内のループのアミノ酸残基を無作為化若しくは突然変異させることにより付与することができる。タンパク質に新規の結合部位を作製するためのスカフォールドについては、Nygrenらにより詳しく論述されている (Nygren et al., (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469)。抗体ミメティクスのためのタンパク質スカフォールドは、国際公開第0034784号パンフレット (その全体が、本明細書によって参照により援用される) に記載されており、ここで、本発明者らは、少なくとも1つの無作為化ループを有するフィブロネクチンIII型ドメインを含むタンパク質 (抗体ミメティクス) を記載している。1つ又は複数のCDR、例えば、HCDRのセットを移植するために好適なスカフォールドは、免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーの任意のドメインメンバーによって提供され得る。スカフォールドは、ヒト又は非ヒトタンパク質のいずれであってもよい。非抗体タンパク質スカフォールドの利点は、少なくとも一部の抗体分子より小さく、及び/又は製造しやすいスカフォールド分子中に抗原結合部位を提供することができる点である。小サイズの結合剤は、細胞に進入する、組織の深部まで浸透する、又は他の構造内の標的に到達することができる、或いは、標的抗原のタンパク質空洞内に結合することができるなどの有用な生理学的特性を付与し得る。非抗体タンパク質スカフォールド中の抗原結合部位の使用については、Wess、2004年 (Wess, L. In: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004) に論述されている。典型的なのは、安定な骨格と1つ又は複数の可変ループを有するタンパク質であり、その場合、1つ又は複数のループのアミノ酸配列は、標的抗原に結合する抗原結合部位を形成するように特異的又は無作為に突然変異している。かかるタンパク質としては、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 由来のプロテインAのIgG結合ドメイン、トランスフェリン、アルブミン、テトラネクチン、フィブロネクチン (例えば、第10フィブロネクチンIII型ドメイン)、リポカリン並びに結晶性及びその他のAffilin (商標) スカフォールド (Scil Proteins) が挙げられる。他のアプローチの例として、シクロチドを基材とする「ミクロボディ (Microbodies)」- 分子内ジスルフィド結合を有する低分子量タンパク質、ミクロプロテイン (Microproteins) (Versabodies (商標)、Amunix) 及びアンキリン反復タンパク質 (DARpins, Molecular Partners) が挙げられる。

#### 【0224】

抗体配列及び/又は抗原結合部位に加えて、結合剤は、他のアミノ酸、例えば、折り畳まれたドメインなどのペプチド若しくはポリペプチドを形成するアミノ酸、又は抗原に結合する能力以外の別の機能的特徴を分子に付与するアミノ酸を含んでもよい。結合剤は、検出可能な標識を担持してもよく、或いは、毒素又はターゲティング部分若しくは酵素と

10

20

30

40

50

結合してもよい（例えば、ペプチジル結合若しくはリンカーを介して）。例えば、結合剤は、抗原結合部位と共に、触媒部位（例えば、酵素ドメイン中に）を含んでもよく、この場合、抗原結合部位は、抗原に結合し、これにより、触媒部位を抗原にターゲティングする。触媒部位は、例えば、切断によって、抗原の生物学的機能を阻害し得る。

#### 【0225】

その他の実施形態は、ここに開示する本明細書及び実施の考察から当業者には明らかになるであろう。本明細書及び例は、あくまで例示として考慮すべきであり、真の範囲及び趣旨は、以下の特許請求の範囲によって示される。

#### 【実施例】

#### 【0226】

#### 実施例1．材料及び方法

##### 臨床試料

以下のREMARK指針(23)に従い、2つの独立したコホートの乳癌試料を分析した。1つは、1986～1998年に、年齢が<70歳の女性のノッティンガム・テノブス乳癌系列(Nottingham Tenovus Breast Carcinoma Series)からの1,795の連続ケースを含んだ(ノッティンガムコホート(Nottingham Cohort))(24、25)。腫瘍タイプ、組織学的グレード、サイズ、リンパ節(LN)状態、ER-、PR-及びHER2状態、シトケラチン(CK)プロフィール、再発(局部、局所及び遠位)並びに生存に関するデータが入手可能であった。第2コホートは、ガイズアンドセントトーマス乳房組織バンク(Guy's and St. Thomas' Breast Tissue Bank)、ロンドンからの1,197の浸潤性症例であった(ロンドンコホート(London Cohort))。患者は、1960年～1998年に手術を受けた(98%が1975年以降)。腫瘍タイプ、グレード、LN状態、ER-、PR-及びHER2状態、無病及び全生存期間についてのデータが入手可能であった。臨床病理学的データの概要を示す(図10)。全ての試験は、ノースイーストロンドン研究倫理委員会(North East London Research Ethics Committee)により承認された。

#### 【0227】

##### 免疫組織化学的分析

免疫組織化学では、組織マクロアレィ(TMA)の4µmのホルマリン固定、パラフィン包埋連続切片を使用した。各試料は、最小2×0.6mm腫瘍コアの形態を呈した。標準的アビジン-ビオチン複合体技術(Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Peterborough, UK)を、シトケラチン5/6(Sigma, UK)及びシトケラチン14(Sigma, UK)のためのクエン酸緩衝液マイクロウェーブ抗原賦活化と共に使用した。v6インテグリンのために用いるプロトコル(mAb 6.2G2, Biogen Idec)は、以前記載されている(16)。正常乳房(n=15)をシトケラチン抗体の正の対照とし、マウスIgGは、負の対照とした。インテグリン v6染色を、腫瘍細胞染色の程度(0、<25%=1、25～50%=2、50%～75%=3、>75%=4)及び強度(0=陰性、1=弱、2=中、3=強)の和としてスコアリングし；0～7の最終スコアを付与する。強力な v6染色の例を図1Bに示す。各腫瘍コアを2人の独立した病理学者によってスコアリングし；最終スコアは、2つの読み取り値の平均を表す。強力な発現(スコア 5)を示す患者と、中度又は陰性染色(スコア<5)を示す患者との間に予め定めたカットオフを全ての分析で用いた。CK5/6及びCK14発現について、>10%の染色が起これば、患者を陽性に見なした(25)。

#### 【0228】

##### METABRICコホート前処置

この試験は、乳癌国際協会の分子分類学(Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium)(26)によって作成されたMETABRICデータを使用する。本プロジェクトの資

10

20

30

40

50

金は、英国癌研究 (Cancer Research UK) 及びブリティッシュコロ  
ンビア癌研究所支部 (British Columbia Cancer Agency  
Branch) により提供された。乳癌 METABRIC データセットを前処理し、ま  
とめた後、Illumina BeadStudio により作成された生 (raw) エクス  
プレッション (expression) ファイルからクオンタイル正規化した。(R  
packages: beadarray v2.4.2 and illuminaHuman v3.db\_1.12.2)。生 METABRIC ファイルを欧州ゲノム - フェ  
ノムアーカイブ (EGA) からダウンロードした (試験識別番号: EGAS00000000  
00083)。1つの METABRIC 試料の生データファイルは、本発明者らの分析の時  
点で入手できなかったため、それは除外した。前処理は全て R 統計的環境 (statistical  
environment) v2.14.1 において実施した。

10

#### 【0229】

##### 生存分析

ロンドン及びノッティンガム臨床コホートにおける HER2+ 患者を、v6 タンパ  
ク質発現を用いて、低リスク群及び高リスク群に二分した (低リスク v6 < 5、高リ  
スク v6 ≥ 5)。生存分析を R 統計的環境 v2.14.1 (R パッケージ: 生存 v2  
.36 ~ 14) において実施した。単変量 Cox 比例ハザードモデルをあてはめること  
によってハザード比を推定し、リスク群の生存の差の有意性を、Logrank 検定を用い  
て計算した。同様に、METABRIC コホートにおける遺伝子発現由来の HER2+ 患  
者を、ITGB6 発現プロファイルを用いて分析した。METABRIC における ITGB  
6 発現についてのリスク群二分化閾値は、ロンドン/ノッティンガム臨床コホートの抗  
体試験によって決定された低及び高リスク HER2+ 患者の割合を用いることにより設定  
した。R 統計的環境 v2.14.1 において、カプラン・マイヤー生存曲線を作成した。

20

#### 【0230】

##### 細胞株及び薬物供給源

20 のヒト乳癌細胞株を v6 発現について分析した。全ての株の遺伝学的アイデン  
ティティ (genetic identity) を LGC STR プロファイリングによ  
って確認した (データは示していない)。10% 胎仔ウシ血清 (FBS) 及び L-グルタ  
ミンを含有する DMEM において、ヒト乳癌細胞株 MCF-7 及び MDA-MB-468  
細胞を増殖させた。MCF-7/neo-1 及び MCF-7/HER2-18 は、Hun  
g 教授 (Texas, USA) からの好意による寄贈品である (37)。細胞供給源及び  
培地要件については、記載されているとおりである (37、38、39、40)。10%  
FCS、L-グルタミン及びインスリン (10 µg/ml) を含有する RPMI において  
、BT-474 細胞を増殖させた。

30

#### 【0231】

マウスモノクローナル抗体 6.2G2 は、Biogen Idec (Cambridge,  
MA, USA) からの寛大な寄贈品であった。IgG 及び v6-阻止抗体 264  
RAD は、Oncology iMED, AstraZeneca (Macclesfield,  
UK) からの寛大な寄贈品であった。トラスツズマブは、Roche Ph  
armaceuticals からの寛大な寄贈品であった。siRNA は、Dharma  
con (SMARTpool: siGENOME, Thermo Scientific)  
) から供給された。増殖因子は、Peprtech から供給された。

40

#### 【0232】

##### トランスウェル及びミニ器官型浸潤アッセイ

トランスウェル浸潤アッセイのために、70 µl の BD マトリゲル基底膜 (Matrigel  
Basement Membrane) マトリックス (マトリゲル): 培地 (1  
: 2 比) でコーティングした直径 6.5 mm、細孔径 8 µm のトランスウェル (Trans  
well) (登録商標) (Corning BV) 中に、処理後、1 ウェル当たり 5 ×  
10<sup>4</sup> 個の細胞を接種した。マトリゲルを介して浸潤した細胞を、72 時間後に、CAS  
Y 計数器 (Scharfe Systems, Germany) を用いて計数した。器官

50



型アッセイのために、 $5 \times 10^4$ 個のMRC5/hTERT線維芽細胞を含有する120  $\mu$ lのコラーゲン（ラットテイルコラーゲン（Rat tail Collagen）I、Marathon Laboratories）：マトリゲル混合物（70：30）を含む、直径6.5 mm、細孔径4  $\mu$ mのトランスウェル上に、処理後、1ウェル当たり $5 \times 10^4$ 個の細胞を接種した。培地を5～6日にわたって2日置きに交換し、ゲルを通常生理食塩水中に固定し、パラフィン包埋して、切片をヘマトキシリン及びエオシン染色した。各ゲル上の5地点での平均深さに、浸潤細胞が占める面積を掛けることによって、浸潤指数を算出した。ImageJ 1.64ソフトウェアを用いて、分析を実施した。

#### 【0233】

##### 免疫ブロッティング

処理後、細胞をNP-40バッファー中に溶解させてから、ウエスタンブロッティングに付した。手短には、定量後、1レーン当たり10～50  $\mu$ gのタンパク質をロードし、ゲル泳動させ、膜に移した。0.1%TBS-Tween-20中の5%脱脂乳において、室温で1時間のインキュベーションにより、非特異的結合を阻止した。膜を所望の一次抗体と一緒に、一晚4℃でインキュベートした。図13に、抗体及び供給業者の一覧を記載する。ImageJ 1.64ソフトウェアを用いて、分析を実施した。

#### 【0234】

##### ヒト腫瘍異種移植片モデル

全ての動物実験は、Home Office Guidelineにより承認され、これらを遵守した。全ての動物試験のために、264RAD及びトラスツズマブを最終濃度10 mg/kgで、1xPBSに溶解させた。腫瘍細胞注射の24時間前に、エストロゲンペレット（0.25 mgを60日放出、Innovative Research of America）をマウスに皮下移植した。SCIDマウス（Oncology iMED, AstraZeneca, Macclesfield, U.Kからの寛大な寄贈品）又はCD1-nu/nuマウス（Charles River Laboratories）を、200  $\mu$ lのPBS中の $1 \times 10^6$  MCF-7/HER2-18細胞又は1：1のPBS/マトリゲル中の $1 \times 10^7$  BT-474細胞のいずれかと一緒に、皮下接種した。腫瘍が触知可能（3～4 mm<sup>3</sup>）になるか、又は100若しくは200 mm<sup>3</sup>に達したら、マウスを無作為に処置群に分けた。マウスは、2週間毎に、ヒトIgG、264RAD、トラスツズマブ又は264RADとトラスツズマブの両方の腹腔内注射（200  $\mu$ lのPBS中10 mg/kg）を受けた。2週間毎に、カリパスを用いて、腫瘍を2方向で測定し、式（幅<sup>2</sup>×長さ）/2を用いて、腫瘍体積を計算した。

#### 【0235】

##### 統計分析

対照インビトロ培養物に対する薬物処置培養物の統計的有意性を、2つの変数についてのスチューデントt検定を用いて決定した。3つ以上の変数の場合、Prism GraphPadソフトウェア（Systat Software, San Jose, CA, USA）を用いたBonferroni's Multiple Comparison Testと共に、一元配置分散分析（one-way ANOVA）を用いて決定した。腫瘍異種移植片モデルについては、個別の増殖曲線をプロットした後、線形混合モデル（27）を用いて、処置間の差を検定した。これを、統計ソフトウェアR（R Development Core Team, 2010）2.11.1におけるnlmeパッケージを用いて、最大尤度によりあてはめた。P値は、ウォールド（Wald）検定から得たものである。Prism GraphPadのLog-Rank検定を用いて、マウスの生存率を測定した。統計検定は全て両側検定であった。

#### 【0236】

実施例2．インテグリン  $\alpha$ 6及びHER2の高度共発現により、乳癌からの低生存率が予測される。

乳癌を有する女性総計2000人超の2つの個別のコホート（ロンドン及びノッティンガム）からの組織マイクロアレイ（TMA）上の  $\alpha$ 6発現について染色した（染色例、

10

20

30

40

50

図1A)。これら2コホートの臨床病理学的パラメータ、及びこれらのパラメータとV6発現の相関を図10及び11にそれぞれ示す。正常乳房組織( $n > 15$ )は、V6発現がないのに対し、V6の高度発現は、浸潤性乳管癌の15%~16%に観察された(図1A、1B、及び11)。V6の高度発現と低生存率との間に有意な相関があった(図1C及び1D)。そのため、5年生存率は、ロンドンコホートでは71.3%から57%に(図1C;  $P = 2.9 \times 10^{-6}$ )、ノッティンガムコホートでは73.5%から53.2%に(図1D;  $P = 4.73 \times 10^{-5}$ )低下し、低生存率とV6の高度発現との有意な関連は、少なくとも15年続いた(図6)。腫瘍病期について調節した後も、サイズ及びグレードV6は、生存率の独立した予測因子のままであった( $P = 0.03$ ; 総合コホートデータ)。腫瘍播種に関するデータは、ノッティンガム系列についてしか入手できなかったが、この系列では、V6発現は、遠位拡散と有意に関連していた( $P = 0.02$ )。1026人のV6陰性患者のうち、317(31%)が、遠隔転移を有したのに対し、対応する205人のV6陽性患者のうち、81(40%)が、遠隔転移を有した。さらに、V6陽性癌は、骨への拡散を有する可能性が有意に高かった( $P = 0.04$ )。

#### 【0237】

また、いずれのコホートについても、HER2と高度V6発現との間に強力な相関があったことも認めた( $P = 0.001$ ; 図11)。高度V6及びHER2タンパク質の共発現は、総合ロンドン及びノッティンガムコホートにおいて生存率を有意に低下させた(図1E: ハザード比(HR)3.43;  $P = 3.98 \times 10^{-12}$ )。METABRIC乳癌発現データベース(>2000患者(26))の分析によって、高度ERBB2(HER2)及びITGB6(インテグリン6サブユニット)遺伝子発現を有した患者が、生存率を有意に低下した(図1F;  $HR = 1.94$ ,  $P = 0.003$ )ことが確認されたことから、増大したリスクは、転写レベルで制御されると思われる。このように、タンパク質及びmRNAレベルの両方でHER2とV6との間に相関があると思われ、乳癌からの低い生存率が予測されるため、本発明者らは、これら2つの受容体が、協同して浸潤及び癌を促進するのかどうかを調べた。

#### 【0238】

実施例3. インテグリンV6及びHER2はいずれも、乳癌浸潤を促進する。

フローサイトメトリーを用いて、V6及びHER2の発現、並びにマトリゲルを通じて浸潤するそれらの能力について、20の乳癌細胞株をスクリーニングした(図2A、2B、及び12)。細胞株の80%が、V6を発現したことが見出され、これらのうち、V6/HER2二重陽性細胞株BT-474、MCF10A、CA1a(CA1a)及びトラスツズマブ耐性MCF-7/HER2-18(HER2-18)をさらに詳しく調べた。V6(264RAD)又はHER2(トラスツズマブ、TRA)の抗体遮断は、浸潤を有意に阻止した(図2C及び2D)。同様に、ITGB6(図2E)又はERBB2(図2F)に対するsiRNAも、浸潤を有意に阻止した。264RADは、V8に対してある程度の活性も有することから、これらの実験をV6特異的抗体、10D5を用いて反復し、同様の結果を得た(図7A)。V6及びHER2の組み合わせ抗体遮断は、単一抗体遮断によって得られたもの以上に浸潤を低減しなかった(図2G)が、恐らくこれは、これらの受容体が、同じ経路を介して機能したことを示唆している。HER2-18又はCA1a細胞の増殖は、マトリゲルアッセイの工程中、又は処理の7日後に、264RAD、トラスツズマブ若しくは両抗体の組み合わせでの処置によって有意に変化しなかった(図7B)。3日にわたるいずれの処置によっても、トラスツズマブ感受性BT-474細胞において増殖は有意に低減しなかったが、トラスツズマブは、7日にわたって増殖を約30%低減し; 264RADは、3又は7日にわたりBT-474増殖に有意に作用しなかった(データは示していない)。

#### 【0239】

共焦点顕微鏡検査によって、V6及びHER2が、乳癌細胞に共局在化したことが明らかにされた(図7C)。しかし、2つのタンパク質は、ヘレグリン1(HRG)

10

20

30

40

50

と共に、又はなしで、いずれかの弱い会合を強化するためにタンパク質 - タンパク質架橋剤を添加した場合でも、共免疫沈降しなかった（データは示していない）。

#### 【0240】

実施例4．インテグリン V 6 は、HER2 駆動の浸潤を媒介する。

V 6 及びHER2 機能同士の関係を確認するため、HER2 / 3 ヘテロ二量体化及び下流シグナル伝達活性化を誘導するために、HRG の添加によりHER2 浸潤を刺激した。HER3 は、乳癌におけるHER2 の優先的な二量体化のパートナーであり（28）、低生存率をもたらす。HRG は、HER4 のリガンドでもあるが、シグナル伝達の大部分は、HER2 / 3 を介して起こる（データは示していない）。これは、P - HER4 発現が、HRG 有り又はなしのいずれの場合でも、無視できる程度であった腫瘍異種移植片において確認された。

10

#### 【0241】

図3A及び3Bは、HRG が、HER2 - 18 及びCA1a 細胞両方の浸潤性向を有意に高めたこと、並びにこの浸潤の増大が、HER2（トラスツズマブ）又は V 6（264RAD）の抗体遮断によって阻害され得ることを示す。これらのデータは、HER2 促進の浸潤が、V 6 により媒介されることを示唆している。対照的に、BT - 474 細胞へのHRG の添加は浸潤能力を増強せず、これは、それらのHER2 促進浸潤性向が、最大であったことを示唆している。しかし、V 6 又はHER2 の遮断は、やはりそれらの内因性浸潤性向を抑制した（図3A及びB）。

#### 【0242】

20

より生理学的に重要なアッセイにおいて浸潤を試験するために、腫瘍細胞が線維芽豊富なリッチコラーゲンゲルに浸潤することを可能にする器官型浸潤アッセイを用いて、細胞株を試験した。HER2 - 18 及びBT - 474 細胞は、器官型システムに適合させることができないことが判明したため、CA1a 細胞を試験した。図3Cは、V 6 又はHER2 の抗体遮断及びsiRNA ノックダウンの両方が、浸潤を有意に抑制することを示す。浸潤は、V 6 遮断によって67.45 ± 12.53%、またHER2 遮断によって69.81 ± 9.85% 低減した（ヒストグラムに示される「浸潤指数（Invasion Index）」として定量される浸潤）。これらのデータは、マトリゲル浸潤データを支持するものである（図2）。まとめると、これらのインビトロデータは、乳癌において、V 6 が、HER2 と協同して、浸潤に必要な細胞内シグナルを生成することを示唆し、さらには、V 6 機能の遮断が、HER2 標的化抗体療法を改善し得ることも示唆している。264RADもまた V 8 に対してある程度の活性を有する（29）が、MCF - 7 / Her2 - 18、MCF10A、CA1a 及びBT - 474 は、このインテグリンを発現しないため、この抗体の作用は、これらの細胞において特異的に V 6 に対することに留意されたい。

30

#### 【0243】

実施例5．V 6 の抗体遮断は、インビボでトラスツズマブ効力を改善する

V 6 遮断が、トラスツズマブ抗体療法を改善することができるかどうかを試験するために、トラスツズマブ感受性BT - 474 細胞株の増殖に対する264RADの作用をインビボで試験した。図4Aは、100mm<sup>3</sup>のBT - 474 腫瘍を有するマウスの264RADによる2週間の処置が、IgGと比較して（P < 0.0001）腫瘍増殖を停止し、また、トラスツズマブ（TRA）は、腫瘍の成長を77.8%と有意に低減した（P < 0.0001）ことを示す。しかし、264RAD及びトラスツズマブの併用は、14日の処置後、IgGと比較して（P < 0.0001）、94.8%の体積縮小と、トラスツズマブ単独より有効であった。

40

#### 【0244】

V 6 遮断が、トラスツズマブ耐性腫瘍におけるトラスツズマブの効力を改善することができるかどうかを評価するために、インビボでトラスツズマブ耐性MCF - 7 / HER2 - 18（HER2 - 18）細胞株による抗体療法を反復した。腫瘍を100mm<sup>3</sup>に到達させた後、療法を開始した。図4Bは、急速に進行したIgG対照と比較して、26

50

4 R A D又はトラスツズマブいずれかによる単独療法は、同等程度で増殖を緩徐にした (I g Gと比較して、それぞれ最終体積の53.9% ( $P = 0.0006$ ) 及び52.1% ( $P = 0.0004$ ) 縮小) ことを示す。併用療法は、いずれかの抗体単独より有意に高い程度まで腫瘍体積を縮小し、トラスツズマブ単独と比較して腫瘍体積はさらに24.14% 縮小し ( $P < 0.0001$ )、またI g Gと比較して76.2%の腫瘍の全体的体積縮小を示した ( $P < 0.0001$ )。抗体による処置後のB T - 474 及びH E R 2 - 18 異種移植片の代表的画像を図4 C に示す。

#### 【0245】

次に、処置後の異種移植片におけるタンパク質発現を分析することにより、この抗腫瘍形成効果を支持する分子機構を調べた。

#### 【0246】

実施例6. 264 R A D及びトラスツズマブ療法に対する癌腫瘍の分子応答。

2週間の処置後にB T - 474 及びH E R 2 - 18 異種移植片からの残留腫瘍組織を溶解させ、2週間の処置計画からの様々なシグナル伝達分子について分析した。各抗体の直接標的、V 6、H E R 2 及びH E R 3のタンパク質発現を、これらの経路(全(T o t a l)(T) - A k t 2) 及びV 6 関連T G F シグナル伝達経路(全(T o t a l)(T) 及びホスホ(P) - S m a d 2) の下流標的と共に、評価した。図4 Dの免疫プロット(図4 Eにおいて定量)は、264 R A D又はトラスツズマブ(T R A)による3つの代表的なB T - 474 異種移植片の処置が、有意にV 6の発現を低減し；併用療法は、V 6の発現をほぼなくしたことを示す。併用療法はまた、トラスツズマブ単独で観察されたH E R 2、H E R 3、T - S m a d 2、P S m a d 2 及びT - A k t 2の発現の低減も増強し、これは、併用処置で認められた抗腫瘍性の増強と一致している。

#### 【0247】

H E R 2 - 18 異種移植片を同じ分析に付した(図4 F 及びG)。やはり、V 6レベルは、V 6 遮断抗体264 R A D 及び併用処置によって有意に低下した。P - H E R 2、T - H E R 3、P - H E R 3、T - S m a d 2 及びT - A k t 2における統計的に有意な低減は、併用療法後にしか認められなかった。以前観察されたように、トラスツズマブで処置したH E R 2 - 18 腫瘍においてT - H E R 2レベルは増加した。264 R A DによるV 6の遮断もまた、H E R 2発現を増大したことを観察した。しかし、併用抗体療法は、低下したP - H E R 2レベルによって認められるように、H E R 2を介したシグナル伝達を有意に阻害した。

#### 【0248】

実施例7. V 6の抗体遮断は、トラスツズマブの効力を改善し、トラスツズマブ耐性モデルにおいて生存を延長する。

トラスツズマブ耐性は、重要な臨床上の障害を呈することから、さらにH E R 2 - 18トラスツズマブ耐性モデルにおいて、併用療法の抗腫瘍性の増強を調べた。初期の実験では、小さな腫瘍に対する療法の効果を評価した。皮下異種移植片を触知可能な大きさ(10 ~ 20 mm<sup>3</sup>) に到達させた後、6週間にわたる抗体療法を開始した。264 R A DはI g Gと比較して増殖を70%超低減し、これは、トラスツズマブを用いて認められた低減と均等であった(いずれも $P < 0.001$ ) (図5 A)。さらに印象的なことには、V 6とH E R 2の組み合わせ遮断によって、全処置マウスにおけるH E R 2 - 18腫瘍が根絶された。

#### 【0249】

次に、併用療法が、より大きな異種移植片に対しても同様に有効であるか否かを決定した。腫瘍を200 mm<sup>3</sup> に到達させた後、療法を開始した。図5 Bは、急速に進行したI g Gと比較して、264 R A D又はトラスツズマブのいずれかによる単独療法が、この場合も同等程度で増殖を緩徐にし(それぞれ $P = 0.0019$  及び $P = 0.0022$ )、これもまた、併用療法によって有意に低減された(それぞれ $P = 0.0135$  及び $P = 0.0223$ )。併用療法は、腫瘍の成長を完全に抑制し(I g Gと比較して、 $P < 0.0001$ )、そのサイズは50日間不変のままであった。これらのマウスを、それらの腫瘍が

許可される (Home Office 規定に従い) 最大サイズに達するまで進行させ、その時点で死なせた。図 5 C は、I g G と比較して、264 RAD 又はトラスツズマブによる単独療法が、生存率を有意に高め (それぞれ  $P = 0.0007$  及び  $P = 0.018$ )、併用療法は、さらに有効であった ( $P < 0.0001$ ) ことを示す。実際に、併用療法は、単独療法より有意に優れていた (264 RAD 及びトラスツズマブと比較して、それぞれ  $P = 0.0039$  及び  $P = 0.0393$ )。このように、V 6 の 264 RAD 遮断は、乳癌増殖を抑制し、トラスツズマブ感受性及び耐性乳癌異種移植片の両方でトラスツズマブの治療能力を増強した。

#### 【0250】

実施例 8 . 長期 264 RAD 及びトラスツズマブ療法に対する乳房腫瘍の分子応答。

10

単独療法が、併用療法に類似の分子機構を介して作動していることを確認するために、6 週間の処置後に腫瘍組織を採取し、溶解させ (図 5 A から)、同じパネルのタンパク質について免疫プロットングした。併用処置した異種移植片は、この試験の早期に根絶されたため、併用療法の分析は一切実施することができなかった。図 5 D 及び E は、6 週間にわたる 264 RAD 及びトラスツズマブ単独療法が、6 タンパク質、T - H E R 2、P - H E R 2、T - H E R 3、P - H E R 3、及び T - A k t 2 の発現を有意に低減し、2 週間の併用療法の応答に類似していた (図 4 D ~ G)。

#### 【0251】

T - S m a d 2 及び P - S m a d 2 の低下によって測定される T G F シグナル伝達の抑制は、264 RAD 又はトラスツズマブいずれかによる 2 週間の単独療法後に (トラスツズマブ感受性) B T - 474 細胞に起こり、この低下は、併用療法によってさらに低減された (図 4 D)。対照的に、H E R 2 - 18 の 2 週間の抗体療法後の T - S m a d 2 及び P - S m a d 2 には、限定的な変化があるか、又は全く変化はなかった。しかし、6 週間の単独療法の後、T - S m a d 2 及び P S m a d 2 レベルは、H E R 2 - 18 腫瘍において有意に低下した (図 5 D 及び E)。

20

#### 【0252】

これらのデータを支持して、H E R 2 - 18 異種移植片における 6 発現の免疫組織化学的分析 (図 5 F) もまた、6 発現がほとんど根絶された 2 週間の併用療法と比較して、単独療法によって 6 週間後、6 発現の低減を示した。

#### 【0253】

30

さらに、このことは、H E R 2 - 18、C A 1 a 及び B T - 474 細胞におけるマトリゲル浸潤アッセイによって支持され、ここで、T G F (3 R I I に対する s i R N A 又は T G F に対する抗体 (結果が類似のため、抗体データは示していない) で処置した細胞は、浸潤を抑制することができず、また 264 RAD は、T G F の存在及び非存在下で、同様の程度まで浸潤を阻害することができた (図 8)。

#### 【0254】

実施例 9 . 考察

この試験は、結論として、以下のことを示している：1) 乳癌におけるインテグリン v 6 の上方制御は、患者の低生存率を予測させる予後因子であり、これは、遠隔転移の発生と関連している ( $P = 0.03$ ) こと、2) v 6 及び H E R 2 の同時上方制御は、現在まで見出されている、より不良な予後の乳癌の亜群の 1 つを呈示すること、並びに 3) これらの臨床的知見についての生物学的解釈は、v 6 及び H E R 2 が協同し、インテグリン v 6 が、H E R 2 促進癌の浸潤挙動を媒介することである。従って、本発明者らのデータは、v 6 発現のための生検の試験が、乳癌を有する女性をこの新たな「非常に高い」リスク v 6 陽性 / H E R 2 + 亜群に階層化する常用的な免疫病理学的手順となるはずであるという提案を支持する。この階層化が重要であるのは、本発明者らの試験もまた、この非常に高いリスク亜群のための有望な治療戦略を示唆するからである。

40

#### 【0255】

1988 年のその導入以来、抗 H E R 2 抗体トラスツズマブは、早期乳癌の補助療法と

50

して、又は転移乳癌の化学療法との併用のいずれかで、HER2+乳癌を有する女性のための第一選択療法となっている(5、30)。このように、225,000人を超える女性が米国で乳癌を発症した2012年に、20~25%が、HER2過剰発現を有したと考えられ(NIH統計)、トラスツズマブ療法を受けた可能性がある。しかし、これらの女性の70%は、トラスツズマブに対して耐性を発生することになるか、又は既存の耐性を有しており(7)、これは、最大39,375人の米国女性が、具体的な治療法が存在しないHER2+乳癌を発症し得ることを意味する。本発明者らのデータは、トラスツズマブ耐性疾患を有する女性の40%超が、高レベルのv6も発現する可能性があることを示している。本発明者らは、これらの女性のv6の抗体ターゲティングが、治療の一選択肢を提供し得ることを示し、本発明者らの前臨床試験がこの提案を支持している。本発明者らのデータは、トラスツズマブ感受性及びトラスツズマブ耐性HER2+過剰発現ヒト乳癌異種移植片の両方において、v6及びHER2の同時抗体ターゲティング(トラスツズマブによる)が、トラスツズマブ単独の治療効果を有意に改善すると共に、生存期間を有意に延長することを明らかにしている。かかる応答を臨床的に早急に達成する必要がある。

10

#### 【0256】

抗体遮断が、いかにして乳癌増殖を抑制するか、又はさらに低減することができるかについての分子機構は、一部に、腫瘍表現型をより低いリスク亜群に変更することを含む。このように、抗体で処置した腫瘍には、v6、HER2及びHER3(それらの上方制御が、乳癌を促進し、生存率を低下させ、従って、転移を駆動する3つの受容体)の発現の一貫した下方制御がある。v6又はHER2いずれかをターゲティングする単独療法であってもv6発現を抑制することができ、これは、上記2つの分子が、乳癌において同時調節されていることをさらに証明するものである。HER2の下方制御は、トラスツズマブ感受性株BT-474における2週間の単独抗体療法によって達成されたが、トラスツズマブ耐性株HER2-18では達成されなかった。しかし、6週間の単独療法は、HER2-18トラスツズマブ耐性腫瘍においてv6、HER2及びHER3の発現を排除した。

20

#### 【0257】

BT-474又はHER2-18腫瘍モデルのいずれかで、v6又はHER2を抗体ターゲティング後、v6及び/又はHER2の消失は、腫瘍増殖を有意に緩徐にしたが、v6/HER2組み合わせターゲティングが達成したように、腫瘍増殖を停止若しくは低減しなかった。そのため、本発明者らは、v6及びHER2挙動に關与するシグナル伝達経路を調べた。

30

#### 【0258】

試験から、トラスツズマブが、HER2分解(31)及びPI3-K/Aktシグナル伝達の下方制御(32)を促進することによって、HER2+細胞における抗増殖作用を媒介することが判明し、データは、ここで、HER2のトラスツズマブ遮断だけでなく、264RADを用いたv6遮断によっても、インビボで観察されたものと一致する。本発明者らは、その細胞株が、Akt1及びAkt2を発現したが、Akt3は発現しなかったことを見出した(データは示していない)。さらに、インビトロで、Akt2のsiRNA下方制御が、BT-474、HER2-18及びCA1a細胞株の浸潤を抑制したが、Akt1の場合は抑制しなかった(図9)。従って、Akt2タンパク質について抗体処置した腫瘍を分析し、2週間の併用療法が、Akt2発現を有意に低減したのに対し、単独療法は、ほとんど効果がなかったことを明らかにした。このように、3/3乳癌細胞株における浸潤に不可欠なAktアイソフォームであるAkt2の消失は、単独療法と比較して、v6及びHER2組み合わせターゲティングのインビボ効力の改善と相関している。

40

#### 【0259】

本発明者らは、v6が潜伏TGFを活性化し得ることから、TGFも調べた(16)。さらに、活性化TGFは、遊走、浸潤及び転移を増大することによって、HER

50

R 2 腫瘍形成能を促進する ( 1 0、1 1、1 2、3 3 )。この場合も、併用療法のみが、B T - 4 7 4 腫瘍における全 ( T ) 及び活性化 ( P ) - S m a d 2 を有意に低減したのに対し、単独療法は有意に有効ではなかった。対照的に、トラスツズマブ耐性腫瘍の場合には、併用療法後に、T G F シグナル伝達の低減は中程度であったか、又は T - S m a d 2 の最低限の有意な低減しか観察されなかった。従って、2 週間の抗体療法後、T G F シグナル伝達の下方向制御よりもむしろ A k t 2 の下方向制御の方が、併用療法で認められる腫瘍抑制の増強と、より強力に相関している。しかし、これは、v 6 の抗体遮断による T G F シグナル伝達の消失が、腫瘍療法、及び 6 週間の療法後に認められた全生存率に寄与する可能性を否定するものではない。

【 0 2 6 0 】

10

まとめると、本発明者らは、v 6 の高い発現によって、有意に危険なタイプの疾患を有する女性が識別されるため、v 6 発現に関する乳癌の検査が標準慣行になるべきであると提案する。これは、特に、現在までに見出されている予後の不良な乳癌群の 1 つである H E R 2 / v 6 二重陽性癌を有する女性の 4 0 % について言えることである。乳癌に関して v 6 発現の常用的な決定では、治療介入を必要とする高リスクカテゴリーに女性を階層化する。さらに、本発明者らのデータは、v 6 の抗体遮断が、かかる女性に ( 恐らく、トラスツズマブ耐性疾患を有する女性であっても ) 有効な別の療法を提供し得ることも明らかにしている。ヒト ( 2 6 4 R A D ( 2 9 ) 及びヒト化 ( S T X - 1 0 0 ( 3 6 ) ) v 6 遮断抗体が、ヒトへの用途のために開発中であるという事実は、乳癌の v 6 標的化療法が実現可能であり、近い将来重要な検討事項とすべきであることを示している。

20

【 0 2 6 1 】

実施例 1 0 . V 6 結合剤 : 免疫及び力価決定

免疫

可溶性 V 6 及び細胞結合 V 6 ( 細胞表面にヒト V 6 を発現する C H O 形質転換体 ) をそれぞれ用いて、免疫を実施することができた。C H O 形質転換体の作製のために、ヒト完全長 V 6 c D N A を p c D N A 3 発現ベクターに挿入した。C H O 細胞をエレクトロポレーションにより一過的にトランスフェクトした。免疫原として好適なレベルの細胞表面上のヒト V 6 の発現を蛍光活性化セルソータ ( F A C S ) 分析により確認した。キャンペーン ( C a m p a i g n ) 1 については 1 0  $\mu$  g / マウスの可溶性タンパク質を、また、キャンペーン 2 については 3  $\times$  1 0<sup>6</sup> 細胞 / マウスのトランスフェクト C H O 細胞を、X e n o M o u s e ( 商標 ) における初回免疫に使用した。これは、以下に開示されている方法に従った : 1 9 9 6 年 1 2 月 3 日に出願された米国特許出願第 0 8 / 7 5 9 , 6 2 0 号明細書、並びに 1 9 9 8 年 6 月 1 1 日に公開された国際特許出願国際公開第 9 8 / 2 4 8 9 3 号パンフレット、及び 2 0 0 0 年 1 2 月 2 1 日に公開された国際公開第 0 0 / 7 6 3 1 0 号パンフレット ( これらの開示内容は、本明細書によって参照により援用される )。初回免疫に続いて、5  $\mu$  g / マウスの 1 3 回の追加免疫を群 1 及び 2 に投与し ( 可溶性抗原 )、1 . 5  $\times$  1 0<sup>6</sup> 細胞 / マウスの 9 回の追加免疫を群 3 及び 4 に投与した ( 細胞結合抗原 )。免疫プログラムを表 2 にまとめる。

30

【 0 2 6 2 】

40

【表 2】

表 2: 免疫プログラムのまとめ

キャンペーン	群	免疫原	株	マウスの数	免疫経路
1	1	可溶性 $\alpha V\beta 6$	XMG2/k	10	IP, 尾部, BIP, 2回/週, x 6 週
1	2	可溶性 $\alpha V\beta 6$	XMG1/kl	10	IP, 尾部, BIP, 2回/週, x 6 週
2	3	細胞結合 $\alpha V\beta 6$ (CHO 形質転換体)	XMG2/k	10	IP, 尾部, BIP, 2回/週, x 6 週
2	4	細胞結合 $\alpha V\beta 6$ (CHO 形質転換体)	XMG1/kl	10	IP, 尾部, BIP, 2回/週, x 6 週

10

## 【0263】

力価による採取のための動物の選択

可溶性抗原で免疫したマウスについて、ヒト  $V_6$  に対する抗体の力価を E L I S A アッセイにより試験した。天然（細胞結合）抗原で免疫したマウスについての抗体の力価を F A C S により試験した。E L I S A 及び F A C S 分析から、 $V_6$  に特異的であると思われるマウスが何匹かいたことがわかった。そのため、免疫プログラムの終了時に、20匹のマウスを採取のために選択して、次の実施例に記載するように、免疫したマウスの脾臓及びリンパ節からリンパ球を単離した。

## 【0264】

20

実施例 11 . リンパ球の回収と B 細胞単離

免疫マウスを頸椎脱臼により死なせ、各コホートから流入領域リンパ節を採取して、ブールした。D M E M 中での粉碎によりリンパ球を解離させて、組織から細胞を放出させ、細胞を D M E M 中に懸濁させた。I g M 中での負の選択と I g G に対する正の選択によって B 細胞を濃縮した。細胞を培養して、B 細胞を増殖させ、抗体分泌形質細胞に分化させる。

## 【0265】

抗体分泌形質細胞を選択培地中で常用的に増殖させた。ヒト  $V_6$  抗体を産生する可能性がある細胞から収集した完全な上清を、以下の実施例に詳述する次のスクリーニングアッセイに付した。

30

## 【0266】

実施例 12 . 細胞結合  $V_6$  との結合

分泌した抗体と  $V_6$  の結合を評価した。以下に説明するように、細胞結合  $V_6$  との結合は、F M A T マクロ共焦点スキャナーを用いて評価し、可溶性  $V_6$  との結合は、E L I S A により分析した。

## 【0267】

採取した細胞から収集した上清を試験して、 $V_6$  を安定に過剰発現する H E K 2 9 3 細胞に対する分泌抗体の結合を評価した。親 2 9 3 F 細胞株を負の対照として用いた。F r e e s t y l e 培地 ( I n v i t r o g e n ) 中の細胞を、安定な形質転換体の場合には 2 5 0 0 細胞 / ウェルの密度で、また親細胞の場合には 2 2 , 5 0 0 細胞 / ウェルの密度で、3 8 4 ウェル F M A T プレート中に 5 0  $\mu$  L / ウェルの容量で接種した後、細胞を 3 7 で一晩インキュベートした。次に、1 0  $\mu$  L / ウェルの上清を添加し、プレートを 4 で約 1 時間インキュベートした後、1 0  $\mu$  L / ウェルの抗ヒト I g G - C y 5 二次抗体を 2 . 8  $\mu$  g / m l の濃度 ( 4 0 0 n g / m l の最終濃度 ) で添加した。次に、プレートを 4 で約 1 時間インキュベートしてから、F M A T マクロ共焦点スキャナー ( A p p l i e d B i o s y s t e m s ) を用いて蛍光を読み取った。11の抗体の F M A T 結果を表 3 にまとめる。

40

## 【0268】

さらに、可溶性  $V_6$  への抗体の結合を E L I S A により分析した。C o s t a r 培地結合 9 6 ウェルプレート ( C o s t a r カタログ # 3 3 6 8 ) を、総量 5 0  $\mu$  L / ウェ

50



ルで、TBS / 1 mM MgCl<sub>2</sub> 緩衝液中の濃度 5 µg / ml の V<sub>6</sub> と一緒に、4 で一晩インキュベートすることによりコーティングした。次に、プレートを TBS / 1 mM MgCl<sub>2</sub> 緩衝液で洗浄した後、250 µL の 1 × PBS / 1 % ミルクを用い、室温で 30 分間ブロックした。10 µL の上清を 40 µL の TBS / 1 mM MgCl<sub>2</sub> / 1 % ミルクに添加して、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、TBS / 1 mM MgCl<sub>2</sub> / 1 % ミルク中 0.400 ng / ml のヤギ - 抗ヒト IgG Fc ペルオキシダーゼと一緒にインキュベートし、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを洗浄した後、1 - Step TMB 基質を用いて展開させた。抗体の 1 つについての ELISA 結果を表 3 に示す。

【0269】

【表 3】

表 3: 細胞結合及び可溶性 αVβ6 への上清の結合

mAb	FMAT データ			ELISA データ
	計数	FL1	FLIX 計数	OD
sc 049	185	4377.73	809880	ND
sc 058	ND	ND	ND	1.79
sc 188	127	628.04	79761	ND
sc 097	98	1237.18	121243	ND
sc 277	28	382.31	10704	ND
sc 133	82	709.82	58205	ND
sc 161	23	725.21	16679	ND
sc 254	174	9179.65	1597259	ND
sc 264	63	734.29	46260	ND
sc 298	102	2137.94	218069	ND
sc 374	174	4549.65	791639	ND
sc 320	141	3014.63	425062	ND
負の対照 (ブランク):	0	0	0	0.21
正の対照 (2077z - 1 ug/mL):	67	659.49	44185	6.00

【0270】

#### 実施例 13 . 細胞接着の阻害

様々な抗体を含有する上清の相対効力を決定するために、V<sub>6</sub> 陽性 HT29 細胞の TGF-β<sub>1</sub> LAP 媒介接着を阻害する能力について抗体を評価した。プレートを 10 µg / ml の TGF-β<sub>1</sub> LAP で一晩コーティングした後、アッセイ前の 1 時間にわたり 3 % の BSA / PBS でプレブロックした。次に、細胞をペレット化してから HBS 中で 2 回洗浄した後、細胞を適切な濃度の HBS 中に再懸濁させた。V 字底プレートにおいて、適切な抗体の存在下、細胞を 4 で 30 分間インキュベートした。抗原コーティング溶液を除去した後、100 µL の 3 % BSA を用い、プレートを室温で 1 時間ブロックした。プレートを PBS 又は HBS で 2 回洗浄した後、細胞 - 抗体混合物を、コーティング済プレートに移してから、プレートを 37 で 30 分間インキュベートした。続いて、コーティング済プレート上の細胞を温 HBS で 4 回洗浄した後、細胞を - 80 で 1 時間凍結させた。細胞を室温で 1 時間解凍させた後、100 µL の CyQuant 色素 / 溶解バッファ (Molecular Probes) を各ウェルに製造者の指示に従い添加した。485 nm の励起波長及び 530 nm の発光波長で蛍光を読み取った。12 の抗体についての結果を表 4 にまとめる。表示する抗体の効力は、アッセイにおいて得ることができる最大及び最小接着値を表すのに用いたプレートのコーティング及び非コーティング対照に対し、62 % 阻害から 100 % 超阻害までの範囲であった。

【0271】

10

20

30

40

【表 4】

表 4: 接着アッセイ

抗体 ID	アッセイ 1 阻害率%	アッセイ 2 阻害率%	平均阻害 率%
sc 049	80%	98%	89%
sc 058	77%	46%	62%
sc 097	96%	106%	101%
sc 133	99%	106%	103%
sc 161	98%	106%	102%
sc 188	99%	103%	101%
sc 254	98%	106%	102%
sc 264	98%	100%	99%
sc 277	98%	101%	100%
sc 298	98%	102%	100%
sc 320	97%	97%	97%
sc 374	118%	89%	104%

10

## 【0272】

実施例 14 . マカク (macaque) V 6 及びヒト V との交差反応性

マカク V 6 に対する抗体含有上清の交差反応性を、カニクイザル (cynomolgus) V 及びカニクイザル 6 で一過的にトランスフェクトした HEK293 細胞の FACS 分析を用いて、上清について試験した。

20

## 【0273】

また、ヒト V に対する交差反応性も試験した。このアッセイの場合、V 3 及び V 5 を発現するが、V 6 は発現しない親 A375M 細胞の FACS 分析を用いて、上清について試験した。このスクリーンは、抗体が、6 鎖又は V と組み合わせた 6 鎖のいずれかを特異的に認識していることを示すように設計した。ヒト V アッセイは、マカク V 6 交差反応性スクリーンと同時に実施した。

## 【0274】

アッセイは、以下のように実施した。約 75% 密集の A375M 細胞を次のように CFSE 細胞内色素で標識した：ファルコンチューブ中で細胞 (1 ウェル当たり 250,000 ~ 300,000 細胞に相当) を解離させてペレット化し、次いで、250,000 細胞につき 100 µL の最終容量まで FACS 緩衝液中の 0.125 µM CFSE 中に再懸濁させた後、37 °C で 5 分間インキュベートする。次に、細胞をペレット化し、上清を廃棄して、FACS 緩衝液中に再懸濁させた後、37 °C で 30 分間インキュベートした。続いて、細胞を FACS 緩衝液で 2 回洗浄した後、1 ウェル当たり最終容量 100 µL の FACS 緩衝液中に再懸濁させた。

30

## 【0275】

HEK293 細胞をカニクイザル V 及びカニクイザル 6 で一過的にトランスフェクトした。48 時間後、細胞を収集し、FACS 緩衝液中に再懸濁させて、100 µL 中約 50,000 細胞の最終濃度を達成した。

## 【0276】

40

総計約 100,000 個の細胞 (CFSE 標識 A375M 細胞とトランスフェクト済 293 細胞との 50:50 混合物を含む) を以下のような各反応に使用した。100 µL の CFSE 標識 A375M 細胞と 100 µL の 293 細胞を V 字底プレート中に分配した。プレート内の細胞を 1500 rpm で 3 分間ペレット化した後、100 µL の FACS 緩衝液中に再懸濁させた。ペレット化ステップを反復し、FACS 緩衝液上清を除去した。採取した抗体含有上清、又は対照一次抗体を 50 µL の容量に添加し、細胞を再懸濁させた。一次抗体対照は、マウス V 6 (Cat MAB2077z, Chemicon) 及び抗 V 組換え体であった。プレートを氷上で 45 分間インキュベートした後、100 µL の FACS 緩衝液を添加して一次抗体を希釈した。次に、1500 rpm で 3 分間遠心分離することにより、細胞をペレット化した後、ペレットを 100 µL の FACS 緩衝

50

液中に再懸濁させた。ペレット化ステップを反復し、FACS緩衝液上清を除去した。続いて、細胞を適切な二次抗体（ $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ）中に7AAD色素（ $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ）と一緒に再懸濁させて、氷上で7分間染色した。次に、 $150\mu\text{L}$ のFACS緩衝液を添加して、細胞を $1500\text{rpm}$ で3分間ペレット化した後、 $100\mu\text{L}$ のFACS緩衝液で洗浄して、ペレット化し、次いで、 $250\mu\text{L}$ の緩衝液中に再懸濁させてから、FACSチューブに添加した。ハイスループットFACS機で試料を分析し、Cell Quest Proソフトウェアを用いて分析した。

【0277】

12の抗体についての結果を表5にまとめるが、これらの結果は、表示した抗体が、マカク V 6に特異的に結合することができたが、親A375M細胞上のヒト V には非特異的に結合することができなかったことを明らかにしている。

【0278】

【表5】

表5. マカク  $\alpha\text{V}\beta6$  及びヒト  $\alpha\text{V}$  に対する交差反応性

抗体 ID	転位した Mac AVB6 細胞%	Mac AVB6 GeoMean	転位した A375M 細胞%	A375M GeoMean
sc 049	23%	30.19	20%	1.74
sc 058	25%	22.77	18%	1.78
sc 097	35%	37.04	24%	1.84
sc 133	32%	35.22	24%	1.79
sc 161	14%	32.98	11%	16.68
sc 188	18%	23.9	13%	1.65
sc 254	59%	78.49	55%	2.31
sc 264	55%	66.38	46%	2.35
sc 277	35%	33.35	23%	1.86
sc 298	53%	63.08	45%	2.14
sc 320	19%	33.45	15%	23.18
sc 374	51%	61.79	39%	2.14
ヒト IgG アイソタイプ 対照	1% (1日目) 0% (2日目)	9.54 (1日目) 7.39 (2日目)	5% (1日目) 1% (2日目)	1.66 (1日目) 7.23 (2日目)
マウス 二次抗体を 有する マウス IgG2	1% (1日目) 0% (2日目)	8.85 (1日目) 11.21 (2日目)	4% (1日目) 3% (2日目)	1.67 (1日目) 11.16 (2日目)
正の対照 2077z ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	42% (1日目) 11% (2日目)	55.52 (1日目) 28.11 (2日目)	30% (1日目) 5% (2日目)	2.03 (1日目) 15.36 (2日目)

【0279】

実施例15. V 6特異的溶血ブランクアッセイ

組換え抗体の生産のために、各採取物から抗体分泌形質細胞を選択した。ここでは、V 6に対する抗体を発現する単一形質細胞を見出すために、蛍光ブランクアッセイを使用した。続いて、次の実施例に説明するように、単一細胞を逆転写及びポリメラーゼ連鎖反応に付して、初期抗体特異性をコードした可変重鎖及び可変軽鎖をレスキュー及び増幅した。V 6特異的溶血ブランクアッセイを実施するのに必要ないくつかの専用試薬及び材料の調製について以下に記載する。

【0280】

ヒツジ赤血球 (SRBC) のビオチン標識。SRBCは、25%ストックとしてRMP I培地中に保存した。ストックの $1.0\text{mL}$ を $15\text{mL}$ ファルコンチューブ中に等分し、細胞を沈降させた後、上清を除去することにより、 $250\mu\text{L}$ のSRBC沈渣 (packed cell) ペレットを取得した。次に、細胞ペレットを $50\text{mL}$ チューブ中の $4.75\text{mL}$ のPBS (pH 8.6) に再懸濁させた。個別の $50\text{mL}$ チューブ中で、 $2.5\text{mg}$ のSulfo-NHSビオチンを $45\text{mL}$ のPBS (pH 8.6) に添加した。ビオチンが完全に溶解したら、 $5\text{mL}$ のSRBCを添加し、チューブを室温で1時間回転させ

た。SRBCを3000gで5分間遠心分離した。上清を取り除き、25mLのPBS (pH 7.4)を洗浄液として添加した。洗浄サイクルを3回反復した後、4.75mLの免疫細胞培地(10% FCSを含むRPMI 1640)を250μLのビオチン標識SRBC (B-SRBC)ペレットに添加して、B-SRBC (5% B-SRBCストック)を穏やかに再懸濁させた。ストックは、必要になるまで4℃で保存した。

#### 【0281】

B-SRBCのストレプトアビジン(SA)コーティング。1mLの5% B-SRBCストックを新しいエッペンドルフチューブ中に移した。B-SRBC細胞を微量遠心管中で、8000rpm (6800rcf)のパルススピンによりペレット化した。続いて、上清を取り除き、ペレットを1.0mLのPBS (pH 7.4)中に再懸濁させ、遠心分離を反復した。洗浄サイクルを2回反復した後、B-SRBCペレットを1.0mLのPBS (pH 7.4)中に再懸濁させて、5% (v/v)の最終濃度をもたらした。10μLの10mg/mLのストレプトアビジン(CalBiochem, San Diego, CA)ストック溶液を添加した。チューブを混合してから室温で20分間回転させた。洗浄ステップを反復し、SA-SRBCを1mLのPBS (pH 7.4) (5% (v/v))中に再懸濁させた。

#### 【0282】

SA-SRBCのヒトV6コーティング。可溶性抗原(膜貫通ドメインを欠失する)をSRBCのコーティングに用いた。V6は、細胞表面上に二量体としてしか提示されないため、両方の鎖を使用した。SA-SRBCを50μg/mLのビオチン標識V6でコーティングし、混合してから室温で20分間回転した。前述のように、1.0mLのPBS (pH 7.4)で2回SRBCを洗浄した。AgコーティングしたSRBCを、最終濃度5% (v/v)までRPMI (+10% FCS)中で再懸濁させた。

#### 【0283】

免疫蛍光(IF)によるV6-SRBCの品質の決定。10μLの5% SA-SRBCと10μLの5% AgコーティングSRBCを各々、40μLのPBSを含有する個別の新しい1.5mLエッペンドルフチューブに添加した。ヒト抗V6抗体をSRBCの各資料に50μg/mLで添加した。チューブを室温で25分間回転させた後、細胞を100μLのPBSで3回洗浄した。細胞を50μLのPBS中に再懸濁させてから、光安定性蛍光色素Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, OR)に結合した2μg/mLのGt-抗ヒトIgG Fc抗体とインキュベートした。チューブを室温で25分間回転させた後、100μLのPBSで洗浄してから、10μLのPBS中に再懸濁させた。10μLの染色細胞を清浄な顕微鏡ガラススライド上に滴下し、ガラスカバーで覆い、蛍光の下で観察して、0~4の任意の等級でスコアを付けることにより、単離した細胞の品質を評価した。

#### 【0284】

形質細胞の調製。V6活性を中和するものとして事に見出された単一B細胞培養ウェルの内容物(従って、目的の免疫グロブリンを分泌するB細胞クローンを含有する)を採取した。ウェル内に存在するB細胞培養物を37℃のRPMI + 10% FCSの添加により回収した。細胞をピペットで再懸濁させ、新しい1.5mLエッペンドルフチューブに移した(最終容量約500~700μL)。細胞を微量遠心管において1500rpm (240rcf)で、室温にて2分間遠心分離した後、チューブを180°回転させてから、1500rpmでさらに2分間遠心分離した。凍結培地を取り除いてから、免疫細胞を100μLのRPMI (10% FCS)中で再懸濁させた後、遠心分離した。RPMI (10% FCS)による洗浄を反復し、60μLのRPMI (FCS)中で再懸濁させた後、使用の準備が整うまで氷上で保存した。

#### 【0285】

溶血ブランクアッセイの実施。60μLの免疫細胞の試料に、各々60μLのV6コーティングSRBC (5% (v/v)ストック)、RPMI (FCS)中に調製した4×モルモット補体(Sigma, Oakville, ON)ストック、及び4×増強血清

10

20

30

40

50

ストック (RPMI (FCS) 中 1 : 900) を添加した。この混合物 (3 ~ 5  $\mu$ l) を 100 nm Falcon 組織培養プレートからプラスチック製蓋に滴下し、その液滴を非希釈パラフィン油で被覆した。このスライドを 37 °C で最小 45 分間インキュベートした。

#### 【0286】

ブランクアッセイ結果の分析。ヒト V<sub>6</sub> の触媒ドメインによるヒツジ赤血球のコーティングは成功した。次に、これらの Ag コーティングされた赤血球を用いて、以下の表 6 に示すウェルからの抗原特異的形質細胞を同定した。次に、顕微操作により、これらの細胞を単離した。抗原特異的形質細胞をレスキューする顕微操作の後、可変領域遺伝子をコード化する遺伝子を、次の実施例にさらに詳しく説明するように、単一形質細胞での RT-PCR によりレスキューした。

#### 【0287】

#### 【表 6】

表 6. ブランクアッセイ結果

親 プレート ID			ブランクアッセイ	
プレート	行	列	アッセイ	単細胞
68	B	10	蛍光	45-57
296	D	10	蛍光	58-59
318	F	1	溶血	60-62
612	G	1	蛍光	187-189
752	D	12	蛍光	95-100
762	D	8	蛍光	277-286
766	B	5	蛍光	132-143, 147-150
827	E	12	蛍光	159-170
659	F	11	蛍光	252-263
761	H	3	蛍光	264-276
765	A	8	蛍光	287-298
652	D	2	蛍光	374-379, 392-397
806	A	6	蛍光	312-321

#### 【0288】

#### 実施例 16 . 組換えタンパク質の単離

所望の単一形質細胞の単離後、mRNA を抽出し、逆転写酵素 PCR を実施して、各細胞により分泌された抗体の可変重鎖及び軽鎖をコードする cDNA を生成した。ヒト可変重鎖 cDNA を、PCR 中に添加した制限酵素で消化し、この反応の産物を、クローニングのための適合性オーバーハングを有する IgG2 発現ベクター中にクローニングした。このベクターは、ヒト IgG2 の定常ドメインを pcDNA3.1+/Hygro (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) の多重クローニング部位中にクローニングすることによって作製した。ヒト可変軽鎖 cDNA は、PCR 反応中に添加した制限酵素で消化し、この反応の産物を、クローニングのための適合性オーバーハングを有する Ig 又は Ig 発現ベクター中にクローニングした。このベクターは、ヒト IgK 又は IgL の定常ドメインを pcDNA3.1+/Neo (Invitrogen) の多重クローニング部位中にクローニングすることによって作製した。

#### 【0289】

次に、重鎖及び軽鎖発現ベクターを、リポフェクタミンを用いて、70% 密集ヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293 細胞の 60 mm ディッシュ中にトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞は、オリジナル形質細胞と同一の特異性を有する組換え抗体を 24 ~ 72 時間にわたり分泌した。上清 (3 mL) を HEK 293 細胞から採取し、インタクトな抗体の分泌が、ヒト IgG を特異的に検出するサンドイッチ ELISA により立証された。特異性は、ELISA を用いて、V<sub>6</sub> への組換え抗体の結合により確認した。標的抗原に結合することができるレスキューされた抗体分泌クローンを表 7 にまとめる。

#### 【0290】

【表 7】

表 7. 組換え抗体のための分泌及び結合データ

親 プレート ID			
プレート	行	列	抗体 ID
68	B	10	49
296	D	10	58
612	G	1	188
752	D	12	97
762	D	8	277
766	B	5	133
827	E	12	161
659	F	11	254
761	H	3	264
765	A	8	298
652	D	2	374
806	A	6	320

10

## 【0291】

## 実施例 17 . 組換え抗体の精製

抗 V 6 抗体のより大きなスケールの生産のために、重鎖及び軽鎖発現ベクター（各鎖 2.5  $\mu$ g / ディッシュ）を、70%密集の HEK 293 細胞を含む 10 個の 100 mm ディッシュ中にリポフェクトした。トランスフェクトした細胞を 37 で 4 日間インキュベートし、上清（6 mL）を採取し、6 mL の新鮮な培地に取り換えた。7 日目に、上清を除去し、初期採取物（10 プレートから総計 120 mL）と一緒にプールした。Protein-A Sepharose（Amersham Biosciences, Piscataway, NJ）アフィニティクロマトグラフィーを用いて、抗体を上清から精製した（1 mL）。抗体を 500  $\mu$ l の 0.1 M グリシン pH 2.5 を含む Protein-A カラムから溶離した。溶離物を PBS（pH 7.4）中で透析した後、濾過滅菌した。抗体を非還元 SDS-PAGE により分析することによって、純度及び収率を評価した。280 nm での光学密度を測定することにより、タンパク質濃度を決定した。

20

## 【0292】

## 実施例 18 . V 6 抗体の構造分析

抗体の可変重鎖及び可変軽鎖をシーケンシングして、それらの DNA 配列を決定した。抗 V 6 抗体についての完全な配列情報は、各 及び / 鎖組み合わせについて、ヌクレオチド及びアミノ酸の配列表に記載する。可変重鎖配列を分析して、VH ファミリー、D 領域配列及び J 領域配列を決定した。次に、一次アミノ酸配列を決定するために配列を翻訳して、生殖系列 VH、D 及び J 領域配列と比較することにより、体細胞高頻度突然変異を評価した。

30

## 【0293】

表 8 は、抗体重鎖領域をそのコグネイト生殖系列重鎖領域と比較する表である。表 9 は、抗体 又は 軽鎖領域をそのコグネイト生殖系列軽鎖領域と比較する表である。

40

## 【0294】

免疫グロブリン鎖の可変（V）領域は、複数の生殖系列 DNA セグメントによりコードされ、これらのセグメントは、B 細胞固体発生中に機能性可変領域（V<sub>H</sub>D<sub>J</sub>又は V<sub>K</sub>J<sub>K</sub>）に結合する。V 6 に対する抗体応答の分子及び遺伝子多様性を詳細に試験した。これらのアッセイは、抗 V 6 抗体に特異的ないくつかの点を明らかにした。

## 【0295】

シーケンシングデータによれば、sc 298 及び sc 374 の重鎖の一次構造は、類似しているが、同一ではない。sc 254 は、他の 2 つと構造的に異なる。また、特定の抗体が、そのそれぞれの生殖系列配列とはアミノ酸レベルで異なる場合、抗体配列を突然変異させて生殖系列配列に戻すことができることも認識すべきである。かかる補正的突然

50

変異は、標準的分子生物学的技術を用いて、1、2、3つ若しくはそれを超える位置、又は突然変異位置のいずれかの組み合わせで実施することができる。非限定的例として、表9は、s c 2 9 8の軽鎖配列（配列番号40）が、対応する生殖系列配列（配列番号68）とは、F R 1領域でV a lからA l aへの突然変異（突然変異1）により、C D R 1領域でL e uからA l aへの突然変異（突然変異2）により、並びにF R 3領域でA s nからS e rへの突然変異により、異なることを示す。従って、突然変異1の部位に生殖系列配列を得るために、突然変異1を変更するように、s c 2 9 8の軽鎖をコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を修飾することができる。さらに、突然変異2の部位に生殖系列配列を得るために、突然変異2を変更するように、m A b s c 2 9 8の軽鎖をコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を修飾することができる。さらにまた、突然変異3の部位に生殖系列配列を得るために、突然変異3を変更するように、m A b s c 2 9 8の軽鎖をコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を修飾することもできる。さらには、突然変異1、2及び3の部位に生殖系列配列を得るために、突然変異1、突然変異2及び突然変異3を変更するように、s c 2 9 8の軽鎖をコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を修飾することもできる。またさらに、突然変異1、突然変異2及び突然変異3の任意の組み合わせを変更するように、s c 2 9 8の軽鎖をコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を修飾することもできる。別の例では、s c 2 6 4の重鎖配列（配列番号30）は、その生殖系列配列（配列番号55）と61位で異なる。従って、生殖系列配列を得るために、s c 2 6 4の重鎖をコードするアミノ酸又はヌクレオチド配列を、NからYへと修飾することができる。以下の表10～13は、s c 1 3 3、s c 1 8 8及びs c 2 6 4について、生殖系列からのかかる変異の位置を示す。各行は、太字で示す位置に生殖系列と非生殖系列残基のユニークな組み合わせを表示する。突然変異により生殖系列配列に戻ることができる抗体配列の具体的例として、以下のものが挙げられる：s c 1 3 3（重鎖のアミノ酸70のLを突然変異により生殖系列アミノ酸Mに戻す）（本明細書では、s c 1 3 3 T M Tと称する）；s c 1 3 3（軽鎖のアミノ酸93のNを突然変異により生殖系列アミノ酸Dに戻す）（本明細書では、s c 1 3 3 W D Sと称する）；及びs c 2 6 4（軽鎖のアミノ酸84のAを突然変異により生殖系列アミノ酸Dに戻す）（本明細書では、s c 2 6 4 A D Yと称する）。

#### 【0296】

一実施形態は、C D R領域、すなわちC D R 1、C D R 2及び/又はC D R 3におけるアミノ酸の1つ又は複数を修飾することを含む。一例では、本明細書に記載する抗体の重鎖のC D R 3を修飾する。典型的に、アミノ酸は、類似の側鎖を有するアミノ酸で置換する（保存的アミノ酸置換）か、又はアラニン若しくはロイシンなどの任意の適切なアミノ酸で置換することもできる。一実施形態では、s c 2 6 4 C D R 3、V A T G R G D Y H F Y A M D V（配列番号30のアミノ酸残基100～114）を1つ又は複数のアミノ酸において修飾することができる。本出願人は、活性に有害な影響を及ぼすことなく、C D R 3領域を修飾することができることを既に立証している。すなわち、C D R 3領域の第2 GがAに対して置換されたs c 2 6 4 R A Dを参照されたい。C D R 3領域内の他の修飾も考慮される。別の実施形態では、s c 1 3 3 C D R 3領域、R L D Vを1つ又は複数のアミノ酸で修飾することができ、AをL及び/又はAをVに置換することを含む。アミノ酸を置換する手段は、当該技術分野において公知であり、部位指定突然変異誘発がある。

#### 【0297】

別の実施形態は、抗体の異質性又はその結合の特異性に影響を与え得る配列の任意の構造的特質を置換することを含む。一例では、s c 2 6 4の抗体は、C D R 3領域にR G D配列を有し、これは、交差反応性結合を引き起こし得る。従って、R G D内のグリシン残基をアラニンで置換することができる（s c 2 6 4 R A D）。

#### 【0298】

【表 8】

表 8. 重鎖分析

鎖名	配列番号	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	49	VH1-2	5-12	JH6 B	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSCKAS	GYTFT GYM H	WVRQ APQG LEWM G	WINPNSG GTNYAQ KFQG	RVTMTDRDTSIST AYMELSLRSDDD TAVYYCAR	RL--	WGQG TTVT VSS
sc 133	14				QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSCKAS	GYTFT GYM H	WVRQ APQG LEWM G	WINPNSG DTNYAQ KFQG	RVTMTDRDTSIST AYMELSLRSDDD TAVYYCAR	RLDV	WGQG TTVT VSS
	50	VH3-21	D1-1	JH6 B	EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAAS	GFTFS SYSM N	WVRQ APKG LEWVS	SISSSSY IYYADSV KG	RFTISRDNNAKNS LYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	-- VQLERY YYYG DV	WGQG TTVT VSS
sc 320	42				EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAAS	GYTFT NYIM H	WVRQ APKG LEWVS	SISSSSY YYADSV KG	RFTISRDNNAKNS LYLQMNSLRAE DTAVYYCAR	DPVPLER RDYYYG MDV	WGQG TTVT VSS
	51	VH3-23	D5-5	JH6 B	EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAAS	GFTFS SYAM S	WVRQ APKG LEWVS	AISGSGG STYYADS VKG	RFTISRDNNAKNS LYLQMNSLRAE TAVYYCAR	-- VDTAMV YYGMDV	WGQG TTVT VSS
sc 58	6				EVQLVESGG GLVKPGGSL RLSCAAS	GFTFS SYAM S	WVRQ APKG LEWVS	AISGSGG STYYADS VKG	RFTISRDNNAKNS LYLQMNSLRAE TAVYYCAR	GVDTAM VTYGM V	WGQG TTVT VSS
	52	VH3-23	D5-5	JH6 B	QVQLVESGG GVVQPGGSL RLSCAAS	GFTFS SYGM H	WVRQ APKG LEWV A	VIWYDGS NKYYAD SVKG	RFTISRDNNAKNS LYLQMNSLRAE TAVYYCAR	-JAAR-- YYYG MDV	WGQG TTVT VSS
sc 298	38				QVQLVESGG	GFTFS	WVRQ	VIWYDGS	RFTISRDNNAKNS	DLAARR	WGQG

10

20

30



組名	配列番号	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
		33		B	GVVQPGRL RLSCAAS	SYGM H	APGKG LEWV A	NKYYAD SVKG	YMQMNSLRAED TAVYYCAR	GDYYY GMDV	TTVT VSS
sc 374	46	VH3- 33	D6-6	JH6 B	QVQLVESGG GVVQPGRL RLSCAAS	GFTFS SYGM H	WVRQ APGKG LEWV A	VIWYDGS NKYYAD SVKG	RFTISRDNKNTL YMQMNSLRAED TAVYYCAR	TEGIAAR LYYYG MDV	WGQG TTVT VSS
	53	生殖系列			QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGGIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYSGS TYYNPSL KS	RVTIISVDTSKNQ FSLKLSSTAAAD TAVYYCAR	-- GIAAAG-- YIYSGS MDV	WGQG TTVT VSS
sc 254	26	VH4- 31	D6-13	JH6 B	QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGGIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYSGS TYYNPSL KS	RVTIISVDTSKNQ FSLKLSSTAAAD TAVYYCAR	YRGPAA GRGDFY YFGMDV	WGQG TTVT VSS
	54	生殖系列			QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGGIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYSGS TYYNPSL KS	RVTIISVDTSKNQ FSLKLSSTAAAD TAVYYCAR	--- ITIFGVFD Y	WGQG TLVT VSS
sc 49	2	VH4- 31	D3-3	JH4 B	QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVA	GGGIR SGDY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	NIYSGS TYYNPSL KS	RITISVATSRNQF SLKLSSTAAADT AVYYCAR	GGAITIFG VFDY	WGQG TLVT VSS
	55	生殖系列			QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGGIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYSGS TYYNPSL KS	RVTIISVDTSKNQ FSLKLSSTAAAD TAVYYCAR	VAT--- YIYSGS MDV	WGQG TTVT VSS
Sc 264	30	VH4- 31	D4-17	JH6 B	QVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVS	GGGIS SGGY YWS	WIRQH PGKGL EWIG	YIYSGR TYNNPSL KS	RVTIISVDTSKNQ FSLKLSSTAAAD TAVYYCAR	VATGRG DYHFYA MDV	WGQG TTVT VSS
	56	生殖系列			QVQLQESGP GLVKPSQTLS	GGGIS SGGY	WIRQH PGKGL	YIYSGS TYNNPSL	RVTIISVDTSKNQ FSLKLSSTAAAD	--- LRYYYY	WGQG TTVT

10

20

30

額名	配列 番号	V	D	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
Sc 188	22	VH4- 31	D4-23	JH6 B	LTCTVS QVQLVQSGP GLVKPSQTLS LTCTVS	YWS GGSIS SGVY YWT	EWIG WIRQH PGNGL EWIG	KS YIYSGS TSYNPSL KS	TAVYYCAR RVTISVDTSKKQ FSLNLTSTVAAD TAVYYCAR	YGMDV EGPLRGD EYVGLD V	VSS WGQG TTVT VSS
	57		生殖系列		EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYST SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDS TRYSPF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCAR	--- SSGYA FDI	WGQG TMVT VSSA
Sc 97	10	VH5- 51	D3-22	JH3 B	EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYST SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDS TRYSPF QG	QVILSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCAR	HDESSGY YYVFDI	WGQG TMVT VSSA
	58		生殖系列		EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYST SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDS TRYSPF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCAR	-----GMDV	WGQG TTVT VSS
Sc 277	34	VH5- 51	D3-10	JH6 B	EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYST SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDS TRYSPF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCAR	HPMEDG MDV	WGQG TTVT VSS
	59		生殖系列		EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYST SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDS TRYSPF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCAR	-GIAAAG- YYVGM V	WGKG TTVT VSSA
Sc 161	18	VH5- 51	D6-13	JH6 C	EVQLVQSGA EVKKPGESLK ISCKGS	GYST SYWI G	WVRQ MPGK GLEW MG	IYPGDS TRYSPF QG	QVTISADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCAR	HGIAAAG FYVYM DV	WGQG TTVT VSSA

【表 9】

表 9. 軽鎖分析

鎖名	配列番号	V κ	J	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	J
	60	生殖系列		DIVMTQTPL SLSVTPGQP ASISC	KSSQSL HSDGKT YLY	WYQKP GQPPQL LIY	EVS NRF S	GVPDRFSGSG TDFTLKISRVEAE DVGYYC	MQSIQ LPWT K	FGQG TKVEI K
Sc 254	28		A2	DIVMTQTPL SLSVTPGQP ASIFC	KSSQSL NSDGKT YLC	WYQKP GQPPQL LIY	EVS NRF S	GVPDRFSGSG TDFTLKISRVEAE DVGYYC	MQGI QLPW AF	FGQG TKVEI K
	61	生殖系列		EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC	RASQSV SSSYLA	WYQK PGQAPR LLIY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPWT K	FGQG TKVEI K
sc 188	24		A27	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC	RAGQTIS SRYLA	WYQK PGQAPR PLIY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPRT K	FGQG TKVEI K
sc 374	48	生殖系列	A27	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC	RASQSV SSSYLA	WYQK PGQAPR LLIY	GAS SRA T	DIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPWT K	FGQG TKVEI K
	62			EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC	RASQSV SSSYLA	WYQK PGQAPR LLIY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPYT K	FGQG TKLEI K
Sc 49	4	生殖系列	A27	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC	RASQSV SSSYLA	WYQK PGQAPR LLIY	GAS SRA T	GIPDRFSGSGGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQYG SSPCS K	FGQG TKLEI K
	63			EIVLTQSPGT	RASQSV	WYQK	GAS	GIPDRFSGSGGT	QQYG	FGPCT

10

20

30

領名	配列 番号	V κ	J	FR1	CDR1	FR2	CDR <sub>2</sub>	FR3	CDR3	J
				LSLSPGERAT LSC	SSSYLA	PGQAPR LLIY	SRA T	DFTLTISRLEPED FAVYYC	SSPFT	KVDIK R
sc 161	20	A27	JK3	EIVLTQSPDT LSLSPGERAS LSC	RASQNV NRNYLV	WYQQK PGQAPR LLIY	GTS NRA T	GIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPED FAVYYC	QQCG SLPFT	FGPGT KVDIK R

10

20

30

領名	配列 番号	Vλ	J	FR1	CDR1	FR2	CDR 2	FR3	CDR3	J
	64	生殖系列		QSVLTQPPS VSAAPGQKV TISC	SGSSNI GNYYVS	WYQQLP GTAPKL LIV	DNN KRP S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWD SSLSA -YV	FGTG KTV
sc 133	16	V1-19	JL1	QSVLTQPPS VSAAPGQKV TISC	SGSSNI GNYYVS	WYQQLP GTAPKL LIV	DNN KRP S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWN SSLSA GYV	FGTG KTV
	65	生殖系列		QSVLTQPPS VSAAPGQKV TISC	SGSSNI GNYYVS	WYQQLP GTAPKL LIV	DNN KRP S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWD SSLSA VV	FGGG TKLT VL
sc 320	44	V1-19	JL2	QSVLTQPPS MSAAPGQK VTISC	SGSSNI GNYYVS	WYQQLP GTAPKL LIV	DNN KRP S	GIPDRFSGSKSGT SATLGITGLQTG DEADYYC	GTWD SSLSA GV	FGGG TKLT VL
	66	生殖系列		SYELTQPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV LVIV	EDS KRP S	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTDS SGNH VV	FGGG TKLT VL
sc 277	36	V2-7	JL2	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAF	WYQQK SGQAPV LVIV	DDN KRP S	GIPERFSGSSSGT MATLTITGAQVE DEADYYC	YSTDS SGHH V	FGGG TKLT VL
sc 97	12	V2-7	JL2	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV LVIV	EDIK RPS	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTDS SGNH WVF	FGGG TKLT VL
	67	生殖系列		SYELTQPPSV SVSPGQTARI TC	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV LVIV	EDS KRP S	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE DEADYYC	YSTDS SGNH VV	FGGG TKLT VL
sc 58	8	V2-7	JL3	SYELTQPPSV SVSPGQTARI	SGDALP KKYAY	WYQQK SGQAPV	DDS KRP	GIPERFSGSSSGT MATLTISGAQVE	YSTDS SGNH	FGGG TKLT

10

20

30

[illegible]

**【 0 3 0 0 】**

## 【表 1 0】

表 10: 表示残基番号での生殖系列 (配列番号 49)への sc 133 重鎖 (配列番号 14) の例示的突然変異

54	57	70	76
N	G	M	T
N	G	L	I
N	G	L	T
N	D	M	I
N	D	L	I
N	D	M	T
N	D	L	T
K	G	M	I
K	G	M	T
K	G	L	I
K	G	L	T
K	D	M	I
K	D	L	I
K	D	M	T

10

## 【 0 3 0 1】

## 【表 1 1】

表 11: 表示残基番号での生殖系列 (配列番号 61)への sc 188 軽鎖(配列番号 24) の例示的突然変異

26	28	29	32	47
G	S	V	S	L
G	S	V	S	P
G	S	V	R	P
G	S	V	R	L
G	S	V	R	L
G	S	V	S	P
G	S	I	R	P
G	S	I	R	L
G	T	V	R	L
G	T	V	S	P
G	T	V	S	L
G	T	I	R	P
G	T	I	R	L
G	T	I	S	L
S	S	V	S	P
S	S	V	R	P
S	S	V	R	L
S	S	V	R	L
S	S	V	S	P
S	S	I	R	P
S	S	I	R	L
S	T	V	R	L
S	T	V	S	P
S	T	V	S	L
S	T	I	R	P
S	T	I	R	L
S	T	I	S	L

20

30

40

## 【 0 3 0 2】

## 【表 1 2】

表 12: 表示残基番号での生殖系列 (配列番号 56) への sc 188 重鎖(配列番号 22)の例示的突然変異

33	37	45	60	78	83	85
G	S	K	Y	N	K	S
G	S	K	Y	N	K	T
G	S	K	Y	N	N	S
G	S	K	Y	N	N	T
G	S	K	Y	K	N	S
G	S	K	Y	K	N	T
G	S	K	Y	K	K	S
G	S	K	Y	K	K	T
G	S	K	S	N	K	S
G	S	K	S	N	K	T
G	S	K	S	N	N	S
G	S	K	S	N	N	T
G	S	K	S	K	N	S
G	S	K	S	K	N	T
G	S	K	S	K	K	S
G	S	K	S	K	K	T
G	S	N	Y	N	K	S
G	S	N	Y	N	K	T
G	S	N	Y	N	N	S
G	S	N	Y	N	N	T
G	S	N	Y	K	N	S
G	S	N	Y	K	N	T
G	S	N	Y	K	K	S
G	S	N	Y	K	K	T
G	S	N	S	N	K	S
G	S	N	S	N	K	T
G	S	N	S	N	N	S
G	S	N	S	N	N	T
G	S	N	S	K	N	S
G	S	N	S	K	N	T
G	S	N	S	K	K	S

10

20

30



33	37	45	60	78	83	85
G	S	N	S	K	K	T
V	S	K	Y	N	K	S
V	S	K	Y	N	K	T
V	S	K	Y	N	N	S
V	S	K	Y	N	N	T
V	S	K	Y	K	N	S
V	S	K	Y	K	N	T
V	S	K	Y	K	K	S
V	S	K	Y	K	K	T
V	S	K	S	N	K	S
V	S	K	S	N	K	T
V	S	K	S	N	N	S
V	S	K	S	N	N	T
V	S	K	S	K	N	S
V	S	K	S	K	N	T
V	S	K	S	K	K	S
V	S	K	S	K	K	T
V	S	N	Y	N	K	S
V	S	N	Y	N	K	T
V	S	N	Y	N	N	S
V	S	N	Y	N	N	T
V	S	N	Y	K	N	S
V	S	N	Y	K	N	T
V	S	N	Y	K	K	S
V	S	N	Y	K	K	T
V	S	N	S	N	K	S
V	S	N	S	N	K	T
V	S	N	S	N	N	S
V	S	N	S	N	N	T
V	S	N	S	K	N	S
V	S	N	S	K	N	T
V	S	N	S	K	K	S
V	S	N	S	K	K	T
G	I	K	Y	N	K	S
G	I	K	Y	N	K	T
G	I	K	Y	N	N	S
G	I	K	Y	N	N	T
G	I	K	Y	K	N	S
G	I	K	Y	K	N	T
G	I	K	Y	K	K	S
G	I	K	Y	K	K	T
G	I	K	S	N	K	S
G	I	K	S	N	K	T

10

20

30

33	37	45	60	78	83	85
G	I	K	S	N	N	S
G	I	K	S	N	N	T
G	I	K	S	K	N	S
G	I	K	S	K	N	T
G	I	K	S	K	K	S
G	I	K	S	K	K	T
G	I	N	Y	N	K	S
G	I	N	Y	N	K	T
G	I	N	Y	N	N	S
G	I	N	Y	N	N	T
G	I	N	Y	K	N	S
G	I	N	Y	K	N	T
G	I	N	Y	K	K	S
G	I	N	Y	K	K	T
G	I	N	S	N	K	S
G	I	N	S	N	K	T
G	I	N	S	N	N	S
G	I	N	S	N	N	T
G	I	N	S	K	N	S
G	I	N	S	K	N	T
G	I	N	S	K	K	S
G	I	N	S	K	K	T
V	I	K	Y	N	K	S
V	I	K	Y	N	K	T
V	I	K	Y	N	N	S
V	I	K	Y	N	N	T
V	I	K	Y	K	N	S
V	I	K	Y	K	N	T
V	I	K	Y	K	K	S
V	I	K	Y	K	K	T
V	I	K	S	N	K	S
V	I	K	S	N	K	T
V	I	K	S	N	N	S
V	I	K	S	N	N	T
V	I	K	S	K	N	S
V	I	K	S	K	N	T
V	I	K	S	K	K	S
V	I	K	S	K	K	T
V	I	N	Y	N	K	S
V	I	N	Y	N	K	T
V	I	N	Y	N	N	S
V	I	N	Y	N	N	T
V	I	N	Y	K	N	S

10

20

30

33	37	45	60	78	83	85
V	I	N	Y	K	N	T
V	I	N	Y	K	K	S
V	I	N	Y	K	K	T
V	I	N	S	N	K	S
V	I	N	S	N	K	T
V	I	N	S	N	N	S
V	I	N	S	N	N	T
V	I	N	S	K	N	S
V	I	N	S	K	N	T
V	I	N	S	K	K	S
V	I	N	S	K	K	T

40

## 【表 13】

表 13: 表示残基番号での生殖系列 (配列番号 69) への sc 264 軽鎖(配列番号 32)の例示的突然変異

31	36	84
Y	H	A
Y	H	D
Y	Q	A
S	H	D
S	Q	D
S	Q	A

10

## 【0304】

実施例 19 . V 6 抗体の効力決定

TGF LAP に対する HT29 細胞の接着を阻止する能力に基づいて抗体を識別するために、次の接着アッセイを実施した。

## 【0305】

Nunc MaxiSorp (Nunc) プレートに 50  $\mu$ L の 10  $\mu$ g/mL TGF  $\beta$ 1 LAP (TGF LAP) で一晚コーティングした後、アッセイ前の 1 時間にわたり 3% BSA / PBS でプレブロックした。続いて、最適密度まで増殖した HT29 細胞をペレット化し、HBBS (1% BSA を含み、且つ  $Mn^{2+}$  を含まない) で 2 回洗浄した後、細胞を 1 ウェル当たり 30,000 細胞で HBBS 中に再懸濁させた。コーティング液をプレートから除去してから、プレートを 100  $\mu$ L の 3% BSA で室温において 1 時間ブロックした後、PBS 中で 2 回洗浄した。

20

## 【0306】

抗体滴定物を最終容量 30  $\mu$ L 中及び最終濃度の 2 倍の 1 : 3 段階希釈物において調製した。対照ウェル中の PBS 濃度が、最も希薄な抗体ウェル中の PBS 濃度と一致することを確実にするように注意した。30  $\mu$ L の細胞を各ウェルに添加し、V 字底プレートにおいて、細胞を抗体の存在下、4 で 40 分間インキュベートした。細胞抗体混合物をコーティング済プレートに移して、プレートを 37 で 40 分間インキュベートした。続いて、コーティング済プレート上の細胞を温 HBSS で 4 回洗浄した後、細胞を -80 で 15 分間凍結した。細胞を室温で解凍させた後、100  $\mu$ L の CyQuant 色素 / 溶解緩衝液 (Molecular Probes) を製造者の指示に従って各ウェルに添加した。励起波長 485 nm 及び発光波長 530 nm で蛍光を読み取った。正及び負の対照ウェルにより決定される、アッセイにおいて可能な細胞接着の最大及び最小量に基づき、各 mAb についての推定  $IC_{50}$  値を計算した。12 の抗体についての結果を表 14 にまとめる。

30

## 【0307】

## 【表 1 4】

表 14. 接着アッセイ結果 (推定 IC<sub>50</sub> 値)

	n=1 (ng/mL)	n=2 (ng/mL)	n=3 (ng/mL)
sc 049	>5000	>5000	>5000
sc 058	4065	2028	3259
sc 097	1006	281	536
sc 133	25	16	30
sc 161	2408	137	ND
sc 188	41	26	ND
sc 254	63	37	37
sc 264	26	14	18
sc 277	1455	540	720
sc 298	29	25	33
sc 320	648	381	415
sc 374	277	300	549
正の対照 2077Z	226	185	286

10

## 【0308】

## 実施例 20 . 競合アッセイ

抗体が、可溶性 TGF- $\beta$  LAP への V $\beta$ 6 インテグリンの結合を特異的に阻止することができることを証明するために、精製済抗体を用いて、競合アッセイを実施することにより、抗体が V $\beta$ 6 に結合して、GST-LAP ペプチドとのその結合を阻止する能力を測定した。

20

## 【0309】

培地結合 96 ウェルプレート (Costar、カタログ # 3368) を 50  $\mu$ L / ウェルの PBS 及び 0.05% アジ化ナトリウム中の 10  $\mu$ g / ml の GST-LAP でコーティングしてから、4℃で一晩インキュベートした。続いて、プレートを 300  $\mu$ L / ウェルのアッセイ希釈剤 (TBS (50 mM トリス、50 mM NaCl、1 mM MgCl<sub>2</sub> 及び 1 mM CaCl<sub>2</sub>、pH 6.9 中の 1% ミルク) を用いて 3 回洗浄した後、300  $\mu$ L / ウェルの TBS 中の 5% ミルクを用いて、プレートをブロックしてから、室温で 30 分間インキュベートした。次に、mAb (10  $\mu$ g / ml ~ 0.01  $\mu$ g / ml の範囲の 1:3 段階希釈物) を V $\beta$ 6 (0.05% アジ化ナトリウムを含有するアッセイ希釈剤中の 250 ng / ml) と一緒に一晩インキュベートした。翌日、50  $\mu$ L / ウェルのプレインキュベート一次抗体を GST-LAP ペプチドコーティング済プレートに移し、室温で 1 時間インキュベートした。続いて、300  $\mu$ L / ウェルのアッセイ希釈剤を用いて、ウェルを 3 回洗浄した。次に、プレートに結合した V $\beta$ 6 の量を検出するために、mAb 2075 (Chemicon) をアッセイ希釈剤 (50  $\mu$ L / ウェル) 中濃度 1  $\mu$ g / ml で添加した後、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、ウェルを 300  $\mu$ L / ウェルのアッセイ希釈剤を用いて 3 回洗浄した後、アッセイ希釈剤 (50  $\mu$ L / ウェル) 中 400 ng / ml のヤギ抗マウス IgG Fc - ペルオキシダーゼと一緒に室温で 1 時間インキュベートした。次に、ウェルを 300  $\mu$ L / ウェルのアッセイ希釈剤を用いて 3 回洗浄した後、総量 50  $\mu$ L / ウェルの 1 ステップ TMB (Neogen) を用いて展開させた。15 分後、展開反応を 50  $\mu$ L / ウェルの 1 N 塩酸でクエンチングした。プレートを 450 nm で読み取り、抗体の 5 つについての結果を図 14 にまとめる。これは、抗体が、GST-LAP への V $\beta$ 6 の結合を阻害することができたことを示している。

30

40

## 【0310】

実施例 21 . V $\beta$ 3 又は V $\beta$ 5 インテグリンに対する交差反応性

抗体が、V $\beta$ 6 インテグリンのみに対して機能性であり、V $\beta$ 3 又は V $\beta$ 5 インテグリンに対してはそうではないことを証明するために、次のアッセイを実施して、これらの抗体が、オステオポンチンペプチドへの A375M 細胞の接着を阻害する能力を試験した。

50

## 【0311】

アッセイプレートをおステオポンチンでコーティングした。おステオポンチンの2つの断片：OPN17-168及びOPN17-314を用いた。アッセイプレートを3%BSA/PBSでアッセイ前の1時間にわたりプレブロックした。A375M細胞を培養フラスコから取り除き、ペレット化してから、1%BSA並びに1mM  $\text{Ca}^{2+}$ 及び1mM  $\text{Mn}^{2+}$ を含有するHBSSで2回洗浄した。続いて、細胞を1ウェル当たり30,000細胞でHBSS中に再懸濁させた。おステオポンチン断片を含有するコーティング液を除去してから、プレートを100  $\mu\text{L}$ の3%BSAで室温にて1時間ブロックした。コーティング済プレートを、1%BSAを含有するHBSSで2回洗浄した。抗体滴定物を最終容量30  $\mu\text{L}$ 中及び最終濃度の2倍の1:4段階希釈物において調製した。再懸濁させた細胞を、V字底プレート内の滴定した抗体を含むウェルに添加し、細胞及び抗体を4で40分間コインキュベートした。次に、細胞-抗体混合物をコーティング済プレートに移した後、プレートを37で40分間インキュベートした。続いて、コーティング済プレート上の細胞を温HBSSで4回洗浄した後、プレート内の細胞を-80で15分間凍結した。細胞を室温で解凍させた後、100  $\mu\text{L}$ のCyQuant色素/溶解緩衝液(Molecular Probes)を製造者の指示に従って各ウェルに添加した。励起波長485nm及び発光波長530nmで蛍光を読み取った。

10

## 【0312】

抗体の5つについての結果を表15にまとめる。市販のVインテグリン特異的抗体をこのアッセイの正の対照として使用したところ、接着の約90%阻害を呈示した。市販のV6抗体は、V3又はV5インテグリンに対する接着についての本アッセイで負の対照として使用した。抗体は全て濃度5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で試験したが、いずれの試験抗体もV3又はV5インテグリンへの接着を阻止することはできなかった。

20

## 【0313】

## 【表15】

表15.  $\alpha\text{V}\beta3$  又は  $\alpha\text{V}\beta5$  インテグリンに対する交差反応性

抗体 ID	阻害率%
sc 133	3
sc 188	-2
sc 254	-5
sc 264	3
sc 298	9
$\alpha\text{V}$ 対照	89
$\alpha\text{V}\beta6$ 対照	11
ヒト IgG 対照	3
マウス IgG 対照	5

30

## 【0314】

実施例22. 4 1インテグリンに対する交差反応性

抗体が、V6インテグリンのみに対して機能性であり、4 1インテグリンに対してはそうではないことを証明するために、アッセイを実施して、これらの抗体が、フィブロネクチンのCS-1ペプチドへのJ6.77細胞の接着を阻害する能力を試験した。J6.77細胞を結合のために使用し、アッセイプレートをコーティングするためにフィブロネクチンのCS-1ペプチドを用いた以外は、実施例21に記載のようにアッセイを実施した。

40

## 【0315】

抗体の11についての結果を表16にまとめる。市販の1インテグリン特異的抗体をこのアッセイの正の対照として使用したところ、接着の97%阻害を呈示した。市販のV6特異的抗体は、4 1に対する接着についての本アッセイで負の対照として使用した。抗体は全て濃度5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で使用したが、いずれの試験抗体も4 1への接着を阻止することはできなかった。

50

【 0 3 1 6 】

【 表 1 6 】

表 16.  $\alpha 4 \beta 1$  インテグリンに対する交差反応性

5 $\mu$ g/ml の抗体	阻害率%
sc 58	-14
sc 97	-7
sc 133	-15
sc 161	12
sc 188	-10
sc 254	0
sc 264	-8
sc 277	-17
sc 298	-7
sc 320	-8
sc 374	-8
ヒト IgG1	-6
ヒト IgG2	-9
抗ベータ 1 インテグリン抗体	97
抗 $\alpha V \beta 6$ インテグリン抗体	-15
プレート上に CS-1 又は 抗体なし	12
抗体なしの CS-1 断片コーティングプレート	10

10

【 0 3 1 7 】

20

実施例 23 . 5 1 インテグリンに対する交差反応性

抗体が、 V 6 インテグリンのみに対して機能性であり、 5 1 インテグリンに対してはそうではないことを証明するために、接着アッセイを実施して、これらの抗体が、フィブロネクチンへの K 5 6 2 細胞の接着を阻害する能力を試験した。

【 0 3 1 8 】

濃度 12 . 5  $\mu$ g / mL のフィブロネクチンの FN 9 - 10 ペプチドでアッセイプレートをコーティングした。アッセイプレートを 3 % B S A / P B S でアッセイ前の 1 時間にわたりプレブロックした。K 5 6 2 細胞を培養フラスコから取り除き、ペレット化してから、1 % B S A 及び 1 m M M n <sup>2+</sup> を含有する H B S S で 2 回洗浄した。続いて、細胞を 1 ウェル当たり 30 , 000 細胞の濃度で H B S S 中に再懸濁させた。オステオポンチン断片を含有するコーティング液を除去してから、プレートを 100  $\mu$  L の 3 % B S A で室温にて 1 時間ブロックした。コーティング済プレートを、1 % B S A を含有する H B S S で 2 回洗浄した。抗体滴定物を最終容量 30  $\mu$  L 中及び最終濃度の 2 倍の 1 : 4 段階希釈物において調製した。再懸濁させた細胞を、V 字底プレート内の滴定抗体を含むウェルに添加し、細胞及び抗体を 4 で 60 分間コインキュベートした。次に、細胞 - 抗体混合物をコーティング済プレートに移した後、プレートを 37 で 40 分間インキュベートした。続いて、コーティング済プレート上の細胞を温 H B S S で 4 回洗浄した後、プレート内の細胞を - 80 で 15 分間凍結した。細胞を室温で解凍させた後、100  $\mu$  L の C y Q u a n t 色素 / 溶解緩衝液 ( M o l e c u l a r P r o b e s ) を製造者の指示に従って各ウェルに添加した。励起波長 485 nm 及び発光波長 530 nm で蛍光を読み取った。

30

40

【 0 3 1 9 】

抗体の 5 つについての結果を表 17 にまとめる。試験抗体を正の対照としての市販の 5 1 抗体、及び負の対照としての V 6 特異的抗体と比較した。このアッセイで用いた 5  $\mu$ g / mL 濃度では、いずれの試験抗体も本アッセイでの接着を阻止することはできなかった。

【 0 3 2 0 】

## 【表 17】

表 17.  $\alpha 5\beta 1$  インテグリンに対する交差反応性

抗体 ID	阻害率%
sc 133	-12
sc 188	5
sc 254	-9
sc 264	-4
sc 298	2
$\alpha V\beta 6$ 対照	7
$\alpha 5\beta 1$ 対照	78
ヒト IgG 対照	11

10

## 【0321】

実施例 24 . マウス及びカニクイザル  $V_6$  インテグリンに対する交差反応性

抗体が、マウス  $V_6$  又はカニクイザル  $V_6$  に対する交差反応性を呈示するか否かを決定するために、次のアッセイを実施した。

## 【0322】

カニクイザル又はマウス  $V_6$ 、若しくは  $V_6$  で一過的にトランスフェクトした HEK293 細胞についての FACS 分析を用いて、マウス及びマウス  $V_6$  に対する mAb の交差反応性を精製 mAb について試験した。形質転換から約 48 時間後、細胞を収集し、FACS 緩衝液中に再懸濁させて、 $100 \mu L$  中約 50,000 細胞の最終濃度を達成した。

20

## 【0323】

総計約 100,000 個の細胞を以下のような各反応に使用した。 $200 \mu L$  の 293 細胞を V 字底プレート内に分配した。プレート内の細胞を  $1500 \text{ rpm}$  で 3 分間ペレット化した後、 $100 \mu L$  の FACS 緩衝液中に再懸濁させた。ペレット化ステップを反復し、FACS 緩衝液の上清を除去した。精製済 mAb、又は対照一次抗体を  $50 \mu L$  の容量に添加し、細胞を再懸濁させた。一次抗体対照は、マウス  $V_6$  (Cat MAB2077z, Chemicon) 及び抗  $V_6$  及び抗  $V_6$  組換え体であった。プレートを氷上で 45 分間インキュベートした後、 $100 \mu L$  の FACS 緩衝液を添加して一次抗体を希釈した。次に、 $1500 \text{ rpm}$  で 3 分間遠心分離することにより、細胞をペレット化した後、ペレットを  $100 \mu L$  の FACS 緩衝液中に再懸濁させた。ペレット化ステップを反復し、FACS 緩衝液の上清を除去した。続いて、細胞を適切な二次抗体 ( $5 \mu g / ml$ ) 中に 7AAD 色素 ( $10 \mu g / ml$ ) と一緒に再懸濁させて、氷上で 7 分間染色した。次に、 $150 \mu L$  の FACS 緩衝液を添加して、細胞を  $1500 \text{ rpm}$  で 3 分間ペレット化した後、 $100 \mu L$  の FACS 緩衝液で洗浄して、ペレット化し、次いで、 $250 \mu L$  の緩衝液中に再懸濁させてから、FACS チューブに添加した。ハイスループット FACS 機で試料を分析し、Cell Quest Pro ソフトウェアを用いて分析した。

30

## 【0324】

結果を表 18 にまとめるが、これらの結果は、mAb sc 133 及び mAb sc 188 が、マウス及びカニクイザル  $V_6$  及び  $V_6$  と明らかに交差反応性であることを示している。mAb sc 254 は、明らかに  $V_6$ 、 $V_6$  及び  $V_6$  と交差反応した。mAb sc 264 及び 298 は、親細胞に対して高レベルの結合を有したため、種交差反応性を認めるのが困難であった。

40

## 【0325】

## 【表 18】

表 18. マウス及びカニクイザル  $\alpha V\beta 6$  に対する交差反応性

抗体	親	マウス アルファ V	マウス ベータ 6	マウス アルファ V ベータ 6	カニクイザル アルファ V	カニクイザル ベータ 6	カニクイザル アルファ V ベータ 6
細胞単独	0	0	0	0	1	0	0
Gt 抗 マウス	0	0	0	0	0	0	0
抗 アルファ V ベータ 6	0	1	11	45	0	5	20
抗 アルファ V	68	68	63	59	68	69	67
抗ベータ 6	0	0	0	0	0	0	0
Gt 抗ヒト	0	0	0	0	0	0	0
ヒト IgG1	0	1	0	1	1	1	0
sc.133	2	4	19	49	5	10	28
sc.188	1	3	29	51	2	17	27
sc.254	8	13	21	50	16	19	26
sc.264	74	71	68	63	70	75	54
sc.298	49	45	52	53	48	52	38

データは、転位した細胞のパーセントを示す。

## 【0326】

## 実施例 25 . 内在化アッセイ

ヒト V 6 を安定して発現した K 5 6 2 細胞株を用いて、抗体の内在化を試験した。精製抗体の内在化を、本アッセイでは内在化しなかった市販の V 6 と比較した。

## 【0327】

結果を表 19 にまとめる。

## 【0328】

## 【表 19】

表 19. 内在化アッセイのまとめ

抗体	濃度(ug/mL)	内在化%
sc 133	10	28%
sc 133	1	30%
sc 188	10	38%
sc 188	1	34%
sc 254	10	49%
sc 254	1	39%
sc 264	10	76%
sc 264	1	77%
sc 298	10	28%
sc 298	1	26%

## 【0329】

## 実施例 26 . 高解像能 Biacore 分析

CM5 チップに固定化した抗体に結合する可溶性 V 6 タンパク質を用いて、V 6 抗体の 5 つについて高解像能 Biacore 分析を実施することにより、可溶性抗原に対するそれらの親和性を推定した。

## 【0330】

Biacore 分析は以下のように実施した。常用的アミンカップリングを用いて、2 つの CM5 Biacore チップに対する高密度ヤギ ヒト IgG 抗体表面を調製した。各 mAb は、100  $\mu$ g/mL の BSA、1 mM  $MgCl_2$ 、及び 1 mM  $CaCl_2$  を含有するガス抜き HBS - P 泳動用緩衝液中に、約 1  $\mu$ g/mL の濃度まで希釈した。より正確には、mAb sc 133 を 0.98  $\mu$ g/mL まで、mAb sc 188 を 0.96  $\mu$ g/mL まで、mAb sc 264 を 0.94  $\mu$ g/mL まで、mAb sc 254 . 2 を 0.87  $\mu$ g/mL まで、mAb sc 298 を 1.6  $\mu$ g/mL まで希釈した。次に、上に記載する濃度で、流速 10  $\mu$ L/分の個別のフローセルにわたって各 mAb を捕獲す



ることにより、捕獲レベルプロトコルを各mAbについて展開した。mAb sc 133、sc 298、及びsc 254.2を30秒間捕獲し、mAb sc 188及びsc 264は1分間捕獲した。続いて、50  $\mu$ L / 分で4分の洗浄ステップを実施することにより、mAb ベースラインを安定化した。

#### 【0331】

mAb sc 133、sc 188、sc 264、及びsc 298の場合、116 ~ 3.6 nM、またmAb sc 254.2の場合には、233 ~ 3.6 nMの濃度範囲で、各濃度範囲について2  $\times$  段階希釈を用い、可溶性 V 6を4分間注射した。各抗原注射の後、10分の解離を行った。抗原試料は、前述したようにHBS - Pランニングで調製した。試料は全て二重参照のために点在する複数のmAb捕獲 / 緩衝液注射サイクルを用いて、3回反復で無作為に注射した。流速100  $\mu$ L / 分での各サイクルの後、1つの18秒パルスの146 mMリン酸 (pH 1.5) で、高密度ヤギ マウス抗体表面を再生した。全ての抗原注射サイクルについて、50  $\mu$ L / 分の流速を使用した。

#### 【0332】

次に、データを、CLAMPを用いた質量移動の項を包含する1 : 1相互作用モデルにあてはめた。得られた結合定数を表20に一覧で示す。mAbは、最も高い親和性から最も低い親和性の順に掲載する。

#### 【0333】

#### 【表20】

表 20. 高分解能 Biacore<sup>TM</sup> から得られたクローニング及び精製 mAbs の親和性決定の結果

抗体	R <sub>max</sub>	k <sub>a</sub> (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	k <sub>d</sub> (s <sup>-1</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)
sc 264	96	5.85 X 10 <sup>4</sup>	3.63 X 10 <sup>-4</sup>	6.2
sc 298	77	5.65 X 10 <sup>4</sup>	1.18 X 10 <sup>-3</sup>	21.0
sc 188	76	4.52 X 10 <sup>4</sup>	9.56 X 10 <sup>-4</sup>	21.2
sc 133	96	5.73 X 10 <sup>4</sup>	1.89 X 10 <sup>-3</sup>	33.0
sc 254.2	53, 45	5.73 X 10 <sup>4</sup>	5.64 X 10 <sup>-4</sup>	34.9

#### 【0334】

実施例 27 . FACSを用いた結合親和性分析

Biacoreに代わり、FACS分析も用いて、ヒト V 6 抗原を安定して発現するK562細胞に対する抗体の1つの結合親和性を推定した。抗原の量を滴定して、結合曲線を作成し、抗原に対する結合親和性を推定した。

#### 【0335】

V 6を発現するK562細胞を、1 mMのMgCl<sub>2</sub>及び1 mMのCaCl<sub>2</sub>を含有する濾過済HBS緩衝液中に、濃度約6百万細胞 / mLで再懸濁させた。細胞を氷上に維持した。精製済mAb sc 188を、96ウェルプレート内の11ウェルにわたってHBS中に1 : 2の希釈係数により段階的に希釈した。各列の第12ウェルは、緩衝液のみを含有した。滴定は3回反復して行った。最終容量が300  $\mu$ L / ウェルとなり、各ウェルが約120,000個の細胞を含有するように、追加のHBS及び細胞を各ウェルに添加した。mAb sc 188の最終分子濃度は、4.9 ~ 0.019 nMであった。プレートをプレートシェーカー内に4 で5時間配置して、プレートをスピンし、HBSで3回洗浄した後、200  $\mu$ Lの131 nM Cy5ヤギ - ヒトポリクローナル抗体 (Jackson Laboratories、109 - 175 - 008) を各ウェルに添加した。次に、プレートを4 で40分間振盪した後、再度HBSで3回スピン及び洗浄を行った。各mAb濃度について20,000「イベント」の幾何平均蛍光 (GMF) を、FACS Calibur計器を用いて記録し、対応する3回反復滴定点を平均することにより、各mAb濃度について1つのGMF点を取得した。Scientistソフトウェアによる、分子mAb濃度の関数としての平均GMFのプロットを、式：

## 【数 1】

$$F = P' \cdot \frac{(K_D + L_T + n \cdot M) - \sqrt{(K_D + L_T + n \cdot M)^2 - 4n \cdot M \cdot L_T}}{2} + B$$

を用いて非線形的にフィッティングした。

## 【0336】

前述の式において、 $F$  = 幾何平均蛍光、 $L_T$  = 合計分子  $mAb$  濃度、 $P'$  = 任意の蛍光単位を結合された  $mAb$  と関連付ける比例定数、 $M$  = 細胞のモル濃度、 $n$  = 1細胞当たりの受容体の数、 $B$  = バックグラウンドシグナル、及び  $K_D$  = 平衡解離定数である。 $mAb$   $sc188$  の場合、 $P'$ 、 $n$ 、 $B$ 、及び  $K_D$  は、非線形分析において自由に変動させるため、 $K_D$  の推定値を取得した。

10

## 【0337】

得られたプロットをその非線形フィット（赤色の線）と共に図15に示す。表21は、 $mAb$   $sc188$  について得られた  $K_D$  を、フィットの95%信頼区間と一緒に記載する。 $mAb$   $sc188$  に関するこれらの結果は、1タイプの受容体への結合を示している。

## 【0338】

FACSにより決定される  $sc188$  に対する結合親和性は、 $Biacore$  によって決定されたものより有意に堅固であった（実施例26）。 $sc188$  の  $K_D$  値の差について少なくとも2つの解釈がある。第1の理由は、2つのアッセイが、測定に異なる形態の抗体を使用したことである。すなわち、 $Biacore$  では、可溶性抗体を使用し、FACS分析では、細胞に結合した形態の抗体を使用した。第2の理由は、試験した抗体が、抗原の細胞結合形態に対して増殖したため、細胞結合抗体に結合するほど高い親和性で可溶性抗体に結合しない可能性があることである。

20

## 【0339】

## 【表21】

表 21. FACSを用いた結合親和性分析

抗体	$K_D$ (pM)	95% CI (pM)
sc188	51.9	+22.7

30

## 【0340】

## 実施例28. CDCアッセイ

前述の実施例に記載した精製済抗体は、IgG1アイソタイプであり、エフェクター機能を有し得る。これらの抗体が、補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する能力を決定するために、V6を安定して発現する293細胞（293-10A11）及び親293細胞（293F）を用いて、次のアッセイを実施した。

## 【0341】

細胞のカルセイン染色のために、HT29、293-10A11、及び293F細胞の各々約  $2.5 \times 10^6$  のアリコートを開別3mlの無血清RPMI培地中に再懸濁させた。次に、45  $\mu$ Lの1mMカルセインを各々3mlの細胞試料に添加した後、試料を37で45分間インキュベートした。細胞を1200  $\times$  RPMで3分間遠心分離した後、上清を廃棄し、細胞をそれぞれの細胞株の培地に再懸濁させた。遠心分離ステップを反復し、細胞を再懸濁させることにより、50  $\mu$ Lの培地中約100,000細胞の最終濃度を達成した。

40

## 【0342】

各抗体の段階的1:2希釈物をV字底96ウェルプレートにおいて、50  $\mu$ Lの容量中20  $\mu$ g/mL ~ 0.625  $\mu$ g/mLの範囲の濃度で調製した。次に、前述のように調製した100,000個の細胞を50  $\mu$ Lの容量で抗体含有プレートに添加し、得られた混合物を氷上で2時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をペレット化し、上清を廃棄した。細胞を、10%ヒト血清（ABIDナー#27）を含有する100  $\mu$

50

Lのそれぞれの培地に再懸濁させてから、37℃で30分間インキュベートした。次に、細胞を遠心分離し、80 µLの上清をFMA Tプレートに移した。励起波長485 nm及び発光波長530 nmを用いて、Tecanリーダでプレートの読み取りを行った。

#### 【0343】

結果を表16A～3Eにまとめるが、これらの結果は、試験した各精製済抗体が、V6インテグリンを安定して発現する293細胞においてCDCを媒介することができることを示している。

#### 【0344】

##### 実施例29．部位指定突然変異誘発

免疫化(実施例1)から調製した抗体の1つ(sc264)は、TGFLAP結合阻害アッセイにおいて、強力な機能性遮断活性をインビトロで示した(実施例4を参照)が、非V6発現細胞株に対する交差反応性を呈示した(実施例24を参照)。この抗体、sc264は、CDR3領域にRGD配列を有し、この配列が、交差反応性結合の原因であると推定される。従って、部位指定突然変異誘発を用いて、RGD内のグリシン残基をアラニンで置換した(sc264RAD)。

#### 【0345】

二次抗体(sc188)は、FR3領域内にグリコシル化部位を有する。この部位を、NLTからKLTへの置換を含む部位指定突然変異誘発によって排除した(sc188SDM)。次に、実施例7及び8に記載するように、これら2つの抗体の突然変異形態を発現させて、精製した後、以下の実施例に説明するように、精製済抗体を分析した。

#### 【0346】

##### 実施例30．突然変異型抗体の交差反応性結合を試験するための結合アッセイ

実施例24で観察された交差反応性結合が、sc264の部位指定突然変異誘発によって低減したか否かを試験するために、結合アッセイを実施した。sc264からRGD部位を除去することにより、オリジナルの抗体と比較して、結合が低減するか否かを試験するために、抗体の結合を293T及び293F細胞株について分析した。

#### 【0347】

293T及び293F細胞を収集後に沈降させてから、1%BSAと1mMのMgCl<sub>2</sub>及び1mMのCaCl<sub>2</sub>を含有するHBSS(洗浄緩衝液)中に再懸濁させて、少なくとも150,000個の細胞が各反応で用いられるようにした。細胞をV字底96ウェルプレート(Sarstedt)内の反応物の間で分割し、プレート内の細胞を1500rpmで3分間ペレット化した後、HBSS上清を除去した。一次抗体を、50 µLの容量中に、表19に表示する濃度で添加した後、細胞を再懸濁させてから、氷上で60分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を1500rpmで3分間の遠心分離によりペレット化し、100 µLの洗浄緩衝液中に再懸濁させてから、再度ペレット化した。次に、細胞を10 µg/mlの7AADと一緒に2 µg/mlの適切な二次抗体中に再懸濁させてから、氷上で7分間染色した後、150 µLの洗浄緩衝液を添加し、細胞を1500rpmで3分間ペレット化して、1%BSAを含む100 µLのHBSS中に再懸濁させた。HTSアタッチメント付きのFACS機で試料を読み取り、データをCell Quest Proソフトウェアを用いて分析した。結果を表22にまとめるが、データは、任意単位の幾何平均シフト値として表される。これらのデータは、試験した全ての濃度で、sc264RADが、オリジナルmAb sc264と比較して、親293T細胞との有意に低い結合を有したことを明らかにしている。

#### 【0348】

## 【表 2 2】

表 22. 親細胞に対する突然変異抗体の交差反応性

抗体	濃度 (ug/ml)	293T 細胞	293T- $\alpha$ V $\beta$ 6 細胞
なし	n/a	3	2
マウス IgG2a	20	27	8
ヒト IgG1	20	4	4
抗 $\alpha$ V $\beta$ 6	20	4	5
sc 264	20	433	6673
sc 264 RAD	20	44	7241
sc 188	20	27	6167
sc 188 SDM	20	25	6758
sc 264	5	88	6418
sc 264 RAD	5	13	6840
sc 188	5	9	5822
sc 188 SDM	5	9	6822
sc 264	1.25	24	6230
sc 264 RAD	1.25	7	4890
sc 188	1.25	6	6395
sc 188 SDM	1.25	5	4532

## 【0349】

実施例 3 1 . 突然変異型抗体の効力分析

HT-29 細胞の TGF- $\beta$ 1 LAP 媒介接着を阻害するのに必要な突然変異型 V $\beta$ 6 抗体の濃度 (IC<sub>50</sub>) を決定するために、以下のアッセイを実施した。

## 【0350】

Nunc MaxiSorp (Nunc) プレートに 50  $\mu$ L の 10  $\mu$ g/ml の TGF- $\beta$ 1 LAP (TGF- $\beta$ 1 LAP) で一晚コーティングした後、アッセイ前の 1 時間にわたり 3% BSA/PBS でプレブロックした。続いて、最適密度まで増殖させた HT-29 細胞をペレット化し、HBSS (1% BSA と 1 mM の MgCl<sub>2</sub> 及び 1 mM の CaCl<sub>2</sub> を含有) で 2 回洗浄した後、1 ウェル当たり 30,000 細胞で、HBSS に再懸濁させた。コーティング液をプレートから除去し、これらのプレートを 100  $\mu$ L の 3% BSA で室温にて 1 時間ブロックした後、PBS で 2 回洗浄した。

## 【0351】

抗体滴定物を最終容量 30  $\mu$ L 中及び最終濃度の 2 倍で、1:4 段階希釈物において調製した。対照ウェル中の PBS 濃度が、最も希薄な抗体ウェル中の PBS 濃度と一致することを確実にするように注意した。30  $\mu$ L の細胞を各ウェルに添加し、V 字底プレートにおいて、細胞を抗体の存在下、4 時間で 40 分間インキュベートした。細胞抗体混合物をコーティング済プレートに移して、プレートを 37℃ で 40 分間インキュベートした。続いて、コーティング済プレート上の細胞を温 HBSS で 4 回洗浄した後、細胞を -80℃ で 15 分間凍結した。細胞を室温で解凍させた後、100  $\mu$ L の CyQuant 色素/溶解緩衝液 (Molecular Probes) を製造者の指示に従って各ウェルに添加した。励起波長 485 nm 及び発光波長 530 nm で蛍光を読み取った。12 の抗体についての結果を表 23 にまとめるが、これらの結果は、突然変異型抗体の IC<sub>50</sub> が、各オリジナル抗体のそれよりも一貫して低いことを明らかにしている。

## 【0352】

## 【表 2 3】

表 23. HT29 細胞の TGFβ<sub>1</sub>LAP 媒介性接着を阻害するのに必要な突然変異型抗体の濃度 (IC<sub>50</sub>)

	n=1 (ng/ml)	n=2 (ng/ml)	n=3 (ng/ml)
sc.264	113	96	55
sc.264 RAD	13	13	39
sc.264	57	89	46
sc.188	125	157	64
sc.188 SDM	22	24	67

10

## 【0 3 5 3】

実施例 3 2 . 4 1 インテグリンに対する突然変異型抗体の交差反応性

変異型抗体が、V 6 インテグリンのみに対して機能性であり、4 1 インテグリンに対してはそうではないことを証明するために、アッセイを実施して、これらの抗体が、フィブロネクチンの CS - 1 ペプチドへの J 6 . 7 7 細胞の接着を阻害する能力を試験した。以下に説明するように、アッセイを実施した。

## 【0 3 5 4】

アッセイプレートにフィブロネクチンの CS - 1 ペプチドでコーティングした。アッセイプレートを 3 % B S A / P B S でアッセイ前の 1 時間にわたりプレブロックした。J 6 . 7 7 細胞を密集まで増殖させた後、培養フラスコから取り除き、ペレット化してから、H B S S で 3 回洗浄した。続いて、細胞を 1 ウェル当たり 3 0 , 0 0 0 細胞の濃度で H B S S に再懸濁させた。フィブロネクチン断片を含有するコーティング液を除去してから、プレートを 1 0 0 μ L の 3 % B S A で室温にて 1 時間ブロックした。コーティング済プレートを H B S S で 3 回洗浄した。抗体滴定物を最終容量 3 0 μ L 中及び最終濃度の 2 倍で、1 : 4 段階希釈物において調製した。再懸濁させた細胞を、V 字底プレート内の滴定抗体を含有するウェルに添加し、細胞及び抗体を 4 で 4 0 分間コインキュベートした。次に、細胞 - 抗体混合物をコーティング済プレートに移した後、プレートを 3 7 で 4 0 分間インキュベートした。続いて、コーティング済プレート上の細胞を温 H B S S で 4 回洗浄した後、プレート内の細胞を - 8 0 で 1 5 分間凍結した。細胞を室温で解凍させた後、1 0 0 μ L の Cy Q u a n t 色素 / 溶解緩衝液 ( M o l e c u l a r P r o b e s ) を製造者の指示に従って各ウェルに添加した。励起波長 4 8 5 n m 及び発光波長 5 3 0 n m で蛍光を読み取った。

20

30

## 【0 3 5 5】

2 つの突然変異型抗体及びそれらの標識突然変異対応物についての結果を表 2 4 にまとめる。市販の 1 インテグリン特異的抗体をこのアッセイの正の対照として使用したところ、接着の 9 5 % 阻害を呈示した。4 1 への接着についての本アッセイにおいて、市販の V 6 特異的抗体を負の対照として使用した。抗体は全て 5 μ g / m l で用いたが、いずれの試験抗体も、4 1 への接着を阻止することはできなかった。

## 【0 3 5 6】

## 【表 2 4】

40

表 24. α4β1 インテグリンに対する交差反応性

5ug/ml の抗体	阻害率%
sc.188	2
sc.188 SDM	-6
sc.264	-30
sc.264 RAD	-2
ヒト IgG1	26
ヒト IgG2	13
ヒト IgG4	15
抗ベータ 1 インテグリン	95

50

## 【 0 3 5 7 】

実施例 3 3 . 5 1 インテグリンに対する突然変異型抗体の交差反応性

変異型抗体が、 V 6 インテグリンのみに対して機能性であり、 5 1 インテグリンに対してはそうではないことを証明するために、アッセイを実施して、これらの抗体が、フィブロネクチンへの K 5 6 2 細胞の接着を阻害する能力を試験した。アッセイは、実施例 1 4 に記載のように記載のように実施した。結果を表 2 5 にまとめるが、これらの結果は、いずれの試験抗体も、 5 1 への接着を阻止することはできなかったことを示している。

## 【 0 3 5 8 】

## 【表 2 5 】

10

表 25.  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンに対する交差反応性

抗体 ID	阻害率%
sc 188	-5
sc 188 SDM	-8
sc 264	3
sc 264 RAD	6
$\alpha V \beta 6$ 対照	-16
$\alpha 5 \beta 1$ 対照	78
ヒト IgG 対照	-12

## 【 0 3 5 9 】

20

実施例 3 4 . マウス及びカニクイザル V 6 インテグリンに対する突然変異型抗体の交差反応性

突然変異型 V 6 特異的抗体が、マウス V 6 又はカニクイザル V 6 に対する交差反応性を呈示するか否かを決定するために、次のアッセイを実施した。

## 【 0 3 6 0 】

K 5 6 2 親細胞、又はカニクイザル又はマウス V 6 を発現する K 5 6 2 細胞を収集後に沈降させてから、1 % B S A と 1 m M の C a C l <sub>2</sub> 及び 1 m M の M g C l <sub>2</sub> を含有する H B S S ( 洗浄緩衝液 ) に再懸濁させて、少なくとも 1 5 0 , 0 0 0 個の細胞が各反応で用いられるようにした。細胞を V 字底 9 6 ウェルプレート ( S a r s t e d t ) 内の反応物の間で分割し、プレート内の細胞を 1 5 0 0 r p m で 3 分間ペレット化した後、H B S S 上清を除去した。一次抗体を、5 0  $\mu$  L の容量中に添加した後、細胞を再懸濁させてから、氷上で 6 0 分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を 1 5 0 0 r p m で 3 分間の遠心分離によりペレット化し、1 0 0  $\mu$  L の洗浄緩衝液中に再懸濁させてから、再度ペレット化した。次に、細胞を 1 0  $\mu$  g / m l の 7 A A A D と一緒に、2  $\mu$  g / m l の適切な二次抗体中に再懸濁させてから、氷上で 7 分間染色した後、1 5 0  $\mu$  L の洗浄緩衝液を添加し、細胞を 1 5 0 0 r p m で 3 分間ペレット化して、1 % B S A を含む 1 0 0  $\mu$  L の H B S S に再懸濁させた。H T S アタッチメント付き F A C S 機で試料を読み取り、データを C e l l Q u e s t P r o ソフトウェアを用いて分析した。結果を表 2 6 にまとめるが、データは、任意単位の幾何平均シフト値として表される。これらのデータは、試験した濃度で、s c 2 6 4 R A D 及び s c 1 8 8 S D M が、マウス V 6 及びカニクイザル V 6 に対する交差反応性を呈示することを明らかにしている。

30

40

## 【 0 3 6 1 】

## 【表 26】

表 26. マウス及びカニクイザル  $\alpha V\beta 6$  との交差反応性

抗体	親	マウス アルファ V ベータ 6	カニクイザル ア ルファ V ベータ 6
細胞単独	3	3	3
Gt 抗マウス	5	6	7
抗アルファ V ベータ 6	15	122	84
抗アルファ V	109	144	163
抗ベータ 6	26	43	37
マウス IgG2a	23	36	25
マウス IgG1	12	20	13
Gt 抗ヒト	7	12	7
ヒト IgG1	46	108	54
sc 133	57	246	154
sc 188	55	227	139
sc 188 SDM	47	219	142
sc 254	98	260	190
sc 264	33	160	121
sc 264 RAD	48	196	139
sc 298	33	150	97

10

## 【0362】

20

## 実施例 35 . 内在化アッセイ

ヒト V 6 を安定して発現した K 5 6 2 細胞株を用いて、突然変異型抗体の内在化を試験した。アッセイは、実施例 24 に記載したように実施した。精製抗体の内在化を、本アッセイでは内在化しなかった市販の V 6 と比較した。

## 【0363】

結果を表 27 にまとめるが、これらの結果は、sc 264 RAD 突然変異型抗体が、非突然変異 sc 264 よりも有意に低く内在化されることを明らかにしている。

## 【0364】

## 【表 27】

30

表 27. 内在化アッセイのまとめ

抗体	濃度 (ug/ml)	内在化%
sc 264	10	75%
sc 264	1	47%
sc 264 RAD	10	42%
sc 264 RAD	1	31%
sc 188	10	18%
sc 188	1	27%
sc 188 SDM	10	22%
sc 188 SDM	1	17%

## 【0365】

40

## 実施例 36 . FACS を用いた sc 264 RAD の結合親和性アッセイ

V 6 への sc 264 RAD の結合親和性アッセイを実施例 18 に記載のように測定した。このアッセイの結果を表 28 にまとめるが、これらの結果は、sc 264 RAD 抗体が、親和性 < 50 pM を有することを明らかにしている。

## 【0366】

## 【表 28】

表 28. FACS を用いた結合親和性分析

mAb 試料	K <sub>D</sub> (pM)	95% CI (pM)
sc 264 RAD	46.3	+ 15.9

50

## 【0367】

実施例37. s c 2 6 4 R A Dとs c 2 6 4 R A D / A D Yの活性の比較

s c 2 6 4 R A D抗体及び2 6 4 R A Dの生殖系列 ( G L ) 形態 ( 軽鎖に突然変異 A 8 4 Dを含む)、s c 2 6 4 R A D / A D Yの活性をD e t r o i t - 5 6 2 接着アッセイで比較した。

## 【0368】

プレートに0.5  $\mu$ g/mlのG S T - T G F - b L A P融合タンパク質で、4 にて一晚コーティングし、翌朝洗浄してから、3 % B S A / P B Sで1時間ブロックした。続いて、D e t r o i t - 5 6 2 細胞 ( 1 ウェル当たり25000細胞 ) を、2 mMのM g C l<sub>2</sub>を含有するH B S Sにおいて37 で45分間にわたりプレートに接着させた。4 5分後、プレートをP B Sで3回洗浄し、エタノール中に固定した。H o e s c h tでの染色により細胞を視覚化し、C e l l o m i c s A r r a y s c a n I Iで、1ウェル当たり結合した細胞の数を計数することにより定量した。

10

## 【0369】

図18に示すデータから、s c 2 6 4 R A D及びs c 2 6 4 R A D / A D Yのいずれも、同様の活性を有すること、並びに V 6機能を阻止する能力は修飾抗体においても維持されることがわかる。

## 【0370】

実施例38. 増殖試験

抗体2 6 4 R A D、1 3 3及び1 8 8 S D Mが、a v b 6機能をインビボで阻止することを証明するために、各々を V 6陽性腫瘍異種移植片の成長を阻害する能力について試験した。かかるモデルの1つは、V 6を発現し、しかも皮下腫瘍異種移植片として増殖するD e t r o i t - 5 6 2 鼻咽頭細胞株である。

20

## 【0371】

D e t r o i t - 5 6 2 細胞を、E a r l e ' s B S S及び2 mM L - G l u + 1.0 mMピルビン酸ナトリウム、0.1 mM N E A A + 1.5 g / L重炭酸ナトリウム + 10 % F B Sを含むE M E M中で培養した。細胞を採取し、50 % P B S + 50 %マトリゲルに再懸濁させた。次に、懸濁液を、0.1 mlの容量中マウス1匹当たり5  $\times$  10<sup>-6</sup>で右脇腹に移植した。マウスは、6 ~ 8週齢のN C R雌ヌードマウスであった。投与は、腫瘍が0.1 cm<sup>3</sup>に達したとき開始し、試験期間中、週1回20 mg / kgで投与した。

30

## 【0372】

3つの抗体は全て腫瘍増殖を阻害した ( 図17を参照 )。2 6 4 R A Dが最も有効であり、次に1 3 3、そして1 8 8であった。このデータは、抗体2 6 4 R A D、1 3 3及び1 8 8が、インビボで活性であり、増殖のために V 6シグナル伝達に依存的な腫瘍の成長を低減することができることをはっきりと示している。

## 【0373】



【表 2 9】

表 29 例示の抗体重鎖アミノ酸配列

鎖名	配列番号	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
sc 264 RAD	75	QVQLQESGP GLVKPSQTL SLTCTVS	GGSS SGGY WS	WIRQHPGKGL WIG	YIYYSGRTY NNPSLKS	RVTSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCAR	VATGRA DYHFYA MDV	WGQGT TVTVSS
sc 264 RAD/A DY	95	QVQLQESGP GLVKPSQTL LTCTVS	GGSS GGY WS	WIRQHPGKGL WIG	YIYYSGRTY NNPSLKS	RVTSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCAR	VATGRA DYHFYA MDV	WGQGT TVTVSS
sc 188 SDM	71	QVQLQESGP GLVKPSQTL LTCTVS	GGSS GVYY WT	WIRQHPGKGL WIG	YIYYSGSTSY NPSLKS	RVTSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAV YYCAR	EGPLRGD YYYGLD V	WGQGT TVTVSS
sc 133 TMT	79	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSCKAS	GYTFT GYM H	WVRQAPGQGL EWMG	WINPKSGDT NYAQKFQG	RVMTTRDTSTSTAY MELSLRLSDDTAV YYCAR	RLDV	WGQGT TVTVSS
sc 133 WDS	83	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSCKAS	GYTFT GYM H	WVRQAPGQGL EWMG	WINPKSGDT NYAQKFQG	RVTLTRDTSTSTAY MELSLRLSDDTAV YYCAR	RLDV	WGQGT TVTVSS
sc 133 TMT/W DS	87	QVQLVQSGA EVKKPGASV KVSCKAS	GYTFT GYM H	WVRQAPGQGL EWMG	WINPKSGDT NYAQKFQG	RVMTTRDTSTSTAY MELSLRLSDDTAV YYCAR	RLDV	WGQGT TVTVSS

10

20

30

【 0 3 7 4 】

【表 3 0】

表 30 例示の抗体輕鎖アミノ酸配列

鎖名	配列番号	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
sc 264 RAD	77	SYELTQPSV SVSPGGQTARI TC	SGDVL AKKSA R	WFHQKPGQAP VLVIY	KDSERPS	GIPERFSGSSSGTTV TLTISGAQVEDEAA YYC	YSAADN NLV	FGGGTK LTVL
sc 264 RAD/A DY	97	SYELTQPSV SVSPGGQTARI TC	SGDVL AKKSA R	WFHQKPGQAP VLVIY	KDSERPS	GIPERFSGSSSGTTV TLTISGAQVEDEAD YYC	YSAADN NLV	FGGGTK LTVL
sc 188 SDM	73	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSC	RAGQT ISSRYL A	WYQQKPGQAP RPLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVY YC	QQYGSSP RT	FGGGTK VEIK
sc 133 TMT	81	QSVLTQPPSV SAAPGQKVITI SC	SGSSS NIGNN YVS	WYQQLPCTAP KLLIY	DNKKRPS	GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEAD YYC	GTWNSSL SAGYV	FGTGTK VTVL
sc 133 WDS	85	QSVLTQPPSV SAAPGQKVITI SC	SGSSS NIGNN YVS	WYQQLPCTAP KLLIY	DNKKRPS	GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEAD YYC	GTWDSLL SAGYV	FGTGTK VTVL
sc 133 TMT/W DS	89	QSVLTQPPSV SAAPGQKVITI SC	SGSSS NIGNN YVS	WYQQLPCTAP KLLIY	DNKKRPS	GIPDRFSGSKSGTSA TLGITGLQTGDEAD YYC	GTWDSLL SAGYV	FGTGTK VTVL

10

20

30

## 【 0 3 7 5 】

## 参考文献

1. Varden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Bioi. 2001; 2: 127 - 137.
2. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987; 235: 177 - 182.
3. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989; 244: 707 - 712.

40

50

4. Wong AL, Lee SC. Mechanisms of Resistance to Trastuzumab and Novel Therapeutic Strategies in HER2-Positive Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*. 2012;2012:415170.
5. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1659-1672.
6. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:1673-1684.
7. Arribas J, Baselga J, Pedersen K, Parra-Palau JL. p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res*. 2011;71:1515-1519.
8. Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011;11:263-275.
9. Lindsley CW, Barnett SF, Layton ME, Bilodeau MT. The PI3K/Akt pathway: recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Curr Cancer Drug Targets*. 2008;8:7-18.
10. Ueda Y, Wang S, Dumont N, et al. Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor beta-induced cell motility. *J Biochem*. 2004;279:24505-24513.
11. Wang SE, Shin I, Wu FY, Friedman DB, Arteaga CL. HER2/Neu (ErbB2) signaling to Rac1-Pak1 is temporally and spatially modulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*. 2006;66:9591-9600.
12. Muraoka RS, Koh Y, Roebuck LR, et al. Increased malignancy of Neu-induced mammary tumors overexpressing active transforming growth factor beta1. *Mol Cell Biol*. 2003;23:8691-8703.
13. Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta1 by plasmin. *J Cell Biol*. 1990;110:1361-1367.
14. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell*. 1999;96:319-328.

10

20

30

40

50

15. Hazelbag S, Kenter GG, Gorter A, et al. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol.* 2007; 212: 316 - 324.
16. Bates RC, Bellovin DL, Brown C, et al. Transcriptional activation of integrin beta 6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest.* 2005; 115: 339 - 347. 10
17. Elayadi AN, Samli KN, Prudkin L, et al. A peptide selected by biopanning identifies the integrin alphavbeta6 as a prognostic biomarker for nonsmall cell lung cancer. *Cancer Res.* 2007; 67: 5889 - 5895.
18. Breuss JM, Gallo J, Delisser HM, et al. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci.* 1995; 108 (Pt 6): 2241 - 2251. 20
19. Van Aarsen LA, Leone DR, Ho S, et al. Antibody-mediated blockade of integrin alpha v beta 6 inhibits tumor progression in vivo by a transforming growth factor-beta-regulated mechanism. *Cancer Res.* 2008; 68: 561 - 570.
20. Hu M, Yao J, Carroll DK, et al. Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell.* 2008; 13: 394 - 406. 30
21. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002; 110: 673 - 687.
22. Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene.* 1998; 17: 1365 - 1373.
23. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK). *Eur J Cancer.* 2005; 41: 1690 - 1696. 40
24. Rakha EA, EI-Rehim DA, Paish C, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer.* 2006; 42: 3149 - 3156.
25. Abd EI-Rehim OM, Pinder SE, Paish CE, et al. Expression of luminal and basal cyto keratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004; 203: 661 - 671. 50

26. Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012; 486: 346 - 352.
27. Crowder MJ HD. Monographs on Statistics and Applied Probability. 1, Editor, editor "editors. London: Chapman & Hall; 1990.
28. Lewis GO, Lofgren JA, McMurtrey AE, et al. Growth regulation of human breast and ovarian tumor cells by heregulin: Evidence for the requirement of ErbB2 as a critical component in mediating heregulin responsiveness. *Cancer Res*. 1996; 56: 1457 - 1465. 10
29. Eberlein C, Kendrew J, McDaid K, et al. A human monoclonal antibody 264RAD targeting alphavbeta6 integrin reduces tumour growth and metastasis, and modulates key biomarkers in vivo. *Oncogene*. 2012.
30. Slamon OJ, Leyland-Janes B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001; 344: 783 - 792. 20
31. Varden V. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology*. 2001; 61 Suppl 2: 1 - 13.
32. Clark AS, West K, Streicher S, Dennis PA. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2002; 1: 707 - 717. 30
33. Muraoka-Cook RS, Shin I, Vi JV, et al. Activated type I TGFbeta receptor kinase enhances the survival of mammary epithelial cells and accelerates tumor progression. *Oncogene*. 2006; 25: 3408 - 3423.
34. Falcioni R, Antonini A, Nistico P, et al. Alpha 6 beta 4 and alpha 6 beta 1 integrins associate with ErbB-2 in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res*. 1997; 236: 76 - 85. 40
35. Guo W, Pylayeva Y, Pepe A, et al. Beta 4 integrin amplifies ErbB2 signaling to promote mammary tumorigenesis. *Cell*. 2006; 126: 489 - 502.
36. Violette S, Sheppard D, Rosas, 10, Arjomandi, M, Rice, T, Gilman, M, Kaminski, N, Prasse, A, Maroni, B. Identification Of Biomarkers To Monitor The Activity Of STX-100, A Hum 50

- anized Anti - V 6 Antibody , In A Phase 2 a Trial In Idiopathic Pulmonary Fibrosis . A m J Respir Crit Care Med . 2012 ; 185 .
- 37 . Benz CC , Scott GK , Sarup JC , et al . Estrogen - dependent , tamoxifen resistant tumorigenic growth of MCF - 7 cells transfected with HER2 / neu . Breast Cancer Res Treat . 1992 ; 24 { 2 } : 85 - 95 .
- 38 . Meyer T , Marshall JF , Hart IR . Expression of alphav integrins and vitronectin receptor identity in breast cancer cells . B r J Cancer . 1998 ; 77 ( 4 ) : 530 - 6 .
- 39 . Santner SJ , Dawson PJ , Tait L , et al . Malignant MCF10CA1 cell lines derived from premalignant human breast epithelial MCF10AT cells . Breast Cancer Res Treat . 2001 ; 65 ( 2 ) : 101 - 10 .
- 40 . Nahta R , Esteva FJ . Herceptin : mechanism s of action and resistance . Cancer Lett . 2006 ; 232 ( 2 ) : 23 - 38 .
- 41 . Neve RM , Chin K , Fridlyand J , et al . A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes . Cancer Cell . 2006 ; 10 ( 6 ) : 515 - 27 .
- 42 . Subik K , Lee JF , Baxter L , et al . The Expression Patterns of ER , PR , HER2 , CK5 / 6 , EGF R , Ki - 67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines . Breast Cancer ( Auckl ) . 2010 ; 4 : 35 - 41 .

【 0376 】

参照による援用

特許、特許出願、論文、教科書などを含む、本明細書に引用する全ての参照文献、並びにそこに引用される参照文献は、既に引用されていない範囲まで、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

【 0377 】

均等物

上に記載した明細書は、当業者が実施形態を実施することができる上で十分であると見なされる。以上の記載及び実施例は、特定の実施形態を詳述し、本発明者らによって考慮される最良の形態を記載する。しかしながら、以上の記載がいかに詳細に文章で表され得るかにかわらず、これらの実施形態は、様々な方法で実施されることができ、従って、本発明は、添付の特許請求の範囲及びいずれかのそれらの均等物に従って解釈すべきであることが理解されるであろう。

【図 1】

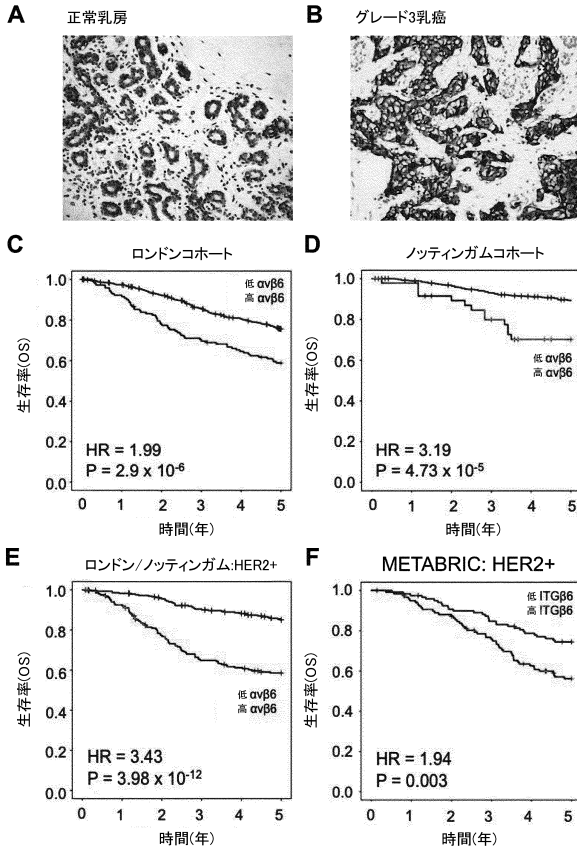
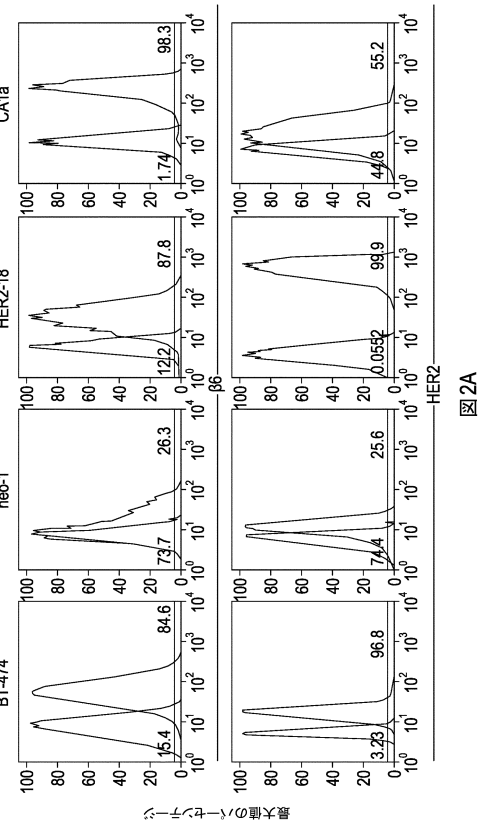
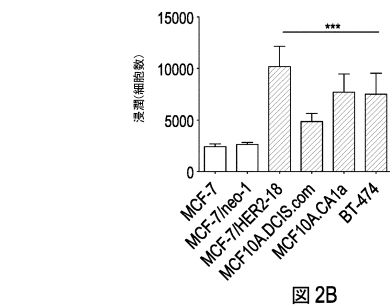


図 1

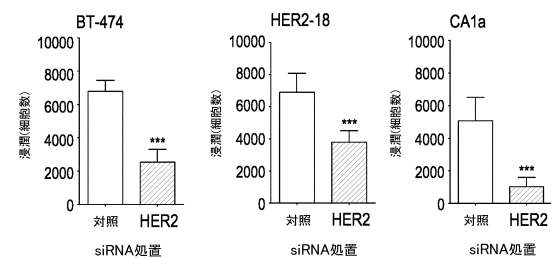
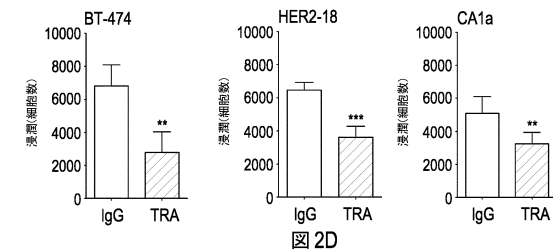
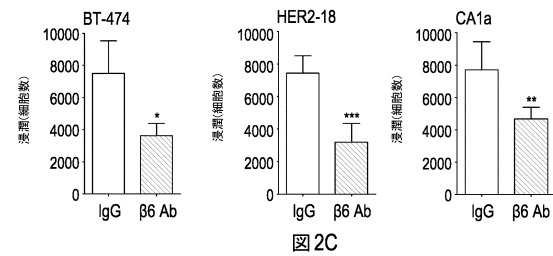
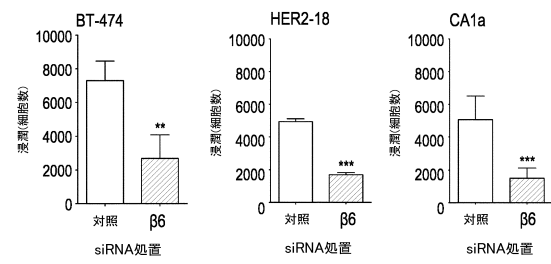
【図 2 A】



【図 2 B - D】



【図 2 E - F】



【図2G】

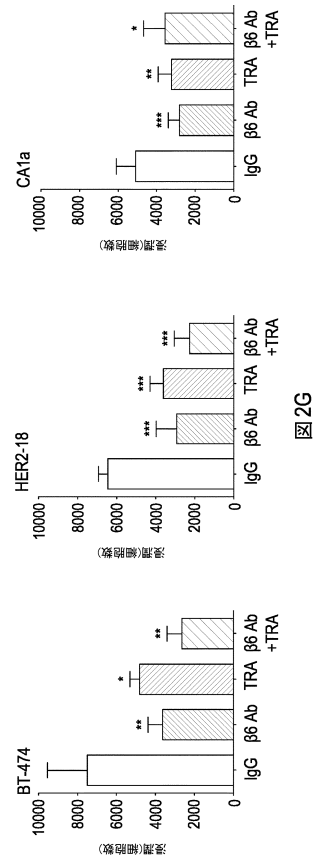


図2G

【図3A - B】

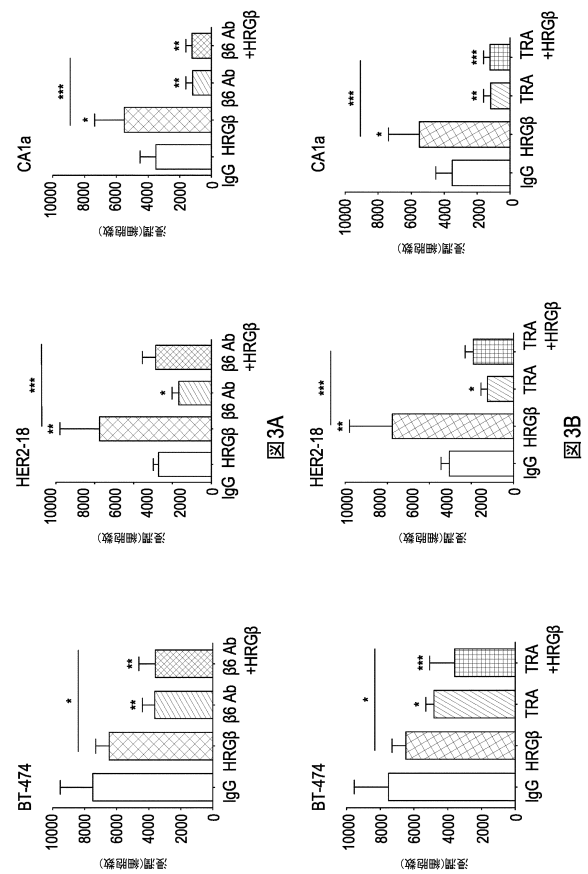


図3A

図3B

【図3C】

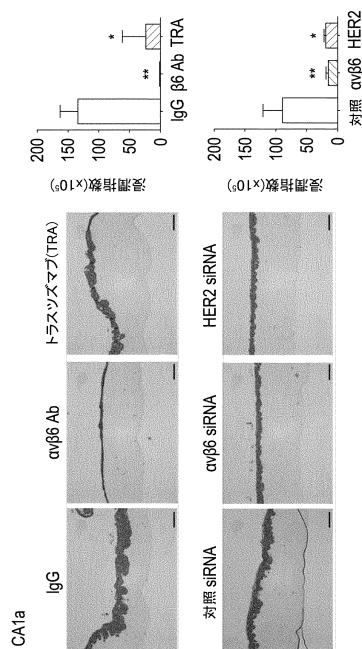


図3C

【図4A - C】

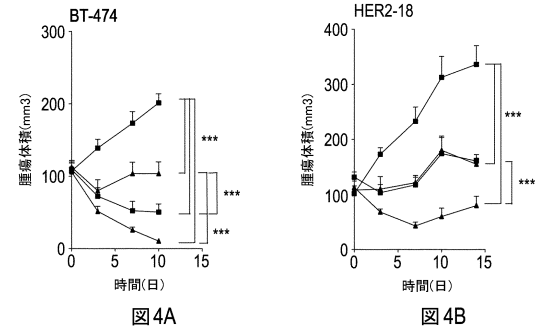


図4A

図4B

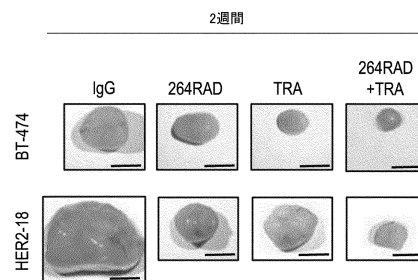


図4C



【 図 4 D 】

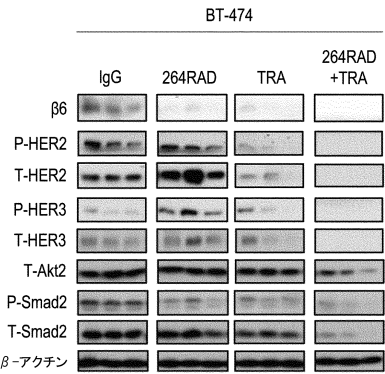


図 4D

【 図 4 E 】

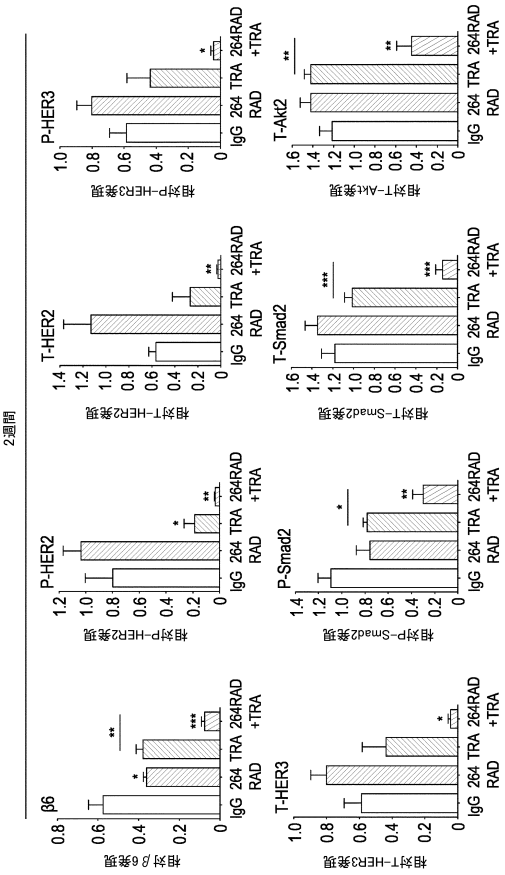


図 4E

【 図 4 F 】

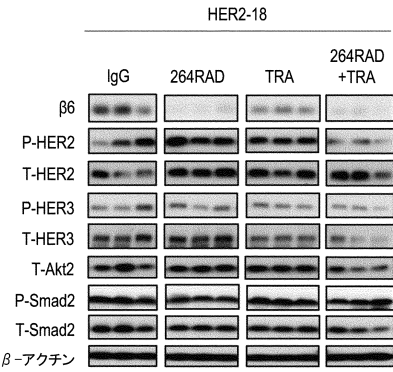


図 4F

【 図 4 G 】

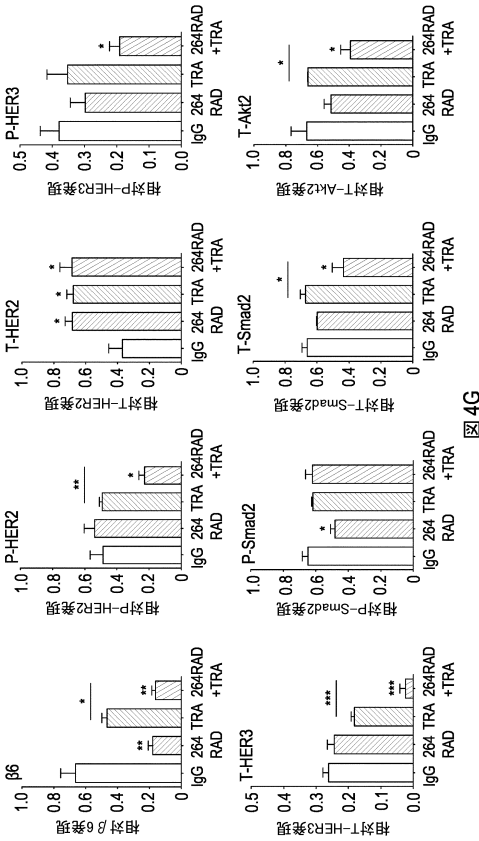


図 4G

【図 5 A - D】

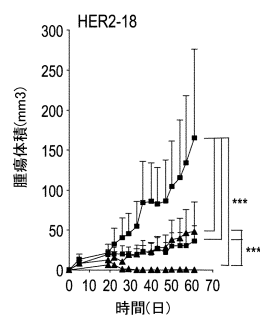


図 5A

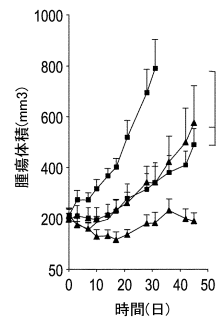


図 5B

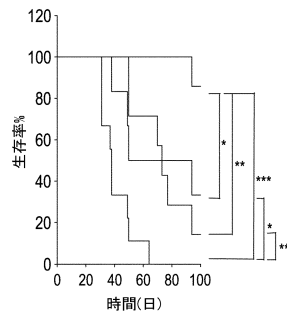


図 5C

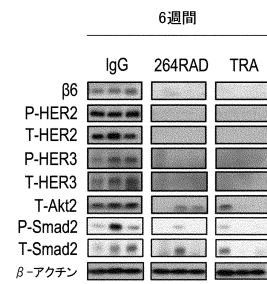


図 5D

【図 5 E】

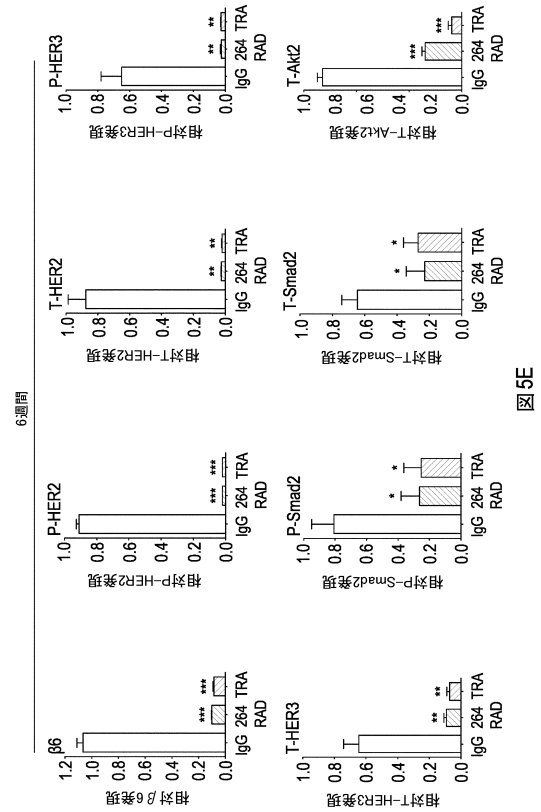


図 5E

【図 5 F】

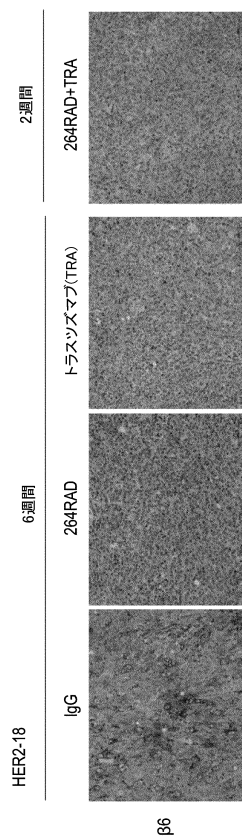


図 5F

【図 6 A - D】

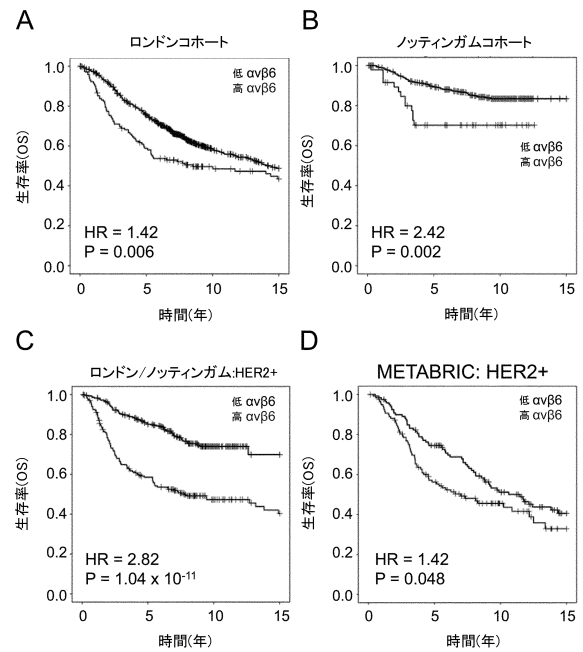


図 6

【図7A - C】

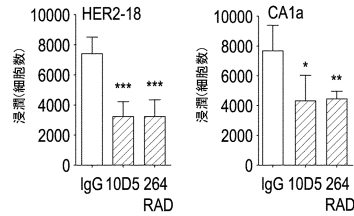


図7A

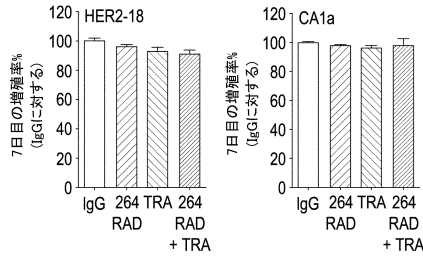


図7B

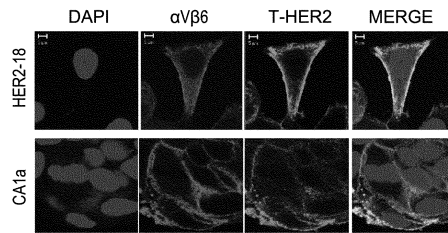


図7C

【図9】

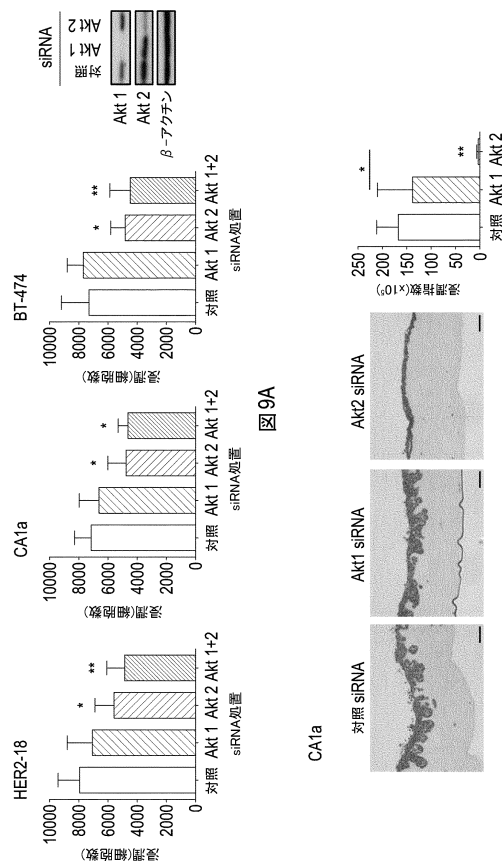


図9A

図9B

【図8】

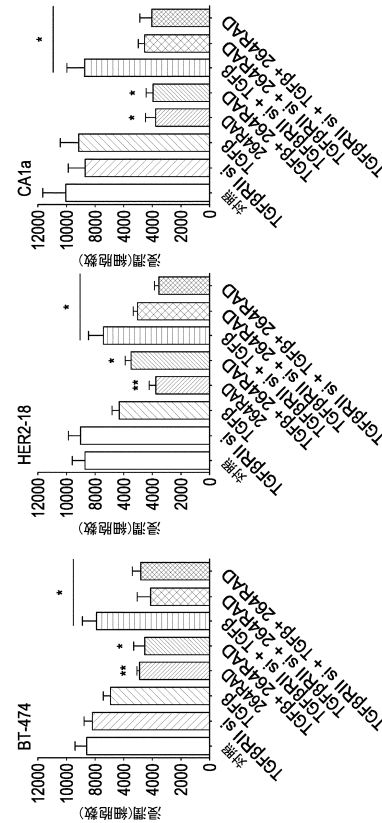


図8

【図10】

乳癌組織マイクロアレイのノッティンガム及びロンドンコホートの臨床病理学的特徴					
因子	カテゴリー	患者 (情報有り 総数の%)	乳癌 による 死(患者 の%)	患者 (情報有り 総数の%)	乳癌 による 死(患者 の%)
		ノッティンガムコホート		ロンドンコホート	
年齢(年)	≤40	157 (9)	54 (34)	110 (10)	58 (53)
	41-50	501 (28)	133 (27)	248 (22)	92 (37)
	51-60	591 (33)	154 (26)	304 (27)	144 (47)
	61-70	528 (29)	139 (26)	278 (24)	135 (49)
	70+	14 (1)	4 (29)	190 (17)	88 (46)
	不明	4	0	0	0
腫瘍 サイズ (mm)	≤10	218 (12)	26 (11)	108 (10)	20 (9)
	11-20	905 (51)	220 (24)	213 (19)	74 (35)
	21-30	483 (27)	164 (34)	235 (22)	85 (36)
	31-50	146 (8)	69 (47)	360 (33)	193 (54)
	>50	30 (2)	0 (0)	177 (16)	125 (71)
	不明	13	2	37	20
リンパ節 状態	陰性	987 (63)	175 (18)	440 (52)	117 (27)
	陽性	581 (37)	215 (37)	403 (48)	189 (47)
	不明	227	94	287	211
グレード	1	330 (19)	32 (10)	151 (14)	30 (20)
	2	595 (33)	125 (21)	484 (45)	220 (45)
	3	857 (48)	325 (38)	451 (41)	234 (52)
	不明	13	2	44	33
ER 状態	陰性	481 (29)	165 (34)	307 (32)	164 (53)
	陽性	1167 (71)	285 (24)	661 (68)	301 (46)
	不明	147	34	162	52
PR 状態	陰性	735 (45)	246 (33)	484 (50)	265 (55)
	陽性	896 (55)	201 (22)	484 (50)	197 (41)
	不明	164	484	162	55
αvβ6 状態	陰性/中度	1034 (83)	277 (27)	817 (85)	393 (48)
	強度	207 (17)	74 (36)	142 (15)	79 (56)
	不明	554	133	238	77
トリプル ネガティブ	無	1256 (79)	321 (26)	719 (80)	342 (48)
	有	331 (21)	113 (34)	175 (20)	99 (57)
	不明	208	50	303	108

図10

【図 1 1】

因子	カテゴリー	avβ6 -ve/中度(%)	avβ6 強度 (%)	有意性
ノッティンガム系列				
腫瘍 サイズ(mm)	≤20	642 (63)	116 (57)	p=0.1
	>20	384 (37)	89 (43)	
リンパ節 状態	陰性	549 (62)	103 (58)	p=0.4
	陽性	341 (38)	74 (42)	
グレード	1	185 (18)	33 (16)	p=0.006
	2	361 (35)	52 (25)	
	3	480 (47)	120 (59)	
ER状態	陰性	241 (25)	87 (46)	p<0.001
	陽性	713 (75)	102 (54)	
PR状態	陰性	397 (42)	113 (60)	p<0.001
	陽性	553 (58)	76 (40)	
HER2 状態	陰性	931 (92)	160 (78)	p<0.001
	陽性	81 (8)	46 (22)	
トリプル ネガティブ/基底	陰性	750 (81)	138 (75)	p=0.05
	陽性	176 (19)	47 (25)	
ロンドン系列				
腫瘍 サイズ(mm)	≤20	226 (29)	28 (21)	p=0.06
	>20	567 (71)	107 (79)	
リンパ節 状態	陰性	312 (52)	51 (52)	p=0.9
	陽性	290 (48)	47 (48)	
グレード	1	95 (12)	3 (2)	p<0.001
	2	407 (51)	57 (41)	
	3	289 (37)	80 (57)	
ER状態	陰性	196 (26)	80 (63)	p<0.001
	陽性	545 (74)	48 (37)	
PR状態	陰性	330 (45)	106 (83)	p<0.001
	陽性	406 (55)	21 (17)	
HER2 状態	陰性	671 (92)	81 (63)	p<0.001
	陽性	55 (8)	48 (37)	
トリプル ネガティブ/基底	陰性	581 (83)	86 (68)	p<0.001
	陽性	121 (17)	40 (32)	

図 11

【図 1 2】

分子 サブタイプ	細胞株	受容体状態	浸潤 傾向 <sup>1</sup>	発現 <sup>2</sup> $\alpha v\beta 6$	HER2
正常細胞	MCF10A		-	++++	-
基底乳癌	BT-20	TN	++	++++	-
	HCC1937	TN	ND	++++	-
	HCC1954	ER-, PR-, HER2+	+++	++++	++++
	MDA MB-468	TN	++++	++++	-
過剰浸潤	HCC38	TN	++	++++	-
	HS578T	TN	++	-	-
	MCF10AT1k.c12	ER+	ND	++++	-
	MCF10A.neo.T	ER+,	+	++++	-
	MCF10A.CA1a	ER+	++++	++++	+++
	MCF10A.CA1h	ER+,	ND	++++	-
	MCF10A.DCIS.com	ER+	++++	++++	+++
	SUM159	ER-, PR-	+++	++++	-
	GI-101	ER+	++++	++++	-
管乳癌	BT-474	ER+, PR+, HER2+	+++	++++	++++
	MCF-7	ER+, PR+	-	-	+
	MCF-7/neo-1	ER+, PR+	-	-	+
	MCF-7/HER2-18	ER+, PR+, HER2+	++++	++++	++++
	SKBR-3	ER-, PR-	ND	++++	++++
	ZR-75	ER+, PR+	ND	-	++

図 12

【図 1 3】

標的	抗体名/カタログ番号	供給者
$\alpha v\beta 6$	抗インテグリン $\alpha v\beta 6$ 抗体, クローン10D5(#MAB20772)	Millipore
$\alpha v\beta 6$	264RAD	Oncology iMED, AstraZeneca
$\alpha v\beta 6$	6.2G2	Stromedix Inc
$\alpha v\beta 6$	Integrin Beta 6 (C-19)	Santa Cruz
全Akt(pan. 1, 2, 3)&ホスホ- Akt	Akt (pan) (C67E7) (#4691) Akt1 (C73H10) (#2938) Akt 2 (D6G4) (#3063) Akt 3 (62A8) (#3788) Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP (#4060) & Phospho- Akt (Thr308) (#9275)	Cell Signaling Technology (CST)
$\beta$ -アクチン	$\beta$ -Actin (13E5) (#4970)	CST
全& ホスホ-HER2	HER2/ErbB2 (29D8) (#2165) Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1221/1222) (6B12) (#2243)	CST
全& ホスホ-HER3	HER3/ErbB3 (1B2E) (#4754) Phospho-HER3/ErbB3 (Tyr1289) (21D3) (#4791)	CST
全& ホスホ-Smad2	Smad2 (D43B4) (#5339), Phospho-Smad2 (Ser465/467) (#3101)	CST

図 13

【図 1 4】

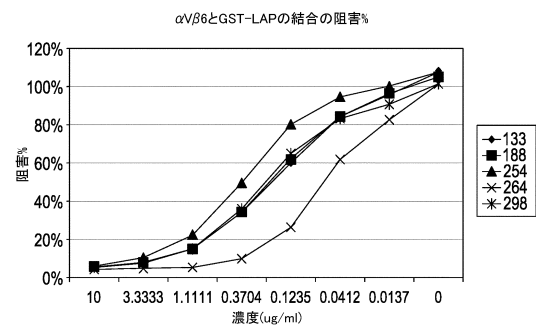


図 14

【図 15 A - B】

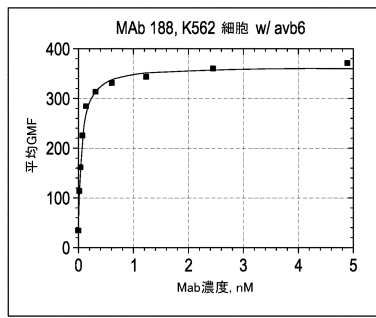


図 15A

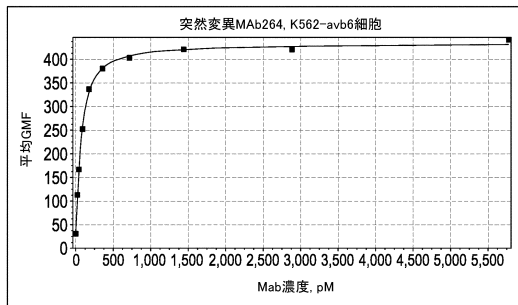


図 15B

【図 16 A - B】

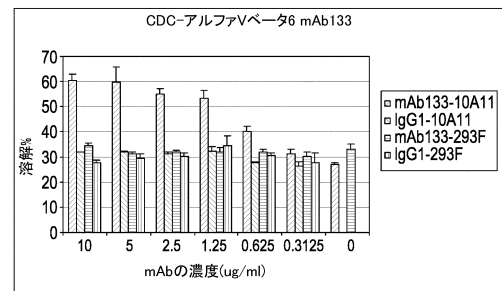


図 16A

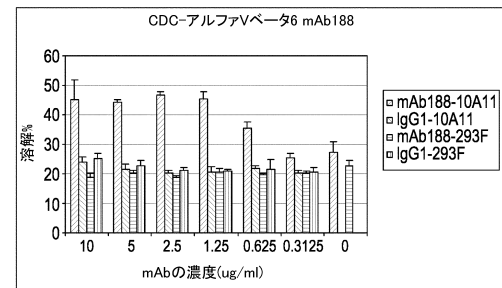


図 16B

【図 16 C - E】

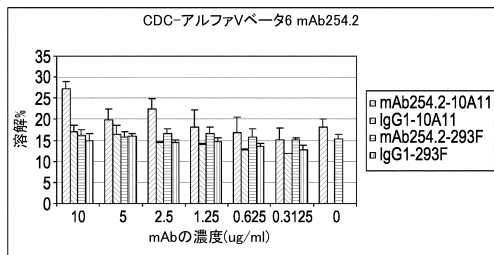


図 16C

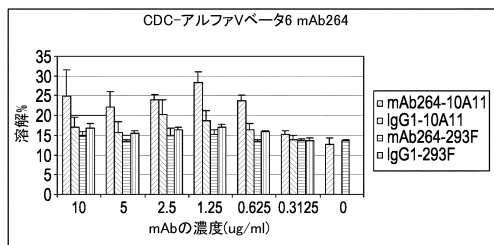


図 16D

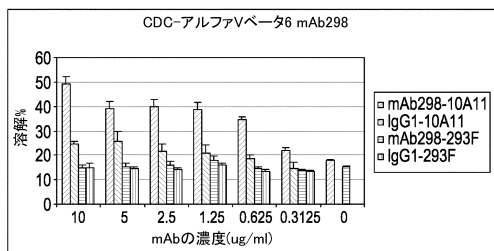


図 16E

【図 17】

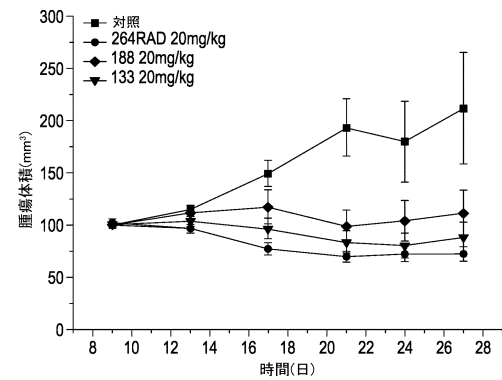


図 17

【図 18】

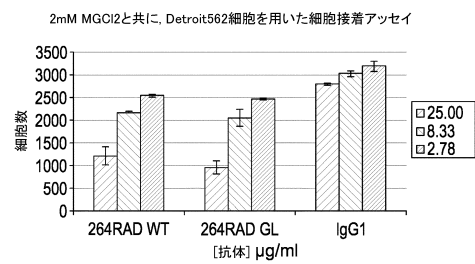


図 18

【配列表】

0006527508000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 マーシャル, ジョン エフ  
イギリス国 イーシー１エム ６ピーキュー グレーター ロンドン ロンドン, チャーターハウ  
ス スクウェア, クイーン メアリー ユニバーシティ オブ ロンドン, パーツ キャンサー  
インスティテュート
- (72)発明者 ムーア, ケイト エム  
イギリス国 イーシー１エム ６ピーキュー グレーター ロンドン ロンドン, チャーターハウ  
ス スクウェア, クイーン メアリー ユニバーシティ オブ ロンドン, パーツ キャンサー  
インスティテュート

審査官 高橋 樹理

- (56)参考文献 特表２００９－５４５３２７（ＪＰ，Ａ）  
Cancer research, 2011年, Vol.71, Issue 24 Supplement, Abstract nr P2-01-05  
Oncogene, 2013年, Vol.32, p.4406-4416  
The Oncologist, 2009年, Vol.14, p.760-768

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K 39/395  
A61P 35/00  
A61P 43/00  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)