

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-223685

(P2017-223685A)

(43) 公開日 平成29年12月21日(2017.12.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z N A K 2 G O 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-139448 (P2017-139448)	(71) 出願人	509012625
(22) 出願日	平成29年7月18日 (2017.7.18)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2011-509793 (P2011-509793) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
原出願日	平成21年5月18日 (2009.5.18)	(74) 代理人	110002077
(31) 優先権主張番号	61/054, 115		園田・小林特許業務法人
(32) 優先日	平成20年5月16日 (2008.5.16)	(72) 発明者	ゲルツライヒター, トーマス, リチャード
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 05, ブリスベン, トリニティ ロード 100
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ベータ7インテグリンアンタゴニストを用いた消化管炎症性障害の治療評価のためのバイオマーカーの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストのような治療剤の効果、効能、安全性及び／又は投与量の評価方法。

【解決手段】 消化管炎症性障害の治療のためのベータ7インテグリンアンタゴニストのような治療剤の効果、効能、安全性、予後、及び／又は投与量の指標（又はバイオマーカー）として、末梢血中の腸ホーミングリンパ球のレベル、腸ホーミングリンパ球における医薬の占有率のレベル、及び／又は腸ホーミングリンパ球におけるベータ7インテグリンレセプターのレベルを使用する評価方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの効能を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管障害の治療のためのアンタゴニストの効能を示し、バイオマーカーが、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上のインテグリンベータ7アンタゴニスト占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターからなる群から選択される方法。

10

【請求項 2】

消化管炎症性障害を有する患者のインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する応答性を予測する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が前記アンタゴニストを用いた治療への前記患者の応答性を示し、バイオマーカーが、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上のインテグリンベータ7アンタゴニスト占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターからなる群から選択される方法。

20

【請求項 3】

患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与量を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画を用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することに基づいて、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与量を調節することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画に対する効能又は応答性を示し、バイオマーカーが、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上のインテグリンベータ7アンタゴニスト占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターからなる群から選択される方法。

30

【請求項 4】

患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与計画を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画を用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することに基づいて、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与計画を調節することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画に対する効能又は応答性を示し、バイオマーカーが、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上のインテグリンベータ7アンタゴニスト占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターからなる群から選択される方法。

40

【請求項 5】

バイオマーカーの量の前記変化が増加又は減少である、請求項 1 又は 2 の方法。

【請求項 6】

前記変化が前記バイオマーカーの量における増加である、請求項 2 の方法。

【請求項 7】

前記バイオマーカーの量を、医薬の第一の投与の100日以内に測定する、請求項 5 の方法。

【請求項 8】

前記バイオマーカーの量を医薬の投与の少なくとも約24時間後に測定する、請求項 5

50

の方法。

【請求項 9】

前記消化管炎症性障害が炎症性腸疾患である、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記炎症性腸疾患がクローン病（C D）又は潰瘍性大腸炎（U C）である、請求項 9 の方法。

【請求項 11】

前記患者がヒトである、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

前記インテグリンベータ 7 アンタゴニストが抗ベータ 7 抗体である、請求項 9 の方法。

【請求項 13】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 12 の方法。

【請求項 14】

前記抗体がキメラ、ヒト又はヒト化抗体である、請求項 13 の方法。

【請求項 15】

前記抗体が抗体断片である、請求項 12 の方法。

【請求項 16】

抗体が H V R - L 1、H V R - L 2、H V R - L 3、H V R - H 1、H V R - H 2、及び H V R - H 3 からなる群から選択される 6 個の高頻度領域（H V R）を含み、ここで：

（i）H V R - L 1 はアミノ酸配列 A 1 - A 11 を含み、ここで、A 1 - A 11 は R A S E S V D T Y L H（配列番号：1）；R A S E S V D S L L H（配列番号：7）、R A S E S V D T L L H（配列番号：8）、又は R A S E S V D D L L H（配列番号：9）又は配列番号：1、7、8 又は 9 の変異体であり、ここで、アミノ酸 A 2 は A、G、S、T、及び V からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 3 は S、G、I、K、N、P、Q、R、及び T からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 4 は E、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、及び R からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 5 は S、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、及び V からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 6 は V、R、I、A、G、K、L、M、及び Q からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 7 は D、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S 及び T からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 8 は D、G、N、E、T、P 及び S からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 9 は L、Y、I 及び M からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 10 は L、A、I、M、及び V からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 A 11 は H、Y、F、及び S からなる群から選択され；

（i i）H V R - L 2 はアミノ酸配列 B 1 - B 8 を含み、ここで、B 1 - B 8 は K Y A S Q S I S（配列番号：2）；R Y A S Q S I S（配列番号：67、又は X a a Y A S Q S I S（配列番号：68、ここで X a a は任意のアミノ酸を示す）、及び／又はアミノ酸 B 4 が S 及び D からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 B 5 は Q 及び S からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 B 6 は S、D、L、及び R からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 B 7 は I、V、E 及び K からなる群から選択され；

（i i i）H V R - L 3 はアミノ酸配列 C 1 - C 9 を含み、ここで、C 1 - C 9 は Q Q G N S L P N T（配列番号：3）又は配列番号：3 の変異体であり、ここで、アミノ酸 C 8 が N、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M、及び Y からなる群から選択され；

（i v）H V R - H 1 はアミノ酸配列 D 1 - D 10 を含み、ここで D 1 - D 10 は G F F I T N N Y W G（配列番号：4）であり；

（v）H V R - H 2 はアミノ酸配列 E 1 - E 17 を含み、ここで、E 1 - E 17 は G Y I S Y S G S T S Y N P S L K S（配列番号：5）であるか、又は配列番号：5 の変異体であり、ここで、アミノ酸 E 2 は Y、F、V 及び D からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 E 6 は S 及び G からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 E 10 は S 及び Y

10

20

30

40

50

からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 E 1 2 は N、T、A、及び D からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 E 1 3 は P、H、D、及び A からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 E 1 5 は L 及び V からなる群から選択され、及び／又はアミノ酸 E 1 7 は S 及び G からなる群から選択され；

(v i) HVR-H 3 はアミノ酸配列 F 2-F 1 1 を含み、ここで、F 2-F 1 1 は M T G S S G Y F D F (配列番号：6) 又は R T G S S G Y F D F (配列番号：6 6) であるか；又はアミノ酸配列 F 1-F 1 1 を含み、ここで、F 1-F 1 1 は A M T G S S G Y F D F (配列番号：6 3)、A R T G S S G Y F D F (配列番号：6 4)、又は A Q T G S S G Y F D F (配列番号：6 5)、又は配列番号：6、6 3、6 4、6 5、又は 6 6 の変異体であり、ここでアミノ酸 F 2 が R、M、A、E、G、Q、S であり、及び／又はア

10

【請求項 1 7】

前記抗体が 3 個の重鎖高頻度領域 (HVR-H 1-H 3) 配列と 3 個の軽鎖高頻度領域 (HVR-L 1-L 3) 配列を含み、ここで、

(i) HVR-L 1 が配列番号：7、配列番号：8 又は配列番号：9 を含み；

(i i) HVR-L 2 が配列番号：2 を含み；

(i i i) HVR-L 3 が配列番号：3 を含み；

(i v) HVR-H 1 が配列番号：4 を含み；

(v) HVR-H 2 が配列番号：5 を含み；及び

(v i) HVR-H 1 が配列番号：6 又は配列番号：6 3 又は配列番号：6 4 又は配列番号：6 6 を含む、請求項 1 6 の方法。

20

【請求項 1 8】

前記サンプルが前記患者の末梢血サンプルである、請求項 1、2 又は 3 の方法。

【請求項 1 9】

健康な個体と比較した場合、患者の減少した割合が、疾患の予後を示す、前記患者の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量と末梢ホーミングリンパ球の量の割合と健康な個体の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量と末梢ホーミングリンパ球の量の割合を比較することを含む患者の炎症性腸疾患の予後を予測する方法。

【請求項 2 0】

バイオマーカーが患者の末梢血の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球における治療剤の占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ 7 インテグリンレセプターからなる群から選択される、候補医薬を用いた治療に応答して非ヒト検体の末梢血におけるバイオマーカーの量が効果的に増加する投与量に基づく患者の有効な投与量の決定を含む、消化管炎症性障害と診断された患者の候補医薬を用いた治療の設計方法。

30

【請求項 2 1】

非ヒト検体がサルである、請求項 2 0 の方法。

【請求項 2 2】

前記医薬が抗ベータ 7 インテグリン抗体である、請求項 2 0 の何れかーに記載の方法。

【請求項 2 3】

前記リンパ球を、配列番号：2 5 の軽鎖可変領域配列と配列番号：2 6 の重鎖可変配列を含む抗体と同じエピトープに結合する、単離抗体に結合させることを含む、アルファ E ベータ 7 インテグリンを発現するリンパ球及びアルファ 4 ベータ 7 インテグリンを発現するリンパ球及びアルファ E ベータ 7 及びアルファ 4 ベータ 7 の両者を発現するリンパ球を含むリンパ球の個体群の同定方法。

40

【請求項 2 4】

前記リンパ球を炎症性腸疾患と診断された患者の末梢血から得る、請求項 2 3 の方法。

【請求項 2 5】

前記リンパ球を炎症性腸疾患と診断された患者のリンパ節及び腸の組織から得る、請求項 2 3 の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストのような、治療剤（又は医薬）の効果、効能、安全性、及び／又は投与量の評価方法に関する。特に、本発明は、消化管炎症性障害の治療のためのベータ7インテグリンアンタゴニストのような治療薬の効果、効能、安全性、及び／又は投与量の指標（「バイオマーカー」）として、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球のレベル、腸ホーミングリンパ球における医薬の占有率のレベル、及び／又は腸ホーミングリンパ球におけるベータ7インテグリンレセプターのレベルの使用方法に関する。このような方法は、例えば、一又は複数のこれらのバイオマーカーを用いた、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた消化管炎症性障害の治療に対する患者の応答性の評価を含む。さらに、本発明は、医薬治療及び／又は投与計画、又は予後の設計のためのこのようなバイオマーカーの使用方法を提供する。

10

【背景技術】

【0002】

外部物質に対し体を保護するために、免疫系の細胞は末梢血を介して体内を循環し、リンパ節及び抗原が濃縮されている組織に移行する。概して、2つの異なるホーミング系、末梢ホーミングと粘膜ホーミングがあり、浸透性又は粘膜性の抗原に免疫を与える。消化管部位で最初に活性化される細胞は好ましくは粘膜組織と節に移行し得る。これに対して、末梢リンパ節において活性化された細胞は好ましくは末梢部位に移行する。(Butcher等, Adv Immunol (1999)) 循環している細胞は腸のリンパ節及び組織に高内皮細静脈 (HEV) を越えて浸出することによって入る。これはリンパ球の表面上の接着分子とHEV上のレセプター (アドレシン) の間の相互作用を介して起きる。(Butcher等, Adv Immunol (1999))

20

【0003】

インテグリンは細胞接着から遺伝子調節までの多くの細胞プロセスに関与する α/β ヘテロ二量体細胞表面レセプターである (Hynes, R.O., Cell 1992, 69, 11-25; Hemler, M.E., Annu. Rev. Immunol., 1990, 8, 365-368)。免疫系において、インテグリンは炎症プロセス中における白血球の輸送、接着及び浸潤に関連している (Nakajima, H等, J. Exp. Med. 1994, 179, 1145-1154)。インテグリンの差次的発現により、細胞の接着特性が調節され、異なるインテグリンが異なる炎症反応に関与する (Butcher, E.C.等, Science 1996, 272, 60-66)。ベータ7含有インテグリン（つまり、アルファ4ベータ7及びアルファEベータ7）は、主として単球、リンパ球、好酸球、好塩基球及びマクロファージで発現するが、好中球では発現しない (Elices, M.J.等, Cell 1990, 60, 577-584)。アルファ4Eベータ7インテグリンの主要なリガンドは、内皮表面タンパク質粘膜アドレシン細胞接着分子 (MAdCAM-1) 及び血管細胞接着分子 (VCAM-1) である (Makarewicz, R.等, J. Biol. Chem. 1994, 269, 4005-4011)。高内皮小静脈 (HEVs) の炎症部位に発現しているMAdCAM-1及び／又はVCAM-1にアルファ4ベータ7が結合すると、白血球が内皮に強固に付着することが報告されており；この強固な結合過程の後に、細胞が炎症組織内に溢出する (Chuluyan, H.E.等, Springer Semin. Immunopathology 1995, 16, 391-404)。(上皮内リンパ球 (IEL) で発現する) アルファEベータ7インテグリンの主要なリガンドは、Eカドヘリンであり、アルファEベータ7含有細胞の上皮細胞への結合を容易にすることが報告されている。Eカドヘリンは腸へのホーミングにおいて機能しないことが報告されている一方、EカドヘリンとアルファEベータ7の相互作用はリンパ球を腸上皮に結合させる役割を果たす。

30

40

【0004】

IBDは大腸の炎症、自己免疫症状、及び幾つかの場合、小腸のグループである。IBDの主要な形態はクローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) である。自己免疫疾患として、IBDは腸の肥厚と細胞破壊につながる、消化管へのリンパ球への浸潤の増加によって特徴付けられる。リンパ球のホーミングを阻害することによってこの浸潤を阻害するこ

50

とで疾患に関連する炎症と細胞破壊を下方調整することができる。循環粘膜ホーミングリンパ球は腸管炎症の患者中で変化することが報告されている。(Meenan等Gut 1997; 40:241-246) アルファ4ベータ7、MAdCAM-1、又はVCAM-1に対するモノクローナル抗体は結腸炎のような(Viney等, J. Immunol., 1996, 157: 2488-2497) 腸管炎症性疾患及び炎症性腸疾患 (IBD; Podalski, D. K., N. Eng. J. Med., 1991, 325:928-937; Powrie, F. 等, Ther. Immunol., 1995, 2:115-123) の動物モデルにおいて有効なモジュレーターであることが報告されている。

【0005】

アルファEベータ7に対するモノクローナル抗体の投与は、IL-2^{-/-}マウス中の免疫誘導大腸炎を阻害し、改善することが報告されており、アルファEベータ7 (Ludviksson等, J Immunol. 1999, 162(8):4975-82) を発現する粘膜固有層のCD4⁺リンパ球の大腸局在に依存する炎症性腸疾患の開始と維持を示唆する。抗 α 4抗体(ナタリズマブ)は、CD (Sandborn等, N Engl J Med 2005;353:1912-25) の患者の治療に有効であることが報告されており、抗 α 4 β 7 (MLN-02) はUCの患者に有効であることが報告されている(Feagan等, N Engl J Med 2005;352:2499-507)。これらの見解は治療標的として α 4 β 7を確認し、 α 4 β 7とMAdCAM-1の相互作用がIBDの発症を媒介することを支持する。このように、ベータ7インテグリンのアンタゴニストは、IBDの治療における治療薬として非常に可能性がある。

【0006】

所望の効果、安全性、及び/又は効能を有する治療を設計するために、ベータ7インテグリンアンタゴニストのような、治療薬を用いた治療への患者の応答性と予後を評価することは重要である。したがって、治療薬を用いた治療に対する患者の応答性を正確に予測し、及び/又は追跡し得るバイオマーカーの開発は望ましい。このような予測は、臨床試験と疾患治療における患者の有効な治療法の設計に不可欠である。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、消化管炎症性障害の患者の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストのような、治療剤(又は医薬)の効果、効能、安全性、及び/又は投与量の評価方法に関する。特に、本発明は、消化管炎症性障害の治療のためのベータ7インテグリンアンタゴニストのような治療薬の効果、効能、安全性、及び/又は投与量の指標(又はバイオマーカー)として、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球のレベル、腸ホーミングリンパ球における医薬の占有率のレベル、及び/又は腸ホーミングリンパ球におけるベータ7インテグリンレセプターのレベルの使用方法に関する。このような方法は、例えば、一又は複数のこれらのバイオマーカーを用いた、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた消化管炎症性障害の治療に対する患者の応答性の評価を含む。さらに、本発明は、医薬治療及び/又は投与計画、又は予後の設計のためのこのようなバイオマーカーの使用方法を提供する。

【0008】

幾つかの態様では、治療薬を用いた患者の治療前のバイオマーカーのレベルを、患者の治療の間及び/又は後の同じバイオマーカーのレベルと比較し、患者のこのバイオマーカーのレベルの変化(例えば、増加又は減少)が、患者の消化管炎症性障害の治療のための、例えば、ベータ7インテグリンアンタゴニストのような、治療剤の効果、効能、安全性、及び/又は予後を示す。さらに、このような本発明の方法は、患者の消化管炎症性障害の治療のための医薬治療又は投与計画を設計するために使用し得る。

【0009】

一態様では、本発明は、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの効能を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管炎症性障害の治療のた

めのアンタゴニストの効能を示す方法に関する。

【0010】

別の態様では、本発明は、消化管炎症性障害を有する患者のインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する応答性を予測する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカの量の変化が前記アンタゴニストを用いた治療への前記患者の応答性を示す方法に関する。

【0011】

更に別の態様では、本発明は、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与量を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画を用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカの量と比較することに基づいて、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与量を調節することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカの量の変化が、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画に対する効能又は応答性を示す方法に関する。

【0012】

別の態様では、本発明は、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与計画を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画を用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカの量と比較することに基づいて、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与計画を調節することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカの量の変化が、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画に対する効能又は応答性を示す方法に関する。

【0013】

一実施態様では、バイオマーカの量の変化は増加である。

別の実施態様では、バイオマーカの量の変化は減少である。

更に別の実施態様では、サンプルは患者の末梢血サンプルである。

一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストを受容した後に前記患者の血液サンプル中のバイオマーカの量は、第一のインテグリンベータ7アンタゴニストの投与の100日以内に測定される。

別の実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストを受容した後に前記患者の血液サンプル中のバイオマーカの量は、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与の約50日以内に測定される。

更に別の実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストを受容した後に前記患者の血液サンプル中のバイオマーカの量は、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与の約24時間以内に測定される。

【0014】

一実施態様では、消化管炎症性障害は、炎症性腸疾患である。

更なる実施態様では、炎症性腸疾患は、クローン病(CD)「又は」潰瘍性大腸炎(UC)である。

【0015】

別の実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストは、抗ベータ7インテグリン抗体である。

別の実施態様では、前記患者はヒトである。

一実施態様では、前記変化した量は、前記バイオマーカの量の、少なくとも約30%、約50%、約1倍、又は約3倍の増加である。

一実施態様では、抗ベータ7インテグリン抗体は、約1mg/kgから100mg/kg

10

20

30

40

50

g の量で投与される。

更なる実施態様では、前記量は、5 mg / kg から 50 mg / kg である。

一実施態様では、治療は更に一又は複数の更なる医薬の有効量の投与を更に含む。

更なる実施態様では、更なる医薬は、免疫抑制剤、疼痛制御剤、止瀉剤、抗生物質、又は一又は複数の前記薬剤の組み合わせである。

より更なる実施態様では、前記免疫抑制剤は、スルファサラジン、5-アミノサリチル酸 (5-ASA)、メトロダゾール、シプロフロキサシン、アザチオプリン又は6-メルカプトプリンである。

別の実施態様では、前記更なる医薬は、別の抗ベータ7インテグリン抗体である。

一実施態様では、抗ベータ7インテグリン抗体は前記患者に非経口投与する。

更なる実施態様では、抗ベータ7インテグリン抗体は、前記患者に静脈内及び／又は皮下投与する。

一実施態様では、前記抗ベータ7インテグリン抗体は、少なくとも毎1、2、3、4、5、6、8、又は12週毎に1回の頻度で投与する。

更なる実施態様では、前記ベータ7インテグリン抗体は週毎に投与する。

別の実施態様では、前記抗ベータ7抗体は、少なくとも1、2、4、6、8、12、24、36、又は52週間投与する。

【0016】

一実施態様では、抗体はモノクローナルである。

別の実施態様では、前記抗体は、キメラ、ヒト又はヒト化抗体である。

別の実施態様では、前記抗体は抗体断片である。

一実施態様では、前記抗体はヒトベータ7インテグリンサブユニットと二次インテグリンサブユニット及び／又はインテグリンリガンドの相互作用を阻害する。

一実施態様では、二次インテグリンサブユニットは、アルファ4インテグリンサブユニットであり、ここで、リガンドはMAdCAM、VCAM又はフィブロネクチンである。

一実施態様では、アルファ4インテグリンサブユニットはヒト由来である。

一実施態様では、二次インテグリンサブユニットは、アルファEインテグリンサブユニットであり、ここでリガンドはECADヘリンである。

一実施態様では、リガンドはヒト由来である。

一実施態様では、アルファEインテグリンサブユニットはヒト由来である。

【0017】

別の実施態様では、抗ベータ7インテグリン抗体は3個の重鎖高頻度領域 (HVR-H1-H3) 配列及び3個の軽鎖高頻度領域 (HVR-L1-L3) 配列を含み、ここで1、2、3、4、5又は6個の高頻度領域 (HVR) は

(i) A1-A11がRASESVDTYLH (配列番号: 1) である、配列A1-A11を含むHVR-L1;

(ii) B1-B8がKYASQSI (配列番号: 2) である、配列B1-B8を含むHVR-L2;

(iii) C1-C9がQQGNSLLPNT (配列番号: 3) である配列C1-C9を含むHVR-L3;

(iv) D1-D10がGFFITNNYW (配列番号: 4) である配列D1-D10を含むHVR-H1;

(v) E1-E17がGYISYSGSTSYNP SLKS (配列番号: 5) である配列E1-E17を含むHVR-H2; 及び

(vi) F1-F11がMTGSSGYFDF (配列番号: 6) である配列F1-F11であるHVR-H3

からなる群から選択される。

更に別の実施態様では、抗体がHVR-L1、HVR-L2、HVR-L3、HVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3からなる群から選択される6個の高頻度領域 (HVR) を含み、ここで:

10

20

30

40

50

(i) HVR-L1はアミノ酸配列A1-A11を含み、ここで、A1-A11はRASESVDTYLH(配列番号:1); RASESVDSLHLH(配列番号:7)、RASESVDTLLH(配列番号:8)、又はRASESVDDLHLH(配列番号:9)又は配列番号:1、7、8又は9の変異体であり、ここで、アミノ酸A2はA、G、S、T、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A3はS、G、I、K、N、P、Q、R、及びTからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A4はE、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、及びRからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A5はS、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A6はV、R、I、A、G、K、L、M、及びQからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A7はD、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S及びTからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A8はD、G、N、E、T、P及びSからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A9はL、Y、I及びMからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A10はL、A、I、M、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A11はH、Y、F、及びSからなる群から選択され;

(ii) HVR-L2はアミノ酸配列B1-B8を含み、ここで、B1-B8はKYSQSIS(配列番号:2); RYASQSIS(配列番号:20、又はXaaYASQSIS(配列番号:21、ここでXaaは任意のアミノ酸を示す)、又は配列番号:2、20又は21の変異体であり、アミノ酸B1がK、R、N、V、A、R、Q、H、P、I、L、Y及びXaa(ここでXaaは任意のアミノ酸を示す)、及び/又はアミノ酸B4がS及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B5はQ及びSからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B6はS、D、L、及びRからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B7はI、V、E及びKからなる群から選択され;

(iii) HVR-L3はアミノ酸配列C1-C9を含み、ここで、C1-C9はQQGNSLPNT(配列番号:3)又は配列番号:3の変異体であり、ここで、アミノ酸C8がN、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、M、及びYからなる群から選択され;

(iv) HVR-H1はアミノ酸配列D1-D10を含み、ここでD1-D10はGFFITNNYWG(配列番号:4)であり;

(v) HVR-H2はアミノ酸配列E1-E17を含み、ここで、E1-E17はGYSYSGSTSYNPSLKS(配列番号:5)であるか、又は配列番号:5の変異体であり、ここで、アミノ酸E2はY、F、V及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E6はS及びGからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E10はS及びYからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E12はN、T、A、及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E13はP、H、D、及びAからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E15はL及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E17はS及びGからなる群から選択され;

(vi) HVR-H3はアミノ酸配列F2-F11を含み、ここで、F2-F11はMTGSSGYFDF(配列番号:6)又はRTGSSGYFDF(配列番号:19)であるか; 又はアミノ酸配列F1-F11を含み、ここで、F1-F11はAMTGSSGYFDF(配列番号:16)、ARTGSSGYFDF(配列番号:17)、又はAQTGSSGYFDF(配列番号:18)、又は配列番号:6、16、17、18、又は19の変異体であり、ここでアミノ酸F2がR、M、A、E、G、Q、Sであり、及び/又はアミノ酸F11がF及びYからなる群から選択される。

【0018】

別の実施態様では、抗体は更にフレームワークを含み、ここで、フレームワーク位置71のアミノ酸はR又はAであり、フレームワーク位置73のアミノ酸はN又はTであり、フレームワーク位置78のアミノ酸はF又はA又はLである。

別の実施態様では、抗体は更に位置71、73及び/又は78の置換を含む重鎖ヒトサブグループIII重鎖コンセンサスフレームワーク配列を更に含む。

一実施態様では、置換はR71A、N73T、L78A又はL78Fである。

別の実施態様では、配列HVR-H2位置E1-E1及びHVR-H3位置F1-F1の間のフレームワーク配列は、HFR3-1-HFR3-31であり、ここで、HFR3-6はA又はRであり、HFR-3-8はN又はTであり、HFR3-13はL又はA又はFである。

更に別の実施態様では、重鎖フレームワーク位置71はアミノ酸R又はAを含み、及び／又は重鎖フレームワーク位置73はT又はNを含み、及び／又は重鎖フレームワーク位置78はF又はA又はLを含む。

【0019】

例示的な実施態様では、抗体は3個の重鎖高頻度領域（HVR-H1-H3）配列と3個の軽鎖高頻度領域（HVR-L1-L3）配列を含み、ここで、

- (i) HVR-L1が配列番号：7、配列番号：8又は配列番号：9を含み；
- (ii) HVR-L2が配列番号：2を含み；
- (iii) HVR-L3が配列番号：3を含み；
- (iv) HVR-H1が配列番号：4を含み；
- (v) HVR-H2が配列番号：5を含み；及び
- (vi) HVR-H1が配列番号：6又は配列番号：16又は配列番号：17又は配列番号：19を含む。

【0020】

更に例示的な実施態様では、前記ヒト化抗体は配列番号：24の軽鎖可変領域配列、及び配列番号：25の重鎖可変領域配列を含む。

一実施態様では、それぞれ、前記抗体は軽鎖及び重鎖可変配列配列番号：10及び配列番号：11に結合する。

【0021】

一態様では、本発明は前記候補医薬を用いた治療に応答して非ヒト検体の末梢血におけるバイオマーカーの量が効果的に増加する投与量に基づく患者の有効な投与量の決定を含む、消化管炎症性障害と診断された患者の候補医薬を用いた治療の設計方法に関する。

一実施態様では、前記非ヒト検体はサルである。

【0022】

一態様では、本発明は健康な個体と比較した場合、前記患者の減少した割合が、疾患の予後を示す、前記患者の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量と末梢ホーミングリンパ球の量の割合と健康な個体の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量と末梢ホーミングリンパ球の量の割合を比較することを含む患者の炎症性腸疾患の予後を予測する方法に関する。

別の態様では、本発明は前記リンパ球を、配列番号：10の軽鎖可変領域配列と配列番号：11の重鎖可変配列を含む抗体と同じエピトープに結合する、単離抗体に結合させることを含む、アルファEベータ7インテグリンを発現するリンパ球及びアルファ4ベータ7インテグリンを発現するリンパ球及びアルファEベータ7及びアルファ4ベータ7の両者を発現するリンパ球を含むリンパ球の個体群の同定方法に関する。

【0023】

一実施態様では、前記リンパ球は消化管炎症性障害と診断された患者の末梢血にある。

別の実施態様では、前記リンパ球は消化管炎症性障害と診断された患者のリンパ節及び腸組織にある。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1はカニクイザル末梢血中のCD4+リンパ球サブユニットを示す。

【図2】図2はカニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhUMAβベータ7の12の静脈内投与又はビヒクルの12の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均（±SD）CD45RA-β7高CD4+リンパ球（絶対カウント、%BL）を示す。

【図3】図3はカニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhUMAβ

10

20

30

40

50

ータ7の12の皮下投与又はビヒクルの12の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均(±SD)CD45RA-β7高CD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

【図4】図4はカニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhUMAbベータ7の12の静脈内投与又はビヒクルの12の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均(±SD)CD45RA-β7低CD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

【図5】図5はカニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhUMAbベータ7の12の皮下投与又はビヒクルの12の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均(±SD)CD45RA-β7低CD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

10

【図6】図6はカニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhUMAbベータ7の12の静脈内投与又はビヒクルの12の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均(±SD)CD45RA-β7中間体CD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

【図7】図7はカニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhUMAbベータ7の12の皮下投与又はビヒクルの12の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均(±SD)CD45RA-β7中間体CD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

【図8】図8はrhUMAbベータ7-4の週毎の25mg/kg rhUMAbベータ7又はビヒクルのIV投与後の末梢血メモリー/エフェクター「腸ホーミング」CD45RA-ベータ7高CD4+リンパ球カウントの一時的な増加を示す。

20

【図9】図9はCD45R-ベータ7高メモリー/エフェクターCD45RA-CD4+末梢血リンパ球上の血清rhUMAbベータ7濃度(マイクログラム/マイクロリッター)とβレセプターの占有率を示す。

【図10】図10(A-D)は末梢血の「腸ホーミング」CD45RA-β7高メモリー/エフェクターCD4+リンパ球の一時的な増加がCD45RA-β7高メモリー/エフェクターCD4+リンパ球上のβ7レセプターの占有率と関係があることを示す。

【図11】図11はrhUMAbベータ7がリンパ球の炎症大腸へのインビボホーミングを阻害するが、CD45RB高-示す。

30

【図12】図12A及び12Bは以下：軽鎖ヒトサブグループカッパIコンセンサス配列(図12A、配列番号：12)、重鎖ヒトサブグループIIコンセンサス配列(図12B、配列番号：13)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変軽鎖(図12A、配列番号：10)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変重鎖(図12B、配列番号：11)、及びヒト化抗体変異体：ヒト化hu504グラフト可変軽鎖(図12A、配列番号：14)、ヒト化hu504Kグラフト可変重鎖(図12B、配列番号：15)、変異体hu504.5、hu504-16、及びhu504-32(ヒト化hu504Kグラフトからのアミノ酸変異)は、変異体hu504.5、hu504.16、及びhu504.32(配列番号：25)について、図12A(軽鎖)(登場の順にそれぞれ配列番号22から24)及び図12B(重鎖)で示される、の可変軽鎖及び重鎖の配列アラインメントを示す。

40

【図13】図13は12のビヒクルの静脈内又は皮下投与後のカニクイザル中のCD45RA-ベータ7高メモリー/エフェクターCD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

【図14】図14は12の5mg/kgのrhUMAbベータ7の静脈内投与後のカニクイザル中のCD45RA-ベータ7高メモリー/エフェクターCD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

【図15】図15は12の15mg/kgのrhUMAbベータ7の静脈内投与後のカニクイザル中のCD45RA-ベータ7高メモリー/エフェクターCD4+リンパ球(絶対カウント、%BL)を示す。

50

【図 16】図 16 は 12 の 50 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の静脈内投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - ベータ 7 高メモリー/エフェクター C D 4 + リンパ球（絶対カウント、% B L）を示す。

【図 17】図 17 は 12 の 15 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の皮下投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - ベータ 7 高メモリー/エフェクター C D 4 + リンパ球（絶対カウント、% B L）を示す。

【図 18】図 18 は 12 の 50 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の皮下投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - ベータ 7 高メモリー/エフェクター C D 4 + リンパ球（絶対カウント、% B L）を示す。

【図 19】図 19 は 5、15、又は 50 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の 12 の静脈内投与又はビヒクルの 12 の静脈内及び皮下投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 + リンパ球（M O E F [%ベースライン]、グループ平均 ± S D）を示す；M O E F = 等しい蛍光の分子。

【図 20】図 20 は 15 又は 50 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の 12 の皮下投与又はビヒクルの 12 の静脈内及び皮下投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 + リンパ球（M O E F [%ベースライン]、グループ平均 ± S D）を示す；M O E F = 等しい蛍光の分子。

【図 21】図 21 は 5、15、又は 50 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の 12 の静脈内投与又はビヒクルの 12 の静脈内及び皮下投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - β 7 中間体 C D 4 + リンパ球（M O E F [%ベースライン]、グループ平均 ± S D）を示す；M O E F = 等しい蛍光の分子。

【図 22】図 22 は 15 又は 50 mg/kg の r h u M A b ベータ 7 の 12 の皮下投与又はビヒクルの 12 の静脈内及び皮下投与後のカニクイザル中の C D 4 5 R A - β 7 中間体 C D 4 + リンパ球（M O E F [%ベースライン]、グループ平均 ± S D）を示す；M O E F = 等しい蛍光の分子。

【図 23】図 23 はカニクイザルへの 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の r h u M A b β 7 の平均（± S D）血清濃度を示す。

【図 24】図 24 はカニクイザルへの 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の回収動物からの実際の平均（± S D）血清濃度及び r h u M A b β 7 のモデル予測血清濃度を示す。

【図 25】図 25 はカニクイザル末梢血中の C D 4 T 細胞サブセットを示す。

【図 26】図 26 はカニクイザルへのビヒクル又は 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の平均（± S D）絶対末梢血 C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 + T 細胞カウント（プレ投与ベースラインのパーセンテージとして表される）を示す。

【図 27】図 27 はカニクイザルへのビヒクル又は 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の平均（± S D）絶対末梢血 C D 4 5 R A - β 7 中間体 C D 4 + T 細胞カウント（プレ投与ベースラインのパーセンテージとして表される）を示す。

【図 28】図 28 はカニクイザルへのビヒクル又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の個別の絶対末梢血 C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 + T 細胞カウントを示す。

【図 29】図 29 はカニクイザルへのビヒクル又は 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の平均（± S D）絶対末梢血リンパ球カウント（プレ投与ベースラインのパーセンテージとして表される）を示す。

【図 30】図 30 はカニクイザルへの各グループへの 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の平均（± S D）絶対末梢血 C D 3 + T 細胞カウント（プレ投与ベースラインのパーセンテージとして表される）を示す。

【図 31】図 31 はカニクイザルへの各グループへの 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の 4 の週毎の I V ボーラス投与後の平均（± S D）絶対末梢血 C D 2 0 + B 細胞

10

20

30

40

50

カウント（プレ投与ベースラインのパーセンテージとして表される）を示す。

【図 3 2】図 3 2 A は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する r h u M A b β 7 の血清濃度と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 3）を示す。図 3 2 B は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する r h u M A b β 7 の血清濃度と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 4）を示す。図 3 2 C は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する r h u M A b β 7 の血清濃度と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 5）を示す。図 3 2 D は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する r h u M A b β 7 の血清濃度と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 6）を示す。

【図 3 3】図 3 3 は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する r h u M A b β 7 の血清濃度と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係を示す。

【図 3 4】図 3 4 A は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する絶対 β 7 高 - 発現メモリー / エフェクター（C D 4 5 R A -）C D 4 + T 細胞と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 3）を示す。図 3 4 B は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する絶対 β 7 高 - 発現メモリー / エフェクター（C D 4 5 R A -）C D 4 + T 細胞と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 4）を示す。図 3 4 C は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する絶対 β 7 高 - 発現メモリー / エフェクター（C D 4 5 R A -）C D 4 + T 細胞と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 5）を示す。図 3 4 D は 4 の週毎に投与される 25 mg / kg の r h u M A b β 7 の I V ポーラス投与後の個別のカニクイザル中の時間に対する絶対 β 7 高 - 発現メモリー / エフェクター（C D 4 5 R A -）C D 4 + T 細胞と非占有末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係（動物 2 6）を示す。

【図 3 5】図 3 5 は平均絶対末梢血 C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 + T 細胞カウントを示す。

【図 3 6】図 3 6 は平均絶対末梢血 C D 4 5 R A - β 7 高 C D 8 + T 細胞カウントを示す。

【図 3 7】図 3 7 は平均絶対末梢血 C D 4 5 R A + β 7 中間体 C D 4 + T 細胞カウントを示す。

【図 3 8】図 3 8 は平均絶対末梢血 C D 4 5 R A - β 7 中間体 C D 8 + T 細胞カウントを示す。

【図 3 9】図 3 9 は r h u M A b β 7 の血清濃度と利用可能な β 7 - 発現末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係を示す。

【図 4 0】図 4 0 は r h u M A b β 7 の血清濃度と利用可能な β 7 - 発現末梢血 C D 8 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

I. 定義

ここで使用する場合、患者の応答又は患者の応答性に関して、「予測」又は「予測する」なる用語は、患者が薬剤又は一連の薬剤に対して有利又は不利に応答する可能性を意味する。一実施態様では、予測はその応答の程度に関する。一実施態様では、予測は、例えば特定の治療的薬剤、例えば抗 β 7 インテグリン抗体による疾患の再発を伴わない一定期間の治療の後に患者が生存しているか又は改善しているかどうか、及び／又はその可

10

20

30

40

50

能性に関する。例えば、本発明の予測方法は、任意の特定の患者のために最も好適な治療様式を選択することによって、治療決定を臨床的に行うことができる。本発明の予測方法は、患者が、治療投薬計画、例えば特定の治療剤や組み合わせの投与、外科的介入、化学療法などを含む特定の治療投薬計画に有利に応答するかどうか、又は治療投薬計画の後に患者が長期に生存しているかどうかを予測する際の有用なツールである。

【0026】

ここで使用される「治療」とは、治療される個体又は細胞の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を意味し、予防のため、又は臨床病理経過中に実施することができる。治療の所望する効果には、疾患の発症又は再発の予防、症状の緩和、疾病の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減少、疾病の進行速度の低減、病状の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾病又は疾患の進行を遅延化させるために使用される。

10

【0027】

「治療法」は、第2の医薬の添加を伴うか又は伴わない、投与量、投与の頻度、又は治療の持続を意味する。

「有効な治療法」は、患者を受ける患者に有利な応答を与える治療法を意味する。

「治療の修正」は、投与量の変化、投与頻度、又は治療の持続、及び／又は第2の医薬を含む治療法の変化を意味する。

「患者応答」は、限定するものではないが以下のものを含む患者に利益を示す任意のエンドポイントを使用して評価できる。(1) 緩徐化及び完全な増殖停止を含む、ある程度の腫瘍増殖の阻害、(2) 腫瘍細胞数の減少、(3) 腫瘍サイズの減少、(4) 近接する末梢器官及び／又は組織への腫瘍細胞浸潤の阻害(すなわち減少、緩徐化又は完全な停止)、(5) 転移の阻害(すなわち減少、緩徐化又は完全な停止)、(6) 必ずではないが腫瘍の退縮又は拒絶が生じ得る抗腫瘍免疫応答の亢進、(7) 腫瘍と関連する一又は複数の症状の、ある程度の軽減、(8) 治療後の生存期間の増加、及び／又は(9) 治療後の特定の時点での死亡率の減少。「応答性」なる用語は完全寛解(CR)及び一部寛解(PR)を含む、測定可能な応答を意味する。

20

【0028】

「完全寛解」又は「CR」は、治療に応答した癌のすべての徴候の消滅を意味する。これは、癌が治癒したことを常に意味するものではない。

30

「一部寛解」又は「PR」は、治療に応答して、炎症の重傷度の少なくとも50%の減少を意味する。

患者のインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する「有益な応答」及び類似の表現は臨床又は抗ベータ7インテグリン抗体のようなアンタゴニストを用いた治療の結果から又は結果としての胃腸炎に罹患するリスクがあるか又は罹患した患者に与えた治療の利点を意味する。このような利点は細胞又は生物学的応答、完全応答、部分応答、安定疾患(進行又は再発がない)、又はアンタゴニストを用いた治療の結果から又は結果としての患者の後の再発を伴う応答を含む。

【0029】

患者の応答性が治療の過程において減少しない場合、「患者は治療に対する応答性を維持する。」

40

「診断」なる用語は、分子又は病的状態、疾患又は状態の同定又は分類を指すために用いられる。例えば、「診断」は特定のタイプの消化管炎症性障害、及びより具体的には、組織／臓器環境によるか、又は他の特徴(例えば、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対するような、治療への応答性によって特徴付けられる患者の亜集団)による、消化管炎症性障害の特定のサブタイプの分類の同定を意味してもよい。

【0030】

本明細書中で用いる「予後」なる用語は、例えば、消化管炎症性障害の再発、再燃、及び薬剤耐性を含む疾患症状の可能性の予測を意味する。

本明細書中で用いる「試料」なる用語は、例えば物理的、生化学的、化学的及び／又は

50

生理学的特徴に基づいて特性を示す又は同定される、細胞実体及び／又は他の分子実体を含有する対象とする被検体から得られる、又は対象とする被検体由来の組成物を指す。例えば、「疾患試料」なる表現及びこの変形は、特徴付けられている細胞実体及び／又は分子実体を含むことが予測される、又はそうであることが知られている対象の被検体から得た任意の試料を指す。試料は関心のある対象のための組織又は対象の末梢血管から得てもよい。

【0031】

「ベータ7インテグリンアンタゴニスト」又は「ベータ7アンタゴニスト」は一又は複数の生物学的活性を阻害する任意の分子又はベータ7インテグリンに関連する一又は複数のベータ7インテグリンの結合の阻害を意図する。本発明のアンタゴニストはベータ7関連効果の一又は複数の態様を調節するために使用してもよく、限定されるものではないが、アルファ4インテグリンサブユニットとの関連、アルファEインテグリンサブユニットとの関連、アルファ4ベータ7インテグリンのMA d CAM、VCAM-1又はフィブロネクチンへの結合、アルファEベータ7インテグリンのE-カドヘリンへの結合を含む。これらの効果は、ベータ7サブユニット又はアルファ4ベータ7又はアルファEベータ2二量体インテグリンへのリガンドの結合阻害を含む任意の生物学的に関連する機構によるか、及び／又は二量体のインテグリンの形成が阻害されるようにアルファとベータインテグリンサブユニットとの結合を阻害することによって調節され得る。本発明の一実施態様では、ベータ7インテグリン抗体は、ヒト化抗ベータ7インテグリン抗体、及びより具体的には組換えヒト化モノクローナル抗ベータ7抗体（又はrh uMA bベータ7）である。幾つかの実施態様では、本発明の抗ベータ7抗体は、アルファEインテグリンサブユニットと関連するアルファ4インテグリンサブユニットへのベータ7サブユニットの結合、アルファ4ベータ7インテグリンのMA d CAM、VCAM-1又はフィブロネクチンへの結合及びアルファEベータ7インテグリンのE-カドヘリンへの結合を阻害又は阻止する抗インテグリンベータ7拮抗抗体である。

【0032】

「ベータ7サブユニット」又は「. ベータ. 7サブユニット」とはヒト β 7インテグリンサブユニットを意味する（E r l e r a、（1991）J. Biol. Chem. 266 : 11009-11016）。ベータ7サブユニットはアルファ4インテグリンサブユニット、例えばヒト α 4サブユニットと会合する（K i l g e r and H o l z m a n n（1995）J. Mol. Biol. 73 : 347-354）。アルファ4ベータ7インテグリンは成熟リンパ球の大部分、並びに、一部集団の胸腺細胞、骨髓細胞及び肥満細胞において発現される。（K i l s h a w and M u r a n t（1991）Eur. J. Immunol. 21 : 2591-2597 ; G u r i s h r a、（1992）149 : 1964-1972 ; 及びS h a w, S. K. and B r e n n e r, M. B.（1995）Semin. Immunol. 7 : 335）。ベータ7サブユニットはまたアルファEサブユニット、例えばヒトアルファEインテグリンサブユニットとも会合する（C e p e k, K. L., ら、（1993）J. Immunol. 150 : 3459）。アルファEベータ7インテグリンは腸上皮内リンパ球（i I E L）上に発現される（C e p e k, K. L.（1993）上掲）。

【0033】

「アルファEサブユニット」又は「アルファEインテグリンサブユニット」又は「. アルファE. サブユニット」又は「. アルファ. Eインテグリンサブユニット」又は「C D 103」とは上皮内リンパ球上のベータ7インテグリンに会合することがわかっているインテグリンサブユニットを意味し、このアルファEベータ7インテグリンはE-カドヘリンを発現する腸上皮へのi E Lの結合を媒介する（C e p e k, K. L. ら、（1993）J. Immunol. 150 : 3459 ; S h a w, S. K. and B r e n n e r, M. B.（1995）Semin. Immunol. 7 : 335）。

【0034】

「MA d CAM」又は「MA d CAM-1」は本発明の文脈においては互換的に使用さ

10

20

30

40

50

れ、そして蛋白粘膜アドレシン細胞接着分子1を意味し、これは短い細胞質テール部及び3つの免疫グロブリン様ドメインよりなる細胞外配列を含む1本鎖ポリペプチドである。マウス、ヒト及びマカクのMAdCAM-1に関するcDNAがクローニングされている(Briskin, ら、(1993) Nature, 363: 461-464; Shyj anら、(1996) J. Immunol. 156: 2851-2857)。

【0035】

「VCAM-1」又は「血管細胞接着分子-1」、「CD106」とは、活性化された内皮上に発現されるアルファ4ベータ7及びアルファ4ベータ1のリガンドを意味し、炎症中の白血球の結合及び遊出のような内皮白血球相互作用において重要である。

【0036】

「CD45」はタンパク質チロシンホスファターゼ(PTP)ファミリーのタンパク質を意味する。PTPは細胞増殖、分化、分裂周期、及び癌化を含む種々の細胞過程を制御するシグナル分子として知られている。このPTPは細胞外ドメイン、1つの膜透過ドメインセグメント及び2つのタンデムな細胞室内触媒ドメインを含み、したがってレセプタータイプのPTPに属する。この遺伝子は造血細胞において特異的に発現している。それは抗原レセプター複合体の構成要素との直接相互作用によるか又は抗原レセプターシグナルのために必要な種々のSrcファミリーキナーゼを活性化することによって機能する。このPTPはまたJAKキナーゼを抑制し、したがってサイトカインレセプターシグナルのレギュレーターとして機能する。4つのオルタナティブスプライスされた、別のアイソフォームをコードするこの遺伝子の翻訳異性体が報告されている。(Tchilian EZ, Beverley PC (2002). "CD45 in memory and disease." Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.) 50 (2): 85-93. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, 等(2004). "Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation." Leuk. Lymphoma 44 (9):1477-81.)。

【0037】

種々のCD45のアイソフォームが存在している: CD45RA、CD45RB、CD45RC、CD45RAB、CD45RAC、CD45RBC、CD45RO、CD45R(ABC)。CD45はまた高度に糖化されている。CD45Rは最長のタンパク質であり、T細胞から単離された場合、200kDaに移動する。B細胞はまたより重い糖化を伴うCD45Rを発現し、分子量220kDaの分子量になり、したがってB220と名付けられている; 220kDaのB細胞アイソフォーム。B220発現はB細胞に限らず、活性化T細胞上、樹状細胞のサブユニット上及び他の抗原提示細胞でもまた発現され得る。Stanton T, Boxall S, Bennett A, 等 (2004). "CD45 variant alleles: possibly increased frequency of a novel exon 4 CD45 polymorphism in HIV seropositive Ugandans." Immunogenetics 56 (2): 107-10.

【0038】

「腸ホーミングリンパ球」は腸リンパ節及び組織に選択的にホーミングするが、末梢リンパ節及び組織にホーミングしないことを特徴とするリンパ球のサブグループを意味する。このリンパ球のサブグループは限定されるものではないが、CD4、CD45RA及びベータ7の組み合わせを含む複数の細胞表面分子の組み合わせのユニークな発現パターンとして特徴付けられる。典型的には、少なくとも末梢血CD45リンパ球の2つのサブセットはCD45R及びベータ7、CD45RA- β 7^高、及びCD45RA- β 7^低CD4⁺細胞のマーカーに基づいて細分される。CD45RA- β 7^高CD4⁺細胞は腸リンパ節及び組織に選択的にホーミングする(Rott 等1996; Rott 等 1997; Williams 等1998; Rose 等1998; Williams and Butcher 1997; Butcher 等1999)。腸ホーミングリンパ球はしたがってフローサイトメトリーアッセイにおいてCD45RA- β 7^高CD4⁺として同定される明確なリンパ球のサブグループである。このリンパ球の集団を同定する方法は当該分野でよく知られており本出願の実施例においても詳細に開示される。

【0039】

ここで表面マーカーに関して使用される場合、記号「+」は細胞表面マーカーのポジテ

10

20

30

40

50

ィブの発現を示す。例えば、 $CD4^+$ リンパ球はその細胞の表面上に発現する $CD4$ を有するリンパ球の集団を示す。

【0040】

ここで表面マーカーに関して使用される場合、記号「 $-$ 」は細胞表面マーカーのネガティブの発現を示す。例えば、 $CD45RA^-$ リンパ球はその細胞の表面上に発現する $CD45RA$ を有さないリンパ球の集団を示す。

【0041】

ここで細胞表面マーカーの発現に関して使用される場合、記号「低」はリンパ球上の細胞表面マーカーの比較的低レベルの発現を示し、一方で「高」はリンパ球上の細胞表面マーカーの比較的高レベルの発現を示す。フローサイトメトリーにおいて、 $\beta 7^{\text{高}}$ の強度は $\beta 7^{\text{低}}$ の少なくとも約10又は100倍である。したがって、例示的な実施態様でここに提供されるように、 $CD45RA^- \beta 7^{\text{低}} CD4^+$ 及び $CD45RA^- \beta 7^{\text{高}} CD4^+$ リンパ球はX軸が $CD45AR$ の発現強度でありY軸がベータ7の発現強度であるフローサイトメトリー解析のドットプロット又はヒストグラムの離れた部位に位置する。

【0042】

「末梢ホーミングリンパ球」は末梢リンパ節及び組織にホーミングするが、腸リンパ節及び組織にホーミングしない特徴を有するリンパ球のサブグループを意味する。例示的な実施態様では、上で説明した通り、末梢ホーミングリンパ球はフローサイトメトリーアッセイにおいて $CD45RA^- \beta 7^{\text{低}} CD4^+$ 細胞として同定されるリンパ球の明確なグループである。リンパ球のこのグループを同定する方法は当該分野で知られており本出願において詳細に開示されている。

【0043】

バイオマーカーの「量」又は「レベル」は当該分野で知られる方法を用いて決定することができる。例えば、例示的な実施態様では、腸ホーミングリンパ球の「量」又は「レベル」は、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する患者の応答性に関連するが、生物学的サンプル中、好ましくは末梢血サンプル中で検出できるレベルである。腸ホーミングリンパ球の量はフローサイトメトリー解析のような当業者に知られている方法によって定量でき、本発明に開示され得る。

【0044】

いくつかの実施態様では、バイオマーカーの「上昇した」又は「増加した」量又はレベルはバイオマーカーの参照／比較量と比較したものである。増加は参照又は比較量の値の関数として、好ましくは約10%より大きく、好ましくは約30%より大きく、好ましくは約50%より大きく、好ましくは約100%より大きく、好ましくは約300%より大きい。例えば、参照又は比較量は治療前のバイオマーカーの量でもよく、より好ましくはベースライン又は投与前の量でもよい。

【0045】

例えば、一実施態様では、腸ホーミングリンパ球の「量」又は「レベル」は、当業者が前記量によって測定される生物学的に特徴のある文脈において統計的に有意な増加と考えるようなリンパ球数の有意な増加を示す。増加は好ましくは、リンパ球の参照／比較量の値の関数として、約10%よりも大きく、好ましくは約30%より大きく、好ましくは約50%より大きく、好ましくは約100%より大きく、好ましくは約300%より大きい。

【0046】

いくつかの実施態様では、バイオマーカーの「減少した」量又はレベルはバイオマーカーの参照／比較量と比較したものである。減少は参照又は比較量の値の関数として、好ましくは約10%より小さく、好ましくは約30%より小さく、好ましくは約50%より小さく、好ましくは約100%より小さく、好ましくは約300%より小さい。例えば、参照又は比較量は治療前のバイオマーカーの量でもよく、より好ましくはベースライン又は投与前の量でもよい。

【0047】

10

20

30

40

50

例えば、「腸ホーミングリンパ球の量を効果的に増加する治療」は、当業者が前記量によって測定される生物学的に特徴のある文脈において統計的に有意な増加と考えるようなリンパ球数の有意な増加を示す。増加は好ましくは、リンパ球の参照／比較量の値の関数として、約10%よりも大きく、好ましくは約30%よりも大きく、好ましくは約50%よりも大きく、好ましくは約100%よりも大きく、好ましくは約300%よりも大きい。

【0048】

ここで使用される「実質的に変らない」なる語句は、当業者が前記量（例えば、リンパ球の量）によって測定される生物学的に特徴のある文脈において統計的に有意な変化と考えないような変化の有意でない程度を示す。該変化は、好ましくは約10%より小さく、好ましくは約5%より小さく、好ましくは約1%より小さい。

10

【0049】

「消化管炎症性障害」は粘膜における炎症及び／又は潰瘍を引き起こす慢性疾患のグループである。これらの障害は例えば炎症性腸疾患（例えばクローン病、潰瘍性結腸炎、非決定性結腸炎及び感染性結腸炎）、粘膜炎（例えば口腔粘膜炎、胃腸粘膜炎、鼻粘膜炎及び直腸炎）、壊死性腸炎及び食道炎を包含する。好ましい実施態様では、消化管炎症性障害は炎症性腸疾患である。

【0050】

「炎症性腸疾患」又は「IBD」は本明細書においては互換的に使用し、炎症及び／又は潰瘍を誘発する腸の疾患を指し、そしてクローン病及び潰瘍性結腸炎を包含する。

「クローン病（CD）」又は「潰瘍性結腸炎（UC）」は病因道の慢性の炎症性の腸の疾患である。クローン病は、潰瘍性結腸炎とは異なり、腸の如何なる部分にも生じ得るのである。最も顕著な特徴としてのクローン病は腸壁の顆粒状の赤紫色の浮腫性の肥厚である。炎症の発生に従い、これらの肉芽腫からその外周境界が消失し、周囲の組織と一体化する場合が多い。下痢及び腸閉塞が主要な臨床特徴である。潰瘍性結腸炎と同様、クローン病の過程は持続性又は回帰性、軽度又は重度となるが、ただし結腸炎とは異なり、クローン病は腸の罹患区分の切除によって治癒されない。クローン病の患者の大部分はある時点において手術を必要とするが、その後の回帰は一般的であり、継続的な医療処置が通常となる。

20

【0051】

クローン病は口腔から肛門に至る消化管の何れかの部分が関与するものであるが、典型的には回結腸、小腸及び結腸－肛門直腸の領域に生じる。組織病理学的には、疾患は断続的な肉芽腫、陰窩膿瘍、索裂及びアフタ性潰瘍により顕在化する。炎症の浸潤は混在性であり、リンパ球（T及びB細胞の両方）、プラズマ細胞、マクロファージ及び好中球よりなる。IgM及びIgG分泌プラズマ細胞、マクロファージ及び好中球の不均衡な増大を伴う。

30

【0052】

抗炎症剤スルファサラジン及び5-アミノサリチル酸（5-ASA）は軽度に活動性の結腸のクローン病を治療するために有用であり、そして疾患の退行を維持するために一般的に処方されている。メトロイダゾール及びシプロフロキサシンはスルファサラジンと薬効において同様であり、そして肛門周囲疾患を治療するために特に有用であると考えられる。さらに深刻な場合では、コルチコステロイドは活動性の再燃の治療に効果があり、さらに退行を維持することが可能である。アザチオプリン及び6-メルカプトプリンもまたコルチコステロイドの長期投与を必要とする患者において良好な結果をもたらしている。これらの薬剤は長期の予防においても役割を果たすことが可能である。残念なことに、一部の患者においては作用が開始される前に極めて長期の遅延（6ヶ月まで）がある場合がある。下痢止め薬もまた一部の患者において兆候的緩解をもたらす。栄養療法又は単元的食餌が患者の栄養状態を改善し、そして急性の疾患の兆候的改善を誘導する場合があるが、持続性の臨床的退行を誘導するわけではない。抗生物質は二次的な小規模の腸内細菌の過剰増殖を治療する場合、及び、化膿性の合併症を治療する場合に使用されている。

40

【0053】

50

「潰瘍性結腸炎（UC）」は大腸に生じる。疾患の過程は持続性又は回帰性、軽度又は重度となる。最早期の幹部はリーベルキューン陰窩の基底部分における膿瘍の形成を伴った炎症性の浸潤である。これらの膨張し崩壊した陰窩の癒着状態は積層する粘膜をその血液供給から分断し、潰瘍をもたらす。疾患の症状は、痙攣、下腹部痛、直腸出血及び糞粒子の乏しい血液、膿汁及び粘膜より主になる頻繁な軟便を包含する。急性、重度又は慢性、非退行性の潰瘍性結腸炎では全結腸摘出が必要となる場合がある。

【0054】

UCの臨床特徴は極めて変動的であり、そして発症は潜行性又は突然であり、そして下痢、テネスマス及び回帰性の直腸出血を包含する場合がある。全結腸に急激な発症があれば、中毒性巨大結腸、致命的な緊急事態が起こる場合がある。腸外の顕在的特長は関節炎、膿皮壊疽、ブドウ膜炎及び結節性紅斑を包含する。

10

【0055】

UCの治療は軽度の症例ではスルファラジン及び関連のサリシレート含有薬剤、そして重度の症例ではコルチコステロイド剤を使用する。サリシレート又はコルチコステロイドの局所投与は場合によっては、特に疾患が遠位の腸に限局されている場合は有効であり、そして全身使用と比較して低減された副作用を有する。鉄及び抗下痢剤の投与のような補助的処置が場合により適応される。アザチオプリン、6-メルカプトプリン及びメトトレキセートは場合により、難治性のコルチコステロイド依存症例において処方される場合がある。

【0056】

「有効量」とは、所望される治療的又は予防的結果を達成するのに必要な期間、必要な用量での有効量を意味する。

20

本明細書中の「患者」なる用語は任意の単一動物を指すものであり、処置が所望される場合には、好ましくは哺乳動物（ヒト及びヒト以外の動物、例えばイヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、動物園の動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、及びヒト以外の霊長類を含む）である。最も好ましくは、ここでの患者はヒトである。

【0057】

「非ヒト動物」という用語は、任意の単一非ヒト動物、より好ましくは（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、動物園の動物、ウシ、ブタ、ヒツジ、及びヒト以外の霊長類のような非ヒト動物を含む）動物を意図している。

30

「抗体」及び「イムノグロブリン」なる用語は互換性をもって広義な意味で使われ、モノクローナル抗体（例えば完全長又は無傷のモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、単価抗体、多価抗体、多特異性抗体（例えば所望の生物学的活性を示す限りの二重特異性抗体）及び（本明細書でさらに詳細に記載される）抗体断片が含まれてもよい。抗体はヒト、ヒト化及び／又は親和性成熟したものであり得る。

【0058】

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、及び多ければその殆ど又は全てを保持する。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADCC機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

40

【0059】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異

50

なる抗体を典型的には含む一般的な（ポリクローナル）抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対するものである。

【0060】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び／又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致するか又は類似するものである（米国特許第4816567号；及びMorrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984)）。

【0061】

非ヒト（例えばマウス）抗体の「ヒト化」形とは、非ヒト免疫グロブリンから得られた最小配列を含むキメラ抗体である。多くの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類のような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）の高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般的に、ヒト化抗体は、全て又はほとんど全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、全て又はほとんど全てのFRがヒト免疫グロブリン配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、状況に応じて免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含む。さらなる詳細は、Jones等, Nature 321, 522-525(1986)；Riechmann等, Nature 332, 323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照のこと。また、以下の概説文献及びここに挙げる引用文献も参照のこと：Vaswani及びHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

【0062】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を含むもの、及び／又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。そのような技術には、ファージディスプレイのようなヒト由来組み合わせライブラリーのスクリーニング（Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)及びHoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)参照）；ヒトモノクローナル抗体産生のためのヒトミエローマ及びマウスーヒトヘテロミエローマ細胞株の使用（Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)；Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)及びBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)参照）；及び内因性の免疫グロブリンを産生しない、ヒト抗体の完全なレパートリーを産生可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）におけるモノクローナル抗体の生成（Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993)；Jakobovits et al., Nature, 362: 255 (1993)；Bruggemann et al., Year in Immunol., 7: 33 (1993)参照）が含まれる。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト動物由来の抗原結合残基を含むヒト化抗体を除く。

【0063】

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び／又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分とは、抗体の診断又は治療への使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及びタンパク質様又は他の非タンパク質様溶質が含まれる。好ましい実施態様において、抗体は、（1）ローリー（Lowry）法によって決定した場合95重量%以上の、最も好ましくは99重量%の抗体まで、（2）スピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15残基のN末端あるいは内部アミノ酸

配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは好ましくは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで精製される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0064】

本願明細書において、用いられる「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列中の高頻度に可変している及び／又は構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。通常、抗体は、VH(H1、H2、H3)の3つと、VL(L1、L2、L3)の3つの計6つの高頻度可変領域を含んでなる。多くの高頻度可変領域が描写されており、本願明細書において、包含される。Kabat相補性決定領域(CDR)は、配列多様性に基づいており、最も一般的に用いられるものである(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置を指す(Chothia 及びLesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高頻度可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループとが組み合わさったものであり、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアにより使用されている。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複雑な結晶構造の分析に基づくものである。これら高頻度可変領域の残基を以下に示す。

【0065】

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

【0066】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。

【0067】

本願明細書において、定められるように、「フレームワーク」又は「FR」残基は高頻度可変領域残基以外のその可変ドメイン残基である。

【0068】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、VLについて、Kabat等によると、前記サブグループはサブグループκIである。一実施態様では、VHについて、Kabat等によると、前記サブグループはサブグループIIである。

【0069】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の改変を有する抗体であって、そのような改変を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が向上してい

る。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks等は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、VHドメインとVLドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDR及び／又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton等、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson等、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins等、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0070】

ここで用いる「実質的に類似」又は「実質的に同じ」なる句は、当業者が2つの数値(一般的には、本発明の抗体に関連するものと参照／比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び／又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が十分に高く類似していることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照／比較抗体の値の好ましくは約50%未満、好ましくは約40%未満、好ましくは約30%未満、好ましくは約20%未満、好ましくは約10%未満である。

【0071】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(Kd)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般的に抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は一般的に抗原により早くより長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。

【0072】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の高頻度可変領域と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、βシート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つの高頻度可変領域により連結されたβシート配置を主にとる4つのFRをそれぞれ含んでいる。各鎖の高頻度可変領域は、FRによって近接して結合され、他の鎖の高頻度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat等、Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞障害活性(ADCC)への抗体の関与を示す。

【0073】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

【0074】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域は相互に作用してVH-VL二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結

合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0075】

またFab断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、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しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合も知られている。

10

【0076】

任意の脊椎動物種からの抗体の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

【0077】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主なクラス:IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMがあり、更にこれらの幾つかは、例えばIgG₁(非A及びAアロタイプを含む)、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、一般に、例えばAbbas等 Cellular and Mol. Immunology, 4版 (W.B. Saunders, Co., 2000)に記載されている。抗体は、抗体と一又は複数の他のタンパク質又はペプチドとの共有的又は非共有的結合によって形成される大きな融合分子の一部であってもよい。

20

【0078】

「全長抗体」、「無傷抗体」及び「全抗体」なる用語は、以下に定義する抗体断片ではなく、その実質的に無傷の形態の抗体を意味するためにここでは交換可能に使用される。該用語は特にFc領域を含む重鎖を持つ抗体を意味する。

【0079】

「裸の抗体」は、異種性の分子、例えば細胞障害性成分又は放射標識にコンジュゲートされない抗体である。

30

【0080】

本明細書中の「Fc領域」なる用語は、天然配列Fc領域及び変異形Fc領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226の位置又はPro230からの位置のアミノ酸残基からFc領域のカルボキシル末端まで伸長すると定義される。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムによれば残基447)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。したがって、インタクト抗体の組成物は、すべてのK447残基が除去された抗体群、K447残基が除去されていない抗体群、及びK447残基を有する抗体と有さない抗体の混合を含む抗体群を含む。

40

【0081】

特に明記しない限り、本明細書中の免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明記によって本明細書中に特別に援用されるKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)のEUインデックスのものである。「KabatのEUインデックス」はヒトIgG1 EU抗体の残基番号を指す。

【0082】

「機能的Fc領域」は、天然配列Fc領域の「エフェクター機能」を有する。例示的「

50

エフェクター機能」には、C1q結合、補体依存性細胞障害作用(CDC)、Fcレセプター結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(ADCC)、食作用、細胞表面レセプター(例えばB細胞レセプター；BCR)の下方制御などが含まれる。そのようなエフェクター機能は、通常、Fc領域が結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わせることを必要とし、例えば本明細書中に開示される様々なアッセイを使用して評価される。

【0083】

「天然配列のFc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒトFc領域は、天然配列のヒトIgG1Fc領域(非A-及びA-アロタイプ)；天然配列のヒトIgG2Fc領域；天然配列のヒトIgG3Fc領域；及び天然配列のヒトIgG4Fc領域；並びに、これらの自然に生じる変異体が含まれる。

10

【0084】

「変異体Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは一又は複数のアミノ酸置換により、天然配列のFc領域とは異なるアミノ酸配列を包含するものである。好ましくは、変異体Fc領域は、天然配列のFc領域もしくは親ポリペプチドのFc領域と比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列のFc領域又は親のポリペプチドのFc領域におよそ1からおよそ10のアミノ酸置換、好ましくはおよそ1からおよそ5のアミノ酸置換を有する。本明細書中の変異体Fc領域は、好ましくは、天然配列のFc領域及び／又は親ポリペプチドのFc領域と、少なくともおよそ80%の同一性を有する、最も好ましくは少なくともおよそ90%の同一性を、より好ましくは少なくともおよそ95%の同一性を有するものであろう。

20

【0085】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、無傷抗体を様々な「クラス」にあてがうことができる。無傷抗体の5種の主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらの幾つかは更に「サブクラス」(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2に分けることができる。抗体の異なったクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なったクラスのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。

【0086】

「抗体依存性細胞媒介細胞障害活性」及び「ADCC」は、Fcレセプター(FcR)(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)を発現する非特異性細胞障害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応に関する。ADCCを媒介する第1の細胞であるNK細胞はFc γ RIIIのみを発現するのに対し、単球はFc γ I、Fc γ II及びFc γ IIIを発現する。造血細胞上のFcR発現はRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)の464ページの表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するために、例えば米国特許第5,500,362号又は5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。このアッセイで利用できるエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞を含む。他に、又はさらに対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)に記載されている様な哺乳動物のモデルでインビボの評価がされうる。

30

40

【0087】

「ヒトエフェクター細胞」は、一つ以上のFcRを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。好ましくは、細胞は、少なくともFc γ RIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球を含む；PBMC類及びNK細胞が好まれる。エフェクター細胞は、その天然ソースより単離されてもよい；例えばここにおいて記載の血液又はPBMC類である。

【0088】

50

「Fcレセプター」又は「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記述するために使用される。好適なFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに好適なFcRは、IgG抗体(γレセプター)に結合し、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスのレセプターを含むものであり、これらのレセプターの対立遺伝子変異体及び選択的スプライシング型を含む。FcγRIIレセプターは、FcγRIIA(「活性化レセプター」)及びFcγRIIB(「阻害レセプター」)を含み、それらは、主としてその細胞質ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有する。活性化FcγRIIAは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンーベース活性化モチーフ(ITAM)を有する。阻害レセプターFcγRIIBは、その細胞質ドメインに、免疫レセプターチロシンーベース活性化モチーフ(ITIM)を有する(Daeron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)に概説されている)。FcRはRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel等, Immunomethods 4:25-34 (1994); 及びde Has等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)において概説されている。将来同定されるものも含む他のFcRが、ここにおける「FcR」なる用語によって包含される。また、この用語は胎児への母性IgGsの移動の原因であり(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))、また免疫グロブリンのホメオスタシスを調節する新生児レセプターであるFcRnも含む。新生児のFcレセプター(FcRn)への結合が向上し、半減期が増加している抗体は、国際公開第00/42072号(Presta, L.)及び米国公開特許第2005/0014934号A1(Hinton等)において、記述される。これらの抗体は、その中にFcRnへのFc領域の結合を向上させる一又は複数の置換を有するFc領域を含んでなる。例えば、Fc領域は、一又は複数の位置238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428又は434(残基のEu番号付け)に置換を有してもよい。向上したFcRn結合を有する好適なFc領域-含有抗体変異体は、そのFc領域の位置307、380及び434(残基のEu番号付け)のうちの1、2又は3にアミノ酸置換を含んでなる。

【0089】

「単鎖Fv」又は「scFv」抗体断片は抗体のV_H及びV_Lドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、FvポリペプチドはV_H及びV_Lドメインの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このリンカーはscFvが抗原結合にとって望ましい構造を形成するのを可能にする。scFvのレビューに関しては、Pluckhuth, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenberg及びMoore編, Springer-Verlag, New York, 269-315頁(1994)を参照。HER2抗体scFv断片は、国際公開第93/16185号; 米国特許第5571894号; 及び米国特許第5587458号に記載されている。

【0090】

「ダイアボディ(diabody)」なる用語は、抗原結合部位を2つ備える小さな抗体断片を指し、この抗体断片は同じポリペプチド鎖(V_H及びV_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む。同じ鎖の上の2つのドメインの間で対合させるにはあまりに短いリンカーを用いて、このドメインを他の鎖の相補性ドメインと強制的に対合させ、2つの抗原結合部位をつくる。ダイアボディについては、例えば欧州特許第404097号; 国際公開第93/11161号; 及びHollinger他, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448(1993)でさらに詳しく記載されている。

【0091】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の改変を有する抗体であって、そのような改変を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が向上している。好ましい親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル単位の、さらにはピコモル単位の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks等は、Bio/Technology, 10:779-783(1992年)において、V_HドメインとV_Lドメインのシャフリングによる親和性成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク

残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas他、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton等、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson等、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins等、J. Mol. Bio l., 226:889-896 (1992)に開示されている。

【0092】

本明細書において、「アミノ酸配列変異形」抗体は、主要種の抗体と異なるアミノ酸配列を有する抗体である。通常、アミノ酸配列変異体は、主要種の抗体と少なくともおよそ70%の相同性を有し、好ましくは、それらは主要種の抗体と少なくともおよそ80%、好ましくは少なくともおよそ90%の相同性である。アミノ酸配列変異体は、主要種の抗体のアミノ酸配列内の、又は主な種類の抗体のアミノ酸配列に隣接した、特定の位置で置換、欠失及び／又は付加を有する。本明細書中のアミノ酸配列変異体の例には、酸性の変異体(例えば脱アミド化された抗体変異体)、基本的な変異体、抗体の1又は2つの軽鎖上にアミノ末端リーダー伸展(例えばVH S-)を有する抗体、抗体の1又は2つの重鎖上にC末端リジン残基を有する抗体などが含まれ、重鎖及び／又は軽鎖のアミノ酸配列に対する変異体の組合せが含まれる。ここで特に関心のある抗体変異体はその一又は二の軽鎖上にアミノ末端リーダー伸展を含み、更に主要な種の抗体に関連する他のアミノ酸配列及び／又はグリコシル化の差異を含んでもよい抗体である。

【0093】

本明細書中の「グリコシル化変異形」抗体は、主要種の抗体に付着した一又は複数の炭水化物部分と異なる一又は複数の接着した炭水化物部分を有する抗体である。本明細書において、グリコシル化変異体の例には、抗体のFc領域に付着した、G0オリゴ糖構造の代わりに、G1又はG2オリゴ糖構造を有する抗体、抗体の1又は2つの軽鎖に接着した1又は2の炭水化物部分を有する抗体、抗体の1又は2つの重鎖に接着する炭水化物のない抗体など、及びグリコシル化変更の組合せを有する抗体が含まれる。抗体がFc領域を有する場合、オリゴ糖構造は、一又は二の抗体の重鎖、例えば、残基299において(298、残基のEu番号付け)に結合してもよい。

【0094】

ここで使用される「細胞障害剤」なる用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し、及び／又は細胞破壊をもたらす物質を意味する。この用語は、放射性同位体(例えばAt₂₁₁、I₁₃₁、I₁₂₅、Y₉₀、Re₁₈₆、Re₁₈₈、Sm₁₅₃、Bi₂₁₂、P₃₂及びLuの放射性同位体)、化学療法剤、及び小分子毒素又は細菌、真菌、植物、又は動物起源の酵素活性毒素などの毒素で、それらの断片及び／又は変異体を含むものを含むことを意図する。

【0095】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン(FSH)のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン(TSH)、及び黄体形成ホルモン(LH)；肝臓成長因子；繊維芽細胞成長因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-α及び-β；ミューラー阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒビン；アクチビン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン(TPO)；NGF-β等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF-αあるいはTGF-βのようなトランスフォーミング成長因子(TGF)；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン(EPO)；オステオインダクティブ因子；インターフェロンα、β、γのようなインターフェロン；マクロファージCSF(M-CSF)のようなコロニー刺激因子(CSF)；顆粒球マクロファージCSF(GM-CSF)及び顆粒球CSF(G-CSF)；IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL

- 9、IL-10、IL-11、IL-12等のインターロイキン(IL)；腫瘍壊死因子、例えばTNF- α 又はTNF- β ；及びLIF及びキットリガンド(KL)を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用される場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0096】

ここで補助治療として用いる「免疫抑制剤」なる用語は、本明細書中で治療される被検体の免疫系を抑制する又は遮断するように働く物質を表す。これは、サイトカイン産生を抑制する、自己抗原の発現を下方制御又は抑制する、あるいはMHC抗原を遮断する物質を含む。そのような薬剤の例として、2-アミノ-6-アリル-5-代替ピリミジン(米国特許第4665077号参照)；非ステロイド性抗炎症剤(NSAID)；ガンシクロビル、タクロリムス、糖質ステロイド、例としてコルチゾール又はアルドステロン、抗炎症剤、例としてシクロオキシゲナーゼインヒビター、5-リポキシゲナーゼインヒビター又はロイコトリエンレセプターアンタゴニスト；プリンアンタゴニスト、例えばアザチオプリン又はミコフェノール酸モフェチル(MMF)；アルキル化剤、例えばシクロホスファミド；プロモクリプチン；ダナゾール；ダブソン；グルタルアルデヒド(米国特許第4120649号に記載のように、MHC抗原を遮断する)；MHC抗原及びMHCフラグメントに対する抗イデオタイプ抗体；シクロスポリン；6メルカプトプリン；副腎皮質ステロイド又は糖質副腎皮質ステロイド又は糖質ステロイド類似体などのステロイド、例としてプレドニゾン、メチルプレドニゾン、例えばSOLU-MEDROL(登録商標)メチルプレドニゾンコハク酸ナトリウム、及びデキサメタゾン；ジヒドロ葉酸レダクターゼインヒビター、例としてメトトレキサート(経口又は皮下)；クロロキン及びヒドロキシクロロキンなどの抗マラリア剤；スルファサラジン；レフルノミド；サイトカイン又はサイトカインレセプター抗体又はアンタゴニスト、例として抗インターフェロン- γ 、- β 、又は- α 抗体、抗腫瘍壊死因子 α 抗体(インフリキシマブ(REMICADE(登録商標))又はアダリムマブ)、抗TNF α イムノアドヘシン(エタネルセプト)、抗腫瘍壊死因子 β 抗体、抗インターロイキン2(IL-2)抗体及び抗IL-2レセプター抗体、抗インターロイキン6(IL-6)レセプター抗体及びアンタゴニスト；抗CD11a及び抗CD18抗体を含む抗LFA-1抗体；抗-L3T4抗体；異種性抗リンパ球グロブリン；pan-T抗体、好ましくは、抗-CD3又は抗CD4/CD4a抗体；LFA-3結合ドメインを含む可溶性ペプチド(1990年7月26日公開の国際公開第90/08187号)；ストレプトキナーゼ；トランスフォーミング成長因子- β (TGF- β)；ストレプトドルナーゼ(streptodornase)；宿主由来のRNA又はDNA；FK506；RS-61443；クロランブシル；デオキシスベルグアニン(deoxyspergualin)；ラパマイシン；T細胞レセプター(Cohen等、米国特許第5114721号)；T細胞レセプターフラグメント(Offner等、Science 251:430-432 (1991)；国際公開第90/11294号；laneway, Nature, 341: 482 (1989)；及び国際公開第91/01133号)；BAFFないしBR3抗体ないしイムノアドヘシンなどのBAFFアンタゴニスト及びzTNF4アンタゴニスト(参考までにMackay及びMackay, Trends Immunol., 23:113-5 (2002)と以下の定義を参照のこと)；T細胞ヘルパーシグナルを阻害する生物学的な薬剤、例として抗CD40レセプター又は抗CD40リガンド(CD154)、例えばCD40-CD40リガンドに対する阻止抗体(例えば、Durie等、Science, 261: 1328-30 (1993)；Mohan等、J. Immunol., 154: 1470-80 (1995))及びCTLA4-Ig(Fink等、Science, 265: 1225-7 (1994))；及びT10B9などのT細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)を含む。

【0097】

II. 詳細な記述

A. ベータ7インテグリンアンタゴニスト

本発明はベータ7インテグリンアンタゴニストの治療に対する患者の応答性を予測する方法に関する。潜在的なアンタゴニストの例には、ベータ7インテグリンに結合する免疫グロブリンの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、及び特に、限定されるものではない

が、ポリ及びモノクローナル抗体とその抗体断片、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、及びキメラ又はそのような抗体又は断片のヒト化したもの並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体が含まれる。その代わりに、潜在的なアンタゴニストは密接に関連するタンパク質、例えば、リガンドを認識するが、影響は与えず、したがってベータ7インテグリンの活動を競合的に阻害するベータ7インテグリンの変異形態であってもよい。

【0098】

別のベータ7インテグリンアンタゴニストとなり得るものは、アンチセンス技術により調製されたアンチセンスRNAまたはDNAコンストラクトであり、例えば、アンチセンスRNAまたはDNA分子は、標的mRNAにハイブリダイズし、蛋白質の翻訳を阻害することにより直接mRNAの翻訳を妨げるように働く。三本鎖形成、または、アンチセンスDNA若しくはRNAによって、アンチセンス技術は遺伝子発現を調製するのに用いることができ、どちらの方法もポリヌクレオチドのDNAまたはRNAへの結合に基づく。例えば、ここでは成熟ベータ7インテグリンをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分は、長さが約10~40塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するのに用いられる。DNAオリゴヌクレオチドは、遺伝子の転写に関する領域に相補的に設計され（三本鎖—Lee et al., *Nucleic Acids Res.*, 6:3073(1979) ; Cooney et al., *Science*, 241:456(1988) ; Dervan et al., *Science*, 251:1360(1991)参照）、それによりベータ7インテグリンの転写、および、産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはイン・ビボでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子のベータ7インテグリンへの転写を妨げる（アンチセンス—Okano, *Neurochem.*, 56:560(1991) ; 「Origodeoxynucleotide as Antisense Inhibitors of Gene Expression」(CRC Press:Boca Raton, FL, 1988))。また、アンチセンスRNAまたはDNAがイン・ビボでPROポリペプチドの産生を阻害するように発現されるように、上記オリゴヌクレオチドは細胞へ届けられ得る。アンチセンスDNAが用いられる場合、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10および+10位の間である翻訳開始部位由来のオリゴデオキシリボヌクレオチドが好ましい。

【0099】

他のアンタゴニストとなり得るものには、活性部位、リガンド又は結合分子結合部位に結合する小分子が含まれ、それによりベータ7インテグリンの通常の生物学的活性を阻害する。小分子の例には、これらに限定されるわけではないが、小型のペプチド、またはペプチド様分子、好ましくは可溶性ペプチド、および、合成非ペプチド有機、若しくは、無機化合物が含まれる。

【0100】

リボザイムは、RNAの特異的開裂を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーションに続く、内ヌクレオチド結合分解性開裂により機能する。標的RNAとなり得るものの内部の特異的リボザイム開裂部位は、公知の技術により同定され得る。詳細については、例えば、Rossi(*Current Biology*, 4:469-471(1994))、および、PCT公開第WO97/33551号（1997年9月18日公開）参照。

【0101】

転写を阻害するのに用いられる三本鎖ヘリックス形成における核酸分子は、一本鎖で、デオキシヌクレオチドにより構成されているべきである。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、一般的に二本鎖のうちの一本の上に相当な長さのプリン、または、ピリミジンが必要とするフーグスティーン型塩基対則をにより三本鎖ヘリックス形成を促進するように設計される。さらなる、詳細については、例えば前述のPCT公開第WO97/33551号参照。これらの小分子は、上述のスクリーニング分析のいずれか1つ、若しくは、それ以上により、および／または、当業者に公知のその他のいずれかのスクリーニング技術により同定され得る。

【0102】

アンタゴニストのスクリーニングアッセイはここで同定される遺伝子によってコードさ

10

20

30

40

50

れるベータ7インテグリンと結合するか又はそれと複合化するか、又はそうでなければ、他の細胞性タンパク質とコードされたポリペプチドの相互作用を妨害等する化合物を同定するために設計される。このようなスクリーニングアッセイは化学的なライブラリーのハイスループットスクリーニングに適したアッセイを含み、それらを小分子の医薬候補を同定するために特に適したものにする。

【0103】

アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞ベースアッセイを含む種々の形態によって行うことができ、当該分野でよく知られている。

【0104】

B. 抗ベータ7インテグリン抗体

一実施態様では、本発明のベータ7インテグリンアンタゴニストは抗ベータ7抗体である。抗体の例としては、上記の通り、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、二重特異性及びヘテロコンジュゲート抗体等が含まれる。

【0105】

1. ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は、関連する抗原とアジュバントを複数回の皮下(sc)又は腹腔内(ip)注射することにより、動物に産生されることが好ましい。それは、免疫化されるべき種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、又は大豆トリブシンインヒビターへ、二重官能性又は誘導体形成剤、例えばマレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介するコンジュゲーション)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、及び無水コハク酸、 SOCl_2 、又はR及びR¹が異なるアルキル基であるR¹N=C=NRへ、関連する抗原をコンジュゲートさせるために有用である。

【0106】

動物を、例えばタンパク質又はコンジュゲート100 µg又は5 µg(それぞれウサギ又はマウスの場合)を完全フロイントアジュバント3容量と併せ、この溶液を複数部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート、又は誘導体に対して免疫する。1ヶ月後、該動物を、完全フロイントアジュバントに入れた初回量の1/5ないし1/10のペプチド又はコンジュゲートを用いて複数部位に皮下注射することにより、追加免疫する。7ないし14日後に動物を採血し、抗体価について血清を検定する。動物は、力価がプラトーに達するまで追加免疫する。好ましくは、動物を、同じ抗原であるが異なるタンパク質にコンジュゲートさせた、及び/又は異なる架橋剤によってコンジュゲートさせたコンジュゲートにより追加免疫する。コンジュゲートはまた、タンパク融合として組換え細胞培養中で調製することができる。また、ミョウバンのような凝集化剤が、免疫反応の増強のために好適に使用される。

【0107】

2. モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、Kohler等、Nature, 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換えDNA法(米国特許第4816567号)によって作製することができる。

【0108】

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを上記のように免疫し、免疫化に用いられたタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか又は産生することのできるリンパ球を導き出す。別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融合剤を用いてミエローマ細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成させる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

【0109】

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、融合していない親の骨髓腫細胞（融合のパートナーとも呼ばれる）の増殖または生存を阻害する一又は複数の物質を好ましくは含む適当な培地に蒔き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPR T)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT-欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含有するであろう(HAT培地)。

【0110】

好ましい融合のパートナーである骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの発現を支援し、融合しない親細胞に対して選択する選択培地に対して感受性である細胞である。これらの中でも、好ましい骨髓腫株化細胞は、マウス骨髓腫ライン、例えば、ソーグ・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、サンディエゴ、カリフォルニア、USAより入手し得るMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、及び、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、マナッサス、バージニア、USAより入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものである。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁, (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

【0111】

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、抗原に対するモノクローナル抗体の産生について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

【0112】

例えば、モノクローナル抗体の結合親和性は、Munson等, Anal. Biochem., 107:220(1980)のスキッチャード分析によって測定することができる。所望の特異性、親和性、及び／又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、そのクローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Godin g, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地は、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地を包含する。また、このハイブリドーマ細胞は、動物の腹水症腫瘍として、例えばマウスへの細胞の腹腔内注射によって、インビボで増殖させることができる。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばアフィニティークロマトグラフィー（例えばプロテインA又はプロテインG-セファロースを用いる）又はイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析等のような常套的な抗体精製法によって、培地、腹水、又は血清から上手く分離される。

【0113】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするDNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262(1993)及びPluckthun, Immunol. Revs. 130: 151-188(1992)が含まれる。

【0114】

更なる実施態様では、モノクローナル抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 34

8:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及び Marks等, J.Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性(nM範囲)のヒト抗体の生成(Marks等, Bio/Technology, 10:779-783[1992])、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え(Waterhouse等, Nuc.Acids.Res., 21:2265-2266[1993])を記述している。従って、これらの技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

【0115】

10

抗体をコードするDNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン(CH及びCL)の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって(米国特許第4,816,567号;Morrison等, Proc.Nat.Acad.Sci.,USA,81:6851(1984))、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド(異種ポリペプチド)のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の変域ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

【0116】

20

例示的な抗ベータ7抗体は、Fib504、Fib21、22、27、30(Tidswell, M. J Immunol. 1997 Aug 1;159(3):1497-505)又はそのヒト化誘導体である。Fib504のヒト化抗体は、米国特許第20060093601号に詳細に開示されており、参照によりその内容全体が組み込まれる(下の議論もまた参照されたい)。

【0117】

3. ヒト及びヒト化抗体

抗ベータ7インテグリン抗体は、更にヒト化抗体又はヒト抗体を含みうる。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化型とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖、又はその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントのCDR由来の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDR由来の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは殆ど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは殆ど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる。Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)。

【0118】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそこに導入された一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者(Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等, Science, 239:1534-1536 (1988))の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応す

40

る配列に置換することにより本質的に実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4816567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基と場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0119】

抗体がヒトの治療用に用いられる場合、抗原性及びHAM A 応答(ヒト抗マウス抗体)を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。HAM A 応答の低減又は除去は、適切な治療薬の臨床上の発達の有意な態様である。例として、Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988; Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495を参照のこと。本明細書において記述されるように、本発明は、HAM A 応答が低減されるか又は取り除かれるように、ヒト化される抗体を提供する。さらに、これらの抗体の変異体は、当分野で公知の慣例的な方法を用いて得られる。その方法のいくつかは以降に記載される。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒトVドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(FR)をヒト化抗体に受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。

【0120】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、好ましい方法では、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

【0121】

ヒト化抗ベータ7インテグリン抗体の様々な形態が考慮される。例えば、ヒト化抗体は、Fabなどの、任意で一又は複数の細胞障害性剤とコンジュゲートしてイムノコンジュゲートを生成する抗体断片とすることができる。或いは、ヒト化抗体は、インタクトIgG1抗体などのインタクト抗体でもよい。

【0122】

例示的なヒト化抗ベータ7抗体は、限定するものではないが、インテグリンサブユニットβ7に対するヒト化モノクローナル抗体であり、ラット抗マウス/ヒトモノクローナル抗体FIB504 (Andrew等, 1994 J Immunol 1994;153:3847-61) から誘導される、rh uMAbベータ7を含む。それは、ヒトイムノグロブリン(Ig)G1重鎖及びκ1軽鎖フレームワークを含むように改変され、チャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生される。この抗体は、消化管のリンパ球サブユニットの輸送と滞留を制御し、潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)のような腸管炎症性疾患(IBD)に関連する、2つの

インテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$ と $\alpha E \beta 7$ に結合する。r h u M A b ベータ7は $\alpha 4 \beta 7$ とそのリガンド（蛋白粘膜アドレシン細胞接着分子-1 [M A d C A M]-1、血管細胞接着分子 [V C A M]-1、及びフィブロネクチン）の細胞相互作用並びに $\alpha E \beta 7$ とそのリガンド（Eカドヘリン）の相互作用の強力なインビトロ阻害剤である。r h u M A b ベータ7は可逆的に類似の高い親和性でウサギ、カンクイザル、及びヒトからのリンパ球上の $\beta 7$ に結合する。それはまたサルの $\beta 7$ にも高い親和性で結合する。r h u M A b ベータ7とその変異体のアミノ酸配列と調製及び使用については米国特許第20060093601号に詳細が開示されており、その内容の全体が組み込まれる。

【0123】

図12A及び12Bは以下の可変軽鎖及び重鎖の配列アラインメントを示す：軽鎖ヒトサブグループカッパIコンセンサス配列（図12A、配列番号：12）、重鎖ヒトサブグループIIコンセンサス配列（図12B、配列番号：13）、ラット抗マウスベータ7抗体（F i b 5 0 4）可変軽鎖（図12A、配列番号：10）、ラット抗マウスベータ7抗体（F i b 5 0 4）可変重鎖（図12B、配列番号：11）、及びヒト化抗体変異体：ヒト化h u 5 0 4 Kグラフト可変軽鎖（図12、配列番号：14）、ヒト化抗体変異体：ヒト化h u 5 0 4 Kグラフト可変重鎖（図12B、配列番号：15）、変異体h u 5 0 4. 5、h u 5 0 4-16、及びh u 5 0 4-32（ヒト化h u 5 0 4 Kグラフトからのアミノ酸変異体は変異体h u 5 0 4. 16、h u 5 0 4. 16、及びh u 5 0 4. 32（配列番号：25）について、図12A（軽鎖）（登場の順にそれぞれ配列番号：22から24）及び図12B（重鎖）に示す）。

【0124】

4. ヒト化抗体

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの産生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを産生することのできるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体産生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の産生が起こる。Jakobovits等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 90:2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362:255-258 (1993); B r u g g e m a n 等, Year in Immuno., 7:33 (1993); 米国特許第5545806号、同5569825号、同5591669号（全てジェンファーム(GenPharm)）；同5545807号；及び国際公開第97/17852号を参照。

【0125】

あるいは、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, Nature 348:552-553 (1990))を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。当該技術では、抗体Vドメイン配列は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdのメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子の何れかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として示される。また、繊維状の粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的性質に基づくセレクションはこれらの性質を提示する抗体をコードする遺伝子を選択する結果となる。このように、ファージはB細胞の幾つかの性質を模倣する。ファージディスプレイは、例えば、Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)に総説されたように、多様な形式で行うことができる。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライブラリからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築し、抗原（自己抗原を含む）の異なった配列に対する抗体を、Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、又はGriffith等, EMBO J. 12:72

10

20

30

40

50

5-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第 5 5 6 5 3 3 2 号及び同 5 5 7 3 9 0 5 号を参照のこと。

【0126】

上記の通り、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞によって発生し得る（米国特許第 5 5 6 7 6 1 0 及び 5 2 2 9 2 7 5 号を参照されたい）。

【0127】

5. 抗体断片

特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。

【0128】

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimotoら, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及びBrennanら, *Science*, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、F a b、F v 及び S c F v 抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模生産が容易となる。抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、F a b'-S H断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(a b')₂断片を形成することができる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(a b')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖F v断片(s c F V)である。国際公開93/16185；米国特許第 5 5 7 1 8 9 4 号；及び米国特許第 5 5 8 7 4 5 8 号を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第 5 6 4 1 8 7 0 号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

【0129】

6. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、ここに記載した通りベータ7インテグリンの2つの異なるエピトープに結合し得る。他のこのような抗体は、T A T結合部位と、他のタンパク質に対する結合部位とを結合することができる。或いは、抗ベータ7インテグリンアームは、細胞防護の機序をT A T発現細胞に集中し局在化させるために、T細胞レセプター分子(例えばC D 3)のような白血球上のトリガー分子、又はF c γ R I (C D 6 4)、F c γ R I I (C D 3 2)及びF c γ R I I I (C D 1 6)のような、I g GのF cレセプター(F c γ R)に結合するアームと結合し得る。二重特異性抗体は、T A Tを発現する細胞に細胞障害性剤を局在化させるために使用することもできる。このような抗体は、T A T結合アームと、細胞障害性剤(例えば、サポリン、抗インターフェロンα、ビンカルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート又は放射性同位元素ハプテン)とに結合するアームとを有している。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片(例えばF(a b')₂二重特異性抗体)として調製することができる。

【0130】

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖／軽鎖対の同時発現に基づく[Milstein及びCuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開のW093/08829、及びTraunecker等, *EMBO J.*, 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

【0131】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン(抗原-抗体結合部位)を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は好ましくは、少なくともヒンジの一部、C H 2 及び C H 3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)を、融合の少なくとも一つに存在させることが望ましい。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしている D N A を、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、組立に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2 または 3 個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

10

【0132】

このアプローチ法の好適な実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対(第二の結合特異性を提供する)とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報 9 4 / 0 4 6 9 0 に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えば Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986) を参照されたい。

20

【0133】

米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。好適な界面は抗体定常ドメインの C H 3 ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第 1 抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第 2 の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

30

【0134】

二重特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号)及び H I V 感染の治療(国際公報第 9 1 / 0 0 3 6 0 号、国際公報第 9 2 / 2 0 0 3 7 3 号及び欧州特許第 0 3 0 8 9 号)等の用途が提案されている。ヘテロコンジュゲートは適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号に記載されている。

40

【0135】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan 等, *Science*, 229:81 (1985) は完全な抗体をタンパク分解性に切断して F (a b ') 2 断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生された F a b ' 断片はついでチオニトロベンゾアート(T N B)誘導体に転換される。F a b ' - T N B 誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元により F a b ' - チオールに再転換し、他の F a b ' - T N B 誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

50

【0136】

最近の進歩により、大腸菌から F a b ' - S H 断片を直接回収できるようになり、これを化学的にカップリングさせて二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体 F (a b ')₂ 分子を記載している。各 F a b ' 断片は別個に大腸菌から分泌され、インビトロでの定方向化学カップリングによって二重特異性抗体を形成した。このようにして形成された二重特異性抗体は E r b B 2 レセプターを過剰発現する細胞及び正常なヒト T 細胞に結合することができ、またヒト乳房腫瘍標的に対してヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を惹起させた。組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及び J u n タンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体の F a b ' 部分に結合させる。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成する。この方法はまた抗体ホモ二量体の生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン (V L) に重鎖可変ドメイン (V H) を結合してなる。従って、一つの断片の V H 及び V L ドメインは他の断片の相補的 V L 及び V H ドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 F v (s F v) 二量体の使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照のこと。

10

20

【0137】

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等 J. Immunol. 147:60(1991)。

【0138】

7. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号] 及び H I V 感染の治療のために [国際公開第 9 1 / 0 0 3 6 0 ; 国際公開第 9 2 / 2 0 0 3 7 3 ; 欧州特許第 0 3 0 8 9 号] 提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製できると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第 4 6 7 6 9 8 0 号に開示されたものが含まれる。

30

【0139】

8. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体 (I g M クラス以外のもの) であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。好ましい二量化ドメインは F c 領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体は F c 領域と、F c 領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ここで、好ましい多価抗体は3ないし8、好ましくは4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも一つのポリペプチド鎖(好ましくは2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)は V D 1 - (X 1)_n - V D 2 - (X 2)_n - F c を有し、ここで V D 1 は

40

50

第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、好ましくは少なくとも2つ(好ましくは4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有する。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

【0140】

9. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞毒性(ADCC)及び/又は補体依存細胞毒性(CDC)を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされうる。あるいは又はさらに、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞毒性(ADCC)を有する可能性がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)ヘサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

【0141】

10. 免疫複合体

この方法で使用されるアンタゴニスト又は抗体は細胞毒性剤、又はサイトカインのような別の医薬とコンジュゲートさせてもよい。一般的に、非ペプチド性剤は、化学的な修飾によって、抗体又はイムノアドヘシンに導入された反応基、糖鎖又はアミノ酸側鎖によって、抗体又はイムノアドヘシンへのコンジュゲートを可能にするリンカーの負荷により修飾される。例えば、薬剤は、リジン残基のε-アミノ基により、遊離したα-アミノ基により、システイン残基に対するジスルフィド交換にり、又は、シッフ塩基結合により様々な求核基を含有する薬剤の付着を可能にする過ヨウ素酸を有する糖鎖の1,2-ジオールの酸化により付着されてもよい。例として米国特許第4256833号を参照。タンパク質修飾剤には、アミン反応性の試薬(例えば、反応性エステル、イソチオシアン酸(isothiocyanate)、アルデヒド及びスルホニルハロゲン化物)、チオール反応性の試薬(例えば、ハロアセチル誘導体及びマレイミド)、及びカルボン酸反応性の試薬及びアルデヒド反応性の試薬が含まれる。CD20アンタゴニスト又は抗体ポリペプチドは、二官能性架橋試薬の使用によってペプチド薬剤に共有結合してもよい。ヘテロ二官能試薬はより共通して用いられており、2つの異なる反応性分子(例えば、アミン反応性とチオール、ヨードアセトアミド又はマレイミド)の使用によって、2つの異なるタンパク質のカップリングの制御が可能となる。このような連結剤の使用は公知技術である。例として米国特許第4671958号を参照。ペプチドリinkerもまた使用されてよい。あるいは、抗体又はイムノアドヘシンは、融合ポリペプチドの調製によってペプチド分子に連結されてもよい。

【0142】

種々の二官能性タンパク質カップリング剤の例は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステ

ルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートHCL等）、活性エステル（ジスクシンイミジルスベレート等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トリエン2, 6-ジイソシアネート等）、及びビス-活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼン等）を含む。

【0143】

11. 免疫リポソーム

ここで開示されている抗ペータ7インテグリン抗体は、免疫リポソームとして製剤化することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、脂質、リン脂質及び／又は界面活性剤を含む種々のタイプの小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含有するリポソームは、例えばEpstein等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 及び米国特許第4485045号及び同4544545号; 及び1997年10月23日に公開の国際公開97/38731に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第5013556号に開示されている。

【0144】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。

【0145】

本発明の抗体のFab'断片は、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬（ドキソルビシン等）は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

【0146】

12. 抗体産生のためのベクター、宿主細胞及び組換え法

本発明は、抗体産生のための核酸と組換え技術を含む、またここに記載の抗ペータ7抗体又はポリペプチド剤をコードする単離された拡散、ベクター及び宿主細胞を提供する。

【0147】

抗体の組換え生産のために、抗体をコードする核酸が単離され、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。別の実施態様では、抗体は、例えば、参照によって具体的に取り込まれる米国特許第5204244号に記載の通り、相同組換えによって産生され得る。モノクローナル抗体をコードするDNAは直ぐに単離され、常套的な手法を用いて(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用することによって)配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には、一般に、これらに制限されるものではないが、次のものの一又は複数が含まれる: シグナル配列、複製起点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列である(例えば、特に出典明示によりここに援用される米国特許第5534615号に記載)。

【0148】

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンズ及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びバシリ・リチエフォルミス(licheniformis)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710に開

10

20

30

40

50

示されたバシリ・リチェニフォルミス 41 P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌 294 (ATCC 31446) であるが、他の大腸菌 B、大腸菌 X1776 (ATCC 31537) 及び大腸菌 W3110 (ATCC 27325) のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

【0149】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗ベータ7インテグリン抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でこ
10
こで使用でき、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ；クルイベロマイセス宿主、例えば K. ラクティス、K. フラギリス (ATCC 12424)、K. ブルガリカス (ATCC 16045)、K. ウィッケラミイ (ATCC 24178)、K. ワルチイ (ATCC 56500)、K. ドロソフィラルム (ATCC 36906)、K. サーモトレランス、及び K. マルキシアナス；ヤローウィア (EP 402226)；ピチアパストリス (EP 183070)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア (EP 244234)；アカパンカビ；シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス；及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリポクラジウム、及びコウジカビ属宿主、例えば偽巢性コウジ菌及びクロカビ
20
が使用できる。

【0150】

グリコシル化抗ベータ7抗体の発現に適切な宿主細胞はまた多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウィルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポドプテラ・フルギペルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトゥス(蚊)、ドゥロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンビクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウィルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニカ NPV の L-1 変異体とボンビクス・モリ NPV の Bm-5 株が公に利用でき、そのようなウィルスは本発明においてここに記載したウィルスとして使用でき、特にスポドプテラ・フルギペルダ細胞の形質転換に使用できる。綿、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコの植物細胞培養をまた宿主として利用することができる。
30

【0151】

しかしながら、脊椎動物細胞における興味が最もあり、培養(組織培養)中の脊椎細胞の増殖は近年では常套的な手順になった。有用な哺乳動物宿主細胞の例は、SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651) で形質転換させたサル腎 CV1 細胞株；ヒト胚腎細胞系 (293 又は懸濁培養で成長するようにサブクローン化された 293 細胞、Graham 等, J. Gen Virol. 36:59(1977))；ベビーハムスター腎細胞 (BHK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980))；マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251(1980))；サル腎細胞 (CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト頸管腫瘍細胞 (HELA, ATCC CCL 2)；イヌ腎細胞 (MDCK, ATCC CCL 34)；バッファローラット肝細胞 (BR
40
L 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞 (Hep G2, HB 8065)；マウス乳房腫瘍細胞 (MMT060562, ATCC CCL 51)；TRI 細胞 (Mather 等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68(1982))；MRC 5 細胞；FS 4 細胞；及びヒト肝臓癌株 (Hep G2) である。

【0152】

宿主細胞は、抗ベータ7インテグリン抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。
50

【0153】

本発明の抗ペータ7インテグリン抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(Sigma)、最小必須培地((MEM),(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM),Sigma)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号; 同4657866号; 同4927762号; 同4560655号; 又は同5122469号; 国際公開第90/03430号; 国際公開第87/00195号; 又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

10

【0154】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は超遠心分離にかけて取り除く。Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH 3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌されている場合、そのような発現系からの上清は、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮する。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

20

30

【0155】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製され、アフィニティークロマトグラフィーが好ましい精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は抗体に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、又は $\gamma 4$ 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 [1983])。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト $\gamma 3$ に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 15671575 [1986])。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がCH3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物とを含む混合物に、約2.5-4.5のpHでの溶離バッファーを用いて、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、好ましくは低い塩濃度(例えば、約0-0.25M塩)で実施される。

40

50

【0156】

C. 薬学的製剤

本発明のポリペプチド、抗体又はアンタゴニストの薬学的製剤は、適当な純度を持つ所望の分子を任意の製薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. 編, (1980)）と、凍結乾燥した製剤又は水溶液の形態で混合することにより調製することができる。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、好ましくは用いられる投与量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び／又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

20

【0157】

ここでの製剤は、治療される特定の徴候のために必要ならば一以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものも含んでよい。そのような分子は、好適には、意図する目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

【0158】

活性成分もまた、例えばコアセルベーション法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれコロイド薬剤送達システム（例えば、リボソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンで、ヒドキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル、及びポリ-（メチルメタアシレート）マイクロカプセルに封入されうる。このような技術は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

30

【0159】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌されていなければならない。これは滅菌濾過膜を通して濾過することにより直ぐになされる。

【0160】

徐放性製剤を調整してもよい。徐放性製剤の適切な例として、抗体を含む固形疎水性ポリマーの半透性基質を上げることができ、この基質は、有形物、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態である。徐放性基質の例には、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリル酸）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3773919号）、Lグルタミン酸及びγエチル-L-グルタミンの共重合体、非分解性エチレン-ビニルアセテート、LUPRON DEPOTTM（乳酸-グリコール酸共重合体及びリユープロリド酢酸塩からなる注射可能な微粒子）のような、分解性の乳酸-グリコール酸の共重合体、並びにポリ-D-（-）3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレンビニルアセテート及び乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日に亘る分子の放出を可能にし、一方、特定のハイドロゲルは、それよりも短期間に亘ってタンパク質を放出する。カプセル封入された抗体は、体内に長時間留まるとき、37℃で水分に曝されることにより、変性又は凝集し、その結果生物学的活性を失い、場合によっては免疫原性に変化する。関与する機序に応じて、安定化のために合理的な戦略を講じることができる。例えば、凝集の機序が、チオージスルフィド交換により分子間S-S結合

40

50

の形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液の凍結、水分含有率の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマー基質組成物の開発により、安定化させることができる。

【0161】

D. 治療方法

本発明の抗ベータ7抗体のような、インテグリンベータ7アンタゴニスト（及び補助治療剤）は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、および局所的な免疫的抑制治療が望まれる場合には、その病巣内への与薬などを含む、あらゆる適した方法により投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下投与を含む。さらに、抗体は、特に減少させた抗体用量で、パルス注入によって適切に投与される。投与は、例えば、部分的には投与が簡潔か慢性的かに応じた、静脈内又は皮下注射のような注射のような任意の適切な経路によってなされる。

10

【0162】

本発明の抗体組成物は、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体とを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の本発明の抗体の量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1～99%で、或いは経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

20

【0163】

疾患の予防又は治療のために、本発明のベータ7アンタゴニストの適切な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの他の作用剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。ベータ7抗体のような、ベータ7アンタゴニストは一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約1mg/kg～15mg/kg(例えば0.1mg/kg～10mg/kg)の抗体を、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができる。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約1mg/kg～100mg/kg以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体の用量の例は、約5mg/kg～約50mg/kgの範囲であろう。ゆえに、約15mg/kg、20mg/kg、30mg/kg又は50mg/kgの一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば少なくとも週ごと又は2、3、4、5、6、7、8、10、12週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2～約20、例えば約6用量の抗体が投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約4mg/kgの初期負荷投与量の後、約2mg/kgの毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。治療の所望の結果に応じて、患者は少なくとも約1、2、6、12、24、36、又は52週間治療を受けてもよい。

30

40

【0164】

活性中・重傷活性UCの患者のケアの標準は、アミノサリチレート、経口コルチコステロイド、6-メリカプトプリン(6-MP)及び／又はアザチオプリンの標準投与量の治療を含む。ここに記載の抗ベータインテグリン抗体のようなインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療は、このような患者の標準的なケアによって達成されたものより優れた、疾患の寛解、及び／又は臨床応答の改善の結果となであろう。

50

【0165】

一実施態様では、IBDの患者の炎症性腸疾患（IBD）のための本発明の治療は抗ベータ7インテグリン抗体のような治療剤の治療的有効量の患者への投与、更には患者への免疫抑制剤、疼痛制御剤、止瀉薬、抗生物質、又はその組み合わせである第二の医薬の有効量の投与を含む。

【0166】

例示的な実施態様では、前記第二の医薬がアミノサリチレート、経口コルチコステロイド、6-メルカプトプリン（6-MP）及びアザチオプリンからなる群から選択される。別の実施態様では、前記第二の医薬は別の抗ベータ7インテグリン抗体又はサイトカインに対するアンタゴニストのような別のインテグリンベータ7アンタゴニストである。

10

【0167】

これらすべての第二の医薬は、第一の医薬とともに互いにならないしはそれら自体で組み合わせて用いてもよく、したがって、本明細書で用いる「第二医薬」なる表現は、それぞれ第一医薬以外の唯一の医薬であることを意味するものではない。したがって、第二の医薬は一つの医薬である必要はないが、一つ以上の薬剤からなるか、一つ以上の薬剤を含有する。

【0168】

本明細書中に記載の第二の医薬は一般に、ここに示したのと同じ用量および投与経路、またはここで用いられる用量の約1～99%量で用いられる。第二の医薬が多少なりとも用いられる場合、起こりうる副作用を除去するか減少するために、特に第一医薬の初回服用以降の後の投与において第一の医薬がない場合よりも少ない量で用いられるのが好ましい。例えば、この抗ベータ7インテグリン抗体を用いた治療はステロイドの漸減又は断続的投与を許容する。

20

【0169】

この併用投与には、別々の製剤又は単一の製剤を用いた共投与（同時投与）、及び好ましくは両（すべての）活性剤が生物学的な活性を同時に示す期間があるような何れかの順番での連続投与が含まれる。

【0170】

第二の医薬の併用投与には、別々の製剤又は単一の製剤を用いた共投与（同時投与）、及び好ましくは両（すべての）活性剤（医薬）が生物学的な活性を同時に示す期間があるような何れかの順番での連続投与が含まれる。

30

【0171】

E. ベータ7アンタゴニストを用いた炎症性腸疾患の治療の評価のためのバイオマーカーの使用

本発明は炎症性腸疾患の患者の治療のための、インテグリンベータ7アンタゴニストのような、治療剤（又は医薬）の効果、効能、安全性、予後、及び／又は投与の評価方法に関する。特に、本発明は、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球のレベルの使用、腸ホーミングリンパ球上の薬剤の占有率のレベルの使用、及び／又は炎症性腸疾患の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストのような、治療剤の効果、効能、安全性、予後、及び／又は投与の指標（「バイオマーカー」）としての腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターのレベルの使用に関する。このような方法は、例えば、一又は複数のこれらのバイオマーカーを使用したインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた炎症性腸疾患の治療に対する応答性の評価を含む。さらに、本発明は薬剤治療及び／又は治療計画、又は予後の設計のためのこのようなバイオマーカーの使用方法を提供する。

40

【0172】

幾つかの態様では、治療剤を用いた患者の治療の前のバイオマーカーのレベルを患者の治療中及び／又は治療後の同じバイオマーカーのレベルと比較し、患者のこのバイオマーカーのレベルの変化（例えば、増加又は減少）は例えば、患者の炎症性腸疾患の治療のためのベータ7インテグリンアンタゴニストのような治療剤の効果、効能、安全性、及び／又は予後を示す。さらに、本発明のこのような方法は、患者の炎症性腸疾患の治療のため

50

の薬剤治療又は投与計画を設計するために使用し得る。

【0173】

1. 応答性の予測及び／又は監視

一態様では、本発明は、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの効能を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管炎症性障害の治療のためのアンタゴニストの効能を示す方法に関する。

【0174】

別の態様では、本発明は、消化管炎症性障害を有する患者のインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する応答性を予測する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が前記アンタゴニストを用いた治療への前記患者の応答性を示す方法に関する。一の実施態様では、本発明は炎症性腸疾患と診断された患者がベータ7の投与を含む血用に対して応答するかどうかを予測するための方法を提供する。本発明は、治療前の腸ホーミングリンパ球の量を用いた治療後の患者の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量の比較を含み、ここで、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療後の増加量は、患者が治療に応答することを示す。

【0175】

患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上のインテグリンベータ7アンタゴニストの占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンアンタゴニストを含むバイオマーカーの量の測定は、ベータ7アンタゴニストの第一の投与がなされた直ぐ後のような、治療の過程における初期段階におけるベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する患者の応答性の予測に利点をもたらす。したがって、患者と患者の主治医は、なされた治療が患者に何らかの利益をもたらすかどうかを見出すために治療が完了するまで待つ必要がない。

【0176】

本発明の一実施態様では、ベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する応答性の予測方法は、a) 治療前の患者からの血液サンプルの獲得；b) 血液サンプル中のバイオマーカーの量の測定；c) 患者へのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与；d) インテグリンベータ7アンタゴニストの投与後の患者からの血液サンプルの獲得；e) 血液サンプル中のバイオマーカーの量の測定；f) b) におけるバイオマーカーの量とe) におけるバイオマーカーの量の比較を含む。e) とb) の間で量の増加が観察された場合、患者は治療に応答性があるであろう。

【0177】

バイオマーカーのベースライン治療前のレベルを設定するために、治療前の複数の点、例えば、治療前の少なくとも1、2、5、10、20、30、40日前におけられバイオマーカーの量を測定することが好ましい。例示的な実施態様では、患者の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量は、治療前の5、10、20、30、60日前に測定される。各点の測定量の平均値が計算され、腸ホーミングリンパ球の治療前のベースラインレベルとして使用されるであろう。

【0178】

インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する患者の応答性を予測するために、患者の血液中のバイオマーカーの量を、治療の過程の任意の点及び好ましくは治療の過程の初期の段階、例えば、限定するものではないが、第一の投与を患者が受けた後の約8時間、12時間、1、2、4、10、20、50、100、300又は500日、好ましくは第一の投与を患者が受けた後の1から50日で決定することができる。一実施態

様では、バイオマーカーの量は治療の過程の関心のある単一の点で測定される。測定した点における得られた値を、異なる点における別の値を得る治療前のベースラインのレベルと比較する。別の実施態様では、バイオマーカーの量は治療の過程において複数の時間点（例えば、少なくとも2、4、6、8、10、16、20、40点）において測定される。各点で得られた値は、各測定点の異なる値を得るための治療前のベースラインのレベルと比較することができる。治療に対する応答性は、これらの値の解析に基づいて評価されるであろう。

【0179】

腸ホーミングリンパ球は、例えば、フローサイトメトリー解析（FACS）等の当該分野で利用可能な技術を用いて、例えば、限定するものではないが、CD4、CD45RA及びベータ7のようなバイオマーカーの組み合わせの発現レベルによって同定される。これらのマーカーの異なる発現パターンのリンパ球のサブセット集団は、フローサイトメトリー（FACS）のような当該分野で使用される標準的な技術を使用して同定される。

【0180】

蛍光標示式細胞分取器（FACS）は、各細胞の特定の散乱光及び蛍光特性に基づき、生物学的な細胞の異種の混合物を、一度に一つの細胞の、2又はそれより多い容器に分離するための方法を提供する。それは、素早く、客観的及び定量的な、各々の細胞からの蛍光シグナル記録並びに特定の関心ある細胞の物理的な分離を提供するので有用な科学機器である。細胞懸濁液が、狭い、速い液体の流れの中央に取り込まれる。流れは細胞の直径に関連して細胞を大きく分離するために調整される。振動機構は、細胞の流れを各々の液滴に分離させる。システムは液滴に一以上の細胞が存在する可能性が低いように調整される。流れが液滴に分離する直前に、流れは、関心のある各細胞の蛍光特性が測定される蛍光測定部位を通過する。電気的な電荷リングが流れが液滴に分離する点にちょうど位置している。電荷は直前の蛍光強度測定に基づくリングにあり、液滴が流れから分離する際に反対電荷が液滴に補足される。荷電した液滴は、その電荷を基に液滴を容器に分離する電気的な偏向システムを通過して落下する。幾つかのシステムでは、電荷は直接流れに適用され、液滴の落下は、流れと同じサインの電荷を保持する。

【0181】

フローサイトメトリーで得たデータはヒストグラムを得るための一次元、又は二次元ドットプロット又は更に三次元にプロットしてもよい。これらのプロット上の領域は、「ゲート」と呼ばれるサブセット抽出のシリーズを作ることによって、蛍光強度を元に逐次的に分離してもよい。具体的なゲートの方法は診断及び臨床の目的のために存在する。プロットはしばしばログスケールで作成される。異なる蛍光試薬の発光スペクトルは重なるので、検出器は電氣的並びに演算的に相殺されるべきである。しばしば、フローサイトメトリーで得たデータは他の人々が使用するための機械を自由にした他の場所で再解析されてもよい(Loken MR. "Immunofluorescence Techniques in Flow Cytometry and Sorting": 341-53. Wiley. (1990)。

【0182】

典型的には、患者の血液サンプル中、末梢血CD4⁺リンパ球の3個のサブセットを、本発明のバイオマーカーを用いたフローサイトメトリーによって区別することができる：腸リンパ節及び組織に選択的にホーミングする、CD45RA⁻β7^高細胞、末梢リンパ節及び組織に選択的にホーミングする、CD45RA⁻β7^低細胞、及び腸及び末梢リンパ節及び組織に選択的に局在化しないCD45RA⁺β7^{中間体}細胞。このように、腸ホーミングリンパ球は少なくともCD4⁺CD45RA⁻β7^高によるか、又はフローサイトメトリーにおけるCD8⁺CD45RA⁻β7^高のような他の細胞表面マーカー又はその組み合わせによって同定することができる。これらのリンパ球の3個のサブセットは、FACS解析のドットプロット又はヒストグラムの離れた部位に位置し、したがって、当業者によって区別することができる。

【0183】

腸ホーミングリンパ球の量は、当該分野の種々の方法で定量することができる。プレ投

与時のベースラインのレベルのパーセントとしての絶対カウントは、患者から回収したサンプル中の各時間点における腸ホーミングCD4⁺リンパ球サブセットについて計算することができる。絶対リンパ球カウント（末梢血のマイクロリットル毎のリンパ球として表される血液学的測定から得られた値）、時間、各サブセットのゲートしたリンパ球のパーセント（フローサイトメトリー解析から得られた）と等しいリンパ球の各サブセットの絶対カウントも、計算することができる。また、腸ホーミングリンパ球は、投与前に得られたベースライン抗体カウントのパーセントとしての絶対カウントであり；プレ投与絶対カウントで割った抗体カウントとして計算される、抗体カウントによって定量することができる。コントロールとして、末梢血ホーミングリンパ球のようなリンパ球の他のサブセットの量を各時間点における同じサンプルについて定量することができる。

10

【0184】

腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンアンタゴニスト占有率の量及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターの量は、当該分野で知られ、本出願の実施例で開示される技術を使用して測定することができる。

【0185】

患者に対する有益な応答を提供するであろう治療は、患者の血液サンプル中の末梢ホーミングリンパ球の有意な増加なしに患者の血液中の腸ホーミングリンパ球の量を有意に増加すべきである。好ましくは、治療は、治療前の基底レベルと比較して、治療後の1、2、4、6、8、20、30、50、100日において、少なくとも約30%、50%又は1、2、3、4、又は5倍バイオマーカーの量を増加させる。

20

【0186】

別の態様では、本発明は、インテグリンベータ7アンタゴニストを投与した後の前記患者の血液サンプル中のバイオマーカーの量を治療前と比較することを含み、前記患者へのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与を含む、炎症性腸疾患と診断された患者の治療への有益な応答の見込みを予測するための方法を提供し、ここで、インテグリンベータ7アンタゴニストを投与した後の血液サンプル中の増加したバイオマーカーの量は、有益な応答の見込みを示す。

【0187】

治療への応答を予測する際のように、末梢血中のバイオマーカーの量は、長期間の有益な応答の見込みを予測するために使用することができる。有益な応答は、限定するものではないが、腹痛、嘔気、嘔吐、下痢、頻繁なボウル運動、熱、疲労及び体重減少のような、炎症性腸疾患に典型的な一又は複数の兆候の減少又は除去、又は疾患の部分又は完全寛解を含む。患者の血液サンプル中の腸ホーミングリンパ球の量は、ここに記載の同じ方法によって定量される。患者への長期間の有益な応答を提供する見込みがあるであろう治療は、末梢ホーミングリンパ球の量を有意に増加することなく末梢血中のバイオマーカーの量を有意に増加させるべきである。好ましくは、治療は治療前の基底レベルと比較して、比較するインテグリンベータ7アンタゴニストが患者に投与された後の1、2、4、6、8、20、30、50、100日後に、少なくとも約1、3、5、8、10倍バイオマーカーの量を増加する。

30

【0188】

更に別の実施態様では、本発明は、前記治療における前記患者の末梢血中のバイオマーカーの量の監視を含むインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する炎症性腸疾患と診断された患者の応答性を監視する方法を提供し、ここで、治療前と比較して維持され増加した量は、前記治療に対する応答性が維持されることを示す。特に、試験した患者のバイオマーカーの量の治療前のベースラインのレベルは、ここに記載の通り計算される。インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する患者の応答性を監視するために、患者の末梢血サンプル中のバイオマーカーの量は、治療の過程の任意の点、好ましくは、治療の過程を通して複数の点、において測定され得る。例えば、バイオマーカーの量は、治療の期間又は治療の所望の効能に応じて、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20日毎に測定される。中間の

40

50

イベントに対する反応における治療に対する応答性は、この方法を用いてまた監視することができる。例えば、患者の血液サンプル中のバイオマーカーの量は、第二の医薬の投与又は変更した投与量の開始、又は患者の肉体的又は精神的状態などの任意の変化の直後に測定することができる。理想的には、腸ホーミングリンパ球の維持され増加したレベルが、治療に対する維持された応答性のために観察されるはずである。バイオマーカーのレベルが治療の過程の幾つかの点において又は特定の中間のイベントに対する反応中に減少した場合、患者の治療に対する応答性が減少したことを示す。

【0189】

本発明はしたがって、a) 前記患者の上記の方法を用いた前記治療に対する応答性の監視；及びb) 増加した前記リンパ球の量が維持されるための前記治療の変更を含む、炎症性腸疾患と診断された患者のベータ7アンタゴニストを用いた治療を修正する方法をまた含む。

10

【0190】

本発明は患者の炎症性腸疾患の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与量又は投与計画を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画を用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することに基づいて、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与量を調節することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの投与又は投与計画に対する効能又は応答性を示す方法を含む。

20

【0191】

2. 治療計画の設計

薬剤の開発は複雑で高価な過程である。新薬を上市する費用は8億ドルから10億ドルと推察される。フェーズIの臨床試験の10%未満が承認される。後期の段階で医薬が失敗する2つの鍵である理由は投与－濃度応答と予期しない安全性の問題との関係の理解の不足である。この筋を考慮すると、どのように薬剤がインビボで機能し、臨床治療の候補の成功を支援するのかについての予測を補助することを可能にするツールを持つことは決定的である (Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK/PD Testing Drug Discovery & Development (2006))。

30

【0192】

薬物動態 (PK) は、薬剤の吸収、分配、代謝、及び排泄の性質を調べる。薬力学 (PD) は投与された薬剤に対する物理学的及び生物学的応答を定義する。PK/PDモデリングは、これら2つのプロセスの数学的及び理論的に連結し、薬剤の動態のより良い予測を補助する。統合PK/PDモデリングとシミュレーションを介した演算支援試験設計は、多くの薬剤開発プログラムに組み込まれ、影響が大きくなっている (Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK/PD Testing Drug Discovery & Development (2006))。

【0193】

PK/PD試験は、典型的には薬剤開発プロセスの全ての段階で実施される。開発は益々複雑、時間がかかり、コスト集約的になっているので、企業は、初期の段階で欠陥のある候補を除き、臨床上の成功の最良の機会を同定するために、PK/PDデータをより良い使用に注目している。(Lakshmi Kamath、上掲)。

40

【0194】

PK/PDモデリングアプローチは、バイオマーカー応答、薬剤レベル、及び投与計画の関係を決定する際に有用である。薬剤候補のPK/PDプロファイルとそれに対する患者の応答を予測する能力は、臨床試験の成功のために決定的である。分子生物学的技術における近年の進歩と種々の疾患に対する標的のより良い理解は、薬剤治療効果の良い臨床指標としてのバイオマーカーを有効にした。バイオマーカーアッセイは、薬剤候補に対する生物学的応答の同定を補助する。バイオマーカーが臨床的に有効であると確認されると

50

、試験シミュレーションは、効果的にモデル化され得る。バイオマーカーは薬剤開発の臨床結果のためにいつか代用され得る代理状態に達成する可能性がある（Lakshmi Kamath、上掲）。

【0195】

その末梢血中のバイオマーカーの量は、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する生物学的応答を同定するさいに使用され得、したがって、候補治療の治療的な効能の良い臨床上の指標として機能し得る。

【0196】

本発明は、前記候補剤を用いた治療に応答する非ヒト検体の末梢血中のバイオマーカーの量を効果的に増加する投与量に基づく患者のための効果的な投与量の決定を含む、炎症性腸疾患と診断された患者に対する候補薬剤を用いた治療の設計方法を含み、ここで、バイオマーカーは、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上の前記治療剤の占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターからなる群から選択される。

【0197】

例示的な実施態様では、a) 前記非ヒト検体へのインテグリンベータ7アンタゴニストの候補投与量の投与を含む候補治療に応答した非ヒト検体の血液サンプル中のバイオマーカーの量の測定；b) 候補投与量が、前記非ヒト検体の末梢血中のバイオマーカーの量を効果的に増加することができるかどうかの決定；c) 前記非ヒト検体の末梢血中のバイオマーカーの量を効果的に増加する投与量の同定；d) 同定した投与量に基づく患者に対する効果的な投与量の決定を含む、炎症性腸疾患と診断された患者に対するインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の設計方法。

【0198】

一実施態様では、本発明の方法はフェーズII及び／又はフェーズIIIの臨床試験における所望の有益な応答を潜在的に提供する候補の投与量を同定するために使用される。

【0199】

非ヒト検体の血液サンプルをフェーズI臨床試験における候補治療を受ける前に回収し、検体の末梢血中のバイオマーカーのベースラインレベルは、出願のセクションE1に記載された通りに確立される。試験した非ヒト検体は、次いで、試験した検体に対するインテグリンベータ7アンタゴニストの候補投与量の投与を含む候補治療を受ける。血液サンプルは、セクションE1に記載の通り治療の過程又は治療の終了後の任意の所望の時間点において検体から再び回収される。候補治療に対するバイオマーカーの量は、候補治療に対する治療前のベースラインと比較した量の違いを決定するために治療前のベースラインと最初に比較されるであろう。候補治療が、バイオマーカーの量の、例えば、少なくとも50%、1、2、3、5、8、又は10倍のような顕著な増加を引き起こす場合、該投与量は、フェーズII又はフェーズIII臨床試験における治療設計のための候補投与量として選択されるであろう。腸ホーミングリンパ球は、本出願のE1に定義され、当該分野の標準的な技術を用いて、特に、CD45AR、CD4（CD8）及びベータ7のような、細胞表面マーカー同定され得る。バイオマーカーの量は、当該分野で利用可能であり、セクションE1に記載されるアプローチを介して定量され得る。

【0200】

上記の工程は、候補治療の純度、特に候補投与量の純度の試験のために複数回使用され得る。試験した候補投与量中のリンパ球の量の最適な増加を引き起こす候補投与量が、フェーズII又はIII臨床試験における治療設計のために選択されるであろう。一実施態様では、同じ非ヒト検体が、候補投与量の純度の各々について試験され得る。候補治療の終了後、治療の残留効果は、本出願の方法を用いて、例えば、バイオマーカーの量が治療前の基底レベルに戻るかどうかを試験することによって、調べるであろう。バイオマーカーの量が、治療前の基底レベルに戻った後、別の候補治療が、腸ホーミングリンパ球に対するその影響を調べるために同様の検体に送達され得る。別の実施態様では、各検体に対するそれぞれの候補治療に伴う、候補治療の純度は、同時に複数の検体について試験され

てもよい。複数の検体が同じ治療に応答する検体における個々の差異を除くために同じ候補計画に対して試験される必要があり得る。

【0201】

フェーズ I 臨床試験から選択された候補投与量は、限定されるものではないが、PK/PDモデリングを含む当該分野の標準的なアプローチを用いたフェーズ II 及び III 臨床試験のための最良の投与量の設計のために仕様されるであろう。薬剤開発における伝統的な PK/PD モデリングは、薬剤投与濃度、薬剤暴露効果、薬剤半減期、時間に対する薬剤濃度、及び時間に対する薬剤効果のようなパラメーターを定義する。より広義に使用する場合、薬剤モデリング、疾患モデリング、試験モデリング、及びマーケットモデリングのような定量技術は、全開発過程を支援し得、リスクの明確な考慮と知識のよりよい使用を通じたより良い決定の結果となる。

10

【0202】

F. 他の候補試薬の治療への応答に対するバイオマーカー

バイオマーカーの量は、インテグリンベータ7アンタゴニスト以外の候補治療剤を用いた治療に対する応答性を予測するために使用され得る。特に、ここに記載のインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の結果を予想する方法は、1) 患者に対する候補薬剤の投与を含む治療に対し、患者が応答性があるかどうかの予測；2) 治療の有効性の見込みの予測；3) 治療に対する患者の応答性の監視；及び4) 候補治療剤を用いた治療の修正、に対し同様の方法で使用され得る。バイオマーカーの量は、上記の方法を用いたインテグリンベータ7アンタゴニスト以外の候補治療剤を用いた治療を設計するために使用され得る。

20

【0203】

好ましくは、候補薬剤は、炎症性腸疾患の患者に、ここに記載の免疫抑制剤のような有益な効果を提供する。より好ましくは、薬剤は、直接又は間接的に、患者の腸への腸ホーミングリンパ球の浸入を阻害する。

【0204】

G. 予後の予測

治療に対する応答性の予測に加え、バイオマーカーの量もまた炎症性腸疾患の予後の予測に有用である。

【0205】

本発明はしたがって、a) 腸ホーミングリンパ球の量と前記患者の血液サンプル中の末梢ホーミングリンパ球の量の比率の測定；及びb) 腸ホーミングリンパ球の量と健常者の血液サンプル中の末梢ホーミングリンパ球の量の比率の測定を含む、患者の炎症性腸疾患の予後の予測方法を含み、ここで、健常者と比較して前記患者の変化した比率は疾患の予後を指示する。

30

【0206】

予後を予測するために、健常者の幾つかの血液サンプルを得る。腸ホーミングリンパ球、具体的には $CD45RA - \beta 7^{\text{高}}$ $CD4^{+}$ 細胞の量は、本発明の方法で測定される。末梢ホーミングリンパ球 ($CD45RA - \beta 7^{\text{低}}$ $CD4^{+}$) の量はまた血液サンプル中で測定される。腸ホーミングリンパ球の量と末梢ホーミングリンパ球の量の比は次いで各血液サンプルについて計算される。健常者の平均ベースライン比は、各健常者の比に基づいて決定される。ベースライン比は、調べた患者の減少した比が観察されるかどうかを推測するためのコントロールとして使用されるであろう。血液サンプルは次いで試験した患者から得られ、腸ホーミングリンパ球の量と末梢ホーミングリンパ球の量の比が計算される。ベースラインコントロールと比較して、患者の比において有意な変化（増加又は減少）、例えば、少なくとも約30%、50%、100%、200%の変化が観察された場合、患者は例えば、寛解の可能性が低く、再発、増強、又は薬剤耐性の可能性が高いといった、悪性の予後であろう。

40

【0207】

H. リンパ球集団の同定方法

50

ヒト化抗ベータ7インテグリン抗体、r h u M A b ベータ7は、その結合パートナーに関係なくベータ7インテグリンサブユニットに結合する。したがって、r h u M A b ベータ7は、それが単独の場合、又はアルファ4又はアルファEと結合している場合、ベータ7に結合する。したがって、抗体とその変異体は、アルファEベータ7インテグリン及び／又はアルファ4ベータ7インテグリンを発現するリンパ球を含むリンパ球の集団を同定するために良いマーカーである。好ましい実施態様では、同定したリンパ球の集団は、アルファEベータ7インテグリンを発現するリンパ球、アルファ4ベータ7インテグリンを発現するリンパ球、アルファ4ベータ7インテグリンとアルファEベータ7の両者を発現するリンパ球を含む。これは当該分野の既知の抗ベータ7抗体、例えば、アルファ4に連結した際、ベータ7だけに結合する、a c t 1 (Meenan等、上掲)とは異なる。

10

【0208】

本発明は、アルファEベータ7インテグリン及び／又はアルファ4ベータ7を発現するリンパ球を含み、前記リンパ球の、配列番号：10の軽鎖可変領域、及び配列番号：11の重鎖可変領域を含む抗体の、同じエピトープに結合する単離された抗体への結合を含むリンパ球の集団を同定する方法に関する。

【0209】

一実施態様では、本発明の方法は、患者の末梢血中のベータ7を発現するリンパ球を同定するために使用される。特に、患者の末梢血サンプルを回収し、アルファEベータ7インテグリンを発現する細胞、アルファ4ベータ7インテグリンを発現する細胞及び両者を発現する細胞を含むリンパ球集団を、ベータ7、C D 4 5 及び C D 4 5 A R を細胞表面マーカーとして用いたフローサイトメトリーを使用して同定し、単離することができる。

20

【0210】

別の実施態様では、本発明の方法は、患者の腸のリンパ節及び組織の、アルファEベータ7インテグリンを発現する細胞及びアルファ4ベータ7インテグリンを発現する細胞を含むリンパ球集団を当該分野で使用される定法、例えば、r h u M A b ベータ7を用いた免疫組織染色によって可視化するために使用される。

【0211】

ここに記載の方法は、炎症性腸疾患の発生と進行に密接に関連するリンパ球集団を検出するために特に有用である。同定された集団、特に患者の末梢血から得た集団を、治療に対する患者の応答性を予測する際にバイオマーカーとしてだけでなく、セクションE及びFにおいて記載した通り治療計画を設計する際にも使用することができる。

30

【0212】

上記の文書による明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。寄託した実施物は、本発明のある側面の一つの例示として意図されており、機能的に等価なあらゆるコンストラクトがこの発明の範囲内にあるため、寄託されたコンストラクトにより、本発明の範囲が限定されるものではない。ここでの物質の寄託は、ここに含まれる文書による説明が、そのベストモードを含む、本発明の任意の側面の実施を可能にするために不十分であることを認めるものではないし、それが表す特定の例証に対して請求の範囲を制限するものと解釈されるものでもない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

40

【0213】

具体的な問題又は状況に対する本発明の教示の出願は、ここに含まれる教示に照らし当該分野の一般的な技術を有する者の能力の範疇であろう。

【0214】

本発明の更なる詳細は、以下の非限定の実施例によって示される。明細書の全ての引用文献の開示は、参照によりここに明確に取り込まれる。

【実施例】

【0215】

実施例1

50

薬物動態学的効果の逆転の評価のための15週回復段階と伸展段階のカニクイザルにおける静脈内及び皮下注射によって週毎にr h u M A b ベータ7を投与した12週安全性と毒物動態学試験

【0216】

1. 概要

r h u M A b ベータ7は、インテグリン $\alpha E \beta 7$ と $\alpha 4 \beta 7$ に結合するヒト化抗ヒトインテグリンベータ7モノクローナル抗体である。これらのインテグリンを発現する細胞は、潰瘍性大腸炎及びクローン病(Feagan等2005; Sandborn et al. 2005)のような腸の炎症性疾患に関連する。r h u M A b ベータ7は、炎症性腸疾患のような疾患を介した免疫系の潜在的な治療として調べられている。この試験の目的は、カニクイザル(Macaca fascicularis)に少なくとも12週間、静脈内(IV)又は皮下(SC)投与によって週毎に投与した際の、r h u M A b ベータ7の安全性、毒物動態、及び薬物動態を評価し、15週の回復の後の任意の薬剤関連効果の可逆性、耐性、及び発生の遅延を評価することである。さらに、コントロール、中間、及び高投与のグループの動物のサブセットを、薬物動態効果の逆転を評価するために解剖前(伸展段階)の付加的な期間に観察した。

【0217】

ナীবの カニクイザルは、6個のグループ(グループ1、3、4、5中の7の動物/性/グループ、グループ2中の6及び5の動物/性)に指定される。グループ1の動物は、IV及びSC投与によってビヒクルを合計12回、週毎に投与した。グループ2から6中の動物に、合計12回、週毎にr h u M A b ベータ7を、それぞれ、5mg/kgのIV(グループ2)、15mg/kgのIV(グループ3)、50mg/kgのIV(グループ4)、15mg/kgのSC(グループ5)、又は50mg/kgのSC(グループ6)のIV投与した。12週の投与段階の後に続いて、各投与グループから3匹の雄及び3匹の雌を、最終投与の2日後の実験80日目に解剖した。残りの動物は、回復段階中の更なる15週において観察した。回復段階の終わりにおいて(実験184日)、2匹の性/グループを解剖した。15週の回復解剖の後、残りの動物(グループ1及び3のそれぞれの2匹の雄及び1匹の雌並びにグループ4、5、及び6のそれぞれの2匹の雄及び2匹の雌)を、PD効果の逆転を評価するために観察した。PDの終点は、この伸展段階において監視し、結果を実験の生存段階の終点を決定するために使用した。

【0218】

ホーミングの特性によって分割される末梢血CD4⁺の3個のサブセットは、診査のPDマーカーとしてフローサイトメトリーによって監視された: CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{高}}$ 、CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{低}}$ 、及びCD45RA⁺ $\beta 7^{\text{中間体}}$ CD4⁺細胞(図1を参照)。CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺細胞は末梢リンパ節及び組織に選択的にホーミングするヒト及びマウスメモリー/エフェクターリンパ球にフェノタイプが類似している(Rott等1996; Rott等1997; Williams等1998; Rose等1998; Williams and Butcher 1997; Butcher等1999)。

【0219】

CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球のグループ平均値は、5mg/kgのr h u M A b ベータ7のIV投与後の投与段階中、ベースラインレベルの約4から5倍増加した。15mg/kg又は50mg/kgのr h u M A b ベータ7(IV又はSC)の投与は、ベースラインと比較して、投与段階において、CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球のグループ平均数のわずかに大きい増加(約5から6倍)の結果となった。一般的に、15又は50mg/kg(IV又はSC)を投与した動物の多数は、5mg/kgの投与量のグループ中の動物の多数と異なり、投与過程においてPD効果を維持した。ビヒクルを与えた動物は、末梢血CD45RA⁻ $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球のグループ平均数の有意な変化を示さなかった。CD45RA⁺ $\beta 7^{\text{中間体}}$ CD4⁺リンパ球とCD45RA⁻ $\beta 7^{\text{低}}$ CD4⁺リンパ球のグループ平均数は、ビヒクル又はr h u M A b ベータ7を投与したカニクイザル中での有意な差はなかった。これらの結果は、r h u M A b ベータ7の提案された作用機序、すなわち、 $\alpha 4 \beta 7$ のそのリガンドへの結合を阻害することを介した、腸

への $\beta 7$ ポジティブリンパ球のホーミングの阻害に一致する。この提案された機序は、末梢循環中のCD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球の蓄積の結果になると予測される。

【0220】

15週の回復段階（試験184日目）の終わりまでに、CD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球の数は、5mg/kgのrhMABベータ7のグループIVの投与量における全ての（10中10）のベースラインレベルに回帰した。15mg/kg又は50mg/kgのrhMABベータ7をIV投与したグループでは、CD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球の数は、それぞれ、13匹の動物中の7匹及び14匹の動物中の2匹がベースラインレベルまで回帰した。15mg/kg又は50mg/kgのrhMABベータ7をSC投与したグループでは、CD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球の数は、それぞれ、14匹の動物中の6匹及び14匹の動物中の1匹がベースラインレベルまで回帰した。このように、CD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球の絶対数のベースラインレベルへの回帰速度は、投与量に依存しているようだ。PD伸展段階（試験288日目）の終わりまでに、rhMABベータ7の投与し試験中生存した全てのカニクイザル（15mg/kgのIV投与したグループでn=3及び50mg/kgのIV、15mg/kgのSC、又は50mg/kgのSC投与したグループの各々でn=4）、はPD効果の逆転（CD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球のベースラインへの回帰）を示した。

10

【0221】

さらに、観察された可逆性及びCD45RA- $\beta 7^{\text{高}}$ CD4⁺リンパ球のベースラインレベルへの回帰が、rhMABベータ7のクリアランスと関係し、可逆性が投与依存的であったようなので、PD効果は薬物動態と関連するようであった。

20

【0222】

プレ投与レベルへのPD効果の回帰速度について同じ投与グループの動物間の変動性は、rhMABベータ7のクリアランスの変化に関係した。

【0223】

2. 安全性、毒物動態及び薬力学

カニクイザル（*Macaca fascicularis*）に少なくとも12週間、静脈内（IV）又は皮下（SC）投与によって週毎に投与した際の、rhMABベータ7の安全性、毒物動態、及び薬物動態を評価し、15週の回復の後の任意の薬剤関連効果の可逆性、耐性、及び発生の遅延を評価した。さらに、コントロール、中間、及び高投与のグループの動物のサブセットを、薬物動態効果の逆転を評価するために解剖前（伸展段階）の付加的な期間に観察した。

30

【0224】

2. 1 実験材料

150mg/mL（バイアル毎の1.3mL）の濃度の透明液体として、rhMABベータ7、Lot M3TOX165はジェネンテックから提供された。実験に使用する前に、試験薬剤は2℃から8℃の範囲の温度を維持するように設定された冷蔵庫に保存した。

【0225】

25mLのバイアル中の透明液体として、rhMABベータ7ビヒクル、Lot M3TOX166はジェネンテックから提供された。実験に使用する前に、試験薬剤は2℃から8℃の範囲の温度を維持するように設定された冷蔵庫に保存した。

40

【0226】

2. 2 種

モーリシャス起源の雄と雌のナイーブのカニクイザル（*Macaca fascicularis*）は、Covance Research Products, Inc. (Harrisburg, PA)から取得した。動物は投与前約4週間順応させた。

【0227】

7匹の雄と47匹の雌の動物は、この実験において使用する可能性があるために最初に順応させた。順応中（投与前段階）において収集したデータを、最小の変動にするために

50

、実験選択の考慮から動物を取り除くために使用した。40匹の雄と40匹の雌のカニクイザルをグループに関して体重バランスを達成するために設計したコンピュータ化された処理を用いて実験のために指定した。

【0228】

2. 3 実験設計

この実験は3段階を含む：12週の投与段階、15週の回復段階、及び伸展段階。12週の投与段階は、rhMABベータ7を最終投与した2日後の、実験80日目の解剖において終了した。15週の回復段階は、12週の投与段階に続き、実験184日目の解剖で終了した。15週の回復段階に続き、PD効果の逆転を評価するために付加的な期間（実験288日目を通じた伸展段階）があった。完全な実験設計は、表1に要約した。

10

表1
試験要約

グループ	投与経路	No./Sex ^a	投与レベル ^b (mg/kg/dose)	投与濃度 ^b (mg/mL)	投与量 ^b (mL/kg/dose)
1 (コントロール) ^c	IV/SC	7/M, 7/F	0	0	0.33
2 (低)	IV	5/M, 5/F	5	15	0.33
3 (中間)	IV	7/M, 7/F	15	45	0.33
4 (高)	IV	7/M, 7/F	50	150	0.33
5 (中間) ^d	SC	7/M, 7/F	15	45	0.33
6 (高) ^d	SC	7/M, 7/F	50	150	0.33

20

IV = 静脈内；SC = 皮下。

30

^a 12週の投与段階（最終投与の2日後）に続き、3匹の動物／性／グループを安楽死させた。グループ4、5、及び6からの2匹の動物／性／グループとグループ1と3からの2匹の雄及び1匹の雌の動物／グループをPD効果の逆転を評価するための解剖の前の付加的な期間に観察した。PD終点は伸展段階の間に監視し、結果を終了のタイミングを決定するために使用した。

^b 実験日1、8、15、22、29、36、43、50、64、71、及び78日目に動物に投与した。

^c グループ1の動物はIV及びSC投与によってビヒクル（コントロール）を投与した。

^d グループ5及び6はMABベータ7のSC注射のみ行った。

40

【0229】

2. 5 投与

動物は、実験日1、8、15、22、29、36、43、50、64、71、及び78日目に伏在静脈又はSC注射で12回の週毎IV注射を行った。SC投与の注射部位は記録した。投与量は直前に記録した体重を基に決定した。動物は体重のkg毎に0.33mLの用量で投与した。IV投与の後に約1mLの食塩水でフラッシュした。

【0230】

これらの偏差は記録して、PD結果の解釈に影響を与えなかった。

【0231】

2. 6 PD血液サンプル回収

実験1日目、実験2日目（第一の投与の24時間後）の投与前、実験15、29、43

50

、57、71、及び78、及び80日目の投与前、解剖前のPD解析のための血液サンプル（約1mL）を静脈穿刺によってそれぞれの動物の大腿静脈からプレ投与段階で1度回収した（投与開始の約6日前）。15週の逆転段階（R）の間、サンプルは実験の92（R13）、106（R27）、120（R41）、134（R55）、148（R83）、及び184（R105）日目に回収した。伸展段階において、PD効果の逆転を評価するために、実験の190日目（R111）から開始し、最後の解剖の日（実験288日目）まで、血液サンプルを、隔週で、生存している全ての動物から回収した。

【0232】

2.7 血液サンプル加工

PD解析のサンプルは少なくとも72時間、約2℃から15℃の温度範囲に維持し、回収した日にジェネンテックに輸送するために、冷蔵ゲルパックにパックした。

【0233】

2.8 PDフローサイトメトリー

末梢血CD4⁺リンパ球のサブセットは、診査のPDバイオマーカーとしてフローサイトメトリーにより評価した。CD45RA⁻β7^高細胞（腸リンパ節及び組織に選択的にホーミングするヒトメモリー／エフェクターCD4⁺リンパ球にフェノタイプが類似）、CD45RA⁻β7^低細胞（末梢リンパ節及び組織に選択的にホーミングするヒトメモリー／エフェクターCD4⁺リンパ球にフェノタイプが類似）（Rott et al. 1996; Rott et al. 1997; Williams et al. 1998; Ros? et al. 1998; Williams and Butcher 1997; Butcher et al. 1999）。CD4⁺リンパ球サブセットの代表的なフローサイトメトリープロットを図1に示す。末梢血CD8⁺リンパ球（CD45RA⁻β7^高、CD45RA⁻β7^低、CD45RA⁺β7^{中間体}CD8⁺リンパ球）のサブセットを類似の方法で調べたが、PD評価には用いなかった。

【0234】

2.8.1 発現アッセイ：末梢血中のβ7発現リンパ球の評価

CD45RA⁻β7^高、CD45RA⁻β7^低、及びCD45RA⁺β7^{中間体}CD4⁺またはCD8⁺リンパ球をrhMABベータ7の存在下β7に結合する非ブロッキング抗β7抗体（9D8）を用いてフローサイトメトリーによって評価した。全血サンプルの解析のためのパネル配置を表2に示した。Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)から購入した、ストレプトアビジンアロフィコシアニン（SAAPC）及びジェネンテックから提供された9D8ビオチンを除く、全ての抗体はBD Biosciences (BD; San Jose, CA)から購入した。

【0235】

表2
β7発現リンパ球測定のための全面パネル配置

試験管	抗原マーカー及び蛍光色素	同定された細胞型
1	IgG-FITC, IgG-PE, CD4-PerCP-Cy5.5, SA-APC	マーカーを設定するためのSSCとFSC上の数をゲートするために使用するアイソタイプ
2	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD4-PerCP-Cy5.5, 9D8-ビオチン/SA-APC ^a	CD4 ⁺ リンパ球のα4及びβ7発現細胞サブセット
3	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD8-PerCP-Cy5.5, 9D8-ビオチン/SA-APC ^a	CD8 ⁺ リンパ球のα4及びβ7発現細胞サブセット

A P C = アロフィコシアニン ; F I T C = 蛍光イソチオシアネート ; F S C = 前方散乱 ;
I g G = イムノグロブリン G ; P E = フィコエリセリン ; P e r C P - C y 5 . 5 = ペリ

ジニクロロフィルタンパク質-シアニン-5.5; SA=ストレプトアビジン; SSC=側方散乱。

^a 9D8-ビオチンは、SA-APCを添加する前に最初にインキュベートした。

【0236】

全ての全血液サンプルについて、55656-43の手順に従ってフローサイトメトリーを行った。それぞれのサンプルについて、試験管2及び3を飽和濃度の9D8ビオチンと共に最初にインキュベートした。機器のセットアップコントロールチューブ（アイソタイプコントロールと単一株）及びアッセイチューブ（試験管1、2、及び3）を手動で準備した。最初のインキュベーションの後、2mLの溶解溶液を赤血球細胞を溶解するために添加し、細胞洗浄を1サイクル行った。第2のインキュベーションについて、サンプル（試験管2及び3）を、CD45RA（クローン5H9）及びCD49d（クローン9F10）と共に、飽和濃度のCD4（クローンL200）（試験管2）またはCD8（クローンSK1）（試験管3）に対する蛍光コンジュゲートモノクローナル抗体とインキュベートした。アイソタイプコントロール抗体を除き、上記で述べた抗体のそれぞれは、カニクイザル白血球と交差反応する。SA-APCは、またビオチン化した抗体を検出するために試験管1、2、及び3に添加した。インキュベーションは30から3033330分間氷上暗室で行った。洗浄ステップを連続して行い、次いで細胞を固定バッファーに再懸濁させた。サンプルは、2℃から4℃で最小30分間保持し、同日に得た。

10

【0237】

フローサイトメトリーは、FACSCalibur（登録商標）（BD、シリアル番号E2020）で行った。25000リンパ球イベントを、前方散乱（FSC）／側方散乱（SSC）プロットを用いて得た。データ解析は、CellQuest Proソフトウェア（PD CellQuest Pro、バージョン5.2.1）を用いて、FSC／SSCでゲートしたリンパ球及びCD4⁺／SSC^低でゲートしたリンパ球又はCD8⁺／SSC^低でゲートしたリンパ球に基づいた。フローサイトグラムは、それぞれの細胞表面マーカーに陽性の細胞の画分を確立するために得た。

20

【0238】

β7亜集団は、幾何学平均蛍光強度（GMFI）として、個別に、ゲートしたCD4⁺細胞又はゲートしたCD8⁺細胞のパーセンテージとして解析した。CD4⁺及びCD8⁺細胞の細胞表面上のβ7の相対レベルを解析するために、可溶性蛍光分子数（MOEF）をSpheroTechビーズ（SpheroTech, Inc.; Lake Forest, IL）を用いて得た標準曲線を用いて各集団のGMFIを積算することによって計算した。GMFIとゲートした細胞のパーセンテージは、3つのCD4⁺及びCD8⁺リンパ球サブセットのそれぞれの被験物質の効果を調べるための実験を通じて監視した。絶対細胞カウントはそれぞれの時間点においてそれぞれのサンプルについて、末梢血のマイクロリットル毎のリンパ球のカウントに基づいて計算した（Covanceによって提供される）。

30

【0239】

2.8.2 占有率アッセイ：末梢血における利用可能なCD45RA⁻β7^高リンパ球CD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球とCD45RA⁻β7^高CD8⁺リンパ球上の占有率は、rhumaβ7の飽和濃度の存在下で結合しないブロッキング抗β7抗体（蛍光ラベルした被験物質、rhumaβ7）を用いて測定した。蛍光コンジュゲートしたハーセプチン、ヒト化IgG1抗体をrhumaβ7のアイソタイプのコントロールとして使用した。

40

【0240】

全血サンプルの解析のためのパネル配置は表3に示した。ジェネンテックから提供される、ハーセプチンアレクサ647及びrhumaβ7アレクサ647を除いて、全ての抗体はBDから購入した。

表3
リンパ球上の $\beta 7$ の占有率を測定するための全血パネル配置

試験管	抗原マーカー及び蛍光色素	サンプルの特性	
1	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, Her-Alx647	rhuMAbベータ7のアイソタイプコントロール として使用するHer-Alexa647	
2	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb ベータ7-Alx647	不飽和、 $\beta 7$ の占有率を検出するため	10
3	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb ベータ7-Alx647	10 μ g/mLのrhuMAbベータ7で飽和	

Alx647 = アレクサ 647 ; F I T C = 蛍光イソチオシアネート ; H e r = ハーセプチン ;
P E = フィコエリテリン ; P e r C P = ペリジニクロロフィルタンパク質。

【0241】

以下の抗体コンジュゲートの飽和濃度を用いて、処理55656-50にしたがって血液サンプルを染色した：蛍光イソチオシアネートにコンジュゲートしたCD4 (F I T C ; クローンM-T477)、フィコエリテリンにコンジュゲートしたCD45RA (P E ; クローン5H9)、P e r C PにコンジュゲートしたCD8、及びアレクサ647にコンジュゲートしたハーセプチン又はアレクサ647にコンジュゲートしたrhuMAbベータ7。試験管3中、rhuMAbベータ7を飽和濃度(10 μ g/mL)において末梢血サンプルに添加した。

【0242】

全てのインキュベーションは30から35分間暗室氷上で実施した。染色後、赤血球細胞を溶解し、サンプルを洗浄し、細胞をLyse Wash Assistant (BD)固定液に再懸濁した。25000のゲートしたリンパ球イベントをF S C / S S Cゲートを用いてBD F A C S C aliburで得た。

【0243】

リンパ球は、S S C / F S C 散布図から同定した。CD4及びCD8細胞は次いでそれぞれS S C / C D 4 F I T C 又はS S C / C D 8 P e r C Pプロットを使用して同定した。試験管1はゲートのためのネガティブコントロールとして使用した。CD45RA- $\beta 7$ 高、CD45RA- $\beta 7$ 低、及びCD45RA- $\beta 7$ 中間体CD4細胞又はCD8細胞は、飽和濃度のrhuMAbベータ7の存在下及び非存在下の試験管を用いて同定した。図1はカニクイザル末梢血中のCD4リンパ球サブセットを示す。

【0244】

2. 9PDデータ解析

プレ投与時のベースラインレベルのパーセンテージとしての絶対カウント(絶対カウント、%BL)を、ビヒクル又はrhuMAbベータ7を与えた動物から得たサンプル中の各時間点における、CD4⁺リンパ球(CD45RA- $\beta 7$ 高、CD45RA- $\beta 7$ 低、及びCD45RA+ $\beta 7$ 中間体)及びCD8⁺リンパ球サブセット(CD45RA- $\beta 7$ 高、CD45RA- $\beta 7$ 低、及びCD45RA+ $\beta 7$ 中間体)のそれぞれについて計算した。ベースラインのパーセンテージとしての、各絶対カウントの平均値は、それぞれのグループについて決定した。雌については、2個のプレ投与値は、全てのフローサイトメトリ評価についてベースライン値を計算するために使用した。雄について、技術的な困難(機器の欠陥)のため、一のプレ投与値のみ(試験1日目)を9D8非ブロッキング抗体を用いた発現アッセイのベースライン値を計算するために使用した。表3に表示される血

液パネル位置を用いたフローサイトメトリー解析から（パーセンテージとして）得た全CD4⁺リンパ球と全CD8⁺リンパ球についてのゲートした値は、占有率と発現アッセイの両者において、それぞれ、全CD4⁺リンパ球と全CD8⁺リンパ球の絶対カウントを計算するために使用した。図1はカニクイザル末梢血中のCD⁺リンパ球サブセットを示す。フローサイトメトリーによって決定される値の定義は以下の通りである：

絶対カウント：リンパ球のそれぞれのサブセットの絶対カウント；絶対リンパ球のカウント（末梢血のマイクロリットル毎のリンパ球として表される血液学測定から得た値）に等しくそれぞれのサブセットのゲートしたリンパ球のパーセンテージをかける（フローサイトメトリーから得た）。

絶対カウント（%BL）：投与前に得たベースラインAbsカウントのパーセンテージとしての絶対カウント；プレ投与絶対カウントで割るAbsカウントとして計算される。

MOEG：等しい蛍光の分子；FL4チャンネルの傾きを幾何学平均蛍光強度にかけて計算される

MOEF（%プレ投与）：投与前のMOEFのパーセンテージとしてのMOEF；投与前の平均MOEFで割った投与後のそれぞれの時間点におけるMOEFとして計算される。

【0245】

3. 結果と考察

非ブロッキング9D8抗体と共に評価した末梢血CD4⁺リンパ球のサブセットのグループ平均（±SD）と各々のカニクイザル絶対カウント（%BL）は、図2-7に示した。

【0246】

CD45RA-β7^高CD4⁺リンパ球のグループ平均数は5mg/kgのrhMAbベータ7（図2を参照されたい）のIV投与後のベースラインレベルより約4から5倍増加した。15mg/kg又は50mg/kgのrhMAbベータ7（IV又はSC）の投与は、ベースラインレベル（図2及び3を参照されたい）と比較して、CD45RA-β7^高CD4⁺リンパ球のグループ平均数のわずかに大きな増加の結果となった。一般的に、15又は50mg/kg（IV又はSC）を投与した動物の多数は、5mg/kgの投与量のグループ（、図14から18）中の動物の多数と異なり、投与過程においてPD効果を維持した。ビヒクルを与えた動物は、CD45RA-β7^高CD4⁺リンパ球のグループ平均数の有意な変化を示さなかった（図2及び3を参照されたい）。CD45RA-β7^低CD4⁺リンパ球のグループ平均数は、25mg/kgのrhMAbベータ7をIV投与した後のベースラインレベルの約4から6倍増加した（図8を参照されたい）。

【0247】

これらの結果は、rhMAbベータ7の提案された作用機序、すなわち、腸へのCD45RA-β7^高リンパ球の移行の阻害による、末梢循環中のこれらの細胞の蓄積に一致する（図11）。提案された作用機序を支持する通り、rhMAbベータ7（図4から8）を投与した動物と比較し、ビヒクルを投与した動物中のCD45RA⁺β7^{中間体}CD4⁺リンパ球又はCD45RA-β7^低CD4⁺リンパ球のグループ平均レベルの有意な差はなかった（図4から8を参照されたい）。

【0248】

15週の回復段階（試験184日目）の終わりまでに、末梢血CD45RA-β7^高CD4⁺リンパ球の数は、5mg/kgのrhMAbベータ7のIV投与したグループの10中10の動物がベースラインレベルに回帰した（図14を参照されたい）。15mg/kg又は50mg/kgをIV投与したグループでは、末梢血CD45RA-β7^高CD4⁺リンパ球の数は、それぞれ、13匹の動物中の7匹及び14匹の動物中の2匹がベースラインレベルまで回帰した（図15から16を参照されたい）。15mg/kg又は50mg/kgをSC投与したグループでは、末梢血CD45RA-β7^高CD4⁺リンパ球の数は、それぞれ、14匹の動物中の6匹及び14匹の動物中の1匹がベースラインレベルまで回帰した（図17から18を参照されたい）。このように、観察されたPD効

果のベースラインへの回帰は投与依存的なようであった。わずかな変動性を示した（図13を参照されたい）1匹の動物を除いて、ビヒクルを投与した末梢血中のCD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球数の有意な変化はなかった（図13を参照）。

【0249】

PD伸展段階（試験288日目）の終わりまでに、rhUMAbベータ7を投与し試験中生存した全てのカニクイザル（15mg/kgのIV投与したグループでn=3及び50mg/kgのIV、15mg/kgのSC、又は50mg/kgのSC投与したグループの各々でn=4）、はPD効果の逆転（CD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球のベースラインへの回帰；図15から18を参照）を示した。また、末梢血CD8⁺リンパ球（CD45RA⁻β7^高、CD45RA⁺β7^低、CD45RA⁺β7^{中間体}CD8⁺リンパ球）のサブセットも調べ、類似の結果を得た。

10

【0250】

末梢血CD4⁺リンパ球上のβ7発現の相対レベルは、MOEFとして調べた。5、15、若しくは50mg/kgのrhUMAbベータ7のIV投与又は15若しくは50mg/kgのrhUMAbベータ7のSC投与後のカニクイザル中の末梢血CD4⁺リンパ球上のβ7の下方修正の証拠がなかった。

【0251】

結論として、末梢血のCD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球のベースラインのレベルへの回帰速度は、rhUMAbベータ7を与えたカニクイザル中で投与量依存的のようだ。また、15又は50mg/kg（IV又はSC）を投与した動物の多数は、5mg/kgの投与量のグループ中の動物の多数と異なり、投与過程においてPD効果を維持した。さらに、観察した可逆性とCD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球のベースラインのレベルへの回帰は、rhUMAbベータ7のクリアランスに関連し、投与依存的のようであるため、PD効果は、薬物動態学に関連するようだ。同じ投与グループの動物間のプレ投与レベルのPD効果の回帰速度の変動率は、rhUMAbベータ7のクリアランスの変化に関連した。これらのrhUMAbベータ7クリアランスの変化は、一般的に幾つかの動物中の抗治療の抗体（ATA）の存在と関連していた（図14-18参照；）。

20

【0252】

7. 結論

CD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球（フェノタイプが腸ホーミング細胞に類似）のグループ平均数は、カニクイザル中の5、15、又は50mg/kgのrhUMAbベータ7のIV又はSC投与後の、プレ投与レベルと比較して約4から6倍増加した。対照的に、ビヒクルを投与した動物は、試験第184日目を通じて末梢血CD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球のグループ平均数の有意な変化を示さなかった。

30

【0253】

これらの結果は、α4β7のそのリガンドへの結合阻害を介した、腸へのβ7ポジティブリンパ球のホーミングのrhUMAbベータ7阻害の作用機序に一致する。この提案された機序は、末梢循環中のCD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球の蓄積の結果となり、これは、実験で観察された。提案された作用機序を支持する通り、rhUMAbベータ7を投与した動物と比較し、ビヒクルを投与したカニクイザル中のCD45RA⁺β7^{中間体}CD4⁺リンパ球（フェノタイプがナイーブのCD4⁺細胞に類似）又はCD45RA⁻β7^低CD4⁺リンパ球（フェノタイプが末梢血ホーミングCD4⁺細胞に類似）のグループ平均レベルの有意な差はなかった。

40

【0254】

15週の回復段階（試験184日目）の終わりまでに、末梢血CD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球の数は、5mg/kgのrhUMAbベータ7のグループIVの投与量における全ての（10中10）のプレ投与レベルに回帰した。15mg/kg又は50mg/kgのrhUMAbベータ7を投与した動物では、末梢血CD45RA⁻β7^高CD4⁺リンパ球の数は、IVの投与グループの（それぞれ）13匹の動物中の7匹及び14匹の動物中の2匹及びSCグループの（それぞれ）14匹中6匹及び14匹中の1匹がプレ

50

投与レベルまで回帰した。PD 伸展段階（試験 288 日目）の終わりまでに、rh u M A b ベータ 7 を投与し試験中生存した全てのカニクイザルは PD 効果の逆転を示した。

【0255】

これらの見解は、末梢血中の CD 4 5 R A - β 7 高 CD 4 + リンパ球のベースラインレベルに戻る際の見かけの投与依存性を示す。さらに、rh u M A b ベータ 7 のクリアランスに関連する観察された可逆性と CD 4 5 R A - β 7 高 CD 4 + リンパ球の数のベースラインへの回帰 PD 効果は薬物動態学に関連するようであった。同じ投与量のグループにおける動物中のプレ投与レベルへの PD 効果の回帰速度における変動率は、幾つかの動物中の A T A の存在に関連する、rh u M A b ベータ 7 のクリアランスの変化に関連した。

【0256】

参考文献

1. Andrew DP, Berlin C, Honda S, et al. Distinct but overlapping epitopes are involved in $\alpha 4 \beta 7$ mediated adhesion to vascular cell adhesion molecule 1, mucosal adhesion molecule 1, fibronectin, and lymphocyte aggregation. *J Immunol* 1994;153:3847-61.
2. Butcher EC, Williams M, Youngman K, et al. Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 1999;72:209-53.
3. Cepek KL, Parker CM, Madara JL, et al. Integrin $\alpha 4 \beta 7$ mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol* 1993;150:3459-70.
4. Feagan BG, Greenberg GR, Wild G, et al. Treatment of ulcerative colitis with a humanized antibody to the $\alpha 4 \beta 7$ integrin. *N Engl J Med* 2005;352:2499-507.
5. Holzmann B, McIntyre BW, Weissman IL. Identification of a murine Peyer's patch specific lymphocyte homing receptor as an integrin molecule with an α chain homologous to human VLA-4. *Cell* 1989;56:37-46.
6. Hu MC, Crowe DT, Weissman IL, et al. Cloning and expression of mouse integrin p(7): a functional role in Peyer's patch specific lymphocyte homing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8254-8.
7. Rosenthal JR, Williams MB, Rott LS, et al. Expression of the mucosal homing receptor $\alpha 4 \beta 7$ correlates with the ability of CD8⁺ memory T cells to clear rotavirus infection. *J Virol* 1998;72:726-30.
8. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, et al. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule 1. Comparison with vascular cell adhesion molecule 1 and correlation with $\alpha 4 \beta 7$ integrins and memory differentiation. *J Immunol* 1996;156(10):3727-36.
9. Rott LS, Rosenthal JR, Bass D, et al. Expression of mucosal homing receptor $\alpha 4 \beta 7$ by circulating CD4⁺ cells with memory for intestinal rotavirus. *J Clin Invest* 1997;100:204-8.
10. Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005;353:1912-25.
11. Williams MB, Butcher EC. Homing of naive and memory T lymphocyte subsets to Peyer's patches, lymph nodes, and spleen. *J Immunol* 1997;159:1746-52.
12. Williams MB, Rose JR, Rott LS, et al. The memory B cell subset responsible for the secretory IgA response and protective humoral immunity to rotavirus expresses the intestinal homing receptor, $\alpha 4 \beta 7$. *J Immunol* 1998;161:4227-35.

【0257】

実施例 2

23 週で回収したカニクイザルに対する静脈内注射によって週毎に投与した rh u M A b β 7 (PRO 145223) の 4 週間の試験的安全及び薬物動態学的評価

【0258】

要約

r h u M A b β 7 (P R O 1 4 5 2 2 3 と呼ぶ) は、ヒト及びカニクイザル (Macaca fascicularis) 中のリンパ球上の α E β 7 及び α 4 β 7 に結合するヒト化イムノグロブリン G 1 (I g G 1) 抗ヒト β 7 抗体である。 α E β 7 及び α 4 β 7 インテグリンを発現する細胞は、潰瘍性大腸炎 (U C) 及びクローン病 (C D) のような、腸の炎症性疾患において重要な役割を有すると考えられている。 r h u M A b β 7 は C D 及び U C のような炎症性腸疾患の患者の潜在的な治療法として調べられている。本実験の目的は、カニクイザルに 4 週間、週毎に静脈内 (I V) 投与した後の r h u M A b β 7 の安全性、薬物動態学 (P K) 、及び薬力学 (P D) 効果を評価し、23 週間の回復期間における任意の薬剤関連の副作用効果の可逆性を特徴付けることである。カニクイザルのグループは、5 又は 25 m g / k g におけるビヒクル又は r h u M A b β 7 の 4 回の週毎の I V 投与を行った。それぞれのグループからの 3 匹の雄と 3 匹の雌の動物を最終投与後の 7 日目に剖検した；ビヒクル及び 25 m g / k g の投与グループからの残りの動物 (2 / 性 / グループ) を剖検の前の最後の投与後の 23 週間観察した。

【0259】

全体として、4 週間の I V 投与後の r h u M A b β 7 の血液濃度－時間プロフィールは、緩やかな除去段階の後の速い初期分配段階を伴う二相変化であった。カニクイザルへの 5 又は 25 m g / k g の r h u M A b の 4 週間の I V ボーラス投与後、抗治療抗体 (A T A) が検知された場合を除いて、容器の血清濃度は第二の投与後に増加した。最初の投与後の 0 日目から 7 日目までの (A U C ₀₋₇ / 投与) の血清濃度－時間プロフィールの投与平均化領域は 5 m g / k g 及び 25 m g / k g 投与のグループについて類似しており、r h u M A b β 7 は、調べた投与領域におけるカニクイザル中の投与比例的な薬物土対応を示すことを示唆した。25 m g / k g 投与グループについて、第一の投与と比較して、A U C ₀₋₇ 及び最大血清濃度 (C_{max}) は、最後の投与後に約 2 倍増加した。これらの見解は両者ともに、カニクイザルへの 25 m g / k g の 4 週間の I V 投与後に r h u M A b β 7 の蓄積があったことを示唆した；しかし、このような蓄積は、これらの投与量における長い半減期を有する抗体について期待されたものである。25 m g / k g の回収動物からのデータの比較解析は 2.93 m L / 日 / k g のクリアランスと比較的長い 14.5 日の終末半減期が見積もられた。しかし、4 匹中 3 のサルは、r h u M A b β 7 のより早いクリアランスに役立つであろう A T A を有する。

【0260】

末梢血 T 細胞の飽和と循環 β 7⁺ T 細胞のレベルの増加が、P D マーカーとして探索された。インテグリン β 7 レセプター占有率アッセイは、末梢血 T 細胞サブセット上の β 7 レセプターが、カニクイザルへの 5 又は 25 m g / k g の r h u M A b β 7 の 4 週間の投与の第一回目後、完全に飽和したことを示唆した。末梢血 T 細胞上の β 7 レセプターの占有率は、血清濃度が約 1 から 10 μ g / m L より大きく、利用可能な β 7 検出が、r h u M A b β 7 の血清濃度の減少に関連した場合維持された。C D 45 R A⁻ β 7^高 T 細胞 (ヒトとマウスにおける腸ホーミング T 細胞にフェノタイプが類似) は、カニクイザルへの 25 m g / k g の 4 週間の投与の後、ベースラインレベルより約 5 倍増加した。同様に、C D 45 R A⁺ β 7^{中間体} T 細胞 (ナイーブ T 細胞にフェノタイプが類似) 4 週間の 25 m g / k g の投与 (ベースラインよりも約 2.5 倍) の後にまた増加した。対照的に、C D 45 R A⁻ β 7^低 T 細胞は、実験を通じて安定のままだった。これらの結果は、r h u M A b β 7 の作用機序、すなわち、リガンドへの α 4 β 7 結合の阻害を介した腸への β 7 陽性リンパ球の輸送の阻害、次いで、末梢循環中のこれらの細胞の蓄積、と一致している。これらの現象は、カニクイザルにおける将来の実験においてさらに調べられるであろう。

【0261】

導入

r h u M A b β 7 (P R O 1 4 5 2 2 3 と呼ぶ) は、ヒト及び非ヒト霊長類中のリンパ球上の α E β 7 及び α 4 β 7 インテグリンに結合するヒト化イムノグロブリン G 1 (I g G 1) 抗ヒト β 7 抗体である。r h u M A b β 7 は、 α 4 β 7 の M a d C A M - 1 、 V

CAM-1、及びフィブロネクチンとの相互作用を0.07-0.1 nMの親和性（50%最小阻害濃度〔IC₅₀〕）で阻害し、EカドヘリンのαEβ7への結合をまた5 nMのIC₅₀で阻害する。αEβ7及びα4β7インテグリンを発現する細胞は、クローン病（CD）及び潰瘍性大腸炎（UC）のような、腸の炎症性疾患において重要な役割を有すると考えられている。rhMABβ7はCD及びUCのような炎症性腸疾患の患者の潜在的な治療として調べられている。

【0262】

目的

この実験の目的は、カニクイザル(Macaca fascicularis)への4週間の週に一度の静脈内（IV）投与後のrhMABβ7の安全性、薬物動態（PK）、及び薬力学（PD）効果を評価し、23週間の回復期間中の任意の被検物質関連の副作用の可逆性を特徴付けることである。本実験の目的は、PKとフローサイトメトリー解析の結果を報告することである。

【0263】

材料と方法

被検物質

rhMABβ7（PRO145223）、ロットM3TOX132は、20 mg/mL（4.5 mL/バイアル）の濃度で、透明からわずかにオパール色、無色から淡黄色液体としてジェネンテックから提供された。rhMABβ7ビヒクル、ロットM3TOX133は、また透明からオパール色、無色から淡黄色の液体（10.5 mL/バイアル）として提供された。本実験で使用される前に、被検物質は、2℃から8℃の温度範囲で維持されるように設定された冷蔵庫に保存された。

【0264】

種

26匹の被検物質-ナードのカニクイザルはSNBL USAストックコロニーから得られた。治療の開始時、動物は、2-6 kgで、2-5年齢であった。治療の開始前の少なくとも1週間順応させた。健康に見え、明らかな以上がない動物に限り本実験に使用した。

【0265】

実験設計

動物は3つのグループのうちの一つにランダム化され、試験物質の4週間のIV投与を行った。グループ1（5匹の雄と5匹の雌）の動物はrhMABβ7ビヒクルを投与した。グループ2（3匹の雄と3匹の雌）とグループ3（5匹の雄と5匹の雌）の動物はそれぞれ、5及び25 mg/kgのrhMABβ7を投与した。それぞれのグループの3匹の雄及び3匹の雌は、最終投与の7日後に終末剖検した。ビヒクル又は25 mg/kgのrhMABβ7を投与したグループからの2匹の雄及び2匹の雌は、回復剖検の前の約23週間の回復期間追跡した。本実験は表2__1にまとめた。

表2__1
試験設計

グループ	No./Sex	経路	試験物質	投与レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与量 ^a (mL/kg)
1	5/M, 5/F	IV	rhMAB β7 ビヒクル	0	0	1.25
2	3/M, 3/F	IV	rhMAB β7	5	20	0.25
3	5/M, 5/F	IV	rhMAB β7	25	20	1.25

C o n c . = 濃度 ; I V = 静脈内。

注意：それぞれのグループの3匹の雄と3匹の雌は、検死動物として設計した。グループ1及び3からの残りの動物は回収した検死動物から設計した。

^a 投与体積は直近の体重に基づいて計算した。

【0266】

投与準備

各グループの被験物質は、適切な濃度でジェネンテックより提供された。

投与

それぞれの投与体積は、投与の日に記録した体重に基づいて計算した。動物は伏在静脈をかいして被験物質を投与した。投与の直後、針が動物から除かれる前、投与装置は、約1 mLの0.9%のNaClでフラッシュした。

血液サンプル回収

全ての血液サンプルは、伏在、大腿骨、又は橈側皮静脈を介してニードル及びシリンジを用いて回収した。

PK解析

血液（約1.2 mL）を、それぞれの動物から回収し、血清をPK解析の次の時間点で回収した：

- ・試験一日目のプレ投与及び15分及び6、24、及び72時間の投与後
- ・試験8及び15日目のプレ投与
- ・試験22日目のプレ投与及び最終投与の15分及び6、24、72時間後。
- ・試験36、43、50、57、64、71、78、85、92、99、106、113、120、127、134、141、148、155、162、169、176、及び183日目。
- ・終末及び回収剖検の日（試験29及び191日目）

しかし、PK解析については、時間点は、0日目において開始するように変更され、この報告では、0、0.0104、0.25、1、3、7、14、21、21.0104、21.25、22、24、28、35、42、49、56、63、70、77、84、91、98、105、112、119、126、133、140、147、154、161、168、175、182、及び190日目と呼ぶ。

抗治療抗体解析

PK解析に用いた同じ血清サンプルを抗治療抗体（ATA）解析に使用した。ATA応答は、以下の時間点で解析した：

- ・試験第1、8、15及び22日目のプレ投与
- ・試験50、71、92、113、134、155、及び176日目。
- ・終末及び回収剖検（試験29及び191日目）

しかし、ATA解析については、時間点は、0日目において開始するように変更され、この報告では、0、7、14、21、28、49、70、91、112、133、154、175、及び190日目と呼ぶ。

フローサイトメトリー解析

血液（約1.5 mL）をそれぞれの動物から回収し、次の時間点で、全リンパ球（B細胞、T細胞、及びナチュラルキラー [NK] 細胞）フローサイトメトリーアッセイ：

- ・8日目（プレ投与）
- ・一日目のプレ投与及び第一の投与後の24時間
- ・15日目のプレ投与及び第二の投与後の24時間
- ・22日目のプレ投与及び第三の投与後の24時間
- ・43、57、71、85、99、113、127、141、155、169、及び183日目
- ・終末及び回収剖検の日（試験29及び191日目）

血液（約1.5 mL）を占有率フローサイトメトリーの次の時間点においてそれぞれの動物から回収した：

- ・一日目のプレ投与及び第一の投与後の24時間
- ・15日目のプレ投与及び第二の投与後の24時間
- ・22日目のプレ投与及び第三の投与後の24時間
- ・57、85、99、113、127、141、155、169、及び183日目
- ・終末及び回収剖検の日（試験29及び191日目）

全ての占有及び非占有の $\beta 7$ 発現CD4⁺及びCD8⁺T細胞解析のために、血液を次の時間点において、それぞれの動物から回収した。

- ・一日目のプレ投与及び第一の投与後の24時間
- ・15日目のプレ投与及び第二の投与後の24時間
- ・22日目のプレ投与及び第三の投与後の24時間
- ・57、99、113、127、141、155、169、及び183日目
- ・終末及び回収剖検の日（試験29及び191日目）

10

【0267】

血液サンプル加工

PK及びATA解析

回収の直後、サンプルは、血清分離試験管に移し、30から80分間室温で塊とした。サンプルを室温で15分間2000 μ gで遠心した。血清を回収し、ラベルした1.5mLのエッペンドルフチューブに移した。

【0268】

フローサイトメトリー解析

回収の直後、フローサイトメトリー解析のための全血サンプルを実験プロトコルに記載のSNBLでヘパリンナトリウム化した試験管に移し、解析のためにジェネンテックに輸送した。サンプルを直ぐに氷上に置き、フローサイトメトリーによる解析まで2℃から8℃の温度範囲で保存した。

20

【0269】

アッセイ

血清濃度

血清サンプルを合計のrhuma $\beta 7$ レベルを定量的ELISAで解析した。このアッセイは全てのサンプルについて、ノートブック4788627ドラフトアッセイ開発要約及びノートブック4788622ドラフト標準操作手順（SOP）にしたがって行った。最初に、96ウェルのマイクロリットルプレートは、ヤギの抗ヒトIgG重鎖及び軽鎖（H&L）で被覆し、カニクイザル血清で前吸収した。この抗体は、結合部位（Birmingham, UK; カタログ AU003.CUS01; ロット 086001）から得、0.05Mの炭酸ナトリウムで、1g/mLに希釈した。組換えヒトrhuma $\beta 7$ （ロット469948、ジェネンテックが生産した）は、標準として使用した。標準曲線は、0.781から50.0ng/mLの範囲だった。標準曲線を決定するために使用する抗体、マトリックスコントロール、及びサンプルは、アッセイ希釈溶液（リン酸緩衝食塩水[PBS]、0.5%、ウシ血清アルブミン[BSA]、0.05%のポリソルベート20、0.05%のプロクリン300、0.25%のCHAPS緩衝液、5mMのエチレンジアミン4酢酸[EDTA]、0.35MのNaCl）中で希釈した。サンプルは、1/20の最小に希釈した。セイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）でタグ化したヒツジ抗ヒトIgG（H&L、サル血清でプレ吸収した）は、The Binding Site（カタログ CUS1684.H; ロット11245）から得、コンジュゲートとして使用した。シグナルはHRPの基質としてテトラメチルベンジジンペルオキシダーゼを使用して得た。コントロールとサンプルからのデータは、希釈のために校正し；それぞれの希釈のための値は平均化した。ニートのカニクイザル血清のための最小定量化濃度は、アッセイ限界の1ng/mLと1/20の最小希釈に基づき20ng/mLであると決定された。

30

40

【0270】

ATA応答の決定

カニクイザルからの血清サンプルは、rhuma $\beta 7$ に対する抗体応答のレベルを決

50

定するための架橋電気化学発光アッセイによって解析した。このアッセイは、r h u M A b β 7 に対する抗体についてのノートブック 4 7 8 8 6 - 4 8 ドラフトアッセイ開発要約にしたがって実施された。ヒト I g G (H & L、サル血清をプレ吸収させた) に対するポリクローナル抗体は、The Binding Site から得、代理ポジティブコントロールとして使用した。コントロールとサンプルは、サンプル希釈液 (H E P E S 緩衝液、2 % 魚ゼラチン、0 . 0 5 % ポリソルベート 2 0、0 . 0 5 % プロクリン 3 0 0、0 . 1 5 M の N a C l、0 % のウシ胎児血清) 中で希釈し、9 6 ウェルの丸底ポリプロピレンプレートに添加した。サンプルは最小の 1 / 1 0 に希釈した。ビオチン化した r h u M A b β 7 と B V タグした r h u M A b β 7 は、コンジュゲートとして使用した。翌日、ストレプトアビジンで被覆したダイナビーズ M 2 8 0 (インビトロジェン Corp.; Carlsbad, CA) を、アッセイ希釈液 (H E P E S 緩衝液、2 % 魚ゼラチン、0 . 5 % ポリソルベート 2 0、0 . 0 5 % プロクリン 3 0 0、0 . 1 5 M の N a C l) 中で希釈し、プレートに添加した。アッセイ応答は、電気化学発光ユニット中で測定した。切断点は、ネガティブコントロールの値に基づいて設定した。r h u M a b β 7 抗体アッセイの最小の報告された力価は、1 . 0 である。

【0271】

フローサイトメトリー解析

末梢血中の全 β 7 発現 C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ T 細胞サブセット

C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ T 細胞を発現する全 β 7 は、r h u M A b β 7 よりも異なるエピトープを標的とした抗 β 7 抗体、9 D 8 を使用して測定した。全血サンプルの解析のためのパネル配置は、表 2 - 2 に提示した。

表 2 - 2
全血パネル配置

試験管番号	抗原マーカー：蛍光色素	同定した細胞型
1	IgG-FITC, IgG-PE, CD4-PerCP, SA-APC	SSC と FSC 上の数をゲートするために使用するアイソタイプ。四重マーカーの設定。
2	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD4-PerCP or CD4-PerCP-Cy5.5, 9D8-ビオチン/SA-APC ^a ,	CD4 T 細胞の α 4 及び β 7 発現細胞サブセット
3	CD45RA-FITC, CD49d-PE, CD8-PerCP or CD8-PerCP-Cy5.5, 9D8-ビオチン/SA-APC ^a ,	CD8 T 細胞の α 4 及び β 7 発現細胞サブセット

F S C = 前方散乱 ; S A = ストレプトアビジン ; S S C = 側方散乱。

a 9 D 8 - ビオチンを S A - A P C を添加する前に最初にインキュベートした。

【0272】

全ての全血液サンプルについて、4 8 0 3 8 - 2 9 及び 4 8 0 3 8 - 8 4 の手順に従ってフローサイトメトリーを行った。それぞれのサンプルについて、試験管 2 及び 3 を飽和濃度の、r h u M A b β 7 の存在下 β 7 に結合する抗 β 7 抗体である、9 D 8 ビオチンと共に最初にインキュベートした。機器のセットアップコントロールチューブ (アイソタイプコントロールと単一株) 及びアッセイチューブ (試験管 1、2、及び 3) を手動で準備した。最初のインキュベーションの後、2 m L の溶解溶液を赤血球細胞を溶解するために添加し、細胞洗浄を 1 サイクル行った。第 2 のインキュベーションについて、サンプル (試験管 2 及び 3) を、カニクイザルの白血球と交差反応すると知られている、C D 4 (クローン M - T 4 7 7)、C D 8 (クローン S K 1)、C D 4 5 R A (クローン 5 H 9)、及び C D 4 9 d (クローン 9 F 1 0)、に対する蛍光コンジュゲートモノクローナル抗体

、又はアイソタイプのコントロール抗体（試験管1）と共にインキュベートした。ストレプトアビジン-A P C（S A A P C）を、またビオチン化した抗体を検出するために試験管1、2、及び3に添加した。両者のインキュベーションは60から5分間氷上暗室で行った。固定化バッファー中で細胞を再懸濁する最終ステップを伴う洗浄ステップを連続して行った。サンプルは、2℃から4℃で最小30分間保持し、同日に得た。

【0273】

フローサイトメトリーは、シリアル番号E3982のFACS Calibur（商標）（BD Biosciences; San Jose, CA）で行った。25000リンパ球イベントを、前方散乱（F S C）／側方散乱（S S C）プロットを用いて得た。データ解析は、CellQuest Proソフトウェア（PD CellQuest Pro、バージョン5.2.1）を用いて、F S C／S S Cでゲートしたリンパ球及び、併用する組み合わせに応じて、C D 4⁺／S S C^低又はC D 8⁺／S S C^低でゲートしたT細胞の両者に基づいた。フローサイトグラムは、それぞれの細胞表面マーカーに陽性の細胞の画分を確立するために得た。

【0274】

β7亜集団は、幾何学平均蛍光強度（G M F I）として、個別に、ゲートしたT細胞のパーセンテージとして解析した。それぞれの時間点における各サンプルについて、可溶性蛍光分子数（M O E F）をSpheroTechビーズによって得た標準曲線を用いて各集団のG M F Iを積算することによって計算した。G M F IとC D 4⁺ 9 D 8^{i n f}、C D 4 5 R A⁻ 9 D 8^高、C D 4 5 R A⁻ 9 D 8^低、C D 4 5 R A⁺、及びC D 4 5 R A⁻を発現する、C D 4⁺又はC D 8⁺Tリンパ球のゲートした細胞のパーセンテージは、それぞれのサブセットの医薬の効果を調べるための実験を通じて監視した。各リンパ球サブセットについてのそれぞれの時間点においてそれぞれのサンプルについて、絶対細胞カウントはS N B Lによって提供される末梢血のマイクロリットル毎のリンパ球のカウントに基づいて計算した。

【0275】

β7亜集団は、幾何学平均蛍光強度（G M F I）として、個別に、ゲートしたT細胞のパーセンテージとして解析した。それぞれの時間点における各サンプルについて、可溶性蛍光分子数（M O E F）をSpheroTechビーズによって得た標準曲線を用いて各集団のG M F Iを積算することによって計算した。G M F IとC D 4⁺ 9 D 8^{i n f}、C D 4 5 R A⁻ 9 D 8^高、C D 4 5 R A⁻ 9 D 8^低、C D 4 5 R A⁺、及びC D 4 5 R A⁻を発現する、C D 4⁺又はC D 8⁺Tリンパ球のゲートした細胞のパーセンテージは、それぞれのサブセットの医薬の効果を調べるための実験を通じて監視した。各リンパ球サブセットについてのそれぞれの時間点においてそれぞれのサンプルについて、絶対細胞カウントはS N B Lによって提供される末梢血のマイクロリットル毎のリンパ球のカウントに基づいて計算した。

【0276】

末梢血中のC D 4⁺とC D 8⁺T細胞サブセット上の占有率
全血サンプルの解析のためのパネル配置は、表2-3に提示する。

表 2-3
全血パネル配置

試験管 番号	抗原マーカー：蛍光色素	同定した細胞型
1	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, Her-Alx647	ネガティブコントロール
2	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb $\beta 7$ -Alx647	$\beta 7$ 占有率を検出するための不飽和試験管
3	CD4-FITC, CD45RA-PE, CD8PerCP, rhuMAb $\beta 7$ -Alx647	10 μ g/mL PRO145223で飽和した試験管

Her = ハーセプチン。

【0277】

以下の抗体コンジュゲートの飽和濃度を用いて、Laboratoryノートブック47237、40頁にしたがって血液サンプルを染色した：FITCにコンジュゲートしたCD4（クローンM-T477）、フィコエリテリン（PE）にコンジュゲートしたCD45RA（クローン5H9）、PerCPにコンジュゲートしたCD8（クローンSK1）、及びアレクサ647にコンジュゲートしたハーセプチン（登録商標）又はアレクサ647にコンジュゲートしたrhuMAbベータ7。試験管3について、試験物質rhuMAb $\beta 7$ （PRO145223）は、飽和濃度（10 μ g/mL）に希釈し、血液サンプルに添加した。

【0278】

全てのインキュベーションは30から35分間暗室氷上で実施した。染色後、赤血球細胞を溶解し、サンプルを洗浄し、細胞をLyse Wash Assistant (BD)固定液に再懸濁した。25000のゲートしたリンパ球イベントを前方散乱／側方散乱ゲートを用いてBD FACSCalibur (BD Biosciences)で得た。

【0279】

リンパ球は、SSC／FSC散布図から同定した。CD4⁺及びCD8⁺細胞は次いでそれぞれSSC／CD4FITC又はSSC／CD8PerCPプロットを使用して同定した。試験管1はゲートのためのネガティブコントロールとして使用した。 $\beta 7^{\text{高}} / \text{CD} 45 \text{RA}^-$ 、及び $\beta 7^{\text{中間体}} / \text{CD} 45 \text{RA}^+$ 細胞を示すリンパ球は、飽和濃度のrhuMAbベータ7の存在下及び非存在下の試験管を用いて同定した。GMFIとゲートした細胞のパーセンテージに注目し、GMFIは次いで、MOEFがFL4チャンネルのGMFI（登録商標）の傾きであるAPCのチャンネルの傾きを使用したMOEFとして表された。

【0280】

全てのインキュベーションは30から35分間暗室氷上で実施した。染色後、赤血球細胞を溶解し、サンプルを洗浄し、細胞をLyse Wash Assistant (BD)固定液に再懸濁した。25000のゲートしたリンパ球イベントを前方散乱／側方散乱ゲートを用いてBD FACSCalibur (BD Biosciences)で得た。

【0281】

リンパ球は、SSC／FSC散布図から同定した。CD4⁺及びCD8⁺細胞は次いでそれぞれSSC／CD4FITC及びSSC／CD8PerCPプロットを使用して同定した。試験管1はゲートのためのネガティブコントロールとして使用した。 $\beta 7^{\text{高}} / \text{CD} 45 \text{RA}^-$ 、及び $\beta 7^{\text{中間体}} / \text{CD} 45 \text{RA}^+$ 細胞を示すリンパ

球は、飽和濃度の r h u M A b ベータ 7 の存在下及び非存在下の試験管を用いて同定した。G M F I とゲートした細胞のパーセンテージに注目し、G M F I は次いで、M O E F（登録商標）が F L 4 チャンネルの G M F I の傾きである A P C のチャンネルの傾きを使用した M O E F として表された。

【0282】

末梢血リンパ球サブセットのフローサイトメトリー解析（全 B 細胞、T 細胞、及び N K 細胞）

全血サンプルの解析のためのパネル配置は、表 2 - 4 に提示する。

表 2 - 4
全血パネル配置

試験管 番号	抗原マーカー：蛍光色素	同定された細胞型
1	IgG-FITC, IgG-PE, IgG-PerCP, IgG-APC,	S S C 及び F S C 上の集団をゲートするために使用されるアイソタイプ。 四重マーカーの設定。
2	CD4-FITC, CD45-PE, CD3-PerCP, CD20-APC	B 細胞、T 細胞、及び T 細胞サブセット

F S C = 前方散乱；S S C = 側方散乱。

【0283】

全ての血液サンプルについて、フローサイトメトリーアッセイは、手順 4 8 0 3 8 - 3 6 にしたがって実施した。サンプルは、適切なアイソタイプコントロールと共に、カニクイザルリンパ球と交差反応することが知られている、蛍光コンジュゲートモノクローナル抗体 C D 4（クローン M - T 4 7 7）、C D 4 5（クローン T U - 1 1 6）、C D 3（クローン S P 3 4 - 2）、及び C D 2 0（クローン L 2 7）飽和濃度と共にインキュベートした。機器設定コントロール試験管とアッセイチューブは、手動で準備した。全てのインキュベーションは、暗室で、室温において 3 0 から 3 5 分間実施した。

【0284】

P K データ解析

スケジュールからの最小の逸脱を伴う、名目上のサンプル回収時間をデータ解析に用いた。r h u M A β 7 の平均（ $\pm$ S D）濃度を、M S エクセル（Microsoft Corp.; Redmond, WA）ソフトウェアを使用してそれぞれの血清サンプルについて計算し、データ点は Kale idaGraph（Synergy Software; Reading, PA）を使用してプロットした。プレ投与の時間点を除いて、報告できるよりも小さい（L T R）と決定された血清濃度は失ったとして処理され、P K データの提示又は解析には使用しなかった。P K データ計算について、実験一日目は、投与開始を示すために P K 0 日目と変更した（血液サンプル回収を参照されたい）。

【0285】

非分画 P K 解析

第一の投与後の 7 日目までの 5 m g / k g の投与グループの各動物からの血清濃度 - 時間データは、I V ボーラスインプットモデルを用いて解析した（モデル 2 0 1、WinNonlin Pro, version 5.0.1; Pharsight Corporation; Mountain View, CA）。血清濃度が、第 2 又は第 3 の投与の後の A T A によって影響を受けるので、5 m g / k g の投与グループの最後の投与の後のデータは、解析しなかった。第一及び最後の投与の 7 日間の 2 5 m g / k g の投与グループの各動物からの血清濃度 - 時間データは、I V ボーラスインプットモデル（モデル 2 0 1）を使用してまた解析した。以下の方法は特定の P K パラメーターを見積もるために使用された：

C_{max} : I V 投与後の最大血清濃度

AUC_{0-7} : 0 から P K 7 日目の血清－時間曲線の下面積は、線形台形規則を使用して計算した。

AUC_{21-28} : P K 21 日目から P K 28 日目の血清－時間曲線の下面積は、線形台形規則を使用して計算した。

AUC_{all} : 0 から回収動物からのデータの P K 日の血清－時間曲線の下面積は、線形台形規則を使用して計算した。

V_1 : 中央分画への体積分布 (投与 / C_{max})

2 分画 P K 解析。

I V ボーラスインプット、一次排泄、及びマイクロ速度定数を伴う 2 分画モデル (モデル 7, WinNonlin Pro, バージョン 5.0.1) を 25 mg / kg 投与グループ中の 4 匹の回収動物からの平均濃度－時間データを解析するために使用した。以下のモデリングオプションと方法は、特定の P K パラメーターを見積もるために使用した：

A、B、 α 、及び β の初期見積もりは WinNonlin によって視覚的に決定した。

WEIGHT = -2 を用いた加重分析

Nelder-Mead 最小化アルゴリズムを使用した。

モデル選択は視覚検査と Akaike's Information Criterion (AIC) のモデル比較によるフィットが良好であることに基づいた。

CL : クリアランス (投与 / AUC)

$t_{1/2, \beta}$: ベータ段階の半減期；終末半減期 ($\ln [2] / \beta$)

V_{ss} : 定常状態における体積分布 ($MRT_{inf} \cdot CL$)

アルファ及びベータ段階 (それぞれ、A 及び B)、マクロ速度定数 (α 、 β)、及び分画間マイクロ速度定数 (k_{10} 、 k_{12} 、及び k_{21}) に関連する 0 時間切片は表 7 に提示した。

【0286】

フローサイトメトリー解析

ベースラインレベルのパーセンテージとしての絶対カウントを、ビヒクル又は r h u M A b ベータ 7 で処理した動物についての実験の各時間点における、CD 4 及び CD 8 T 細胞サブセット ($CD 4^+ RA^+ \beta 7^{high}$ 、 $CD 4^+ RA^+ \beta 7^{low}$ 、及び $CD 4^+ RA^+ \beta 7^{intermediate}$) 及び $CD 4^+ CD 3^+ (CD 8)^+ T$ 細胞、 $CD 3^+ CD 20^+ (NK)$ 細胞、及び $CD 20^+ B$ 細胞のそれぞれについて計算した。ベースラインのパーセンテージとしての、各絶対カウントは、グループ平均を計算するために、それぞれの治療グループ (ビヒクル、5 mg / kg の r h u M A b $\beta 7$ 、及び 25 mg / kg の r h u M A b $\beta 7$) について平均化した。フローサイトメトリーによって決定される値の定義は以下の通りである：

絶対カウント：リンパ球のそれぞれのサブセットの絶対カウント；絶対リンパ球のカウント (末梢血のマイクロリットル毎のリンパ球として表される血液学測定から得た値) に等しくそれぞれのサブセットのゲートしたリンパ球のパーセンテージをかける (フローサイトメトリーから得た)。

絶対カウント (% BL) : 投与前に得たベースライン A b s カウントのパーセンテージとしての絶対カウント；プレ投与絶対カウントで割る A b s カウントとして計算される。

MOEG : 等しい蛍光の分子；FL 4 チャンネルの傾きを幾何学平均蛍光強度にかけて計算される

MOEF (% プレ投与) : 投与前の MOEF のパーセンテージとしての MOEF ; 投与前の平均 MOEF で割った投与後のそれぞれの時間点における MOEF として計算される。

【0287】

結果と考察

P K データ解析

カニクイザルへの 5 mg / kg の r h u M A b $\beta 7$ の 4 週間の I V ボーラス投与後、第一の投与後の 15 分間の平均血清濃度は、196 μ g / mL (範囲：70.9 から 326

10

20

30

40

50

$\mu\text{g}/\text{mL}$)であった最終投与後の15分間と比較して、 $173\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 125 から $207\mu\text{g}/\text{mL}$)であった。第2、3、及び4の投与前の平均の容器の血清濃度は、それぞれ、 $56.5\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 28.7 から $77.1\mu\text{g}/\text{mL}$)、 $35.1\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 0.0401 から $97.1\mu\text{g}/\text{mL}$)、及び $60.2\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 4.29 から $137\mu\text{g}/\text{mL}$)であった。この $5\text{mg}/\text{kg}$ 投与グループの全ての6匹のサルが、第二の投与後に検出されるATA応答したので第二の投与後の容器の血清濃度の変動性は、ATAの存在によって説明され得る; 1匹のサルは、第一のrhUMAb β 7の投与前に、陽性のヒト抗体離力価を有した。最小の容器の濃度である4匹のサルは、最高のATA力価を有した。

【0288】

カニクイザルへの $25\text{mg}/\text{kg}$ のrhUMAb β 7の4週間のIVボラス投与後、第一の投与後の15分間の平均血清濃度は、 $1690\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 1130 から $2250\mu\text{g}/\text{mL}$)であった最終投与後の15分間と比較して、 $917\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 740 から $1070\mu\text{g}/\text{mL}$)であった。第2、3、及び4の投与前の平均の容器の血清濃度は、それぞれ、 $325\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 243 から $677\mu\text{g}/\text{mL}$)、 $535\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 240 から $709\mu\text{g}/\text{mL}$)、及び $594\mu\text{g}/\text{mL}$ (範囲: 194 から $776\mu\text{g}/\text{mL}$)であった。rhUMAb β 7の減少した血清濃度と関連するATA応答を示すこの投与グループの10匹のサルのうち5匹(4匹の回収したサルのうち3匹)において、 $25\text{mg}/\text{kg}$ の投与レベルにおいてATA応答もまたあった。ATAは、幾つかのサルにおいて第二の投与後に検出された; このグループの1匹のサルは、rhUMAb β 7の第一の投与前にまた陽性のヒト抗体力価を有した。

【0289】

5又は $25\text{mg}/\text{kg}$ の4週間のIV投与後の生存期間の28日よりを越える血清濃度は図23に提示する。比較のための $5\text{mg}/\text{kg}$ 投与グループにおける回収コホートがなかったので、生存期間(最終投与後の7日目まで)を越える血清濃度は、非分画解析によって比較した。結果は、第一の投与後の(AUC₀₋₇/投与)0日目から7日目からの血清濃度時間プロファイルの投与規格化領域が、 $5\text{mg}/\text{kg}$ と $25\text{mg}/\text{kg}$ の投与グループについて類似していることを示した(それぞれ、 113 ± 17.0 及び 119 ± 15.8 日 $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}/\text{mg}/\text{kg}$; 表5を参照されたい)。これは、rhUMAb β 7が、実験の投与範囲においてカニクイザル中で投与比例薬物動態を示すことを示唆する。中央分画く(V1)への体積分布は、第一の5又は $25\text{mg}/\text{kg}$ の投与後にまた類似した(それぞれ、 29.0 ± 4.30 及び $27.7\pm3.54\text{mL}/\text{kg}$; 表5を参照されたい)。これらの結果は両者ともカニクイザルへの $25\text{mg}/\text{kg}$ の4週間のIV投与後のrhUMAb β 7の蓄積があったことを示唆するが、このような蓄積は、これらの投与量において長い寿命を持つ抗体において期待される。 $5\text{mg}/\text{kg}$ の投与グループの最終投与後のデータは、ATAが第二の投与後のrhUMAb β 7のCLに影響するので比較できなかった。

【0290】

$25\text{mg}/\text{kg}$ の4週間の投与後の23週の回収期間からの4匹のサルからの平均データは、2分画モデルにフィットした(図24を参照されたい)。最終投与後の血清濃度-時間プロファイルは、緩やかな排泄段階に続く速い一次分布を伴う二段階であった。分画分析は、 $25\text{mg}/\text{kg}$ のrhUMAb β 7の4週間のIV投与後の遅い $2.93\text{mL}/\text{日}/\text{kg}$ のCL及び比較的長い 14.5 日の $t_{1/2,\beta}$ を見積もった(表2-6を参照されたい)。しかし、4匹のサルのうち3匹がATAを有し、おそらく、rhUMAb β 7のクリアランスに寄与した。 V_{ss} は、 $56.9\text{mL}/\text{kg}$ と見積もられ、rhUMAb β 7が、末梢分画に殆ど残っていることを示唆した(表2-6を参照されたい。) $25\text{mg}/\text{kg}$ の4週間のIV投与後の全露出(AUC_{a11})は、回収動物からのデータの非分画解析から 33400 日 $\cdot\mu\text{g}/\text{mL}$ と見積もられた(表2-6を参照されたい)。

表 2-5
 カニクイザルへの r h u M A b β 7 の第一又は
 最後の I V ボーラス投与後のそれぞれのデータ (平均 $\pm$ S D)
 の非分画 P K パラメーター

治療 グループ	AUC ₀₋₇ (day $\cdot$ μ g/mL)	AUC ₂₁₋₂₈ (day $\cdot$ μ g/mL)	AUC ₀₋₇ or AUC ₂₁₋₂₈ /Dose (day $\cdot$ μ g/mL/mg/kg)	C _{max} (μ g/mL)	V ₁ (mL/kg)
5 mg/kg 第一投与 (n=6)	563 $\pm$ 84.8	NA	113 $\pm$ 17.0	175 $\pm$ 24.0	29.0 $\pm$ 4.30
25 mg/kg 第一投与 (n=10)	2990 $\pm$ 394	NA	119 $\pm$ 15.8	916 $\pm$ 111	27.7 $\pm$ 3.54
25 mg/kg 最終投与 (n=10)	NA	7020 $\pm$ 1960	281 $\pm$ 78.3	1710 $\pm$ 302	15.1 $\pm$ 3.03

10

20

A U C₀₋₇ = 0 から P K 7 日目までの血清濃度－時間曲線の領域；

A U C₂₁₋₂₈ = P K 21 日目から P K 28 日目までの血清濃度－時間曲線の領域；

C_{max} = I V ボーラス投与後の最大血清濃度；I V = 静脈内；

N A = 適用されず；P K = 薬物動態；V₁ = 中央画分への分配体積（投与 / C_{max}）。

表 2-6
 カニクイザルへの 25 mg / kg の r h u M A b の
 β 7 の四週間の I V ボーラス投与後の4匹の
 回収動物からの平均データの
 2画分 P K パラメーター (% C V)

30

AUC (day $\cdot$ μ g/mL)	CL (mL / 日 / kg)	t _{1/2,β} (日)	V _{ss} (mL/kg)
8530 (5.50)	2.93 (5.51)	14.5 (1.89)	56.9 (7.08)

40

A U C = 血清濃度－時間曲線の領域；C L = 除去；

I V = 静脈内；P K = 薬物動態；t_{1/2, β} = ベータ半減期；V_{ss} = 定常状態における分配体積。

表 2-7
 カニクイザルへの 25 mg/kg の r h u M A b β 7 の
 4週間の I V ボーラス投与後の
 4匹の回収動物からの平均 ($\pm$ S D) の
 2画分モデルパラメーター (% C V)

A	B	α	β	k_{12}	k_{21}	k_{10}
$\mu\text{g/mL}$	($\mu\text{g/mL}$)	(日^{-1})	(日^{-1})	(日^{-1})	(日^{-1})	(日^{-1})
509 26.4)	378 (8.64)	0.795 (57.5)	0.0479 (1.90)	0.372 (72.5)	0.366 (51.4)	0.104 (16.0)

10

A、B = それぞれアルファ及びベータ相と関連する 0 時間切片； α 、 β = それぞれ、マクロ速度定数アルファ及びベータ； k_{10} = 中央分画からの除去速度； k_{12} 、 k_{21} = 分画間速度定数。

【0291】

フローサイトメトリー解析（免疫フェノタイピング及び薬物動態学）

末梢血 C D 4 と C D 8 T 細胞のサブセットのグループ平均 ($\pm$ S D) カウントは、図 3 5 から 3 8 に提示する。

20

図 3 9 から 4 0 は、r h u M A b β 7 の血清濃度と個別のカニクイザル中の利用可能な β 7 発現末梢血 C D 4 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞と C D 8 + β 7 高 C D 4 5 R A - T 細胞の関係を示す。C D 4 と C D 8 のサブセット上の個別及びグループ平均 ($\pm$ S D) 絶対カウント、 β 7 発現、及び利用可能な β 7 発現は、付録 E に提示する。

【0292】

この研究の β 7 レセプターの占有率は C D 4 5 + 又は C D 4 5 - として定義される末梢血 C D 4 又は C D 8 T 細胞サブセット上の利用可能な β 7 としてフローサイトメトリーにより解析した。フェノタイプがヒトのナイーブ及びメモリー/エフェクター T 細胞と類似している C D 4 5 R A + 及び C D 4 5 R A - T 細胞は、 β 7 の中間体体高レベルを発現する（T 細胞サブセットの代表的な F A C S ドットプロットについては図 2 5 を参照されたい）。C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 T 細胞は腸部位に選択的にホーミングする。このアッセイからのデータは、5 及び 25 mg/kg の両者の第一投与後の β 7 の飽和、及び r h u M A b β 7 の血清濃度の減少に関連するフリーの β 7 の回帰を示した（上記の P K / P D の関係の節の図 3 2 から 3 3 を参照されたい）。この飽和データは、1 から 10 $\mu\text{g/mL}$ よりも大きい r h u M A b β 7 の血清濃度が末梢血 T 細胞上の β 7 レセプターの完全な飽和を維持するであろうことを示唆した。

30

【0293】

末梢血 T 細胞上の全 β 7 発現レベルは、フローサイトメトリーによって β 7 を検出する非競合抗体を使用した r h u M A b β 7 の投与後に調べた。5 又は 25 mg/kg の I V 投与後のカニクイザルにおける末梢血 T 細胞上の β 7 の下方修正の証拠はなかった（データ示さず）。末梢血の全 β 7 細胞は β 7 の検出のための同じ非分画抗体を使用して r h u M A b β 7 の投与後にまた調べた。

40

【0294】

C D 4 5 R A - β 7 高 C D 4 + T 細胞（ヒトとマウスにおける腸ホーミング T 細胞にフェノタイプが類似）は、カニクイザルへの 25 mg/kg の 4 週間の投与の後、ベースラインレベルより約 5 倍増加した。同様に、C D 4 5 R A + β 7 中間体 C D 4 + T 細胞（ナイーブ T 細胞にフェノタイプが類似）も 4 週間の 25 mg/kg の投与（ベースラインよりも約 2.5 倍）の後にまた増加した（図 2 7 を参照されたい）。ビヒクルコントロール動物の C D 4 5 R A - β 7 低 T 細胞又は T 細胞サブセットにおける有意な変化はなかつ

50

た（図 26 及び 27 を参照されたい）。類似の結果は、 $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ 及び $CD45RA^{+}$ 中間体 $CD8^{+}T$ 細胞に観察された。これらの結果は、この治療抗体の提案された作用機序である、 $\beta7$ を発現するリンパ球の腸への輸送阻害に一致する。

【0295】

この仮説の裏付けとして、増加した末梢血中の $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ T 細胞のパーセンテージは、 $rhuMAb\beta7$ による血液 T 細胞上の $\beta7$ レセプターの占有率と関係する。同様に、 $rhuMAb\beta7$ の占有率の損失（利用可能な $\beta7$ レセプターの検出）は、末梢血中の $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ T 細胞のベースラインへの回帰と関連する。例えば、試験 99 日目において、動物 24 と 25 の血液中の $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ T 細胞のパーセンテージは、ベースラインレベルに減少した（図 6 を参照されたい）。この減少は、これらの特定のサルにおける試験 99 日目の $rhuMAb\beta7$ による $\beta7$ の占有率の減少と関連した（上記の PK/PD の関係における図 32 及び 33 を参照されたい）。対照的に、動物 23 と 26 は、試験 99 日目に末梢血 T 細胞上の飽和 $\beta7$ レセプターを示し、血液中の $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ $CD4^{+}T$ 細胞の絶対数はプレ投与レベルと比較して増加されたままだった（図 28 を参照されたい）。類似の結果は、 $CD8^{+}T$ 細胞のサブセットについても観察された。このように、 $\beta7$ レセプターの占有率は、血液中の $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ $CD4^{+}T$ 細胞の増加したパーセンテージと関連し、腸部位への輸送の阻害と一致する。 $CD45RA^{-}$ と $CD45RA^{+}$ 末梢血 T 細胞のサブセットの増加は、下記の循環リンパ球中の観察された増加に寄与した。

【0296】

25 mg/kg の $rhuMAb\beta7$ の週毎の投与は、第一の投与後に明らかであり、最終の投与後に増加するであろう、循環リンパ球中の穏やかな増加を引き起こす。25 mg/kg の投与量グループにおけるカニクイザルは、ビヒクルコントロールグループ（図 29 を参照されたい）の 1.3 倍の平均増加と比較してベースラインより約 2.2 倍の平均増加であった。 $rhuMAb\beta7$ の血清濃度が減少したので、プレ投与又はビヒクルのレベルまで 25 mg/kg の投与グループにおける絶対リンパ球カウントは回帰した、 $rhuMAb\beta7$ によるリンパ球 $\beta7$ レセプター占有率と関連する効果。したがって、この実験で明らかな循環リンパ球中の穏やかな増加は、一時的であり、 $rhuMAb\beta7$ の投与と関連し、上述の通り、リンパ球を発現する $\beta7$ の腸への輸送阻害に最も起因するようであった。末梢血リンパ球のカウントの増加は、 T 細胞における増加がより大きく、 B 細胞と比較して大きな持続性を示すが、 T 細胞及び B 細胞の両方で明らかであった（図 30 及び 31 を参照されたい）。

【0297】

PK/PD の関係

インテグリン $\beta7$ レセプターの飽和と循環 $\beta7^{+}T$ 細胞のレベルは、 PD マーカーとして使用した。カニクイザルへの 5 又は 25 mg/kg の $rhuMAb\beta7$ の 4 週間の投与後、末梢血 T 細胞上の $\beta7$ 発現の下方修正の明らかな証拠は観察されなかった。しかし、末梢血 T 細胞上の $\beta7$ の飽和は、5 又は 25 mg/kg の $rhuMAb\beta7$ の第一の投与後に観察され、脱飽和は（利用可能な $\beta7$ の検出）は、約 $10\mu g/mL$ よりも小さい $rhuMAb\beta7$ レベルにおける減少と関連するようであった（それぞれ、動物 23 から 26 及び図 33 からのプロファイルについての図 32 A-D を参照されたい）。末梢血 $CD45RA^{-}\beta7^{\text{高}}$ $CD4^{+}T$ 細胞上の $\beta7$ の占有率とこれらの細胞の増加した絶対数の関係は、 $rhuMAb\beta7$ の投与後にもまた観察された（図 34 A から D を参照されたい）。これらの結果は、1 から $10\mu g/mL$ よりも大きな $rhuMAb\beta7$ の血清濃度はが腸ホーミング $CD4^{+}$ 細胞上の $\beta7$ の占有率を維持し、これら T 細胞の腸へのホーミングを阻止し、代わりに末梢へのこれらの細胞の蓄積を起こし得ることを示唆する。

【0298】

結論

カニクイザルへの 5 又は 25 mg/kg の $rhuMAb\beta7$ の 4 週間の IV ボーラス投与後、 ATA が形成した場合を除いて第二の投与後に容器の血清濃度が増加した。第一の

投与後の AUC_{0-7} / 投与量は、 5 mg/kg 及び 25 mg/kg の投与に類似し、 $rhMAb\beta 7$ が、試験した投与範囲における、カニクイザル中で投与比例薬物動態を示すことを示唆した。 25 mg/kg の投与グループについては、 AUC_{0-7} と C_{max} は、第一投与と比較して最終投与後に約 2 倍増加した。これらの両者の結果は、予想されたとおり、カニクイザルへの 25 mg/kg の 4 週間の IV 投与後の、 $rhMAb\beta 7$ の蓄積を示唆する。 25 mg/kg の回収動物からのデータの比較解析は、 2.93 mL/日/kg の遅い CL と比較的長い 14.5 日の $t_{1/2, \beta}$ を見積もった。

【0299】

インテグリン $\beta 7$ レセプター占有率アッセイは、末梢血 T 細胞サブセット上の $\beta 7$ レセプターは、第一の 4 週間の 5 又は 25 mg/kg の $rhMAb\beta 7$ のカニクイザルへの投与後に完全に飽和したことを示唆した。利用可能な $\beta 7$ の検出は、 $rhMAb\beta 7$ の血清濃度の減少に関係し、約 10 g/mL より大きな血清濃度は、末梢血 T 細胞上の $\beta 7$ レセプターの占有率を維持するであろう。 $CD45RA^{-}\beta 7^{\text{高}}$ T 細胞（フェノタイプがヒトとマウスの腸ホーミング T 細胞に類似）は、カニクイザルへの 25 mg/kg の 4 週間の投与後、ベースラインレベルよりも約 5 倍増加した。同様に、 $CD45RA^{+}\beta 7^{\text{中}}$ 間体 T 細胞（フェノタイプがヒトナイーブ T 細胞に類似）は 25 mg/kg の 4 週間の投与後にまた増加した（ベースラインよりも約 2.5 倍大きい）。これらの結果は、 $rhMAb\beta 7$ の作用機序、すなわち、末梢循環へのこれらの細胞の蓄積につながる、 $\alpha 4\beta 7$ のそのリガンドへの結合の障害を介した、 $\beta 7$ 陽性リンパ球の腸への輸送の障害と一致する。これらの現象は、さらにカニクイザルの将来の研究に展開するであろう。

付録 2 F

実験要約表

試験物質： $rhMAb\beta 7$

実験のタイプ：非 GLP、インビボ、複数回投与、安全性及び薬物動態学

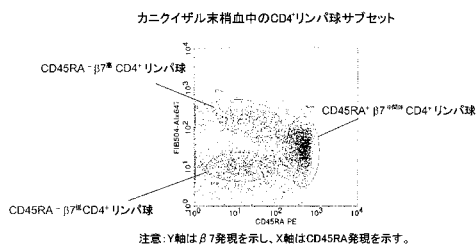
方法：動物は 3 つのグループのうちの一つにランダム化され、試験物質の 4 週間の IV 投与を行った。グループ 1（5 匹の雄と 5 匹の雌）の動物は 1.25 mg/kg の $rhMAb\beta 7$ ビヒクルを投与した。グループ 2（3 匹の雄と 3 匹の雌）とグループ 3（5 匹の雄と 5 匹の雌）の動物はそれぞれ、5 及び 25 mg/kg の $rhMAb\beta 7$ を投与した。それぞれのグループの 3 匹の雄及び 3 匹の雌は、最終投与の 1 週間後に終末剖検した。ビヒクル又は 25 mg/kg の $rhMAb\beta 7$ を投与したグループからの 2 匹の雄及び 2 匹の雌は、回復剖検の前の約 23 週間の回復期間追跡した。血清サンプルは合計の $rhMAb\beta 7$ レベルを測定するための定量的な ELISA と $rhMAb\beta 7$ に対する抗体の応答レベルを決定するための架橋電気化学発光によって解析した。合計の占有及び非占有 $\beta 7$ 発現 $CD4^{+}$ 及び $CD8^{+}$ T 細胞サブセット、 $CD4^{+}$ 及び $CD8^{+}$ T 細胞サブセット上の占有率、及びリンパ球サブセット（全ての B 細胞、T 細胞、及びナチュラルキラー細胞）をフローサイトメトリーによって解析した。薬物動態学データは、非分画及び 2 分画解析を行った。

結果：全体として、4 週間の IV 投与後の $rhMAb\beta 7$ の血液濃度－時間プロフィールは、緩やかな除去段階の後の速い初期分配段階を伴う二相変化であった。抗治療抗体（ATA）が検知された場合を除いて、容器の血清濃度は第二の投与後に増加した。最初の投与後の 0 日目から 7 日目までの（ AUC_{0-7} / 投与）の血清濃度－時間プロフィールの投与平均化領域は 5 mg/kg 及び 25 mg/kg 投与のグループについて類似しており、 $rhMAb\beta 7$ は、調べた投与領域におけるカニクイザル中の投与比例的な薬物土応対を示すことを示唆した。 25 mg/kg 投与グループについて、第一の投与と比較して、 AUC_{0-7} 及び最大血清濃度（ C_{max} ）は、最後の投与後に約 2 倍増加した。これらの見解は両者ともに、カニクイザルへの 25 mg/kg の 4 週間の IV 投与後に $rhMAb\beta 7$ の蓄積があったことを示唆した；しかし、このような蓄積は、これらの投与量における長い半減期を有する抗体について期待されたものである。 25 mg/kg の回収動物からのデータの比較解析は 2.93 mL/日/kg のクリアランスと比較的長い 14.5 日の終末半減期が見積もられた。しかし、4 匹中 3 のサルは、 $rhMAb\beta 7$ の

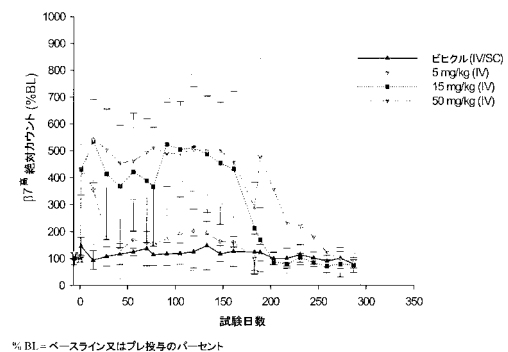
クリアランスに役立つであろう A T A を有する。インテグリン $\beta 7$ レセプター占有率アッセイは、末梢血 T 細胞サブセット上の $\beta 7$ レセプターは、第一の 4 週間の 5 又は 25 mg/kg の r h u M A b $\beta 7$ のカニクイザルへの投与後に完全に飽和したことを示唆した。利用可能な $\beta 7$ の検出は、r h u M A b $\beta 7$ の血清濃度の減少に関係し、約 1 – 10 g/mL より大きな血清濃度は、末梢血 T 細胞上の $\beta 7$ レセプターの占有率を維持するであろう。C D 4 5 R A $^{-}$ $\beta 7^{+}$ 高 T 細胞（フェノタイプがヒトとマウスの腸ホーミング T 細胞に類似）は、カニクイザルへの 25 mg/kg の 4 週間の投与後、ベースラインレベルよりも約 5 倍増加した。同様に、C D 4 5 R A $^{+}$ $\beta 7^{+}$ 中間体 T 細胞（フェノタイプがヒトナイーブ T 細胞に類似）は 25 mg/kg の 4 週間の投与後にまた増加した（ベースラインよりも約 2.5 倍大きい）。これらの結果は、r h u M A b $\beta 7$ の作用機序、すなわち、末梢循環へのこれらの細胞の蓄積につながる、 $\alpha 4 \beta 7$ のそのリガンドへの結合の障害を介した、 $\beta 7$ 陽性リンパ球の腸への輸送の障害と一致する。

10

【図 1】



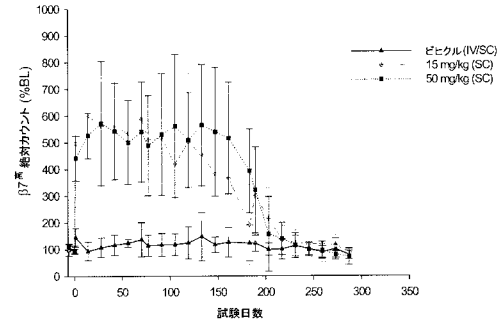
【図 2】



カニクイザルに対する 5、15、又は 50 mg/kg の r h u M A b $\beta 7$ の 12 の静脈内投与又はビヒクルの 12 の静脈内及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均 (±SD) CD45RA $^{-}$ $\beta 7^{+}$ CD4⁺ リンパ球 (絶対カウント、%BL)

注意: プレ投与から試験 80 日まで、n=10 であるグループ 2 (5 mg/kg IV)、投与後から試験 57 日まで n=13 であるグループ 1 (ビヒクル)、及び投与後から試験 15 日まで n=13 であるグループ 3 (15 mg/kg IV) を除いて各グループは n=14 である。グループ 2 (5 mg/kg IV) が n=4、グループ 1 (ビヒクル) が n=7、及びグループ 3 (15 mg/kg IV) が n=7 であることを除いて試験 81 日目から 184 日まで、各グループは n=8 である。グループ 2 (5 mg/kg IV) において全ての動物を安楽死させたグループ 1 (ビヒクル) が n=3 であり、グループ 3 (15 mg/kg IV) が n=3 であることを除いて試験 185 から 288 日まで n=4 である。これらの評価は非ブロッッキング抗体の 9D8 (5、9、1 率を参照されたい) を用いて行った。

【図 3】

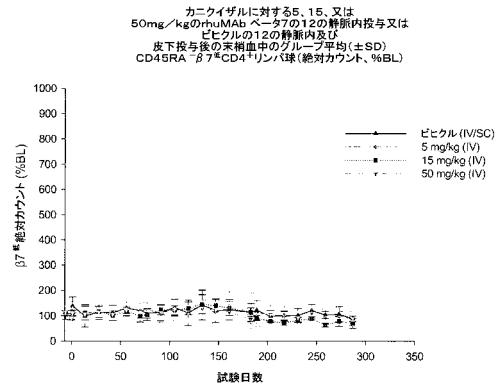


% BL = ベースライン又はプレ投与のパーセント

注意: プレ投与から試験80日目まで、投与後から試験57日までn=13であるグループ1(ビシクル)を除いて各グループはn=14である。グループ1(ビシクル)がn=7あることを除いて試験81日目から184日目まで、各グループはn=8である。グループ2(5mg/kg IV)において全ての動物を安楽死させ、グループ1(ビシクル)がn=3であり、グループ3(15mg/kg IV)がn=3であることを除いて試験185から288日目までn=4である。これらの詳細は非プロテクト抗体の9D8(5.9.1章を参照されたい)を用いて行った。

カニクイザルに対する5、15、又は50mg/kgのrhumaMab ベータ7の12の皮下投与又はビシクルの12の静脈内投与及び皮下投与後の末梢血中のグループ平均(±SD) CD45RA⁺β7⁺CD4⁺リンパ球(絶対カウント、%BL)

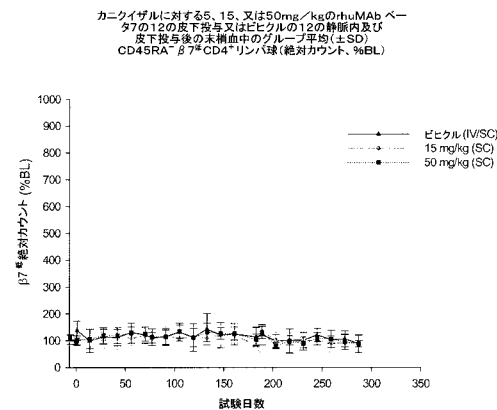
【図 4】



% BL = ベースライン又はプレ投与のパーセント

注意: プレ投与から試験80日目まで、n=10であるグループ2(5mg/kg IV)、投与後から試験57日までn=13であるグループ1(ビシクル)及び投与後から試験15日目までn=1であるグループ3(15mg/kg IV)を除いて各グループはn=14である。グループ2(5mg/kg IV)がn=4、グループ1(ビシクル)がn=7、及びグループ3(15mg/kg IV)がn=7であることを除いて試験81日目から184日目まで、各グループはn=8である。グループ2(5mg/kg IV)において全ての動物を安楽死させ、グループ1(ビシクル)がn=3であり、グループ3(15mg/kg IV)がn=3であることを除いて試験185から288日目までn=4である。これらの詳細は非プロテクト抗体の9D8(5.9.1章を参照されたい)を用いて行った。

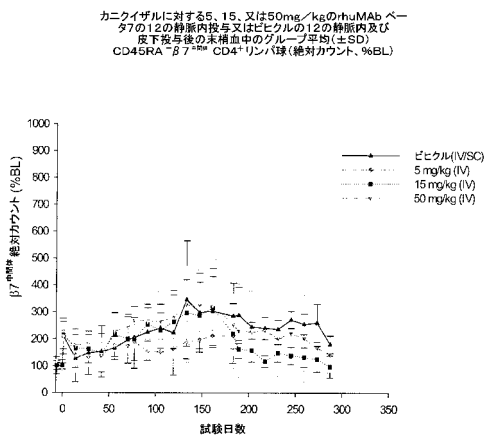
【図 5】



% BL = ベースライン又はプレ投与のパーセント

注意: プレ投与から試験80日目まで、投与後から試験57日までn=13であるグループ1(ビシクル)を除いて各グループはn=14である。グループ1(ビシクル)がn=7あることを除いて試験81日目から184日目まで、各グループはn=8である。グループ2(5mg/kg IV)において全ての動物を安楽死させ、グループ1(ビシクル)がn=3であり、グループ3(15mg/kg IV)がn=3であることを除いて試験185から288日目までn=4である。これらの詳細は非プロテクト抗体の9D8(5.9.1章を参照されたい)を用いて行った。

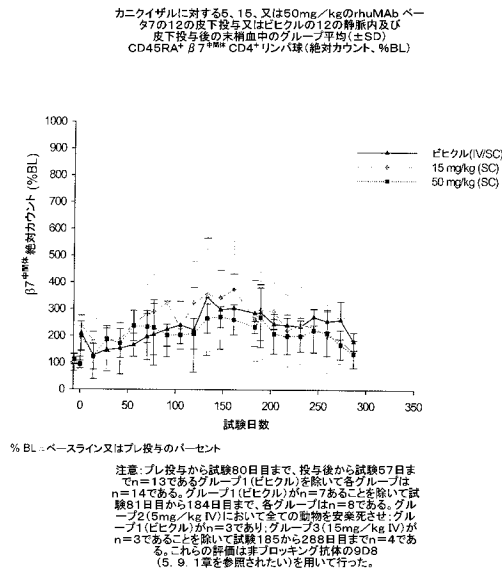
【図 6】



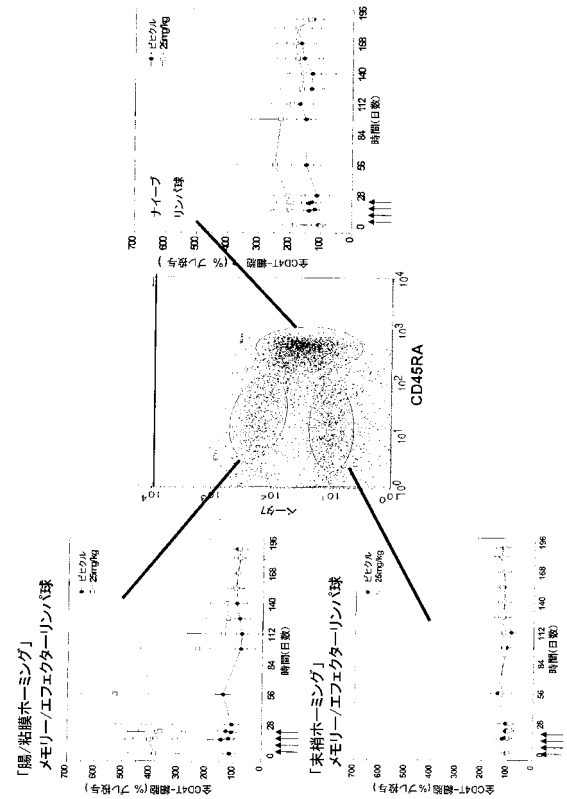
% BL = ベースライン又はプレ投与のパーセント

注意: プレ投与から試験80日目まで、n=10であるグループ2(5mg/kg IV)、投与後から試験57日までn=13であるグループ1(ビシクル)及び投与後から試験15日目までn=1であるグループ3(15mg/kg IV)を除いて各グループはn=14である。グループ2(5mg/kg IV)がn=4、グループ1(ビシクル)がn=7、及びグループ3(15mg/kg IV)がn=7であることを除いて試験81日目から184日目まで、各グループはn=8である。グループ2(5mg/kg IV)において全ての動物を安楽死させ、グループ1(ビシクル)がn=3であり、グループ3(15mg/kg IV)がn=3であることを除いて試験185から288日目までn=4である。これらの詳細は非プロテクト抗体の9D8(5.9.1章を参照されたい)を用いて行った。

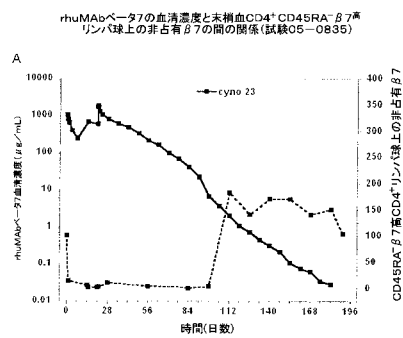
【図 7】



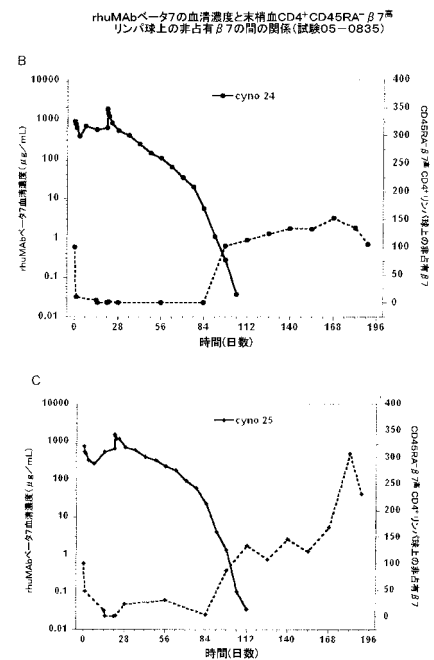
【図 8】



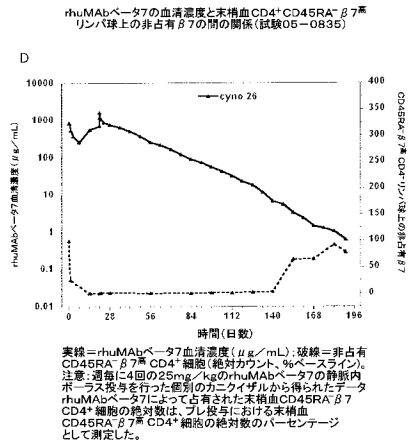
【図 9 A】



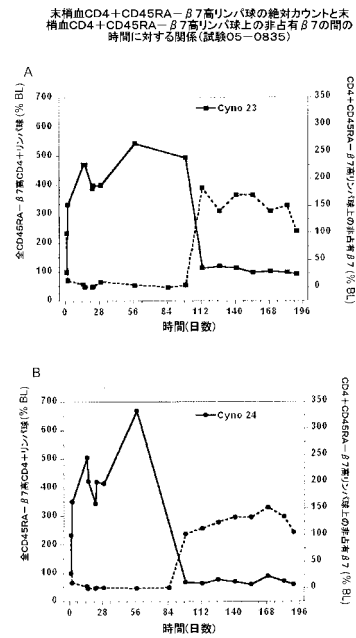
【図 9 B C】



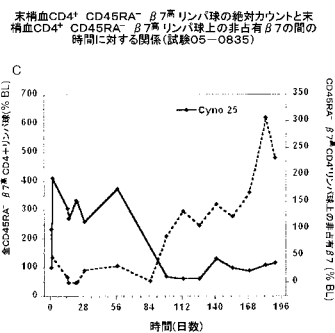
【図 9 D】



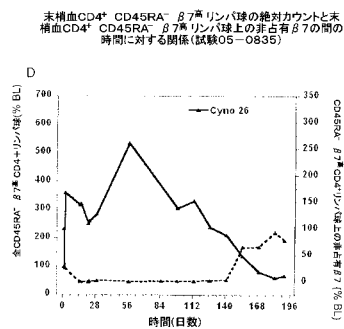
【図 10 A B】



【図 10 C】

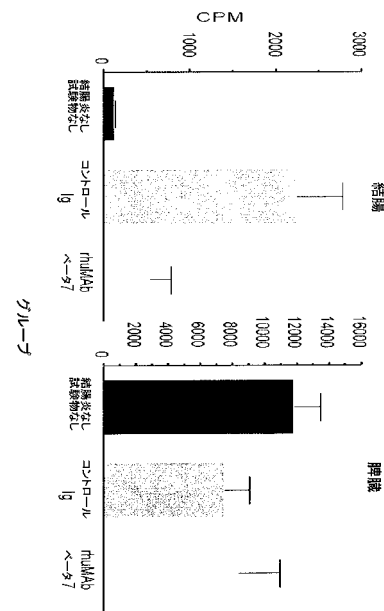


【図 10 D】



BL: ベースライン
 注意: 破線=非占有CD45RA⁺β7⁺CD4⁺細胞(絶対カウント, %ベースライン)
 実験=全占有及び非占有CD45RA⁺β7⁺CD4⁺細胞(絶対カウント, %ベースライン); カニクイザルは25mg/kgのrhMAbベータ7の4回の週毎のIVボラス投与を行った。

【図 11】



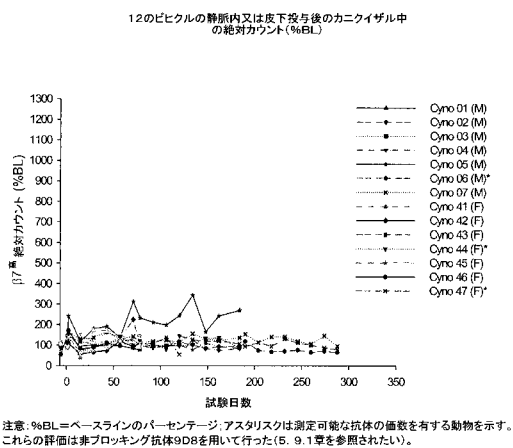
【図 1 2 A】

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35					
huK1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	W						
Flt504	D	V	V	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	T	P	G	E	R	I	S	L	S	C	R	A	S	E	S	V	D	I	T	Y	L	H	W				
504K graft	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	E	S	V	D	I	T	Y	L	H	W					
hu504-5																																								
hu504-16																																								
hu504-32																																								
Kabat#	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75
huK1	Y	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	I	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I		
Flt504	Y	Q	K	P	N	E	S	P	R	L	I	I	K	V	A	S	Q	S	I	S	G	I	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I		
504K graft	Y	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	I	I	K	V	A	S	Q	S	I	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	I		
Kabat#	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108						
huK1	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO.12)						
Flt504	N	G	V	E	L	E	D	L	S	I	Y	Y	C	Q	Q	G	N	S	L	P	N	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K	R	(SEQ ID NO.10)						
504K graft	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	N	S	L	P	N	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	(SEQ ID NO.14)						

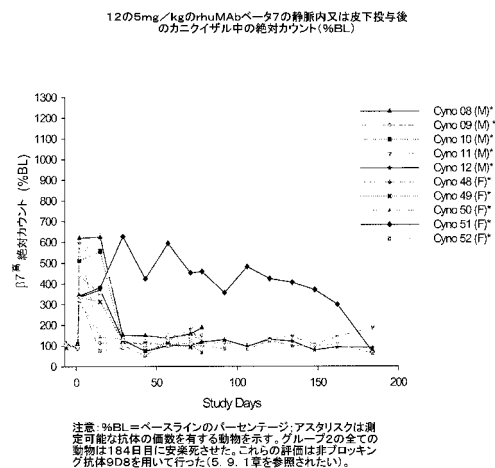
【図 1 2 B】

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G
Flt504	E	V	Q	L	E	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	Q	S	L	S	L	T	C	S	V	T	G	F	F	I	T	N	Y	W	G	W	I	R	K	F	P	G		
504K graft	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	F	I	T	N	Y	W	G	W	V	R	Q	A	P	G	
Kabat#	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	a
hum III	K	G	L	E	W	V	S	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	
Flt504	N	K	M	E	W	M	G	Y	I	S	Y	S	G	S	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	T	R	D	T	S	K	N	Q	F	F	L	Q	M	N
504K graft	K	G	L	E	W	V	G	Y	I	S	Y	S	G	S	T	S	Y	N	P	S	L	K	S	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A	Y	L	Q	M	N	
hu504-5																																										
hu504-16																																										
hu504-32																																										
Kabat#	b	c	63	64	65	66	67	68	69	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	a	k	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113							
hum III	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO.13)												
Flt504	S	V	T	T	E	D	T	A	T	Y	Y	C	A	M	T	G	S	S	G	Y	F	D	F	W	G	P	G	T	M	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO.11)							
504K graft	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	M	T	G	S	S	G	Y	F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	(SEQ ID NO.15)							

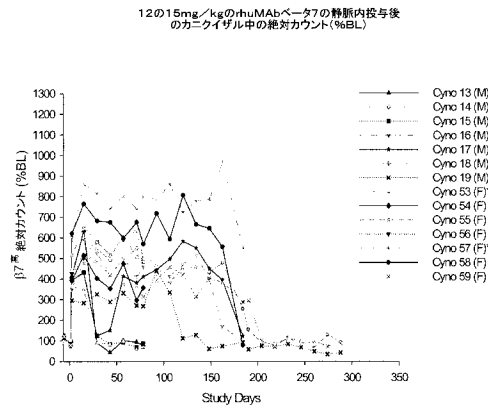
【図 1 3】



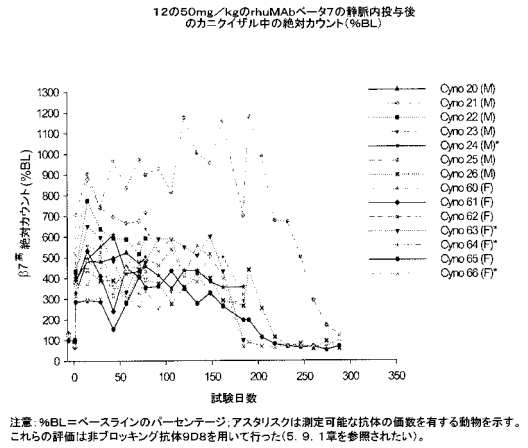
【図 1 4】



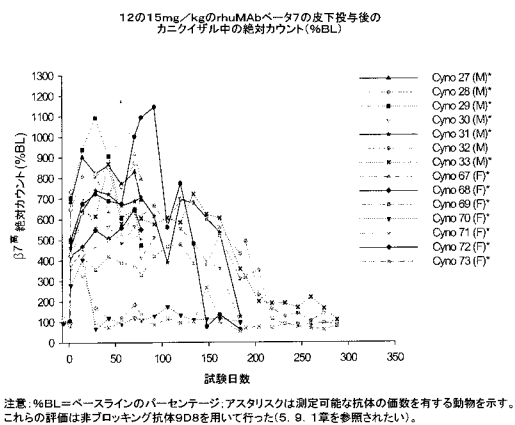
【図 15】



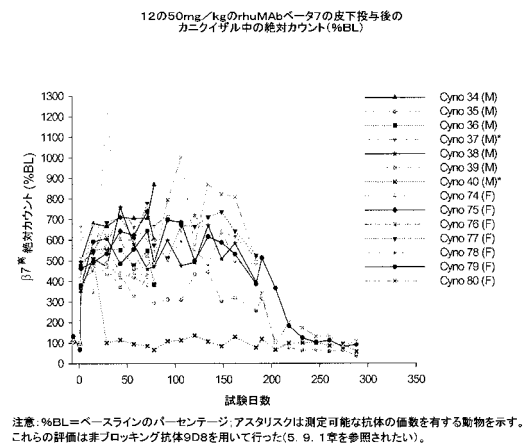
【図 16】



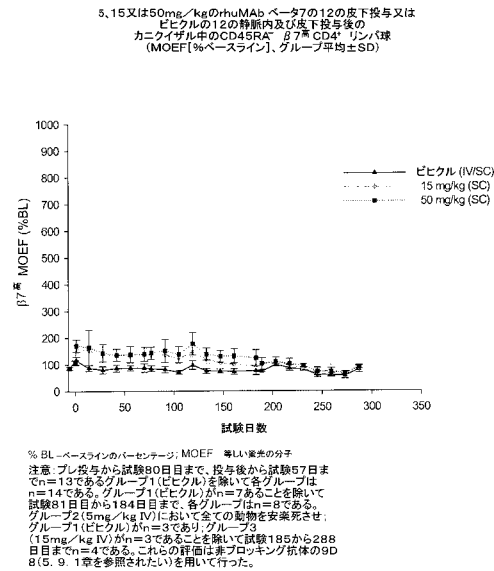
【図 17】



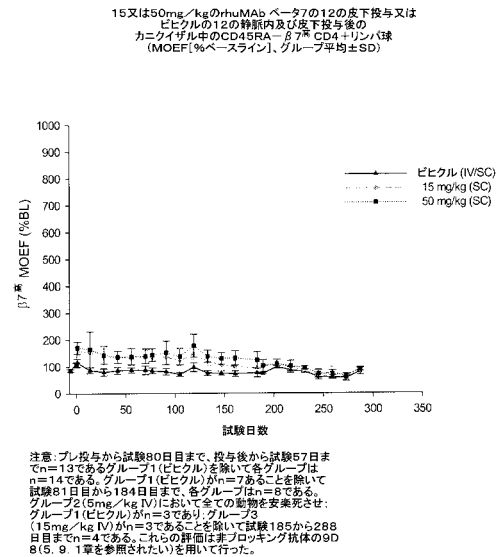
【図 18】



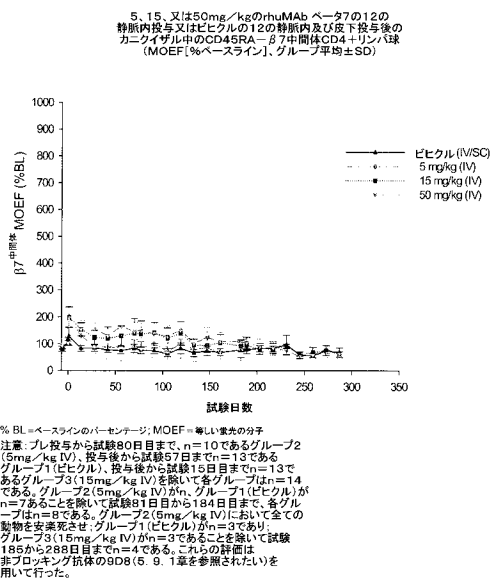
【図 19】



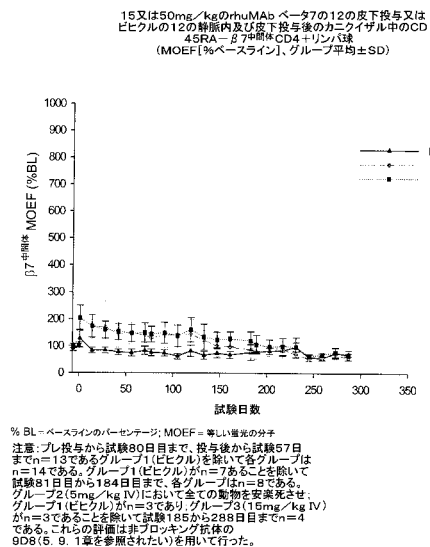
【図 20】



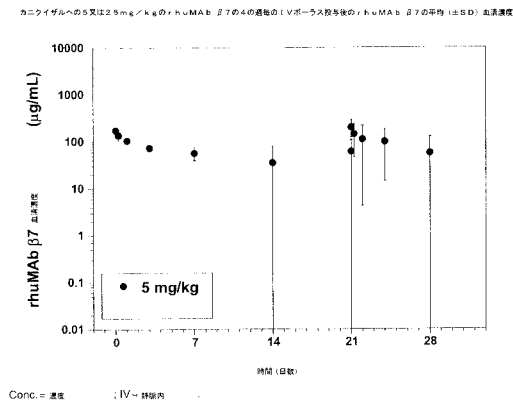
【図 21】



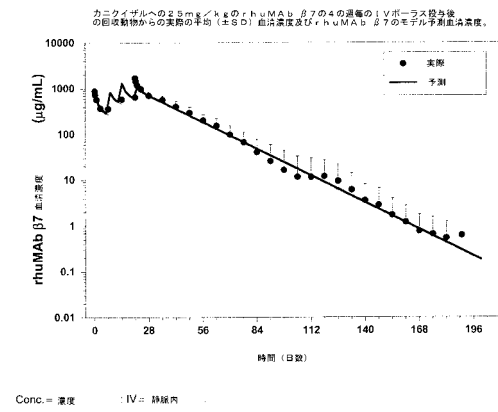
【図 22】



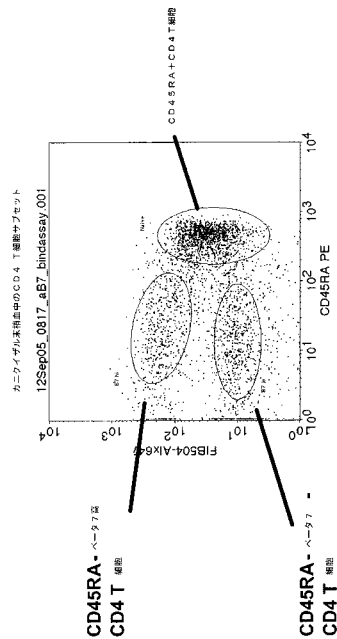
【図 23】



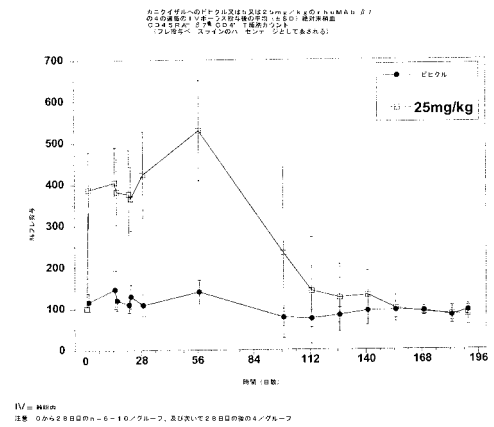
【図 24】



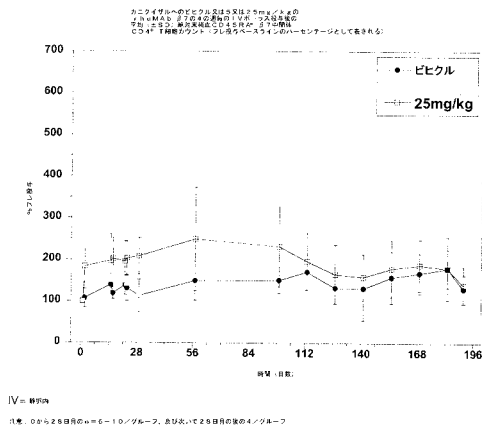
【図 25】



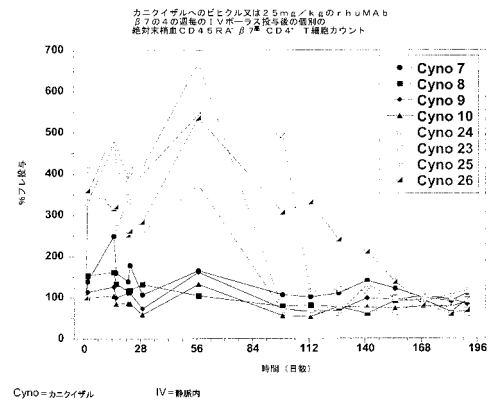
【図 26】



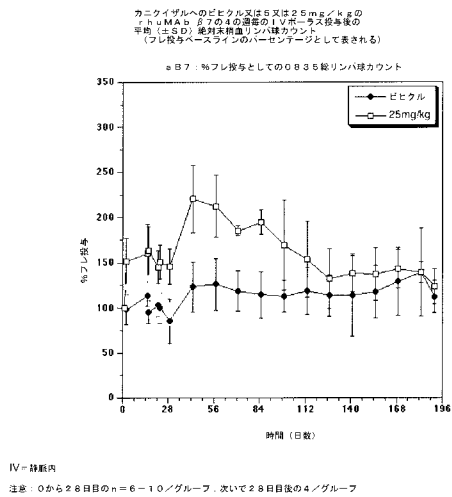
【図 27】



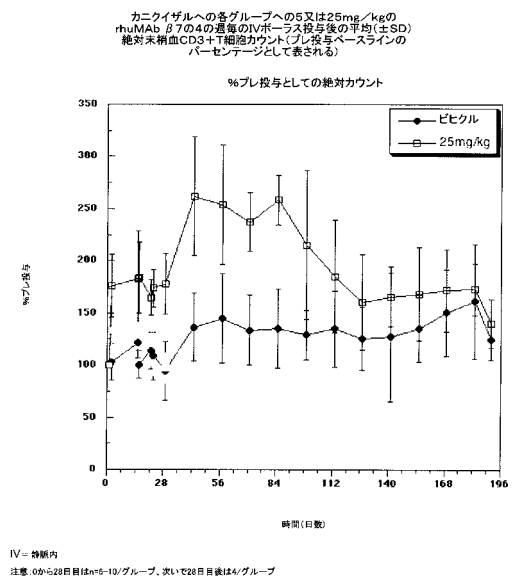
【図 28】



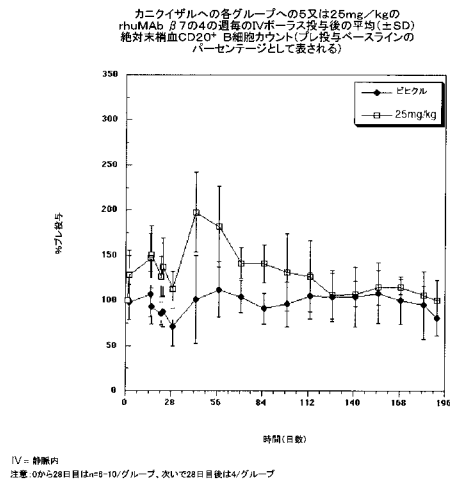
【図 29】



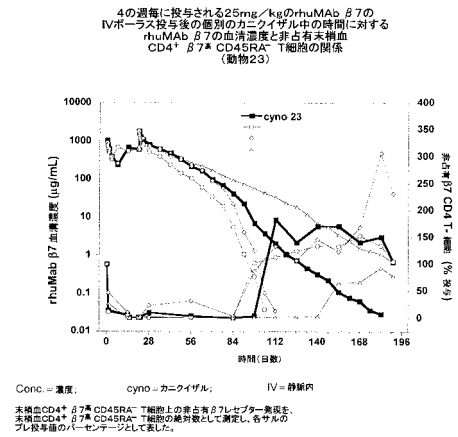
【図 30】



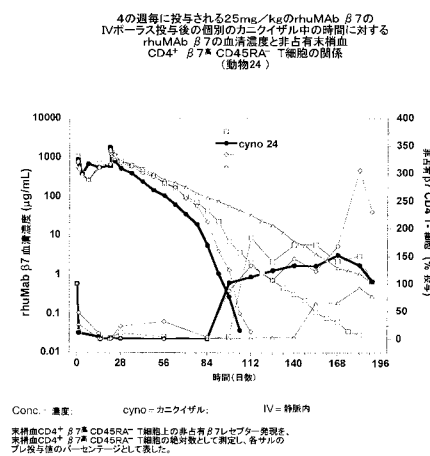
【図 3 1】



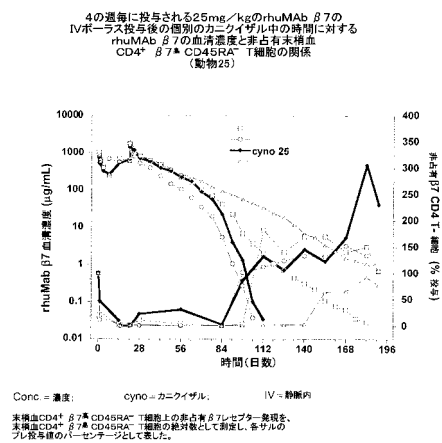
【図 3 2 A】



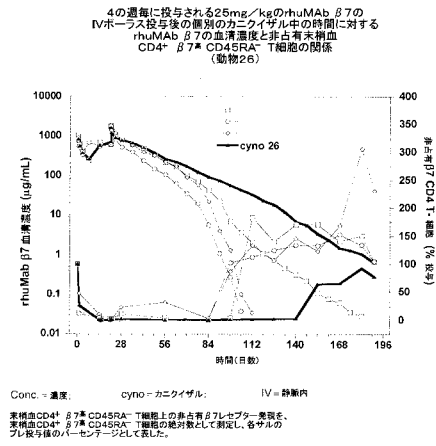
【図 3 2 B】



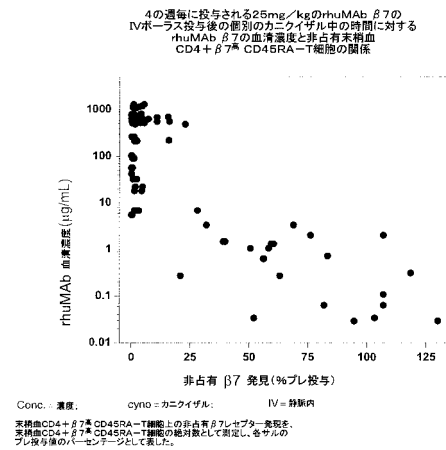
【図 3 2 C】



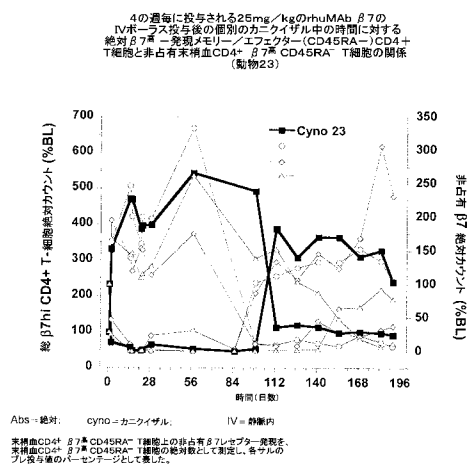
【図 3 2 D】



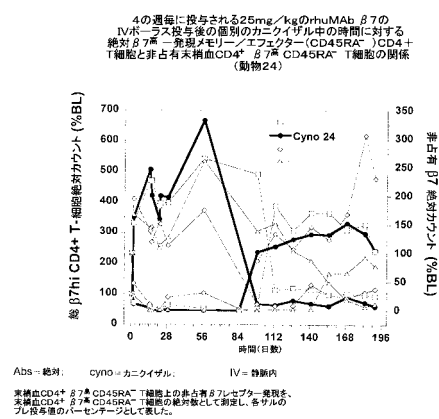
【図 3 3】



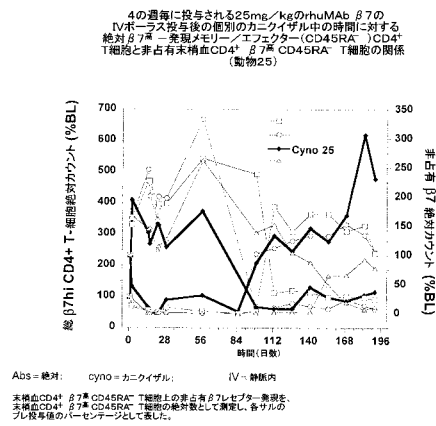
【図 3 4 A】



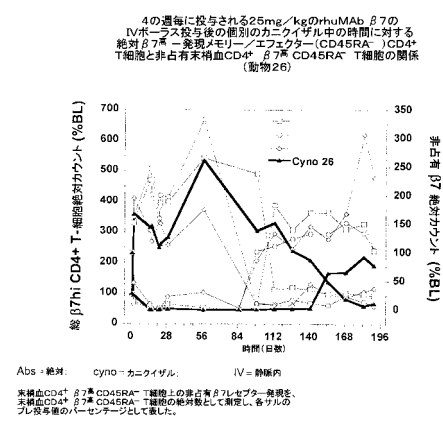
【図 3 4 B】



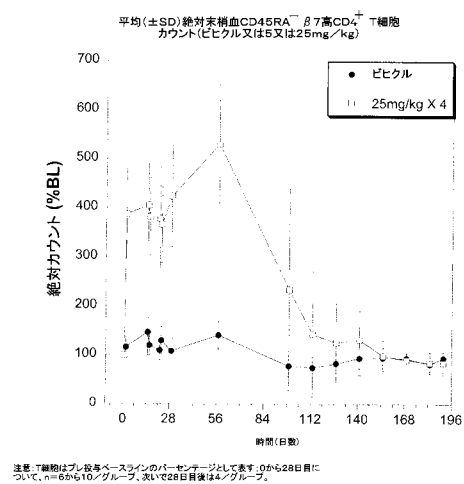
【図 3 4 C】



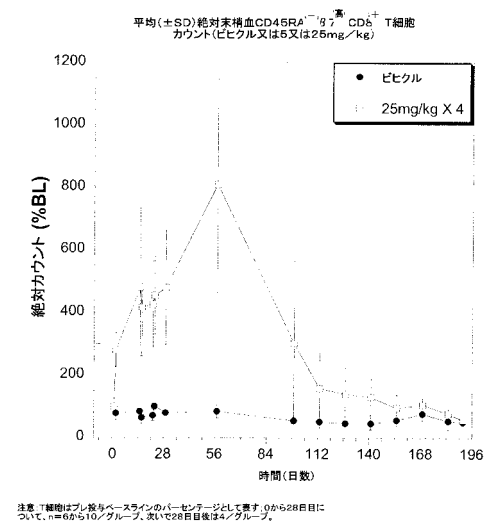
【図 3 4 D】



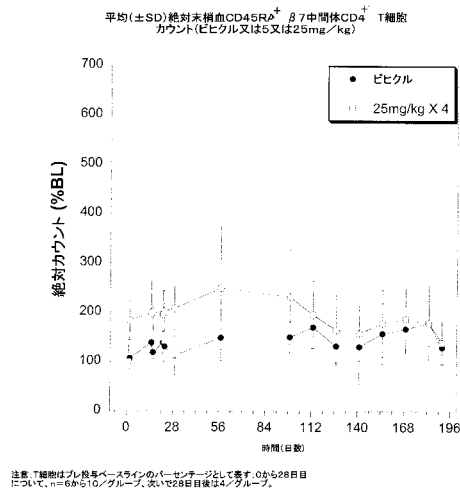
【図 3 5】



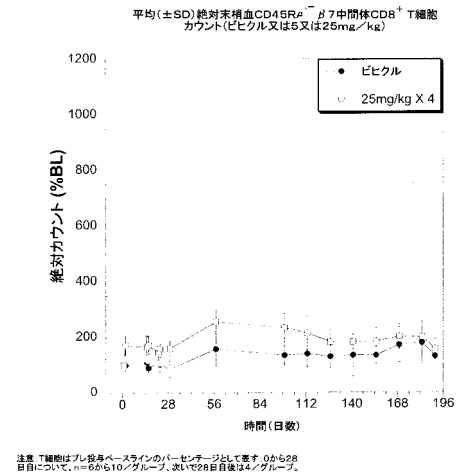
【図 3 6】



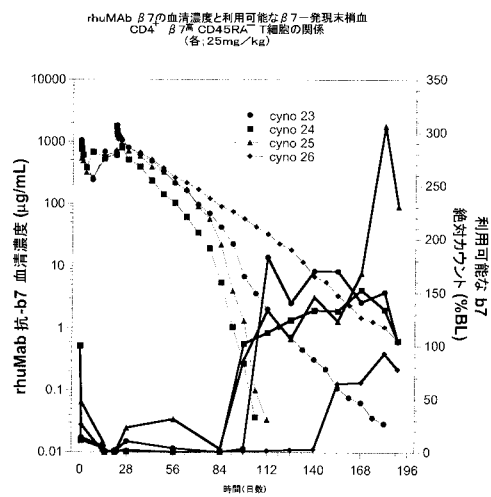
【図 37】



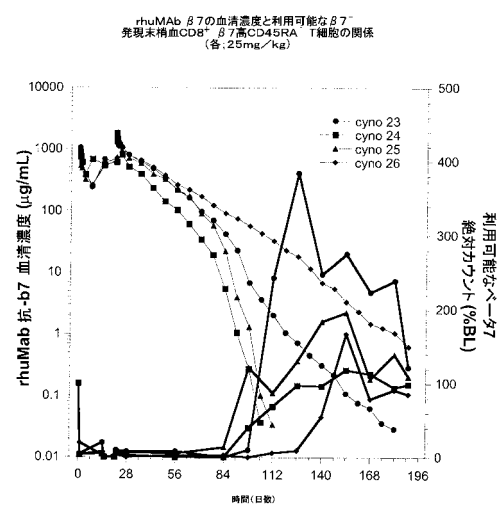
【図 38】



【図 39】



【図 40】



【配列表】

2017223685000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年8月17日(2017.8.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の消化管炎症性障害の治療のためのインテグリンベータ7アンタゴニストの効能を決定する方法において、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療の後又は間に患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量を、治療前の患者から得たサンプル中のバイオマーカーの量と比較することを含み、ここで、治療前と比較して、治療後又は間のバイオマーカーの量の変化が、患者の消化管障害の治療のためのアンタゴニストの効能を示し、バイオマーカーが、患者の末梢血中の腸ホーミングリンパ球、腸ホーミングリンパ球上のインテグリンベータ7アンタゴニスト占有率、及び腸ホーミングリンパ球上のベータ7インテグリンレセプターからなる群から選択される方法。

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
 C O 7 K 16/28 (2006.01) C O 7 K 16/28
 C O 7 K 16/18 (2006.01) C O 7 K 16/18
- (72)発明者 平良木 肇
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94107, サン フランシスコ, 207番, ミネソタ
 ストリート 1310
- (72)発明者 ステファニック, エリック, ゲリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94062, エメラルド ヒルズ, パーク ロード 64
 7
- (72)発明者 ワン, ホン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ロスリン アヴェニュー
 47
- (72)発明者 ウィリアムズ, マーナ, ブロンバーグ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94306, パロ アルト, エリー プレイス 347
- F ターム (参考) 2G045 AA25 AA40 CA17 CA25 DA36 FB03
 4B063 QA18 QQ03 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33 QX01
 4C084 AA17 NA14 ZA662 ZC422
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

【外国語明細書】
2017223685000001.pdf