

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512210

(P2019-512210A)

(43) 公表日 令和1年5月16日 (2019.5.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/22 (2006.01)	C 0 7 K 16/22 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 7 6
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 75 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-540833 (P2018-540833)
 (86) (22) 出願日 平成29年2月6日 (2017.2.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年8月29日 (2018.8.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/016659
 (87) 国際公開番号 W02017/136807
 (87) 国際公開日 平成29年8月10日 (2017.8.10)
 (31) 優先権主張番号 62/291, 987
 (32) 優先日 平成28年2月5日 (2016.2.5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508152917
 ザ ボード オブ リージェンツ オブ
 ザ ユニバーシティー オブ テキサス
 システム
 アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス州
 オースティン ウェスト 第七 ストリ
 ート 2 1 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E G F L 6 特異的モノクローナル抗体及びそれらの使用方法

(57) 【要約】

単離または組換え抗 E G F L 6 モノクローナル抗体が提供される。いくつかの場合では、実施形態の抗体は、癌のような、ヒト疾患の検出、診断、及び / または治療処置に使用することができる。

【選択図】 図 1

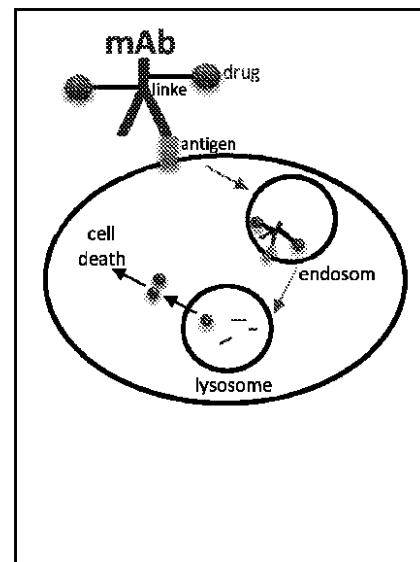


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離モノクローナル抗体であって、前記抗体が、E G F L 6 に特異的に結合し、

(I)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 4 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 5 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 6 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 7 6 と同一であることと、
- (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 7 7 と同一であることと、
- (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 7 8 と同一であることと、

10

(I I)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 1 0 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 1 1 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 1 2 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 8 2 と同一であることと、
- (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 8 3 と同一であることと、
- (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 8 4 と同一であることと、

(I I I)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 1 6 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 1 7 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 1 8 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 8 8 と同一であることと、
- (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 7 7 と同一であることと、
- (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 8 9 と同一であることと、

20

(I V)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 2 2 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 2 3 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 2 4 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 9 3 と同一であることと、
- (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 9 4 と同一であることと、
- (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 9 5 と同一であることと、

30

(V)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 2 8 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 2 9 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 3 0 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 9 9 と同一であることと、
- (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 1 0 0 と同一であることと、
- (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 0 1 と同一であることと、

(V I)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 3 4 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 3 5 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 3 6 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 0 4 と同一であることと、
- (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 1 0 0 と同一であることと、
- (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 0 5 と同一であることと、

40

(V I I)

- (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 4 0 と同一であることと、
- (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 4 1 と同一であることと、
- (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 4 2 と同一であることと、
- (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 0 8 と同一であることと、

50

(e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 7 7 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 0 9 と同一であること、
 (V I I I)
 (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 4 6 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 4 7 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 4 8 と同一であることと、
 (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 1 3 と同一であることと、
 (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 8 3 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 1 4 と同一であること、
 (I X)

10

(a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 5 2 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 5 3 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 5 4 と同一であることと、
 (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 1 7 と同一であることと、
 (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 8 3 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 1 9 と同一であること、
 (X)

20

(a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 5 8 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 5 9 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 6 0 と同一であることと、
 (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 2 1 と同一であることと、
 (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 1 0 0 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 2 2 と同一であること、
 (X I)
 (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 6 4 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 6 5 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 6 6 と同一であることと、
 (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 2 6 と同一であることと、
 (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 1 2 7 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 2 8 と同一であること、または

30

(X I I)
 (a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 7 0 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 7 1 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 7 2 と同一であることと、
 (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 1 3 1 と同一であることと、
 (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 1 0 0 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 1 3 2 と同一であること

を含む、単離抗体。

【請求項 2】

40

(a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 4 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 5 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 6 と同一であることと、
 (d) 第 1 の V_L C D R が配列番号 7 6 と同一であることと、
 (e) 第 2 の V_L C D R が配列番号 7 7 と同一であることと、
 (f) 第 3 の V_L C D R が配列番号 7 8 と同一であること

を含む、請求項 1 に記載の単離抗体。

【請求項 3】

50

(a) 第 1 の V_H C D R が配列番号 1 0 と同一であることと、
 (b) 第 2 の V_H C D R が配列番号 1 1 と同一であることと、
 (c) 第 3 の V_H C D R が配列番号 1 2 と同一であることと、

(d) 第1のV_L CDRが配列番号82と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号83と同一であることと、
 (f) 第3のV_L CDRが配列番号84と同一であること
 を含む、請求項1に記載の単離抗体。

【請求項4】

(a) 第1のV_H CDRが配列番号16と同一であることと、
 (b) 第2のV_H CDRが配列番号17と同一であることと、
 (c) 第3のV_H CDRが配列番号18と同一であることと、
 (d) 第1のV_L CDRが配列番号88と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号77と同一であることと、
 (f) 第3のV_L CDRが配列番号89と同一であること
 を含む、請求項1に記載の単離抗体。

10

【請求項5】

(a) 第1のV_H CDRが配列番号22と同一であることと、
 (b) 第2のV_H CDRが配列番号23と同一であることと、
 (c) 第3のV_H CDRが配列番号24と同一であることと、
 (d) 第1のV_L CDRが配列番号93と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号94と同一であることと、
 (f) 第3のV_L CDRが配列番号95と同一であること
 を含む、請求項1に記載の単離抗体。

20

【請求項6】

(a) 第1のV_H CDRが配列番号28と同一であることと、
 (b) 第2のV_H CDRが配列番号29と同一であることと、
 (c) 第3のV_H CDRが配列番号30と同一であることと、
 (d) 第1のV_L CDRが配列番号99と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号100と同一であることと、
 (f) 第3のV_L CDRが配列番号101と同一であること
 を含む、請求項1に記載の単離抗体。

【請求項7】

(a) 第1のV_H CDRが配列番号34と同一であることと、
 (b) 第2のV_H CDRが配列番号35と同一であることと、
 (c) 第3のV_H CDRが配列番号36と同一であることと、
 (d) 第1のV_L CDRが配列番号104と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号100と同一であることと、
 (f) 第3のV_L CDRが配列番号105と同一であること
 を含む、請求項1に記載の単離抗体。

30

【請求項8】

(a) 第1のV_H CDRが配列番号40と同一であることと、
 (b) 第2のV_H CDRが配列番号41と同一であることと、
 (c) 第3のV_H CDRが配列番号42と同一であることと、
 (d) 第1のV_L CDRが配列番号108と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号77と同一であることと、
 (f) 第3のV_L CDRが配列番号109と同一であること
 を含む、請求項1に記載の単離抗体。

40

【請求項9】

(a) 第1のV_H CDRが配列番号46と同一であることと、
 (b) 第2のV_H CDRが配列番号47と同一であることと、
 (c) 第3のV_H CDRが配列番号48と同一であることと、
 (d) 第1のV_L CDRが配列番号113と同一であることと、
 (e) 第2のV_L CDRが配列番号83と同一であることと、

50

(f) 第3のV_LCDRが配列番号114と同一であることを含む、請求項1に記載の単離抗体。

【請求項10】

(a) 第1のV_HCDRが配列番号52と同一であることと、
 (b) 第2のV_HCDRが配列番号53と同一であることと、
 (c) 第3のV_HCDRが配列番号54と同一であることと、
 (d) 第1のV_LCDRが配列番号117と同一であることと、
 (e) 第2のV_LCDRが配列番号83と同一であることと、
 (f) 第3のV_LCDRが配列番号119と同一であることを含む、請求項1に記載の単離抗体。

10

【請求項11】

(a) 第1のV_HCDRが配列番号58と同一であることと、
 (b) 第2のV_HCDRが配列番号59と同一であることと、
 (c) 第3のV_HCDRが配列番号60と同一であることと、
 (d) 第1のV_LCDRが配列番号121と同一であることと、
 (e) 第2のV_LCDRが配列番号100と同一であることと、
 (f) 第3のV_LCDRが配列番号122と同一であることを含む、請求項1に記載の単離抗体。

【請求項12】

(a) 第1のV_HCDRが配列番号64と同一であることと、
 (b) 第2のV_HCDRが配列番号65と同一であることと、
 (c) 第3のV_HCDRが配列番号66と同一であることと、
 (d) 第1のV_LCDRが配列番号126と同一であることと、
 (e) 第2のV_LCDRが配列番号127と同一であることと、
 (f) 第3のV_LCDRが配列番号128と同一であることを含む、請求項1に記載の単離抗体。

20

【請求項13】

(a) 第1のV_HCDRが配列番号70と同一であることと、
 (b) 第2のV_HCDRが配列番号71と同一であることと、
 (c) 第3のV_HCDRが配列番号72と同一であることと、
 (d) 第1のV_LCDRが配列番号131と同一であることと、
 (e) 第2のV_LCDRが配列番号100と同一であることと、
 (f) 第3のV_LCDRが配列番号132と同一であることを含む、請求項1に記載の単離抗体。

30

【請求項14】

(i) E1-33(配列番号157)のV_HドメインもしくはE1-33mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-33(配列番号158)のV_LドメインもしくはE1-33mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(ii) E1-34(配列番号159)のV_HドメインもしくはE1-34mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-34(配列番号160)のV_LドメインもしくはE1-34mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

40

(iii) E1-80(配列番号161)のV_HドメインもしくはE1-80mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-80(配列番号162)のV_LドメインもしくはE1-80mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(iv) E1-89(配列番号163)のV_HドメインもしくはE1-89mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-89(配列番号164)のV_LドメインもしくはE1-80mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約

50

80%同一のV_Lドメイン、

(v) E2-93 (配列番号165)のV_HドメインもしくはE2-93mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE2-93 (配列番号166)のV_LドメインもしくはE2-93mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(vi) E1-38 (配列番号167)のV_HドメインもしくはE1-38mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-38 (配列番号168)のV_LドメインもしくはE1-38mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(vii) E1-52 (配列番号169)のV_HドメインもしくはE1-52mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-52 (配列番号170)のV_LドメインもしくはE1-52mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(viii) E2-36 (配列番号171)のV_HドメインもしくはE2-36mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE2-36 (配列番号172)のV_LドメインもしくはE2-36mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(ix) E1-95 (配列番号173)のV_HドメインもしくはE1-95mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-95 (配列番号174)のV_LドメインもしくはE1-95mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(x) E2-116 (配列番号175)のV_HドメインもしくはE2-116mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE2-116 (配列番号176)のV_LドメインもしくはE2-116mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、

(xi) E2-135 (配列番号177)のV_HドメインもしくはE2-135mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE2-135 (配列番号178)のV_LドメインもしくはE2-135mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン、または

(xii) E1-142 (配列番号179)のV_HドメインもしくはE1-142mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%同一のV_Hドメイン、及びE1-142 (配列番号180)のV_LドメインもしくはE1-142mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%同一のV_Lドメイン

を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項15】

E1-33 (配列番号157)のV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、E1-33 (配列番号158)のV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む、請求項14に記載の抗体。

【請求項16】

E1-34 (配列番号159)のV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、E1-34 (配列番号160)のV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む、請求項14に記載の抗体。

【請求項17】

E1-80 (配列番号161)のV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、E1-80 (配列番号162)のV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む、請求項14に記載の抗体。

【請求項18】

E1-89 (配列番号163)のV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、E1-89 (配列番号164)のV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む、請求項14に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

E 2 - 9 3 (配列番号 1 6 5) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 2 - 9 3 (配列番号 1 6 6) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 20】

E 1 - 3 8 (配列番号 1 6 7) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 1 - 3 8 (配列番号 1 6 8) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 21】

E 1 - 5 2 (配列番号 1 6 9) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 1 - 5 2 (配列番号 1 7 0) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

10

【請求項 22】

E 2 - 3 6 (配列番号 1 7 1) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 2 - 3 6 (配列番号 1 7 2) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 23】

E 1 - 9 5 (配列番号 1 7 3) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 1 - 9 5 (配列番号 1 7 4) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

20

【請求項 24】

E 2 - 1 1 6 (配列番号 1 7 5) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 2 - 1 1 6 (配列番号 1 7 6) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 25】

E 2 - 1 3 5 (配列番号 1 7 7) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 2 - 1 3 5 (配列番号 1 7 8) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 26】

E 1 - 1 4 2 (配列番号 1 7 9) の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、E 1 - 1 4 2 (配列番号 1 8 0) の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む、請求項 1 4 に記載の抗体。

30

【請求項 27】

E 1 - 3 3、E 1 - 3 4、E 1 - 8 0、E 1 - 8 9、E 2 - 9 3、E 1 - 3 8、E 1 - 5 2、E 2 - 3 6、E 1 - 9 5、E 2 - 1 1 6、E 2 - 1 3 5、または E 1 - 1 4 2 抗体である、請求項 1 4 に記載の抗体。

【請求項 28】

組換え体である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 29】

I g G、I g M、I g A、またはこれらの抗原結合断片である、請求項 1 に記載の抗体。

40

【請求項 30】

F a b'、F (a b')₂、F (a b')₃、一価 s c F v、二価 s c F v、または単一ドメイン抗体である、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 31】

ヒト抗体、ヒト化抗体、または脱免疫化抗体である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 32】

イメージング剤、化学療法剤、毒素、または放射性核種と複合されている、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体。

50

【請求項 33】

毒素と複合されている、請求項 32 に記載の抗体。

【請求項 34】

前記毒素が、アウリスタチンである、請求項 33 に記載の抗体。

【請求項 35】

前記毒素が、モノメチルアウリスタチン E (MMAE) である、請求項 33 に記載の抗体。

【請求項 36】

薬学的に許容される担体中に請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体を含む、組成物。

10

【請求項 37】

請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子。

【請求項 38】

E1-33 (配列番号 4、5、及び 6) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-34 (配列番号 10、11、及び 12) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-80 (配列番号 16、17、及び 18) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-89 (配列番号 22、23、及び 24) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-93 (配列番号 28、29、及び 30) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-38 (配列番号 34、35、及び 36) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-52 (配列番号 40、41、及び 42) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-36 (配列番号 46、47、及び 48) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-95 (配列番号 52、53、及び 54) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-116 (配列番号 58、59、及び 60) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-135 (配列番号 64、65、及び 66) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3、また

20

は

E1-142 (配列番号 70、71、及び 72) の V_H ドメインの CDR 1 ~ 3
 を含む抗体 V_H ドメインを含む、組換えポリペプチド。

【請求項 39】

E1-33 (配列番号 76、77、及び 78) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-34 (配列番号 82、83、及び 84) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-80 (配列番号 88、77、及び 89) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-89 (配列番号 93、94、及び 95) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-93 (配列番号 99、100、及び 101) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-38 (配列番号 104、100、及び 105) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-52 (配列番号 108、77、及び 109) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-36 (配列番号 113、83、及び 114) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E1-95 (配列番号 117、83、及び 118) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、
 E2-116 (配列番号 121、100、及び 122) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3

30

、

E2-135 (配列番号 126、127、及び 128) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3
 、または

E1-142 (配列番号 131、100、及び 132) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3
 を含む抗体 V_L ドメインを含む、組換えポリペプチド。

40

【請求項 40】

請求項 38 または 39 に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、単離ポリヌクレオチド分子。

【請求項 41】

請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 38 または 39 に記載の組換えポリペプチドをコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を含む、宿主細胞。

50

【請求項 4 2】

哺乳動物細胞、酵母細胞、細菌細胞、繊毛虫細胞、または昆虫細胞である、請求項 4 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 4 3】

(a) 細胞中で、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体の V_L 及び V_H 鎖をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を発現させる段階と、

(b) 前記細胞から前記抗体を精製する段階とを含む、抗体の製造方法。

【請求項 4 4】

有効量の請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体を対象に投与する段階を含む、癌を有する対象を治療するための方法。

10

【請求項 4 5】

前記癌が、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、皮膚癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌、または皮膚癌である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記癌が、上皮癌である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記癌が、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、乳癌、肝細胞癌、卵巣癌、淡明細胞型腎細胞癌、肺癌、または腎臓癌である、請求項 4 4 に記載の方法。

20

【請求項 4 8】

前記抗体が、薬学的に許容される組成物中にある、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記抗体が、全身投与される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記抗体が、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、または局所投与される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記対象に少なくとも第 2 の抗癌療法を施す段階をさらに含む、請求項 4 4 に記載の方法。

30

【請求項 5 2】

前記第 2 の抗癌療法が、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法、またはサイトカイン療法である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

対象からの試料中の対照と比較して高い E G F L 6 の存在について試験する段階を含む、対象における癌を検出するための方法であって、

前記試験する段階が、前記試料を請求項 1 4 ~ 2 7 または 3 2 のいずれか一項に記載の抗体と接触させることを含む、方法。

【請求項 5 4】

インビトロ方法としてさらに定義される、請求項 5 3 に記載の方法。

40

【請求項 5 5】

(a) E 1 - 3 3 (配列番号 4)、E 1 - 3 4 (配列番号 1 0)、E 1 - 8 0 (配列番号 1 6)、E 1 - 8 9 (配列番号 2 2)、E 2 - 9 3 (配列番号 2 8)、E 1 - 3 8 (配列番号 3 4)、E 1 - 5 2 (配列番号 4 0)、E 2 - 3 6 (配列番号 4 6)、E 1 - 9 5 (配列番号 5 2)、E 2 - 1 1 6 (配列番号 5 8)、E 2 - 1 3 5 (配列番号 6 4)、または E 1 - 1 4 2 (配列番号 7 0) の V_H C D R 1 と少なくとも 8 0 % 同一の第 1 の V_H C D R と、

(b) E 1 - 3 3 (配列番号 5)、E 1 - 3 4 (配列番号 1 1)、E 1 - 8 0 (配列番号 1 7)、E 1 - 8 9 (配列番号 2 3)、E 2 - 9 3 (配列番号 2 9)、E 1 - 3 8 (配列番号 3 5)、E 1 - 5 2 (配列番号 4 1)、E 2 - 3 6 (配列番号 4 7)、E 1 - 9 5

50

(配列番号 53)、E2-116 (配列番号 59)、E2-135 (配列番号 65)、または E1-142 (配列番号 71) の V_H CDR2 と少なくとも 80% 同一の第 2 の V_H CDR と、

(c) E1-33 (配列番号 6)、E1-34 (配列番号 12)、E1-80 (配列番号 18)、E1-89 (配列番号 24)、E2-93 (配列番号 30)、E1-38 (配列番号 36)、E1-52 (配列番号 42)、E2-36 (配列番号 48)、E1-95 (配列番号 54)、E2-116 (配列番号 60)、E2-135 (配列番号 66)、または E1-142 (配列番号 72) の V_H CDR3 と少なくとも 80% 同一の第 3 の V_H CDR と、

(d) E1-33 (配列番号 76)、E1-34 (配列番号 82)、E1-80 (配列番号 88)、E1-89 (配列番号 93)、E2-93 (配列番号 99)、E1-38 (配列番号 104)、E1-52 (配列番号 108)、E2-36 (配列番号 113)、E1-95 (配列番号 117)、E2-116 (配列番号 121)、E2-135 (配列番号 126)、または E1-142 (配列番号 131) の V_L CDR1 と少なくとも 80% 同一の第 1 の V_L CDR と、

(e) E1-33 (配列番号 77)、E1-34 (配列番号 83)、E1-80 (配列番号 77)、E1-89 (配列番号 94)、E2-93 (配列番号 100)、E1-38 (配列番号 100)、E1-52 (配列番号 77)、E2-36 (配列番号 83)、E1-95 (配列番号 83)、E2-116 (配列番号 100)、E2-135 (配列番号 127)、または E1-142 (配列番号 100) の V_L CDR2 と少なくとも 80% 同一の第 2 の V_L CDR と、

(f) E1-33 (配列番号 78)、E1-34 (配列番号 84)、E1-80 (配列番号 89)、E1-89 (配列番号 95)、E2-93 (配列番号 101)、E1-38 (配列番号 105)、E1-52 (配列番号 109)、E2-36 (配列番号 114)、E1-95 (配列番号 118)、E2-116 (配列番号 122)、E2-135 (配列番号 128)、または E1-142 (配列番号 132) の V_L CDR3 と少なくとも 80% 同一の第 3 の V_L CDR と

を含む、単離抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2016年2月5日に出願された米国仮特許出願第62/291,987号の利益を主張し、その全体が本明細書に参照により組み込まれる。

【0002】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、一般的には癌生物学の分野に関する。より具体的には、癌の治療及び検出のための EGF L6 を標的とするモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0003】

2. 関連技術の説明

ヒト上皮増殖因子 (EGF) 様ドメイン 6 (EGF L6) は、腫瘍及び胎児組織中で最初に発見され、EGF 反復スーパーファミリーのメンバーである。EGF L6 は、4つと半分の EGF 様反復ドメイン、2つの N 結合グリコシル化部位、1つのインテグリン関連モチーフ (RGD)、チロシンリン酸化部位、及び MAM ドメインを有する分泌タンパク質として同定された (Yeung et al., 1999)。研究は、EGF L6 の高発現が、卵巣癌及び肺癌のような特定の癌タイプにおける腫瘍組織と関連していることを示し、健康な成人組織中で見られる発現は限られていた (Buckanovich et al., 2007、Chim et al., 2011、及び Oberauer et al., 2010)。しかしながら、EGF L6 陽性癌の治療のための試薬及び療法の

10

20

30

40

50

必要性が残っている。

【発明の概要】

【0004】

本明細書では、EGFL6に結合するEGFL6モノクローナル抗体について記載される。さらなる態様では、提供されるEGFL6結合抗体は、EGFL6シグナル伝達を低減し、癌細胞増殖を阻害するのに使用することができる。よって、第1の実施形態では、EGFL6に特異的に結合する単離または組換えモノクローナル抗体が提供される。特定の態様では、EGFL6のE1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142モノクローナル抗体との結合を競合する抗体が提供される。特定の態様では、抗体は、E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142モノクローナル抗体の重鎖可変領域及び/または軽鎖可変領域の全部または一部を含み得る。さらなる態様では、抗体は、本実施形態のE1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142モノクローナル抗体の軽鎖及び/または重鎖からの第1、第2、及び/または第3の相補性決定領域(CDR)に対応するアミノ酸配列を含み得る。

10

【0005】

特定の態様では、単離抗体は、E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142重鎖及び軽鎖アミノ酸配列のCDR領域と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のCDR配列を含む。さらなる態様では、抗体は、CDRのうちの1つ以上での1つまたは2つのアミノ酸置換、欠失、または挿入を除き、E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142CDR領域と同一のCDR領域を含む。例えば、抗体は、CDR配列が、E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142モノクローナル抗体のCDRと比較して、 V_H CDR1、 V_H CDR2、 V_H CDR3、 V_L CDR1、 V_L CDR2、及び/または V_L CDR3における1つまたは2つのアミノ酸置換を含む、CDRを含むことができる。よって、いくつかの特定の態様では、実施形態の抗体は、(a)E1-33(配列番号4)、E1-34(配列番号10)、E1-80(配列番号16)、E1-89(配列番号22)、E2-93(配列番号28)、E1-38(配列番号34)、E1-52(配列番号40)、E2-36(配列番号46)、E1-95(配列番号52)、E2-116(配列番号58)、E2-135(配列番号64)、またはE1-142(配列番号70)の V_H CDR1と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第1の V_H CDRと、(b)E1-33(配列番号5)、E1-34(配列番号11)、E1-80(配列番号17)、E1-89(配列番号23)、E2-93(配列番号29)、E1-38(配列番号35)、E1-52(配列番号41)、E2-36(配列番号47)、E1-95(配列番号53)、E2-116(配列番号59)、E2-135(配列番号65)、またはE1-142(配列番号71)の V_H CDR2と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第2の V_H CDRと、(c)E1-33(配列番号6)、E1-34(配列番号12)、E1-80(配列番号18)、E1-89(配列番号24)、E2-93(配列番号30)、E1-38(配列番号36)、E1-52(配列番号42)、E2-36(配列番号48)、E1-95(配列番号54)、E2-116(配列番号60)、E2-135(配列番号66)、またはE1-142(配列番号72)の V_H

20

30

40

50

C D R 3 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の第 3 の V_H C D R と、(d) E 1 - 33 (配列番号 76)、E 1 - 34 (配列番号 82)、E 1 - 80 (配列番号 88)、E 1 - 89 (配列番号 93)、E 2 - 93 (配列番号 99)、E 1 - 38 (配列番号 104)、E 1 - 52 (配列番号 108)、E 2 - 36 (配列番号 113)、E 1 - 95 (配列番号 117)、E 2 - 116 (配列番号 121)、E 2 - 135 (配列番号 126)、または E 1 - 142 (配列番号 131) の V_L C D R 1 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の第 1 の V_L C D R と、(e) E 1 - 33 (配列番号 77)、E 1 - 34 (配列番号 83)、E 1 - 80 (配列番号 77)、E 1 - 89 (配列番号 94)、E 2 - 93 (配列番号 100)、E 1 - 38 (配列番号 100)、E 1 - 52 (配列番号 77)、E 2 - 36 (配列番号 83)、E 1 - 95 (配列番号 83)、E 2 - 116 (配列番号 100)、E 2 - 135 (配列番号 127)、または E 1 - 142 (配列番号 100) の V_L C D R 2 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の第 2 の V_L C D R と、(f) E 1 - 33 (配列番号 78)、E 1 - 34 (配列番号 84)、E 1 - 80 (配列番号 89)、E 1 - 89 (配列番号 95)、E 2 - 93 (配列番号 101)、E 1 - 38 (配列番号 105)、E 1 - 52 (配列番号 109)、E 2 - 36 (配列番号 114)、E 1 - 95 (配列番号 118)、E 2 - 116 (配列番号 122)、E 2 - 135 (配列番号 128)、または E 1 - 142 (配列番号 132) の V_L C D R 3 と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の第 3 の V_L C D R と、を含む。特定の態様では、こうした抗体は、ヒト I g G (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 4、または遺伝的に修飾された I g G) 骨格上に前述の C D R を含むヒト化または脱免疫化抗体である。

10

20

30

40

50

【0006】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号 4、5、6、76、77、及び 78 により表される、モノクローナル抗体 E 1 - 33 の対応する C D R 配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の第 1 の V_H 、第 2 の V_H 、第 3 の V_H 、第 1 の V_L 、第 2 の V_L 、及び第 3 の V_L C D R 配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 33 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

【0007】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 33 (配列番号 157) の V_H ドメインまたは E 1 - 33 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の V_H ドメインと、E 1 - 33 の V_L ドメイン (配列番号 158) または E 1 - 33 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 1 - 33 m A B の V_H ドメインと少なくとも 95 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 33 m A B の V_L ドメインと少なくとも 95 % 同一の V_L ドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化 E 1 - 33 m A B の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 33 m A B の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 33 のものと同一の V_H 及び V_L ドメインを含むことができる。

【0008】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号 10、11、12、82、83、及び 84 により表される、モノクローナル抗体 E 1 - 34 の対応する C D R 配列と少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一の第 1 の V_H 、第 2 の V_H 、第 3 の V_H 、第 1 の V_L 、第 2 の V_L 、及び第 3 の V_L C D R 配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、

モノクローナル抗体 E 1 - 3 4 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

【 0 0 0 9 】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 3 4 (配列番号 1 5 9) の V_H ドメインまたは E 1 - 3 4 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_H ドメインと、E 1 - 3 4 (配列番号 1 6 0) の V_L ドメインまたは E 1 - 3 4 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 1 - 3 4 m A B の V_H ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 3 4 m A B の V_L ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_L ドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化 E 1 - 3 4 m A B の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 3 4 m A B の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 3 4 のものと同じの V_H 及び V_L ドメインを含むことができる。

10

【 0 0 1 0 】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号 1 6、1 7、1 8、8 8、7 7、及び 8 9 により表される、モノクローナル抗体 E 1 - 8 0 の対応する C D R 配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の第 1 の V_H、第 2 の V_H、第 3 の V_H、第 1 の V_L、第 2 の V_L、及び第 3 の V_L C D R 配列を含む。1 つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 8 0 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

20

【 0 0 1 1 】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 8 0 (配列番号 1 6 1) の V_H ドメインまたは E 1 - 8 0 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_H ドメインと、E 1 - 8 0 (配列番号 1 6 2) の V_L ドメインまたは E 1 - 8 0 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 1 - 8 0 m A B の V_H ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 8 0 m A B の V_L ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_L ドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化 E 1 - 8 0 m A B の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 8 0 m A B の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 8 0 のものと同じの V_H 及び V_L ドメインを含むことができる。

30

【 0 0 1 2 】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号 2 2、2 3、2 4、9 3、9 4、及び 9 5 により表される、モノクローナル抗体 E 1 - 8 9 の対応する C D R 配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の第 1 の V_H、第 2 の V_H、第 3 の V_H、第 1 の V_L、第 2 の V_L、及び第 3 の V_L C D R 配列を含む。1 つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 8 9 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

40

【 0 0 1 3 】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 8 9 (配列番号 1 6 3) の V_H ドメインまたは E 1 - 8 9 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_H ドメインと、E 1 - 8 9 (配列番号 1 6 4) の V_L ドメインまたは E 1 - 8 9 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 1 - 8 9 m A B の V_H ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 8 9 m A B の V_L ドメインと少なくとも 9 5 %

50

%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E 1 - 8 9 m A BのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E 1 - 8 9 m A BのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 1 - 8 9のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

【0014】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号28、29、30、99、100、及び101により表される、モノクローナル抗体E 2 - 93の対応するCDR配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第1のV_H、第2のV_H、第3のV_H、第1のV_L、第2のV_L、及び第3のV_L CDR配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 2 - 93のCDR配列と同一であるCDR配列を含む。

10

【0015】

別の態様では、単離抗体は、E 2 - 93（配列番号165）のV_HドメインまたはE 2 - 93 m A Bのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Hドメインと、E 2 - 93（配列番号166）のV_LドメインまたはE 2 - 93 m A Bのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Lドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化E 2 - 93 m A BのV_Hドメインと少なくとも95%同一のV_Hドメインと、ヒト化E 2 - 93 m A BのV_Lドメインと少なくとも95%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E 2 - 93 m A BのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E 2 - 93 m A BのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 2 - 93のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

20

【0016】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号34、35、36、104、100、及び105により表される、モノクローナル抗体E 1 - 38の対応するCDR配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第1のV_H、第2のV_H、第3のV_H、第1のV_L、第2のV_L、及び第3のV_L CDR配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 1 - 38のCDR配列と同一であるCDR配列を含む。

30

【0017】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 38（配列番号167）のV_HドメインまたはE 1 - 38 m A Bのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Hドメインと、E 1 - 38（配列番号168）のV_LドメインまたはE 1 - 38 m A Bのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Lドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化E 1 - 38 m A BのV_Hドメインと少なくとも95%同一のV_Hドメインと、ヒト化E 1 - 38 m A BのV_Lドメインと少なくとも95%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E 1 - 38 m A BのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E 1 - 38 m A BのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 1 - 38のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

40

【0018】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号40、41、42、108、77、及び109により表される、モノクローナル抗体E 1 - 52の対応するCDR配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第1のV_H、第2のV_H、第3のV_H、第1のV_L、第2のV_L、及び第3のV_L CDR配列を含む。1つの態様では、単離抗体

50

は、モノクローナル抗体 E 1 - 5 2 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 5 2 (配列番号 1 6 9) の V_H ドメインまたは E 1 - 5 2 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_H ドメインと、E 1 - 5 2 (配列番号 1 7 0) の V_L ドメインまたは E 1 - 5 2 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 1 - 5 2 m A B の V_H ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 5 2 m A B の V_L ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_L ドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化 E 1 - 5 2 m A B の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 5 2 m A B の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 5 2 のものと同じの V_H 及び V_L ドメインを含むことができる。

10

【 0 0 2 0 】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号 4 6、4 7、4 8、1 1 3、8 3、及び 1 1 4 により表される、モノクローナル抗体 E 2 - 3 6 の対応する C D R 配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の第 1 の V_H、第 2 の V_H、第 3 の V_H、第 1 の V_L、第 2 の V_L、及び第 3 の V_L C D R 配列を含む。1 つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 2 - 3 6 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

20

【 0 0 2 1 】

別の態様では、単離抗体は、E 2 - 3 6 (配列番号 1 7 1) の V_H ドメインまたは E 2 - 3 6 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_H ドメインと、E 2 - 3 6 (配列番号 1 7 2) の V_L ドメインまたは E 2 - 3 6 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 2 - 3 6 m A B の V_H ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 2 - 3 6 m A B の V_L ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_L ドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化 E 2 - 3 6 m A B の V_H ドメインと同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 2 - 3 6 m A B の V_L ドメインと同一の V_L ドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 2 - 3 6 のものと同じの V_H 及び V_L ドメインを含むことができる。

30

【 0 0 2 2 】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号 5 2、5 3、5 4、1 1 7、8 3、及び 1 1 9 により表される、モノクローナル抗体 E 1 - 9 5 の対応する C D R 配列と少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の第 1 の V_H、第 2 の V_H、第 3 の V_H、第 1 の V_L、第 2 の V_L、及び第 3 の V_L C D R 配列を含む。1 つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体 E 1 - 9 5 の C D R 配列と同一である C D R 配列を含む。

40

【 0 0 2 3 】

別の態様では、単離抗体は、E 1 - 9 5 (配列番号 1 7 3) の V_H ドメインまたは E 1 - 9 5 m A B のヒト化 V_H ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_H ドメインと、E 1 - 9 5 (配列番号 1 7 4) の V_L ドメインまたは E 1 - 9 5 m A B のヒト化 V_L ドメインと少なくとも約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % 同一の V_L ドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化 E 1 - 9 5 m A B の V_H ドメインと少なくとも 9 5 % 同一の V_H ドメインと、ヒト化 E 1 - 9 5 m A B の V_L ドメインと少なくとも 9 5 %

50

%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E 1 - 95 m A BのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E 1 - 95 m A BのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 1 - 95のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

【0024】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号58、59、60、121、100、及び122により表される、モノクローナル抗体E 2 - 116の対応するCDR配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第1のV_H、第2のV_H、第3のV_H、第1のV_L、第2のV_L、及び第3のV_L CDR配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 2 - 116のCDR配列と同一であるCDR配列を含む。

10

【0025】

別の態様では、単離抗体は、E 2 - 116（配列番号175）のV_HドメインまたはE 2 - 116 m A Bのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Hドメインと、E 2 - 116（配列番号176）のV_LドメインまたはE 2 - 116 m A Bのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Lドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化E 2 - 116 m A BのV_Hドメインと少なくとも95%同一のV_Hドメインと、ヒト化E 2 - 116 m A BのV_Lドメインと少なくとも95%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E 2 - 116 m A BのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E 2 - 116 m A BのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 2 - 116のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

20

【0026】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号64、65、66、126、127、及び128により表される、モノクローナル抗体E 2 - 135の対応するCDR配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一の第1のV_H、第2のV_H、第3のV_H、第1のV_L、第2のV_L、及び第3のV_L CDR配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 2 - 135のCDR配列と同一であるCDR配列を含む。

30

【0027】

別の態様では、単離抗体は、E 2 - 135（配列番号177）のV_HドメインまたはE 2 - 135 m A Bのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Hドメインと、E 2 - 135（配列番号178）のV_LドメインまたはE 2 - 135 m A Bのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Lドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化E 2 - 135 m A BのV_Hドメインと少なくとも95%同一のV_Hドメインと、ヒト化E 2 - 135 m A BのV_Lドメインと少なくとも95%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E 2 - 135 m A BのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E 2 - 135 m A BのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E 2 - 135のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

40

【0028】

さらなる態様では、単離抗体は、それぞれ、配列番号70、71、72、131、100、及び132により表される、モノクローナル抗体E 1 - 142の対応するCDR配列と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96

50

%、97%、98%、99%、または100%同一の第1のV_H、第2のV_H、第3のV_H、第1のV_L、第2のV_L、及び第3のV_L CDR配列を含む。1つの態様では、単離抗体は、モノクローナル抗体E1-142のCDR配列と同一であるCDR配列を含む。

【0029】

別の態様では、単離抗体は、E1-142（配列番号179）のV_HドメインまたはE1-142 mABのヒト化V_Hドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Hドメインと、E1-142（配列番号180）のV_LドメインまたはE1-142 mABのヒト化V_Lドメインと少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一のV_Lドメインと、を含む。例えば、抗体は、ヒト化E1-142 mABのV_Hドメインと少なくとも95%同一のV_Hドメインと、ヒト化E1-142 mABのV_Lドメインと少なくとも95%同一のV_Lドメインと、を含むことができる。よって、いくつかの態様では、抗体は、ヒト化E1-142 mABのV_Hドメインと同一のV_Hドメインと、ヒト化E1-142 mABのV_Lドメインと同一のV_Lドメインと、を含む。具体的な例では、単離抗体は、モノクローナル抗体E1-142のものと同一のV_H及びV_Lドメインを含むことができる。

10

【0030】

いくつかの態様では、実施形態の抗体は、IgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）、IgM、IgA、遺伝的に修飾されたIgGアイソタイプ、またはこれらの抗原結合断片であり得る。抗体は、Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、一価scFv、二価scFv、二重特異性、または単ドメイン抗体であり得る。抗体は、ヒト、ヒト化、または脱免疫化抗体であり得る。さらなる態様では、単離抗体は、E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135、またはE1-142抗体である。

20

【0031】

いくつかの態様では、抗体は、イメージング剤、化学療法剤、毒素、または放射性核種と複合され得る。具体的な態様では、抗体は、アウリスタチンまたは特にモノメチルアウリスタチンE（MMAE）と複合され得る。

30

【0032】

1つの実施形態では、E1-33（配列番号4、5、及び6）のV_HドメインのCDR1~3、E1-34（配列番号10、11、及び12）のV_HドメインのCDR1~3、E1-80（配列番号16、17、及び18）のV_HドメインのCDR1~3、E1-89（配列番号22、23、及び24）のV_HドメインのCDR1~3、E2-93（配列番号28、29、及び30）のV_HドメインのCDR1~3、E1-38（配列番号34、35、及び36）のV_HドメインのCDR1~3、E1-52（配列番号40、41、及び42）のV_HドメインのCDR1~3、E2-36（配列番号46、47、及び48）のV_HドメインのCDR1~3、E1-95（配列番号52、53、及び54）のV_HドメインのCDR1~3、E2-116（配列番号58、59、及び60）のV_HドメインのCDR1~3、E2-135（配列番号64、65、及び66）のV_HドメインのCDR1~3、またはE1-142（配列番号70、71、及び72）のV_HドメインのCDR1~3を含む抗体V_Hドメインを含む、組換えポリペプチドが提供される。別の実施形態では、E1-33（配列番号76、77、及び78）のV_LドメインのCDR1~3、E1-34（配列番号82、83、及び84）のV_LドメインのCDR1~3、E1-80（配列番号88、77、及び89）のV_LドメインのCDR1~3、E1-89（配列番号93、94、及び95）のV_LドメインのCDR1~3、E2-93（配列番号99、100、及び101）のV_LドメインのCDR1~3、E1-38（配列番号104、100、及び105）のV_LドメインのCDR1~3、E1-52（配列番号108、77、及び109）のV_LドメインのCDR1~3、E2-36（配列番号113、83

40

50

、及び 114) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、E 1 - 95 (配列番号 117、83、及び 118) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、E 2 - 116 (配列番号 121、100、及び 122) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、E 2 - 135 (配列番号 126、127、及び 128) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3、または E 1 - 142 (配列番号 131、100、及び 132) の V_L ドメインの CDR 1 ~ 3 を含む抗体 V_L ドメインを含む、組換えポリペプチドが提供される。

【0033】

いくつかの実施形態では、抗体または本明細書に開示される抗体 V_H もしくは V_L ドメインを含むポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離ポリヌクレオチド分子が提供される。

10

【0034】

さらなる実施形態では、実施形態のモノクローナル抗体または組換えポリペプチドを産生する宿主細胞が提供される。いくつかの態様では、宿主細胞は、哺乳動物細胞、酵母細胞、細菌細胞、纖毛虫細胞、または昆虫細胞である。特定の態様では、宿主細胞は、ハイブリドーマ細胞である。

【0035】

またさらなる実施形態では、細胞中で本明細書に開示される抗体の V_L または V_H 鎖をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチド分子を発現させることと、細胞から抗体を精製することと、含む、本発明の抗体の製造方法が提供される。

【0036】

追加の実施形態では、本明細書に記載されるような抗体または抗体断片を含む薬学的組成物がある。こうした組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含み、追加の有効成分を含有してもしなくてもよい。

20

【0037】

本発明の実施形態では、有効量の本明細書に開示される抗体を投与することを含む、癌を有する対象の治療方法が提供される。特定の態様では、抗体は、E 1 - 33、E 1 - 34、E 1 - 80、E 1 - 89、E 2 - 93、E 1 - 38、E 1 - 52、E 2 - 36、E 1 - 95、E 2 - 116、E 2 - 135、もしくは E 1 - 142 抗体またはこれらから誘導される抗体断片を含む組換えポリペプチドのような、本明細書における実施形態のモノクローナル抗体である。

30

【0038】

特定の態様では、癌は、乳癌、肺癌、頭頸部癌、前立腺癌、食道癌、気管癌、脳癌、肝臓癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、精巣癌、結腸癌、直腸癌、または皮膚癌であり得る。具体的な態様では、癌は、上皮癌である。他の態様では、癌は、結腸直腸腺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、乳癌、肝細胞癌、卵巣癌、淡明細胞型腎細胞癌、肺癌、または腎臓癌であり得る。

【0039】

1 つの態様では、抗体は、全身投与され得る。追加の態様では、抗体は、静脈内、皮内、腫瘍内、筋肉内、腹腔内、皮下、または局所投与され得る。方法は、対象に少なくとも第 2 の抗癌療法を行うことをさらに含み得る。第 2 の抗癌療法の例としては、これらに限定されないが、外科療法、化学療法、放射線療法、凍結療法、ホルモン療法、免疫療法、またはサイトカイン療法が挙げられる。

40

【0040】

さらなる態様では、方法は、対象に本発明の組成物を、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20 回以上のような、1 回以上投与することをさらに含み得る。

【0041】

別の実施形態では、対象からの試料中の対照と比較して高い EGF L6 の存在について試験することを含む、対象における癌の検出方法であって、試験が、試料を本明細書に開示される抗体と接触させることを含む、方法が提供される。例えば、方法は、インビトロ

50

またはインビボ方法であり得る。

【0042】

特定の実施形態は、E G F L 6 に特異的に結合する抗体または単離及び／もしくは組換え抗体もしくはポリペプチドを含む組換えポリペプチド組成物を対象とする。特定の態様では、抗体またはポリペプチドは、本明細書で提供されるいずれかのモノクローナル抗体の全部または一部と、少なくとも、または多くて80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一（またはその中で誘導可能ないずれかの範囲）である配列を有する。またさらなる態様では、単離及び／または組換え抗体またはポリペプチドは、本明細書で提供される配列のいずれかまたはこうした配列の組み合わせからの、少なく

10

【0043】

またさらなる態様では、実施形態の抗体またはポリペプチドは、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかの1つ以上のアミノ酸セグメントを含む。例えば、抗体またはポリペプチドは、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかと少なくとも80、85、90、95、96、97、98、99、または100%同一である、その間の全ての値及び範囲を含む、約、少なくとも、または多くて5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25～25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、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、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200個のアミノ酸長を含む、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個以上のアミノ酸セグメントを含むことができる。特定の態様では、アミノセグメントは、本明細書で提供されるE G F L 6 結合抗体のアミノ酸配列のうちの1つから選択される。

20

30

40

【0044】

またさらなる態様では、実施形態の抗体またはポリペプチドは、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸セグメントを含み、セグメントは、本明細書で提供されるいずれかの配列においてアミノ酸位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25～25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、

50

50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200で始まり、同じ提供される配列においてアミノ酸位置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、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、または200で終わる。特定の態様では、アミノセグメント、またはその部分は、本明細書で提供されるEGFL6結合抗体のアミノ酸配列のうちの1つから選択される。

10

20

30

40

50

【0045】

またさらなる態様では、実施形態の抗体またはポリペプチドは、(表1及び2に提供されるような)EGFL6結合抗体のV、VJ、VDJ、D、DJ、J、またはCDRドメインと少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一(またはその中で誘導可能ないずれかの範囲)であるアミノ酸セグメントを含む。例えば、ポリペプチドは、表1及び2に提供されるようなEGFL6結合抗体のCDR1、2、及び/または3と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一(またはその中で誘導可能ないずれかの範囲)である1、2、または3つのアミノ酸セグメントを含み得る。

【0046】

本発明の方法及び/または組成物の文脈において議論される実施形態は、本明細書に記載されるいずれかの他の方法または組成物に関して使用され得る。よって、1つの方法または組成物に関する実施形態は、本発明の他の方法及び組成物にも適用され得る。

【0047】

本明細書で使用されるとき、「1つの(a)」または「1つの(an)」は、1つ以上

を意味し得る。特許請求の範囲で使用されるとき、「含む (c o m p r i s i n g) 」という語と共に使用される場合、「1つの (a) 」または「1つの (a) n」という語は、1つ以上を意味し得る。

【 0 0 4 8 】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、代替物のみを指すという明らかな指示がない限り、または代替物が相互排他的でない限り、「及び/または」を意味するが、本開示は、代替物及び「及び/または」のみを指すという定義を支持する。本明細書で使用されるとき、「別の」とは、少なくとも第2の以上を意味し得る。

【 0 0 4 9 】

本明細書全体を通して、「約」という用語は、値が、装置についての誤差の固有変動、値を決定するのに使用される方法、または研究対象の間に存在する変動を含むことを示すのに使用される。

【 0 0 5 0 】

本発明の他の対象、特徴、及び利点は、下記の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、この詳細な説明から当業者には本発明の精神及び範囲内での様々な変更及び修正が明らかとなるので、詳細な説明及び具体的な例は、本発明の好ましい実施形態を示しながら、例証としてのみ与えられていることが理解されるべきである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 1 】

下記の図面は、本明細書の一部を形成し、本発明の特定の態様をさらに明示するために含まれる。本発明は、本明細書で提示される具体的な実施形態の詳細な説明と組み合わせた、これらの図面のうちの1つ以上への参照によって、より良く理解され得る。特許または出願書類は、少なくとも1つのカラー図面を含有する。カラー図面を含むこの特許または特許出願公開の写しは、申請及び必要な手数料の支払い後、特許庁より提供されるであろう。

【 0 0 5 2 】

【 図 1 】 A D C (抗体 - 薬物複合体) の作用原理を示す概略図。その標的抗原との結合後、M A b - 抗原複合体はエンドソームに内在化され、これは次にリソソームと融合され、そこでM A b が分解され、薬物が放出される。

【 図 2 】 E L I S A による高結合 E G F L 6 抗体の検出。ヒト (左バー) またはマウス (右バー) E G F L 6 タンパク質 (S i n o B i o l o g i c a l s) は、96 ウェル高結合プレートに、一晚、4、P B S 中でコーティングされた。B 細胞培養上清 (5 μ l の培地及び 95 μ l の P B S) は、プレート上にコーティングされた E G F L 6 抗原に、これとの結合のために添加された。結合した抗体は、H R P 及び T M B 基質と複合されたウサギ I g G に対する二次抗体を使用して検出された。実験は確認のために2回繰り返された。

【 図 3 】 E L I S A における E G F L 6 抗体の結合親和性の決定。一連の抗体濃度は E L I S A において分析され、4 パラメータフィッティングは抗体の結合親和性を計算するのに使用された。実験は3回の繰り返しを有し、エラーバーは標準偏差を示す。

【 図 4 】 E G F L 6 は、腫瘍関連内皮細胞では上方調節されるが、正常卵巣及び創傷治癒組織ではされない。A) 内皮細胞の単離の要約。B) 正常卵巣からの内皮細胞、創傷治癒組織、及び卵巣腫瘍関連内皮細胞の遺伝子マイクロアレイ。C) 卵巣患者における E G F L 6、C D 3 1、及び V E G F の発現。D) Q - R T P C R を使用する遺伝子マイクロアレイデータのバリデーション。スケールバー = 100 μ m。

【 図 5 】 E G F L 6 遺伝子サイレンシングは、A 2 7 8 0 i p 2 卵巣同所性マウスモデルにおいて、創傷治癒を悪化させず、腫瘍負荷を低減した。A) s i 対照及び S i E G F L 6 処理皮膚内皮細胞における E G F L 6 の発現。B) インビトロでの創傷治癒に対する E G F L 6 サイレンシングの効果。C) 棒グラフは創傷治癒面積を表す。D) 創傷治癒に対する E G F L 6 サイレンシングの効果 E) 創傷体積 F) 腫瘍負荷の代表画像 G) 腫瘍重量、及び H) 腫瘍結節。

10

20

30

40

50

【図 6】TWIST1 は低酸素においてEGFL6 発現を誘発する。A、B) 正常酸素及び低酸素条件下でのEGFL6 プロモーターレポーター分析。C) TWIST1 は低酸素条件下でEGFL6 の発現を増加させるD) TWIST1 はEGFL6 のプロモーター領域に結合する。E 及びF) TWIST1 の異所性発現はRF24 細胞におけるEGFL6 発現を増加させる。G) 正常酸素と比較した低酸素においてEGFL6 プロモーター領域に結合するTWIST1 のChIP 分析。ヒト卵巣内皮細胞 (RF24) においてEGFL6 プロモーターに結合するTWIST1 のEGFL6 及びChIP アッセイ。TWIST1 で処理され、EGFL6 またはIgG 対照抗体で免疫沈降されたRF24 細胞からの架橋クロマチン。インプット及び免疫沈降DNA に、EGFL6 転写開始部位の塩基対上流に対応するプライマーを使用してPCR が行われた。PCR 産物は臭化エチジウム染色アガロースゲル上で調査された。H) siRNA を使用するEGFL6 遺伝子サイレンシングは、低酸素条件において増加した細胞死をもたらす。I) 後肢虚血。動脈結紮後、大腿動脈は摘出され、マウスは3つのグループ (n = 5) : 正常、虚血 - 24 時間、及び虚血 - 96 時間に分離された。血流は、連続レーザードップラーを使用して、大腿動脈結紮の前及び後にモニタリングされた。各時点で、組織は採取され、凍結され、免疫蛍光が行われた。J、K) EGFL6 発現は、正常条件と比較して虚血 (低酸素) 条件において内皮細胞中で増加した。

10

【図 7】内皮細胞のEGFL6 での処理は、PI3 キナーゼ / AKT シグナル伝達を活性化する。A) 対照及びEGFL6 処理RF24 細胞におけるRPPA 分析。B) PI3 キナーゼ / AKT シグナル伝達のEGFL6 媒介性活性化のウェスタンブロッティング。C) EGFL6 媒介性IGF - R、EGFR、及びTie2 受容体活性化のウェスタンブロッティング。D) Tie2 抗体はインテグリンタンパク質をブルダウニングした。E) サイトゾル及び膜画分タンパク質におけるTie2 及びAKT シグナル経路。F) siITGB1 及びsiTie2 処理RF24 細胞におけるTie2 及びAKT シグナル経路。G、H) 特異的 siRNA を使用するインテグリン及びTie2 のサイレンシングは、(H) 内皮細胞中のEGFL6 媒介性チューブ形成 (G) 及び遊走を減少させる。I) RGD 遮断ペプチドは、インテグリン媒介シグナル経路J) 遊走K) 及び内皮細胞中のチューブ形成を減少させる。

20

【図 8 - 1】EGFL6 機能的遮断抗体は、血管新生及び腫瘍増殖を低減する。A) 線グラフは抗体結合親和性を表す。B) RF24 細胞におけるTie2 / AKT 活性化に対するEGFL6 遮断抗体の効果。対照、mAb93、及びmAb135 作用濃度は、10 μ g / ml である。C) 皮膚内皮細胞での創傷治癒アッセイに対するEGFL6 遮断抗体の効果。D) RF24 細胞におけるチューブ形成及びE) 遊走に対するEGFL6 遮断抗体の効果。F) SKOV3ip1 腫瘍保有マウス腫瘍重量、腫瘍結節に対するEGFL6 遮断抗体の効果。G) Ki67 及びCD31 発現は細胞増殖及び管密度を示した。腫瘍細胞注入の7日後、マウスはランダムに3つのグループ (10 匹のマウス / グループ) : (1) 対照Ab (5 mg / kg)、(2) EGFL6 Ab93 (5 mg / kg)、及び(3) EGFL6 Ab135 (5 mg / kg) に分けられ、療法を受けた。抗体は週1回投与された。本明細書における実施例に記載されるように腫瘍は採取された。本明細書における実施例に記載されるように創傷は形成され、腫瘍は採取された。エラーバーはSEM を示す。* P < 0.05 対対照Ab。

30

40

【図 8 - 2】EGFL6 抗体による内皮細胞 (RF24 細胞) のチューブ形成の阻害。対照抗体との比較において、抗体は (5 μ g / ml 濃度で) 細胞培養物 (RF24) に添加された。チューブの数は96 ウェルアッセイプレートにおいて48 時間の処理後に計測された。図 8 H は各グループの代表を示し、棒グラフは各処理グループにおけるチューブ数の平均を示す。エラーバーは標準誤差を示し、n = 3 である。

【図 9 - 1】Tie2 - cre、EGFL6^{f / f} ノックアウトマウスの作製。A) Tie2 - cre、EGFL6 ノックアウトマウスの作製。B) 同腹子及びEGFL6 ノックアウトマウスでの単離内皮細胞におけるCD31 発現。C) 単離内皮細胞におけるEGFL6 発現。

50

【図 9 - 2】EGFL6 遺伝子サイレンシングは、SKOV3 ip1 卵巣同所性マウスモデルにおいて、腫瘍負荷及び血管新生を低減する。D) 様々な卵巣癌細胞における EGFL6 の発現。E、F) 卵巣癌の SKOV3 ip1 同所性マウスモデルにおける腫瘍重量及び腫瘍結節に対する内皮細胞 (mEGFL6 siRNA) または腫瘍 (hEGFL6 siRNA) 標的化 EGFL6 siRNA の効果。腫瘍細胞注入の 7 日後、マウスはランダムに 4 つのグループ (10 匹のマウス/グループ): (1) 対照 siRNA、(2) mEGFL6 siRNA、(3) hEGFL6 siRNA、(4) mEGFL6 siRNA + hEGFL6 siRNA に分けられ、療法を受けた。対照または処理グループ中のいずれかの動物が瀕死となった際 (療法の 3 ~ 4 週間後) マウスは犠死させ、腫瘍重量 (E) 及び腫瘍結節の数 (F) が記録された。エラーバーは SEM を示す。G) 増殖及び微小血管密度に対する標的化 EGFL6 siRNA の効果。採取された腫瘍は Ki67 増殖及び CD31 について染色された。スケールバー = 50 μ m。グラフ中のバーは左の画像の標識カラムに連続して対応する。エラーバーは SEM を示す。

【図 10】EGFL6 は腫瘍血管新生を調節する。A) ヒト正常卵巣、卵巣腫瘍、及び創傷治癒組織は解離され、単離内皮細胞及び試料はマイクロアレイ用に加工された。B) ヒト正常卵巣、創傷、及び卵巣腫瘍試料における VEGF の発現。C)、D)、E) 対照 siRNA 及び EGFL6 siRNA 処理 RF24 細胞、ならびに特徴的なチューブ形成及び遊走。EGFL6 についての低または高免疫組織化学染色を有するヒト卵巣癌血管系の代表画像。スケールバー = 200 μ m。エラーバーは SEM を示す。* $p < 0.05$ 対照 siRNA。

【図 11】動物は、創傷ありまたはなしで、対照 siRNA - CH または mEGFL6 siRNA - CH のいずれかで処理された。採取された腫瘍は Ki67 (増殖) 及び CD31 (微小血管) について染色された。エラーバーは SEM を示す。

【図 12】内皮細胞の EGFL6 での処理は、PI3K / AKT シグナル伝達を活性化する。A) 対照及び EGFL6 処理 RF24 内皮細胞におけるタンパク質発現変化を示す RPPA 分析のヒートマップ表示。B) 対照及び EGFL6 処理 RMG2 細胞におけるタンパク質発現変化を示す RPPA 分析のヒートマップ表示。C)、D) 内皮細胞における PI3K 阻害により低減された EGFL6 媒介性遊走及びチューブ形成 (下パネル)。

【発明を実施するための形態】

【0053】

例示的態様の説明

EGFL6 は、創傷治癒に関与する EGF 反復スーパーファミリーのメンバーである。しかしながら、高い EGFL6 は、卵巣癌及び肺癌のような、様々な癌細胞タイプにおいても見出された。本明細書における研究は、EGFL6 活性の阻害が腫瘍組織において癌細胞増殖及び血管新生を阻害するのに効果的であることを示す。また、ここで提供される EGFL6 結合抗体は、EGFL6 活性及び癌細胞増殖を阻害するのに効果的であることが見出された。よって、実施形態の抗体は、癌を治療及び血管新生を阻害するための新たな効果的な方法を提供する。

【0054】

I. 実施形態の抗体

特定の実施形態では、EGFL6 タンパク質の少なくとも一部分に結合し、EGFL6 シグナル伝達及び癌細胞増殖を阻害する、抗体またはその断片が考慮される。本明細書で使用されるとき、「抗体」という用語は、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、及び遺伝的に修飾された IgG のような、いずれかの免疫学的結合剤、ならびに抗原結合活性を保持する抗体 CDR ドメインを含むポリペプチドを広く指すことが意図される。抗体は、キメラ抗体、親和性成熟抗体、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、または抗原結合抗体断片または天然もしくは合成配位子からなる群から選択され得る。好ましくは、抗 EGFL6 抗体は、モノクローナル抗体またはヒト化抗体である。

【0055】

よって、既知の手段により、及び本明細書に記載されるように、ポリクロナルまたはモノクローナル抗体、抗体断片、ならびに結合ドメイン及びCDR（前述のいずれかの操作形態を含む）が作製され得、それらはEGFL6タンパク質、その各エピトープのうちの1つ以上、または前述のいずれかの複合体、こうした抗原もしくはエピトープが天然供給源から単離されるか、または天然化合物の合成誘導体もしくは多様体であるかに特異的である。

【0056】

本実施形態に適した抗体断片の例としては、限定なく、(i) V_L 、 V_H 、 C_L 、及び C_{H1} ドメインからなる、Fab断片、(ii) V_H 及び C_{H1} ドメインからなる「Fd」断片、(iii) 単一抗体の V_L 及び V_H ドメインからなる「Fv」断片、(iv) V_H ドメインからなる、「dAb」断片、(v) 単離CDR領域、(vi) F(ab')₂断片、2つの結合Fab断片を含む二価断片、(vii) V_H ドメイン及び V_L ドメインが、2つのドメインが会合して結合ドメインを形成するのを可能にするペプチドリッカーにより連結した、一本鎖Fv分子（「scFv」）、(viii) 二重特異的一本鎖Fvダイマー（米国特許第5,091,513号参照）、ならびに(ix) 遺伝子融合により構成されるダイアボディ、多価または多重特異的断片（米国特許出願公開第2005/0214860号）が挙げられる。Fv、scFv、またはダイアボディ分子は、 V_H 及び V_L ドメインを連結するジスルフィド架橋の組み込みにより安定化され得る。 C_{H3} ドメインに結合したscFvを含むミニボディも作製され得る（Hu et al., 1996）。

10

20

【0057】

実施形態では、抗体様結合ペプチド模倣体も考慮される。Liu et al. (2003) は、漸減抗体として作用し、より長い血清半減期及びより面倒の少ない合成方法の特定の利点を有するペプチドである、「抗体様結合ペプチド模倣体」(ABiP) について記載する。

【0058】

動物には、EGFL6タンパク質に特異的な抗体を産生するために、EGFL6細胞外ドメイン(ECD)タンパク質のような、抗原が接種され得る。しばしば、抗原は、免疫応答を向上させる別の分子に結合または複合される。本明細書で使用されるとき、複合体は、動物において免疫応答を誘導するのに使用される抗原に結合したいずれかのペプチド、ポリペプチド、タンパク質、または非タンパク質性物質である。抗原接種に应答して動物において産生される抗体は、様々な個別の抗体産生Bリンパ球から作製される様々な非同一性分子（ポリクロナル抗体）を含む。ポリクロナル抗体は、抗体種の混合集団であり、その各々は同じ抗原上の異なるエピトープを認識し得る。動物におけるポリクロナル抗体産生のための正しい条件を前提として、動物の血清中の抗体のほとんどは、動物を免疫化した抗原性化合物上の集成的エピトープを認識するであろう。この特異性は、対象の抗原またはエピトープを認識する抗体のみを選別する親和性精製によりさらに向上する。

30

【0059】

モノクローナル抗体は、抗体の単一種であり、全ての抗体産生細胞が単一Bリンパ球細胞株に由来するので、各抗体分子は同じエピトープを認識する。モノクローナル抗体(MAb)を産生するための方法は、一般的には、ポリクロナル抗体を調製するためのものと同じように開始する。いくつかの実施形態では、マウス及びラットのような齧歯類が、モノクローナル抗体の産生に使用される。いくつかの実施形態では、ウサギ、ヒツジ、またはカエル細胞が、モノクローナル抗体の産生に使用される。ラットの使用は、周知であり、特定の利点を提供し得る。マウス（例えば、BALB/cマウス）は、日常的に使用され、一般的には高割合の安定な融合体をもたらす。

40

【0060】

ハイブリドーマ技術は、EGFL6抗原で予め免疫化されたマウスからの単一Bリンパ球の、不死骨髓腫細胞（通常はマウス骨髓腫）との融合を含む。この技術は、無限の量の

50

同じ抗原またはエピトープ特異性（モノクローナル抗体）を有する構造的に同一の抗体が産生され得るように、不定数の産生物のために単一抗体産生細胞を増殖する方法を提供する。

【0061】

形質B細胞（CD45 + CD5 - CD19 +）は、免疫化ウサギの調製されたばかりのウサギ末梢血単核細胞から単離され、E G F L 6 結合細胞からさらに選別され得る。抗体産生B細胞の富化後、トータルRNAが単離され、cDNAが合成され得る。重鎖及び軽鎖の両方からの抗体可変領域のDNA配列は、増幅され、ファージディスプレイFab発現ベクターに構成され、E. coli に形質転換され得る。E G F L 6 特異的結合Fabは、複数回の富化パンニングを通して選別され、配列決定され得る。選別されたE G F L 6 結合ヒットは、ヒト胚腎臓（HEK293）細胞（Invitrogen）中の哺乳動物発現ベクター系を使用するウサギ及びウサギ/ヒトキメラ形態の完全長IgGとして表され、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）分離ユニットでタンパク質G樹脂を使用して精製され得る。

10

【0062】

1つの実施形態では、抗体は、キメラ抗体、例えば、異種の非ヒト、ヒト、またはヒト化配列（例えば、フレームワーク及び/または定常ドメイン配列）に移植された非ヒトドナーからの抗原結合配列を含む抗体である。方法は、モノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖定常ドメインをヒト由来の類似ドメインで置き換え、外来抗体の可変領域をインタクトなままにするように開発された。あるいは、「完全ヒト」モノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニックなマウスにおいて産生される。方法はまた、齧歯類、例えば、マウス、及びヒトの両方のアミノ酸配列を有する抗体可変ドメインを組換え構成することにより、モノクローナル抗体の可変ドメインをよりヒト形態に変換するように開発された。「ヒト化」モノクローナル抗体では、超可変CDRのみがマウスモノクローナル抗体に由来し、フレームワーク及び定常領域はヒトアミノ酸配列に由来する（米国特許第5,091,513及び6,881,557号参照）。齧歯類に特徴的な抗体中のアミノ酸配列をヒト抗体の対応する位置に見られるアミノ酸配列で置き換えることは、治療的使用中の有害免疫反応の可能性を低減するであろうと考えられる。抗体を産生するハイブリドーマまたは他の細胞には、ハイブリドーマにより産生される抗体の結合特異性を変化してもしなくてもよい、遺伝子変異または他の変更も行われ得る。

20

30

【0063】

様々な動物種においてポリクローナル抗体を産生するため、ならびにヒト化、キメラ、及び完全ヒトを含む、様々なタイプのモノクローナル抗体を産生するための方法は、当該技術分野において周知であり、高度に予測可能である。例えば、下記の米国特許及び特許出願：米国特許出願第2004/0126828及び2002/0172677号、ならびに米国特許第3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,196,265、4,275,149、4,277,437、4,366,241、4,469,797、4,472,509、4,606,855、4,703,003、4,742,159、4,767,720、4,816,567、4,867,973、4,938,948、4,946,778、5,021,236、5,164,296、5,196,066、5,223,409、5,403,484、5,420,253、5,565,332、5,571,698、5,627,052、5,656,434、5,770,376、5,789,208、5,821,337、5,844,091、5,858,657、5,861,155、5,871,907、5,969,108、6,054,297、6,165,464、6,365,157、6,406,867、6,709,659、6,709,873、6,753,407、6,814,965、6,849,259、6,861,572、6,875,434、及び6,891,024号は、こうした方法を実施可能にする説明を提供する。本明細書及びその中で引用される全ての特許、特許出願公開、及び他の刊行物は、これによって本明細書に参照により組み込まれる。

40

50

【 0 0 6 4 】

抗体は、鳥類及び哺乳類を含む、いずれかの動物供給源から産生され得る。好ましくは、抗体は、ヒツジ、ネズミ（例えば、マウス及びラット）、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ウマ、またはニワトリである。加えて、より新しい技術は、ヒトコンピナトリアル抗体ライブラリからのヒト抗体の開発及びこれについてのスクリーニングを可能にする。例えば、バクテリオファージ抗体発現技術は、本明細書に参照により組み込まれる米国特許第 6,946,546 号に記載されるように、特異的抗体を動物免疫化の非存在下で産生することを可能にする。これらの技法は、Marks (1992)、Stemmer (1994)、Gram et al. (1992)、Barbas et al. (1994)、及び Schier et al. (1996) にさらに記載されている。

10

【 0 0 6 5 】

E G F L 6 に対する抗体が、動物種、モノクローナル細胞株、または抗体の他の供給源にかかわらず、E G F L 6 の効果を中和またはこれに対抗する能力を有するであろうことは、十分に予想される。特定の動物種は、抗体の「F c」部分を通した補体系の活性化によってアレルギー応答を引き起こす可能性が高い場合があるので、治療抗体を産生するのに好ましくない場合がある。しかしながら、全抗体は、「F c」（補体結合）断片に、及び結合ドメインまたは C D R を有する抗体断片に酵素的に消化され得る。F c 部分の除去は、抗原抗体断片が望ましくない免疫学的応答を誘導する可能性を低減し、よって、F c を含まない抗体は、予防または治療処置について優先的であり得る。上で記載されたように、抗体はまた、動物に、他の種において産生されたか、または他の種からの配列を有する抗体を投与することからもたらされる有害な免疫学的結果を低減または排除するために、キメラまたは部分的もしくは完全にヒトであるように構成され得る。

20

【 0 0 6 6 】

置換多様体は、典型的には、タンパク質内の 1 つ以上の部位での 1 つのアミノ酸の別のアミノ酸との交換を含有し、他の機能または特性の喪失ありまたはなしで、ポリペプチドの 1 つ以上の特性を調整するように設計され得る。置換は保存的であり得、すなわち、1 つのアミノ酸は、同様の形状及び電荷のもので置き換えられる。保存的置換は、当該技術分野において周知であり、例えば、アラニンのセリンへの、アルギニンのリジンへの、アスパラギンのグルタミンまたはヒスチジンへの、アスパルテートのグルタメートへの、システインのセリンへの、グルタミンのアスパラギンへの、グルタメートのアスパルテートへの、グリシンのプロリンへの、ヒスチジンのアスパラギンまたはグルタミンへの、イソロイシンのロイシンまたはバリンへの、ロイシンのバリンまたはイソロイシンへの、リジンのアルギニンへの、メチオニンのロイシンまたはイソロイシンへの、フェニルアラニンのチロシン、ロイシン、またはメチオニンへの、セリンのトレオニンへの、トレオニンのセリンへの、トリプトファンのチロシンへの、チロシンのトリプトファンまたはフェニルアラニンへの、及びバリンのイソロイシンまたはロイシンへの変更を含む。あるいは、置換は、ポリペプチドの機能または活性が影響を受けるように、非保存的であり得る。非保存的変更は、典型的には、極性または荷電アミノ酸を非極性または非荷電アミノ酸で、及びその逆のように、残基を化学的に非類似のもので置換することを含む。

30

【 0 0 6 7 】

タンパク質は、組換え体であるか、またはインビトロで合成され得る。あるいは、非組換えまたは組換えタンパク質は、細菌から単離され得る。こうした多様体を含有する細菌が、組成物及び方法において実現され得ることも考慮されている。結果として、タンパク質は、単離される必要はない。

40

【 0 0 6 8 】

組成物中に 1 m l 当たり約 0.001 m g ~ 約 10 m g の総ポリペプチド、ペプチド、及び / またはタンパク質があることが考慮されている。よって、組成物中のタンパク質の濃度は、約、少なくとも約、または多くて約 0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.

50

5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0 mg/ml 以上（またはその中で誘導可能ないずれかの範囲）であり得る。このうち、約、少なくとも約、または多くて約 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、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または 100% は、EGFL6 に結合する抗体であり得る。

10

【0069】

抗体または好ましくは抗体の免疫学的部分は、他のタンパク質との融合タンパク質に化学的に複合されるか、またはそれとして表され得る。本明細書及び添付の特許請求の範囲の目的について、全てのこうした融合タンパク質は、抗体または抗体の免疫学的部分の定義に含まれる。

【0070】

実施形態は、少なくとも 1 つの薬剤と結合した EGFL6、ポリペプチド、及びペプチドに対する抗体及び抗体様分子を提供し、抗体複合体またはペイロードを形成する。診断または治療薬としての抗体分子の有効性を増加させるために、従来は、少なくとも 1 つの所望の分子または部分を結合または共有結合または錯化する。こうした分子または部分は、これらに限定されないが、少なくとも 1 つのエフェクターまたはレポーター分子であり得る。エフェクター分子は、所望の活性、例えば、細胞毒性活性を有する分子を含む。抗体に付着したエフェクター分子の非限定的な例としては、毒素、治療酵素、抗生物質、放射線標識ヌクレオチド、等が挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出され得るいずれかの部分として定義される。抗体と複合されたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射線標識、ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、クロモフォア、発光分子、光親和性分子、ビオチンのような、着色粒子または配位子が挙げられる。

20

【0071】

抗体のその複合体部分への付着または複合のためのいくつかの方法は、当該技術分野において知られている。いくつかの付着方法は、例えば、抗体に付着したジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA)、エチレントリアミン四酢酸、N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド、及び/またはテトラクロロ-3-6-ジフェニルグリコウリル-3 のような有機キレート剤を使用する金属キレート錯体の使用を含む。モノクローナル抗体はまた、グルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩のようなカップリング剤の存在下、酵素と反応させ得る。フルオレセインマーカ-との複合体は、これらのカップリング剤の存在下またはイソチオシアネートとの反応により調製される。

30

【0072】

II. 疾患の治療

本実施形態の特定の態様を使用して、EGFL6 シグナル伝達に関連した疾患または障害を予防または治療することができる。EGFL6 のシグナル伝達は、いずれかの適切な薬物により低減され、癌細胞増殖が防止され得る。好ましくは、こうした物質は、抗 EGFL6 抗体であろう。

40

【0073】

「治療」及び「治療する」とは、対象への治療薬の投与もしくは適用、または疾患もしくは健康関連状態の治療利益を得る目的のための対象に対する手順もしくはモダリティの実施を指す。例えば、治療は、薬学的有効量の EGFL6 シグナル伝達を阻害する抗体の投与を含み得る。

【0074】

「対象」及び「患者」とは、霊長類、哺乳類、及び脊椎動物のような、ヒトまたは非ヒ

50

トのいずれかを指す。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0075】

本願全体を通して使用される「治療利益」または「治療有効」という用語は、この状態の医学的処置に関して対象の健康を促進または向上させるいずれかのものを指す。これは、これに限定されないが、疾患の兆候または症状の頻度または重症度の低減を含む。例えば、癌の治療は、例えば、腫瘍のサイズの低減、腫瘍の侵襲性の低減、癌の増殖速度の低減、または転移の予防を含み得る。癌の治療はまた、癌を有する対象の生存期間の延長を指し得る。

【0076】

A. 薬学的調製物

阻害抗体を含有する治療組成物の臨床適用が行われる場合、一般的には、意図される適用に適した薬学的または治療組成物を調製するのが有益であろう。特定の実施形態では、薬学的組成物は、例えば、少なくとも約0.1%の活性化化合物を含み得る。他の実施形態では、活性化化合物は、単位の重量の約2%~約75%、または、例えば、約25%~約60%、及びその中で誘導可能ないずれかの範囲を含み得る。

【0077】

本実施形態の治療組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして注入可能な組成物の形態で有利に投与され、注入前の液体中での溶解、または懸濁に適した固体形態も調製され得る。これらの調製物はまた、乳化され得る。

【0078】

「薬学的または薬理学的に許容される」という語句は、必要に応じて、ヒトのような動物に投与される場合、有害、アレルギー、または他の不都合な反応をもたらさない分子実体及び組成物を指す。抗体または追加の有効成分を含む薬学的組成物の調製は、本開示に照らせば当業者に知られるであろう。また、動物（例えば、ヒト）投与について、調製物は、FDA Office of Biological Standardsにより要求される無菌性、発熱原性、一般的安全性、及び純度基準を満たすべきであることが理解されるであろう。

【0079】

本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される担体」は、当業者に知られるであろう、いずれか及び全ての水性溶媒（例えば、水、アルコール性/水性溶液、食塩溶液、塩化ナトリウム、リンゲルデキストロス、等のような、非経口ビヒクル）、非水性溶媒（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、及びオレイン酸エチルのような、注入可能な有機エステル）、分散媒体、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、防腐剤（例えば、抗細菌または抗真菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス）、等張剤、吸収遅延剤、塩、薬物、薬物安定化剤、ゲル、結合剤、賦形剤、崩壊剤、潤滑剤、甘味剤、香味剤、色素、補液及び栄養補給剤、同様の物質及びこれらの組み合わせを含む。薬学的組成物中の様々な成分のpH及び正確な濃度は、周知のパラメータに従って調節される。

【0080】

「単位用量」または「投与量」という用語は、対象における使用に適した物理的に個別の単位を指し、各単位は、その投与、すなわち、適切な経路及び治療レジメンと関連して上で議論された所望の応答をもたらすように計算された所定の量の治療組成物を含有する。処置の数及び単位用量の両方に従って投与される量は、所望の効果に依存する。患者または対象に投与される本実施形態の組成物の実際の投与量は、対象の体重、年齢、健康、及び性別、治療される疾患のタイプ、疾患浸透の程度、以前または併用の治療介入、患者の突発性疾患、投与経路、ならびに特定の治療物質の有効性、安定性、毒性のような、物理的及び生理的因子により決定することができる。例えば、用量はまた、投与当たり約1 µg/kg/体重~約1000 mg/kg/体重（こうした範囲は介在する用量を含む）以上、及びその中で誘導可能ないずれかの範囲を含み得る。本明細書に挙げられる数から誘導可能な範囲の非限定的な例では、約5 µg/kg/体重~約100 mg/kg/体重

10

20

30

40

50

、約 $5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重}$ ~ 約 $500 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、等の範囲を投与することができる。投与の責任を負う医師は、いずれかの事象において、組成物中の有効成分の濃度及び個別の対象に適した用量を決定するであろう。

【0081】

活性化化合物は、非経口投与用に配合、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、またはさらに腹腔内経路を介した注入用に配合することができる。典型的には、こうした組成物は、液体溶液または懸濁液のいずれかとして調製することができ、注入前に液体を添加して溶液または懸濁液を調製する使用に適した固体形態も調製することができ、調製物は乳化することもできる。

【0082】

注入可能な使用に適した薬学的形態は、無菌水性溶液または分散物、ゴマ油、ピーナツ油、または水性プロピレングリコールを含む配合物、及び無菌注入可能溶液または分散物の即席調製用の無菌粉末を含む。全ての場合において、形態は、無菌でなければならず、容易に注入され得る程度に流動性でなければならない。また、製造及び貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌及び真菌のような、微生物の汚染作用に対して保存されなければならない。

【0083】

タンパク質性組成物は、中性または塩形態に配合され得る。薬学的に許容される塩は、(タンパク質の遊離アミノ基で形成される)酸付加塩を含み、これは、例えば、塩酸もしくはリン酸のような、無機酸、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸、等のような有機酸で形成される。遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または第二鉄のような無機塩基、及びイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカイン、等のような有機塩基からも誘導することができる。

【0084】

薬学的組成物は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール、等)、これらの適切な混合物、及び植物油を含有する溶媒または分散媒体を含むことができる。適切な流動性は、例えば、レシチンのような、コーティングの使用により、分散物の場合には必要な粒子サイズの維持により、及び界面活性剤の使用により維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル、等によりもたすことができる。多くの場合では、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを含むのが好ましいであろう。注入可能組成物の長期吸収は、吸収を遅らせる物質、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンの組成物中での使用によりもたすことができる。

【0085】

B. 併用治療

特定の実施形態では、本実施形態の組成物及び方法は、第2のまたは追加の療法と組み合わせた、癌細胞増殖におけるその活性を阻害するEGFL6に対する抗体または抗体断片を含む。こうした療法は、EGFL6媒介性細胞増殖に関連したいずれかの疾患の治療において適用することができる。例えば、疾患は、癌であり得る。

【0086】

併用療法を含む、方法及び組成物は、治療もしくは予防効果を向上、及び/または別の抗癌もしくは抗過剰増殖療法の治療効果を増加させる。治療及び予防方法及び組成物は、癌細胞の死滅及び/または細胞過剰増殖の阻害のような、所望の効果を達成するのに効果的な組み合わせられた量で提供することができる。このプロセスは、細胞を、抗体または抗体断片及び第2の療法の両方と接触させることを含み得る。組織、腫瘍、または細胞は、薬剤(すなわち、抗体もしくは抗体断片または抗癌剤)のうちの1つ以上を含む1つ以上の組成物または薬理的配合物と接触させることができ、または組織、腫瘍、及び/もしくは細胞を2つ以上の異なる組成物もしくは配合物と接触させることにより、1つの組成

物は、１）抗体もしくは抗体断片、２）抗癌剤、または３）抗体もしくは抗体断片及び抗癌剤の両方を提供する。また、こうした併用療法は、化学療法、放射線療法、外科療法、または免疫療法と共に使用することができることが考慮されている。

【００８７】

「接触された」及び「曝露された」という用語は、細胞に適用される場合、本明細書では、それにより治療構成物及び化学療法または放射線療法剤が標的細胞に送達されるか、または標的細胞と直接隣接して配置されるプロセスを説明するのに使用される。細胞死滅を達成するには、例えば、両方の薬剤が細胞に、細胞を死滅させるか、またはこれが分裂するのを防止するのに効果的な組み合わせられた量で送達される。

【００８８】

阻害抗体は、抗癌治療の前に、その間に、その後に、またはそれに関する様々な組み合わせで投与され得る。投与は、同時から数分、数日、数週間に及ぶ間隔が置かれ得る。抗体または抗体断片が患者に抗癌剤とは別々に提供される実施形態では、一般的には、２つの化合物が依然として患者に対して有利に組み合わせられた効果を発揮することができるように、各送達間で有効期間が切れないことが確保されるであろう。こうした例では、患者に抗体療法及び抗癌療法を、互いの約１２～２４または７２時間以内及び、より具体的には、互いの約６～１２時間以内に提供し得ることが考慮されている。いくつかの状況では、治療期間を顕著に延長することが望ましい場合があり、各投与間で数日（２、３、４、５、６、または７）～数週間（１、２、３、４、５、６、７、または８）が経過する。

【００８９】

特定の実施形態では、治療の過程は、１～９０日以上継続するであろう（こうした範囲は介在する日を含む）。１つの薬剤は、１日目～９０日目（こうした範囲は介在する日を含む）のうちのいずれかの日またはこれらのいずれかの組み合わせに投与され得、別の薬剤は、１日目～９０日目（こうした範囲は介在する日を含む）のうちのいずれかの日またはこれらのいずれかの組み合わせに投与されることが考慮されている。単日（２４時間）以内に、患者は、薬剤の１回または複数回の投与を受け得る。また、治療の過程後、抗癌治療が行われていない期間があることが考慮されている。この期間は、彼らの予後、体力、健康、等のような、患者の状態に応じて、１～７日、及び／または１～５週間、及び／または１～１２か月以上（こうした範囲は介在する日を含む）継続し得る。治療サイクルは必要に応じて繰り返されるであろうと予想される。

【００９０】

様々な組み合わせが使用され得る。下の例について、抗体療法は「Ａ」であり、抗癌療法は「Ｂ」である。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

【００９１】

本実施形態のいずれかの化合物または療法の患者への投与は、薬剤の、もしあれば毒性を考慮して、こうした化合物の投与のための一般的なプロトコルに従うであろう。したがって、いくつかの実施形態では、併用療法が原因である毒性をモニタリングするステップがある。

【００９２】

i. 化学療法

本実施形態に従って多種多様な化学療法剤が使用され得る。「化学療法」という用語は、癌を治療するための薬物の使用を指す。「化学療法剤」は、癌の治療において投与される化合物または組成物を示すのに使用される。これらの薬剤または薬物は、細胞内でのこれらの活性モード、例えば、それらが細胞周期に影響を及ぼすか、及びどのステージで影響を及ぼすかにより分類される。あるいは、薬剤は、DNAに直接架橋、DNAにインターカレート、または核酸合成に影響を及ぼすことにより染色体及び有糸分裂異常を誘発す

10

20

30

40

50

るその能力に基づいて特徴付けられ得る。

【 0 0 9 3 】

化学療法剤の例としては、チオテバ及びシクロホスファミドのような、アルキル化剤、ブスルファン、インプロスルファン、及びピボスルファンのような、アルキルスルホネート、ベンゾドパ、カルボキオン、メツレドパ、及びウレドパのような、アジリジン、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド、及びトリメチルオルオメラミンを含む、エチレンイミン及びメチルアメラミン、アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシノン）、（合成類似体トボテカンを含む）カンプトテシン、プリオスタチン、カリストアチン、（そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む）C C - 1 0 6 5、クリプトフィシン（特にクリプトフィシン 1 及びクリプトフィシン 8）、ドラスタチン、（合成類似体、K W - 2 1 8 9 及び C B 1 - T M 1 を含む）デュオカルマイシン、エレウテロピン、パンクラチスタチン、サルコジクチン、スポンギスタチン、クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミン塩酸塩化物、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、及びウラシルマスタードのような、窒素マスタード、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムヌスチンのような、ニトロスレア、エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシンガンマ 1 及びカリケアマイシンオメガ 1）のような、抗生物質、ダイネマイシン A を含む、ダイネマイシン、クロドロネートのような、ビスホスホネート、エスペラマイシン、ならびにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連クロモタンパク質エンジン抗生物質クロモフォア、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウトラルナイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、（モルホリノ - ドキソルピシン、シアノモルホリノ - ドキソルピシン、2 - ピロリノ - ドキソルピシン、及びデオキシドキソルピシンを含む）ドキソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン C のような、マイトマイシン、マイコフェノール酸、ノガラルナイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、プロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、及びゾルピシン、メトトレキサート及び 5 - フルオロウラシル（5 - F U）のような、抗代謝物、デノブテリン、プテロブテリン、及びトリメトトレキサートのような、ギ酸類似体、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、及びチオグアニンのような、プリン類似体、アンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、及びフロキシウリジンのような、ピリミジン類似体、カルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピトスタノール、メピチオスタン、及びテストラクトンのような、アンドロゲン、ミトタン及びトリロスタンのような、抗アドレナール、フロリン酸のような、葉酸補給剤、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトラキセート、デフォファミン、デメコルシン、ジアジクオン、エルフォルミチン、酢酸エリブチニウム、エボチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシウレア、レンチナン、ロニダイニン、メイタンシン及びアンサマイトシンのような、メイタンシノイド、マイトグアゾン、マイトキサントロン、モビダンモール、ニトラエリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2 - エチルヒドラジド、プロカルバジン、P S K 多糖錯体、ラゾキサン、リゾキシン、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジクオン、2 , 2 ' , 2 ' ' - トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン（特に T - 2 毒素、ベラクリン A、ロリジン A、及びアングイジン）、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、マイトプロニトール、マイトラクトール、ピボプロマン、ガシトシン、アラビノシド（「A r a - C」）、シクロホスファミド、タキソイド、例えば、バク

10

20

30

40

50

リタキセル及びドセタキセルゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、シスプラチン、オキサリプラチン、及びカルボプラチンのような、白金配位錯体、ビンブラスチン、白金、エトポシド(VP-16)、イフォスファミド、マイトキサントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ノバントロン、テニポシド、エダトラキセート、ダウノマイシン、アミノプテリン、キセローダ、イバンドロネート、イリノテカン(例えば、CPT-11)、トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000、ジフルオロメチロルニチン(DMFO)、レチノール酸のような、レチノイド、カペシタビン、カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタビエン、ノベルビン、ファルネシル-タンパク質トランスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

10

【0094】

ii. 放射線療法

DNA損傷を引き起こし、広く使用されている他の因子は、 γ 線、X線、及び/または腫瘍細胞への放射性同位体の特異的送達として一般的に知られているものを含む。マイクロ波、プロトンビーム照射(米国特許第5,760,395及び4,870,287号)、及びUV照射のような、DNA損傷因子の他の形態も考慮される。これらの因子の全ては、広範囲のDNA損傷、DNA前駆体、DNA複製及び修復、ならびに染色体の組立て及び維持に影響を及ぼす可能性が最も高い。X線の線量範囲は、長期間(3~4週間)にわたる50~200レントゲンの1日線量から、2000~6000レントゲンの単回線量までに及ぶ。放射性同位体の線量範囲は、広く変動し、同位体の半減期、放出される放射線の強度及びタイプ、ならびに新生細胞による取込みに依存する。

20

【0095】

iii. 免疫療法

当業者であれば、実施形態の方法と組み合わせ、またはこれらと共に、追加の免疫療法が使用され得ることを理解するであろう。癌治療の文脈において、免疫療法剤は、一般的には、癌細胞を標的化して破壊するための免疫エフェクター細胞及び分子の使用に依存する。リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))はこうした例である。免疫エフェクターは、例えば、腫瘍細胞の表面上のいくつかのマーカーに特異的な抗体であり得る。抗体単独では、療法のエフェクターとして作用し得るか、または細胞死滅に実際に影響を及ぼすように他の細胞を動員し得る。抗体はまた、薬物または毒素(化学療法剤、放射性核種、リシンA鎖、コレラ毒素、百日咳毒素、等)と複合され、標的化剤として作用し得る。あるいは、エフェクターは、腫瘍細胞標的と直接または間接のいずれかで相互作用する表面分子を有するリンパ球であり得る。様々なエフェクター細胞は、細胞毒性T細胞及びNK細胞を含む

30

【0096】

抗体-薬物複合体は、癌治療薬の開発へのブレークスルーアプローチとして出現した。癌は、世界の主要な死亡原因の1つである。抗体-薬物複合体(ADC)は、細胞死滅薬物と共有結合したモノクローナル抗体(MAb)を含む(図1)。このアプローチは、それらの抗原標的に対するMAbの高い特異性を、高度に有効な細胞毒性薬物と組み合わせ、ペイロード(薬物)を富化レベルの抗原を有する腫瘍細胞に送達する「武装」MAbをもたらした(Carter et al., 2008、Teicher 2014、Leal et al., 2014)。薬物の標的化送達はまた、正常組織中でのその曝露を最小化し、減少した毒性及び向上した治療指数をもたらす。FDAによる2つのADC薬物、2011年のADCETRIS(登録商標)(ブレンツキシマブベドチン)及び2013年のKADCYLA(登録商標)(トラスツズマブエムタンシンまたはT-DM1)の承認は、このアプローチの有効性を立証した。現在、癌治療の臨床試験の様々な段階において30個超のADC薬物候補がある(Leal et al., 2014)。抗体操作及びリンカー-ペイロード最適化は、どんどん成熟しており、新たなADCの創薬は、このアプローチに適した新たな標的の同定及び検証(Teicher 2009)及び標的化MAbの産生にますます依存している。ADC標的の2つの基準は、腫瘍細胞中での

40

50

上方調節された / 高レベルの発現及びロバストな内在化である。

【 0 0 9 7 】

免疫療法の1つの態様では、腫瘍細胞は、標的化に対して順応性である、すなわち、他の細胞の大半には存在しない、いくつかのマーカーを有していなければならない。多くの腫瘍マーカーが存在し、これらのうちのいずれかは、本実施形態の文脈における標的化に適している場合がある。一般的な腫瘍マーカーとしては、CD 2 0、癌胎児性抗原、チロシナーゼ (p 9 7)、g p 6 8、T A G - 7 2、H M F G、シアリルルイス抗原、M u c A、M u c B、P L A P、ラミニン受容体、e r b B、及び p 1 5 5 が挙げられる。免疫療法の代替の態様は、抗癌効果を免疫刺激効果と組み合わせることである。I L - 2、I L - 4、I L - 1 2、G M - C S F、 - I F N のような、サイトカイン、M I P - 1、M C P - 1、I L - 8 のような、ケモカイン、F L T 3 配位子のような、増殖因子を含む、免疫刺激分子も存在する。

10

【 0 0 9 8 】

現在調査または使用中である免疫療法の例としては、免疫補助剤、例えば、マイコバクテリウム・ボビス、プラスモジウム・ファルシパラム、ジニトロクロロベンゼン、及び芳香族化合物 (米国特許第 5 , 8 0 1 , 0 0 5 及び 5 , 7 3 9 , 1 6 9 号、H u i and H a s h i m o t o , 1 9 9 8、C h r i s t o d o u l i d e s et al . , 1 9 9 8)、サイトカイン療法、例えば、インターフェロン、及び、I L - 1、G M - C S F、ならびに T N F (B u k o w s k i et al . , 1 9 9 8、D a v i d s o n et al . , 1 9 9 8、H e l l s t r a n d et al . , 1 9 9 8)、遺伝子療法、例えば、T N F、I L - 1、I L - 2、及び p 5 3 (Q i n et al . , 1 9 9 8、A u s t i n - W a r d and V i l l a s e c a , 1 9 9 8、米国特許第 5 , 8 3 0 , 8 8 0 及び 5 , 8 4 6 , 9 4 5 号)、ならびにモノクローナル抗体、例えば、抗 C D 2 0、抗ガングリオシド G M 2、及び抗 - p 1 8 5 (H o l l a n d e r , 2 0 1 2、H a n i b u c h i et al . , 1 9 9 8、米国特許第 5 , 8 2 4 , 3 1 1 号) がある。本明細書に記載される抗体療法と共に1つ以上の抗癌療法が使用され得ることが考慮されている。

20

【 0 0 9 9 】

i v . 外科手術

癌を有する人々の約 6 0 % は、予防的、診断的または病期分類、根治、及び姑息手術を含む、何らかのタイプの外科手術を受けるであろう。根治手術は、癌性組織の全部または一部が物理的に除去、摘出、及び / または破壊される切除術を含み、本実施形態の治療、化学療法、放射線療法、ホルモン療法、遺伝子療法、免疫療法、及び / または代替療法のような、他の療法と共に使用され得る。腫瘍切除術とは、腫瘍の少なくとも一部の物理的な除去を指す。腫瘍切除術に加えて、外科手術による治療は、レーザー手術、凍結手術、電気手術、及び微視的制御手術 (モース手術) を含む。

30

【 0 1 0 0 】

癌性細胞、組織、または腫瘍の一部または全部の摘出後、体内には空洞が形成され得る。治療は、追加の抗癌療法を受けた領域の灌流、直接注入、またはの局所適用により達成され得る。こうした治療は、例えば、1、2、3、4、5、6、もしくは7日毎、または1、2、3、4、及び5週間毎、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、もしくは12か月毎に繰り返され得る。これらの治療は、変動する投与量も有し得る。

40

【 0 1 0 1 】

v . 他の薬剤

処置の治療有効性を向上させるために本実施形態の特定の態様と組み合わせて他の薬剤が使用され得ることが考慮されている。これらの追加の薬剤としては、細胞表面受容体及び G A P 結合の上方調節に影響を及ぼす薬剤、細胞増殖抑制剤及び分化剤、細胞接着の阻害剤、過剰増殖細胞のアポトーシス誘発因子に対する感受性を増加させる薬剤、または他の生物学的薬剤が挙げられる。G A P 結合の数を増やすことによる細胞間シグナル伝達の

50

増加は、隣接する過剰増殖細胞集団に対する抗過剰増殖効果を増加させるであろう。他の実施形態では、細胞増殖抑制剤または分化剤は、治療の抗過剰増殖有効性を向上させるために本実施形態の特定の態様と組み合わせて使用することができる。細胞接着の阻害剤は、本実施形態の有効性を向上させると考えられる。細胞接着阻害剤の例としては、局所接着キナーゼ（FAK）阻害剤及びロバスタチンがある。抗体c225のような、過剰増殖細胞のアポトーシスに対する感受性を増加させる他の薬剤を、治療有効性を向上させるために本実施形態の特定の態様と組み合わせて使用することができることは、さらに考慮されている。

【0102】

III. キット及び診断薬

実施形態の様々な態様では、キットは、治療薬及び/または他の治療及び送達剤を含有すると想定される。いくつかの実施形態では、本実施形態は、実施形態の療法を調製及び/または投与するためのキットについて考慮する。キットは、本実施形態の薬学的組成物のうちのいずれかを含有する1つ以上の封止されたバイアルを含み得る。キットは、例えば、少なくとも1つのEGFL6抗体ならびに実施形態の成分を調製、配合、及び/もしくはは投与するか、または本発明の方法の1つ以上のステップを行うための試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、エペンドルフチューブ、アッセイプレート、シリンジ、ボトル、またはチューブのような、キットの成分と反応しない容器である、適切な容器も含み得る。容器は、プラスチックまたはガラスのような殺菌可能な材料から作製され得る。

【0103】

キットは、本明細書に記載される方法の手順ステップを概説し、本明細書に記載されるものと実質的には同じか、または当業者に知られている手順に従う取扱説明書をさらに含み得る。取扱説明情報は、コンピュータを使用して実行される場合、薬学的有効量の治療薬を送達する現実または仮想の手順を表示させる、機械可読取扱説明を含有するコンピュータ可読媒体中にあり得る。

【実施例】

【0104】

IV. 実施例

本発明の好ましい実施形態を示すために下記の実施例が含まれる。下記の実施例において開示される技法は、発明者により本発明の実施において十分に機能することが見出された技法を表し、よってその実施に好ましいモードを構成するものとみなすことができることが、当業者により理解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、開示される具体的な実施形態において、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、多くの変更を行い、依然として同様または類似の結果を得ることができることを理解すべきである。

【0105】

実施例1 - ヒトEGFL6を標的とするモノクローナル抗体の産生及びクローニング

EGFL6 (Gene bank アクセス # Q8IUX8) タンパク質を使用して、RevMAb Biosciences USA, Inc. でニュージーランドウサギを免疫化した。抗EGFL6血清の力価を、EGFL6タンパク質を96ウェルプレート (max-sorb プレート、Nunc) にコーティングすることによる結合についてのELISAにおける血清の一連の希釈により決定し、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 及びTMB基質と複合された抗ウサギ抗体で検出した。2~3回の追加の免疫化後、力価は $>10^6$ に到達し、末梢血試料を、蛍光補助細胞選別 (FACS) 装置 (BD FACS Aria (商標) III、BD Biosciences) を使用して、調製されたばかりの末梢血単核細胞 (PBMC) からのB細胞 (CD45 + CD5 - CD19 +) 単離のために、免疫化ウサギから回収した。単離B細胞を単一B細胞として播種し、7~10日間培養した。培養上清をEGFL6結合について分析した。陽性ウェルからの細胞を溶解し、トータルRNAを単離し、スーパースクリプト逆転写酵素II (In

【 0 1 0 6 】

(表1) E G F L 6 抗体 の 重鎖 可変配列 の C D R

	重鎖			
	CDR1	CDR2	CDR3	
mAb	ggactcgacctcagtagctactactac (配列番号: 1)	atttatgctgtagtagtgtagccact (配列番号: 2)	gcgagagggtagtagtactatgctcaataattttaacttg (配列番号: 3)	
E1-33	GLDLSSYYY (配列番号: 4)	IYAGSSGST (配列番号: 5)	ARGGGSTYAQYFNL (配列番号: 6)	
E1-34	ggattctcttcacgtagtattatttgg (配列番号: 7)	attcagattactagtggtatcact (配列番号: 8)	agaaggggatatggcctatgctggtagctggcctctgacttg (配列番号: 9)	
E1-80	GFSFSSIIYW (配列番号: 10)	IQITSGIT (配列番号: 11)	RRGYGAYAGTGASDL (配列番号: 12)	
	ggattcaccctcaatagttattat (配列番号: 13)	attgatagtgatagtcctactacg (配列番号: 14)	gcgagagggctatggctctgcttgattggatctc (配列番号: 15)	
	GFTLNSYY (配列番号: 16)	IDSDSPTT (配列番号: 17)	ARGYGPVRLDL (配列番号: 18)	
E1-89	ggattctcttcacgtagcggctactgg (配列番号: 19)	atttatgctgtagtagtggtggcac (配列番号: 20)	tgtacaagagagataatttggtgggtggtctgcttccaaattg (配列番号: 21)	
	GFSFSSGYW (配列番号: 22)	IYAGSSGGH (配列番号: 23)	CTRDNYGGGGSASKL (配列番号: 24)	
E2-93	ggattctcttcacgtagttatggga (配列番号: 25)	attggtcttagtagtgagatc (配列番号: 26)	gtgagagatctttatcatagtaattggttg (配列番号: 27)	
	GFSFSSYG (配列番号: 28)	IGLSSEI (配列番号: 29)	VRDLYHSNGL (配列番号: 30)	
E1-38	ggattctcttcacatagcggctactgg (配列番号: 31)	atctatactagtagtcctactggtgcc (配列番号: 32)	tgtacaagagagataatttggtgggtggtctgcttccaaattg (配列番号: 33)	
	GFSFNSSGYW (配列番号: 34)	IYTSSPTGA (配列番号: 35)	CTRDNFGGGGSASKL (配列番号: 36)	
E1-52	ggattcaccctcagtagctactac (配列番号: 37)	attgatactgataatgatatagg (配列番号: 38)	gggagagggctatgggtcgcttgggttggtgatctc (配列番号: 39)	
	GFTLSSYY (配列番号: 40)	IDTDNDIR (配列番号: 41)	GRGYGALRLDL (配列番号: 42)	
E2-36	ggattctcctcagtagctaccac (配列番号: 43)	attaataatattgggtgccaca (配列番号: 44)	gccagaagtctctgggattcctggtataattcgg (配列番号: 45)	

40

	GFSLSSYH (配列番号 : 46)	INNYGAT (配列番号 : 47)	ARSPGIPGYNS (配列番号 : 48)
E1-95	ggattctcttcagtagcaattca (配列番号 : 49)	attgctagtagtagtagcatagt (配列番号 : 50)	gcgagagattcttgtaatcggttacctttatgcggcgactttaacttg (配列番号 : 51)
	GFSFSSNS (配列番号 : 52)	IASSSSHS (配列番号 : 53)	ARDSGNRGYLYAGDFNL (配列番号 : 54)
E2-116	ggattcgacctcagtagctctactac (配列番号 : 55)	attgacgggtggtgggtgagccact (配列番号 : 56)	gcgagacgagatgctggtgctgggaacgacctttagcttg (配列番号 : 57)
	GFDLSSSYY (配列番号 : 58)	IDGGGGEPT (配列番号 : 59)	ARRDAGAGNAFSL (配列番号 : 60)
E2-135	ggattcgacttcagtagcagctacttt (配列番号 : 61)	atttatactgttatttagtcgtaagact (配列番号 : 62)	gcgagatcggaacaattgaaagattggatctc (配列番号 : 63)
	GDFSSSYF (配列番号 : 64)	IYTVISRKT (配列番号 : 65)	ARSATIERLDL (配列番号 : 66)
E1-142	ggattcaccatcaataactaac (配列番号 : 67)	atttggaaatggatggcagc (配列番号 : 68)	gcgagaaattttaacttg (配列番号 : 69)
	GFTINNYN (配列番号 : 70)	IWNGDGS (配列番号 : 71)	ARNFNL (配列番号 : 72)

10

20

30

40

【 0 1 0 7 】

(表2) E G F L 6 抗体の軽鎖可変配列の C D R

軽鎖			
	CDR1	CDR2	CDR3
EI-33	ccgagtggttataggcactac (配列番号 : 73)	tgggcttcc (配列番号 : 74)	gcaggcggaataatgctagtgataatgataatcat (配列番号 : 75)
	PSVYRHY (配列番号 : 76)	WAS (配列番号 : 77)	AGEYASDSDNH (配列番号 : 78)
EI-34	cagagtggttatataacaacaac (配列番号 : 79)	gaagcatcc (配列番号 : 80)	gcaggcggttatgctggctacatttgggct (配列番号 : 81)
	QSVYNNNN (配列番号 : 82)	EAS (配列番号 : 83)	AGGYAGYIWA (配列番号 : 84)
EI-80	aagaaacgcctatttaccctactac (配列番号 : 85)	tgggcttcc (配列番号 : 86)	gcaggcggaataatgataatgataatgggt (配列番号 : 87)

10

20

30

	KNAYLSYY (配列番号: 88)	WAS (配列番号: 77)	AAEYSDSDNG (配列番号: 89)
E1-89	cagagtggttatagtaacaaccgc (配列番号: 90)	tatgcacc (配列番号: 91)	gcagagataaaactgctgattctgattgct (配列番号: 92)
	QSVYSNNR (配列番号: 93)	YAA (配列番号: 94)	AGYKTADSDGIA (配列番号: 95)
E2-93	gagagcggttataataataaccgc (配列番号: 96)	tatgcacc (配列番号: 97)	gtagcccttaaggttatggtactgacggcaatgct (配列番号: 98)
	ESVYNNNR (配列番号: 99)	YAS (配列番号: 100)	VAFKGYGTDGNA (配列番号: 101)
E1-38	gagagtggttatagtaacaaccgc (配列番号: 102)	tatgcacc (配列番号: 97)	gcagagataaaactgctgattctgattgctgctgct (配列番号: 103)
	ESVYSNNR (配列番号: 104)	YAS (配列番号: 100)	AGYKTADSDGLG (配列番号: 105)
E1-52	cagagtggttataggaactac (配列番号: 106)	tgggtcc (配列番号: 86)	gcagggcgaatagctagtagtagtagtaaatcat (配列番号: 107)
	PSVYRHY (配列番号: 108)	WAS (配列番号: 77)	AGEYASDSDNH (配列番号: 109)
E2-36	cagaatggttatagtaacaaccgc (配列番号: 110)	gaagcatcc (配列番号: 111)	gcagggcggttaggttaggaggttcgattgtagtgcct (配列番号: 112)
	QNVYSYNNR (配列番号: 113)	EAS (配列番号: 83)	AGGYDCRSSDCDA (配列番号: 114)
E1-95	cagagcattaatagttgg (配列番号: 115)	gaagcatcc (配列番号: 111)	caacaggggttaggttagtaattgttgataataatatt (配列番号: 116)
	QSINSW (配列番号: 117)	EAS (配列番号: 83)	QQGYSYSNVDNNI (配列番号: 118)
E2-116	caaagtggttatcttcagaacaac (配列番号: 119)	tatgcacc (配列番号: 97)	cagggcggttaggttaggttagtatataatattct (配列番号: 120)
	QSVYLLQNN (配列番号: 121)	YAS (配列番号: 100)	QGGYSGYINS (配列番号: 122)

E2-135	gagagtggttaataataaccgc (配列番号: 123)	gcgcaccc (配列番号: 124)	gtaggataaaaagtggttatattgatagtattcct (配列番号: 125)
	ESVYNNYR (配列番号: 126)	AAS (配列番号: 127)	VGYKSGYIDSIP (配列番号: 128)
	gcgagtggttaagtaacaactac (配列番号: 129)	tatgcaccc (配列番号: 97)	gcagcgcatatatagtagtagtagtatatggtatt (配列番号: 130)
E1-142	ASVYSNNY (配列番号: 131)	YAS (配列番号: 100)	AGDYSSSSDMCI (配列番号: 132)

【 0 1 0 8 】

選別されたEGFL6結合ヒットを、ヒト胚腎臓（HEK293）細胞（Invitrogen）中の哺乳動物発現ベクター系を使用するウサギまたはウサギ/ヒトキメラIgGとして表した。抗体を、タンパク質A樹脂を含むカラムを使用して、高速タンパク質液体クロマトグラフィー（FPLC）分離ユニットにより精製した。精製されたEGFL6結合抗体を、それらの生物学的特性について特徴分析した。

【 0 1 0 9 】

実施例 2 - E G F L 6 タンパク質に対する抗 E G F L 6 モノクローナル抗体の結合親和性
モノクローナル抗体による E G F L 6 の結合を、B 細胞培養物から回収された上清を使用する E L I S A によりまずスクリーニングした（図 2）。E L I S A 滴定を使用して、モノクローナル抗体のパネルの E G F L 6 抗原に対する結合親和性を決定した（図 3）。モノクローナル抗体のパネルの結合定数（ K_D 及び/または E C 50）を、P r i s m G r a p h P a d プログラムで 4 パラメータ曲線フィッティングを使用して推定した。B

i a c o r e 分析について、全ての実験を 25、45 μ l / 分の流量で行った。抗ヒト Ig G F c 抗体 (T h e r m o F i s h e r 製、酢酸緩衝液中で各々 50 μ g / ml、p H 5.0) を、製造業者からの指示に基づくアミンカップリング手順を使用して、カルボキシメチルデキストランセンサーチップ (C M 5) 上に固定した。試験される精製ウサギ / ヒトキメラ抗体を、0.5 % P 20、H B S - E P 緩衝液中 5 μ g / ml の濃度で希釈し、500 ~ 1000 R U に到達するように F C 2 に注入した。F C 1 を参照細胞として使用した。特異的なシグナルは、F C 2 対 F C 1 で得られるシグナルの相違に対応する。分析物 (組換えヒト E G F L 6、S D S - P A G E ゲル上の見かけ分子量 60 k D a) を、90 秒間、0.5 % P 20、H B S - E P 緩衝液中での一連の濃度希釈 (100、50、25、12.5、6.25、及び 3.13、1.56 n M) で注入した。これらの濃度は、0.5 % P 20、H B S - E P 中のストック溶液から調製した。分析物の解離フェーズを、30 分間にわたりモニタリングした。ランニング緩衝液も、二重参照として同じ条件下で注入した。各ランニングサイクル後、両方のフローセルを、20 ~ 45 μ l のグリシン - H C l 緩衝液 p H 1.5 を注入することにより再生成した。E G F L 6 に対する結合 K_D を、各 E G F L 6 モノクローナル抗体についての k_{off} / k_{on} 速度により計算した (表 3)。

10

【 0 1 1 0 】

(表 3) E L I S A または B i a c o r e 方法により決定される E G F L 6 抗体結合親和性

20

抗体名	EC50 (ng/ml)
E1-34	0.78
E1-38	5.81
E2-93	0.37
E1-142	1.91
E2-135	0.44

【 0 1 1 1 】

実施例 3 - 実験手順及び方法

細胞株及び培養：ヒト上皮性卵巢癌細胞株、S K O V 3 i p 1 及び A 2 7 8 0 i p 2 を、記載されるように維持した (S o o d , A . K . e t a l . M o l e c u l a r d e t e r m i n a n t s o f o v a r i a n c a n c e r p l a s t i c i t y . A m e r i c a n J o u r n a l o f P a t h o l o g y 1 5 8 , 1 2 7 9 - 1 2 8 8 , 2 0 0 1) 。ヒト不死化臍帯内皮細胞 (R F 2 4) を、補充物 (ビルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、M E M ビタミン、及びグルタミン、L i f e T e c h n o l o g i e s) を含む M E M 培地において増殖させた。マウス卵巢内皮細胞 (M O E C) の誘導及び特徴分析については、以前に記載されている (L a n g l e y , R . R . e t a l . T i s s u e - s p e c i f i c m i c r o v a s c u l a r e n d o t h e l i a l c e l l l i n e s f r o m H - 2 K (b) - t s A 5 8 m i c e f o r s t u d i e s o f a n g i o g e n e s i s a n d m e t a s t a s i s . C a n c e r R e s e a r c h 6 3 , 2 9 7 1 - 2 9 7 6 , 2 0 0 3) 。細胞培養物を、95 % 湿度を含む 5 % C O 2 インキュベーター中、37 で維持した。インビボ注入のために、細胞をトリプシン処理し、1,200 r p m で 5 分間 4 で遠心分離し、P B S で 2 回洗浄し、無血清ハンス平衡塩溶液 (L i f e T e c h n o l o g i e s , G r a n d I s l a n d , N Y , U S A) 中で再構成した。(トリパンブルー色素排除により決定される) 95 % 超の生存率を有する単細胞懸濁液のみを、インビボ腹腔内注入に使用した。

30

40

【 0 1 1 2 】

内皮細胞単離：新鮮な組織試料 (5 個の正常卵巢、5 個の創傷組織、及び 10 個の上皮性高悪性度、ステージ I I I または I V 侵襲性漿液性卵巢癌) を、M . D . A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r で初期の外科的診査を受けている患者から、施設内審査委員会 (I n s t i t u t i o n a l R e v i e w B o a r d) からの承認後に入

50

手した。精製内皮細胞からのトータルRNAに、Affymetrix Human U133 plus 2.0 GeneChipプラットフォームを使用してマイクロアレイ分析を行った(Lu, C. et al. Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma. Cancer Research 67, 1757 - 1768, 2007)。

【0113】

定量的リアルタイムPCRバリデーション：定量的リアルタイムRT-PCRを、RNaseasyミニキット(Qiagen)を製造業者の指示に従って使用して単離された、50 ngの精製内皮細胞からのトータルRNAを使用して行った。相補的DNA(cDNA)を、Verso cDNAキット(Thermo Scientific)を使用して0.5~1 µgのトータルRNAから合成した。定量的PCR(qPCR)分析を、SYBR Green ER qPCR SuperMix Universal(Invitrogen)及びBio-Rad(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を使用して3通りで行った。相対定量を、正規化して倍率変化パーセントについて制御する $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法を使用して計算した(Donninger, H. et al. Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. Oncogene 23, 8065 - 8077, 2004)。

10

20

【0114】

siRNA構成物及び送達：siRNAを、Sigma-Aldrich(The Woodlands, TX, USA)から購入した。BLAST検索に基づくいずれかの既知のヒトmRNAとの配列相同性を共有しない非サイレンシングsiRNAを、標的siRNAについての対照として使用した。インビトロ過性形質導入を、記載されるように行った(Landen, C.N., Jr. et al. Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. Cancer Research 65, 6910 - 6918, 2005)。簡潔には、siRNA(4 µg)を、10 µLのLipofectamine 2000形質導入試薬(Lipofectamine)で、製造業者の指示に従って20分間室温でインキュベートし、10 cm培養プレートにおける80%コンフルエンスの培養物中の細胞に添加した。

30

【0115】

逆相タンパク質アレイ(RPPA)及びウェスタンブロット分析：ヒト組換えEGFL6タンパク質の存在または非存在下のRF24及びOVCA3細胞に、RPPA分析を行った。ウェスタンブロット分析を、以前のように行った(Landen, C.N., Jr. et al. 2005, 同上、Halder, J. et al. Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research 12, 4916 - 4924, 2006)。RF24細胞の細胞溶解物をヒト組換えEGFL6タンパク質または抗EGFL6抗体で処理し、PI3キナーゼ及びAKTシグナル伝達の活性化について抗ヒトEGFL6、PI3キナーゼ、及びAKT抗体、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)と複合された二次抗体を使用して確認した。

40

【0116】

50

細胞遊走アッセイ：0.1%ゼラチンでコーティングされた改変Boydenチャンバーを使用して、RF24細胞の遊走をhEGFL6 siRNAの存在または非存在下で評価した。hEGFL6もしくはインテグリンsiRNAでの48時間またはEGFL6抗体もしくはPI3キナーゼ阻害剤での6時間の形質移入後、MEM無血清培地中のRF24細胞(1.0×10^5)を、Transwell多孔質ポリカーボネート膜インサート(Corning, Lowell, MA, USA)の上チャンバーに播種した。チャンバーを、化学誘引物質として下チャンバー中に15%の血清を含むMEM培地を含有する24ウェルプレートに配置した。細胞を加湿されたインキュベーターにおいて6時間遊走させた。遊走した細胞を、ヘマトキシリン染色を使用して染色し、光学顕微鏡観察により試料当たり5つのランダムな視野(元の倍率の200倍)で計測した。実験は2通りで行い、3回実施した。

10

【0117】

チューブ形成アッセイ：マトリゲル(12.5mg/mL)を4で解凍し、50 μ Lを96ウェルプレートの各ウェルに迅速に添加し、10分間37で凝固させた。ウェルを次に6時間37で、EGFL6もしくはインテグリンsiRNA(48時間)またはEGFL6抗体もしくはPI3キナーゼ阻害剤(6時間)で予め処理されたRF24細胞(ウェル当たり20,000)でインキュベートした。実験は3通りで行い、2回繰り返した。Olympus IX81倒立顕微鏡を使用して、ウェル当たり5つの画像を100倍で取得した。画像当たりの(少なくとも3つの細胞が単一点で形成された場合として定義される)節の量を定量化した。細胞凝集を説明するために、最高及び最低値を各グループから除去した。

20

【0118】

プロモーター分析及びクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイ：RF24細胞を、低血清培地(0.5%血清)中で18時間培養した後、EGFL6またはHIF1(50ng/mL)のいずれかで6時間処理した。処理後、ChIPアッセイを、EZ ChIP(商標)キット(Millipore, Temecula, CA, USA)を製造業者により記載されるように使用して行った。簡潔には、架橋細胞を回収し、溶解し、音波処理し、その後にEGFL6(Abchem)抗体またはIgG対照での免疫沈降を行った。免疫錯体を、タンパク質Gアガロースビーズで回収し、溶出した。架橋を65でインキュベートすることにより元に戻した。DNAを次に、EGFL6転写開始部位のプライマー対上流を使用するPCRのために、抽出及び精製した。

30

【0119】

フローサイトメトリー分析：RF24細胞を、PBSで洗浄し、PBS-EDTA5mMで採取した。細胞を次に異なるインテグリン一次抗体(Sigma-Aldrich)で免疫標識し、その後二次抗体(Invitrogen)で染色した。試料をFACSCalibur上で、Cell Questソフトウェアで取得し、データをFlowJoソフトウェアで分析した。

【0120】

卵巣癌及び組織プロセッシングの同所性インビボモデル：雌無胸腺ヌードマウス(NCr-nu)を、NCI-Frederick Cancer Research and Development Center(Frederick, MD, USA)から購入し、以前に記載されたように維持した(Landen, C.N., Jr. et al. 2005、同上)。全てのマウス研究は、施設内動物実験委員会(Institutional Animal Care and Use Committee)により承認された。マウスは、American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care及びUS Public Health Service Policy on Human Care and Use of Laboratory Animalsにより記載されるガイドラインに従って飼育された。腫瘍細胞注入について、A2780ip2またはSKOV3ip1またはOVCAR3細胞(1×10^6)を腹腔内(i.p.)に注入した。療法実

40

50

験について、各 siRNA を、 $150 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重の用量で週 2 回投与した。犠死時、マウス及び腫瘍重量、腫瘍の数及び分布を記録した。解剖を行った個人には処理グループ割り当てがわからないようにした。組織検体を、ホルマリン、OCT (Miles, Inc., Elkhart, IN, USA)、または液体窒素中での急速凍結のいずれかで固定した。オプターゲット効果について、SKOV3ip1 腫瘍保有マウスを、上記と同じ 2 つの異なる EGFL6 siRNA 配列で処理した。

【0121】

異種移植片の免疫組織化学及び免疫蛍光染色：細胞増殖 (Ki67、1:200、Zymed)、微小血管密度 (MVD、CD31、1:500、Pharmingen)、及び低酸素 (炭酸脱水酵素抗 CA9、1:500、Novus) についての IHC 分析を全て記載されるように行った (Thaker, P. H. et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine* 12, 939 - 944, 2006、Lu, C. et al. Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer Cell* 18, 185 - 197, 2010)。統計分析のために、グループ当たり 5 つのランダムに選択された腫瘍からの断面を染色し、腫瘍当たり 5 つのランダムな視野にスコアを付けた。200 倍または 100 倍で写真を撮った。マウス腫瘍試料中の MVD を定量化するために、CD31 について陽性の血管染色の数を、10 個のランダムな $0.159 - \text{mm}^2$ 視野において 200 倍で記録した。PCNA 発現を定量化するために、陽性細胞 (3, 3' - ジアミノベンジン染色) の数を、10 個のランダムな $0.159 - \text{mm}^2$ 視野において 100 倍で計測した (Thaker, P. H. et al. 2006、同上、Lu, C. et al. 2010、同上)。全ての染色を 2 人の研究者が盲目で定量化した。EGFL6 (Santa Cruz) 及び CD31 についての染色は、記載されるように凍結組織を使用して行った (Lu, C. et al. 2010、同上)。

【0122】

マトリゲルプラグアッセイ：インビボマトリゲルアッセイを、マトリゲルプラグをマウスに皮下注入することにより行った。マトリゲルプラグは、(陰性対照としての) 無血清 MEM 完全培地、(陽性対照としての) VEGF、または (試験グループとしての) EGFL6 のいずれかを含んだ。注入の 6 時間後、動物を犠死させ、マトリゲルを回収し、ヘモグロビンアッセイを行った。

【0123】

創傷治癒アッセイ：1 日目に、A2780ip2 細胞をヌードマウスに注入し、2 日目に、創傷を腫瘍保有マウスの背中に形成した。動物は獣医の診察を受け、個別のケージに維持された。マウスを 2 つのグループ ($n = 10$) に分けた。

【0124】

CH / 対照 siRNA 及び CH / mEGFL6 siRNA ナノ粒子：siRNA 処理を 3 日目に開始し、週 2 回 ($150 \mu\text{g} / \text{kg}$) 行った。創傷を (創傷治癒の完了まで) 0、1、3、5、7、9、11、13、及び 15 日目に測定した。いずれかのグループの動物が瀕死となった際に腫瘍を採取した。

【0125】

後肢虚血：以前に記載されたような重症後肢虚血 (Baluk, P., Hashizume, H. & McDonald, D. M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 102 - 111, 2005) を、腹腔内注入によりケタミン ($100 \text{mg} / \text{kg}$) で麻酔をかけた後の雌ヌードマウスにおいて誘発し、大腿動脈をその基部に近いところから、伏在及び膝窩動脈に分岐する遠位点への外腸骨動脈の分枝として摘出した。動脈結紮後、マウスを直ちに下記の実験グループ ($n = 5$)：対照グループ、虚血 - 24 時間、及

び虚血 - 96 時間に割り当てた。連続レーザードップラーイメージング分析 (Moor Instruments, Devon, UK) を行い、大腿動脈結紮前及び後 (24 時間及び 96 時間後) の後肢の血流をモニタリングした。デジタルカラーコード画像を分析し、膝から爪先までの領域における血流を定量化し、灌流の平均値を計算した。各時点で、虚血肢からの組織を採取し、OCT 培地において凍結した。マウスモノクローナル抗 CD31 を使用して MVD を、及び標準的な免疫染色手順を使用して、マウスポリクローナル抗 EGFL6 抗体で、凍結埋込み組織上での EGFL6 発現について決定した。

【0126】

ヒト卵巣癌検体：施設内審査委員会による承認後、利用可能な臨床転帰データ及び委員会認定婦人科病理学者により確認された診断を有する (1985 ~ 2004 年に回収された) 180 個のパラフィン埋込み上皮性卵巣癌検体を、Karmanos Cancer Institute 腫瘍バンクから入手した。

【0127】

ヒト卵巣癌試料について、EGFL6、CD34、及び VEGF の免疫組織化学を、以前に記載されたように行った (Ali-Fehmi, R. et al. Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. American Journal of Obstetrics and Gynecology 192, 819-825, 2005)。EGFL6 染色を、抗ヒト EGFL6 抗体 (Sigma-Aldrich) を使用して行った。簡潔に、ホルマリン固定パラフィン埋込み組織断面を、脱パラフィン化し、再水和した。Div a 溶液での抗原回収後、内因性ペルオキシダーゼを、メタノール中の 3% 過酸化水素で 15 分間遮断した。PBS での洗浄後、断面を、タンパク質ブロック (5% 正常ウマ血清及び 1% ヤギ血清) で 20 分間室温 (RT) で遮断し、続いて抗 EGFL6 抗体 (Sigma-Aldrich) で一晩 4 でインキュベーションを行った。PBS での洗浄後、断面をホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 複合ヤギ抗ウサギ (1:250、Jackson ImmunoResearch) で 1 時間室温でインキュベートした。最後に、3,3'-ジアミノベンジン (Research Genetics) 及びギルヘマトキシリン (BioGenex Laboratories) での対比染色で可視化を達成した。陰性染色をスコア 0 として報告し、EGFL6 の増加する強度についてスコア 1 ~ 4 を使用した。染色の強度及び染色された細胞の割合の両方を考慮する、以前に記載された方法 (Ali-Fehmi, et al., 2005 同上) に従って、染色されたスライドに、組織化学スコア (H-スコア、> 100 が高発現、100 が低発現と定義される) に基づき、2 人の研究者がスコアを付けた。

【0128】

統計分析：動物実験について、処理グループ当たり 10 匹のマウスを割り当てた。この試料サイズは、95% 信頼性で腫瘍重量の 50% 低減を検出する 80% の検出力をもたらした。各グループの腫瘍重量及び腫瘍結節の数を、(2 つのグループの比較のための) スチューデントの t 検定を使用して比較した。0.05 未満の P 値を統計的に有意とみなした。全ての統計試験は、両側であり、Windows 統計ソフトウェア (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) の SPSS バージョン 12 を使用して行った。

【0129】

実施例 4 - 腫瘍関連内皮細胞において上方調節された EGFL6 発現

5 個の正常卵巣、5 個の創傷組織試料、及び 10 個の侵襲性上皮性卵巣腫瘍を入手し、陰性及び陽性免疫選別を行った。マイクロアレイ分析を実施する前に、内皮細胞について全ての試料の純度を、内皮細胞マーカー P1H12 及びフォンウィレブランド因子を使用して確立した (図 4A)。免疫染色は、免疫精製技法が、全ての試料において > 95% の内皮細胞純度をもたらしたことを明らかにした。データの分析は、375 個の遺伝子が、正常及び創傷内皮細胞と比較して、卵巣腫瘍内皮細胞において上方調節されたことを明ら

10

20

30

40

50

かにした(図4B)。とりわけ、EGFL6は、正常及び創傷内皮細胞と比較して、腫瘍内皮細胞において最も高い分化発現を示した(図4B)。卵巣患者試料におけるEGFL6、VEGF、及びCD31の発現を決定した(図4C)。この結果をさらに検証するために、内皮細胞を正常卵巣、卵巣腫瘍、及び創傷治癒組織から単離し、EGFL6の発現を、PCRを使用して決定した。EGFL6は、主に、正常または創傷内皮細胞と比較して、腫瘍内皮細胞においてのみ過剰発現した(図4D)。腫瘍内皮細胞におけるEGFL6上方調節も示された。EGFL6は、内皮細胞及び試験される卵巣癌細胞のほとんどにおいて発現した。腫瘍血管新生におけるEGFL6の役割を示すために、RF24細胞をsiEGFL6で処理し、これは対照細胞と比較して72時間でのタンパク質レベルにおいて80%超のノックダウンをもたらした。EGFL6 siRNA処理細胞は、対照siRNA処理細胞と比較して、顕著に少ない遊走及びチューブ形成を示し、血管新生におけるEGFL6の重要性を示した。

10

20

30

40

50

【0130】

実施例5 - EGFL6サイレンシングはマウスにおける創傷治癒に影響を及ぼさなかった
創傷治癒におけるEGFL6の役割は、ヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMEC)を使用して、形成された創傷を使用して説明された。創傷治癒に対する効果を、下記の手順を使用して行った。1日目に、SKOV3ip1細胞をヌードマウスに注入し、2日目に、創傷を腫瘍保有マウスの背中に形成した(2cm×2cm)。動物をランダムに2つのグループ(n=10)に分け、一方に対照抗体を投与し、他方のグループのマウスをEGFL6抗体で処理した。抗体処理を3日目に開始し、週1回行った(5mg/kg)。創傷(面積=長さ×幅)を、2週間にわたり創傷治癒の完了までモニタリングした。EGFL6抗体は、インビボ研究において創傷治癒を使用して試験される場合、創傷治癒を妨げなかった(図9C)。

【0131】

創傷治癒アッセイでは、24時間後、si対照処理細胞及びsiEGFL6処理細胞が、創傷治癒能力に対して効果を有さなかったことが明らかになった(図5A~5C)。また、腫瘍保有マウスに形成された同様の創傷を使用し、ネズミsiRNA配列を使用する内皮細胞区画におけるEGFL6サイレンシングの創傷治癒に対する効果を決定した。図5D及び5Eに示されるように、対照siRNAまたはマウスEGFL6 siRNAで処理された動物の創傷治癒において顕著な相違は観察されず、両方のグループは創傷治癒の類似パターンも示した。

【0132】

しかしながら、マウスEGFL6 siRNAで処理された動物は、腫瘍負荷の顕著な低減を示し(図5F~5H)、内皮細胞区画におけるEGFL6のサイレンシングが腫瘍増殖に顕著に影響を及ぼすが、創傷治癒を悪化させないことを示した。EGFL6遺伝子サイレンシングは、腫瘍血管における増殖の顕著な低減ももたらした(図11A~11B)。

【0133】

実施例6 - EGFL6は内皮細胞における血管新生を向上させる

EGFL6が低酸素条件下で内皮細胞の増加した生存率をもたらすことを確立するために、EGFL6を、EGFL6 siRNAを使用して低酸素状態で低酸素RF24細胞においてサイレンシングし、細胞死を調査した。図6Aに示されるように、細胞のほぼ50%は、正常酸素と比較して低酸素で5日後も生存した。これとは対照的に、低酸素におけるEGFL6遺伝子サイレンシングは、低酸素及び正常酸素条件下の未処理細胞と比較して75%の細胞死をもたらした(図6H)。マウスの後肢の大腿動脈を摘出することにより、マウスにおいて後肢虚血を形成し、これは後肢への血液及び酸素供給の遮断をもたらした(図6I)。図6J~6Kに示されるように、虚血マウスは、MVD(血管)の顕著な低減及び内皮細胞におけるEGFL6発現の増加を示した。RF24細胞の遊走(図12C)及びチューブ形成(図12D)は、EGFL6での処理後に増加した。

【0134】

実施例 7 - E G F L 6 サイレンシングは腫瘍増殖及び血管新生を阻害する

遺伝子サイレンシングにおける E G F L 6 の治療有効性を、2 つの同所性卵巣癌腫瘍モデル、S K O V 3 i p 1 及び O V C A R 5 を使用して研究した。雌無胸腺ヌードマウス (N C r - n u) は、N C I - F r e d e r i c k C a n c e r R e s e a r c h a n d D e v e l o p m e n t C e n t e r (F r e d e r i c k , M D) から購入し、全てのマウス研究は、施設内動物実験委員会により承認された。マウスは、A m e r i c a n A s s o c i a t i o n f o r A c c r e d i t a t i o n o f L a b o r a t o r y A n i m a l C a r e 及び U S P u b l i c H e a l t h S e r v i c e P o l i c y o n H u m a n C a r e a n d U s e o f L a b o r a t o r y A n i m a l s により記載されるガイドラインに従って飼育された。腫瘍細胞注入について、S K O V 3 i p 1 細胞 (1×10^6) を腹腔内 (i . p) 経路を通して注入した。抗体処理グループについて、精製モノクローナル抗体を、5 週間にわたり週 1 回 5 m g / k g 体重で投与した。犠死時、マウス及び腫瘍重量、腫瘍の数及び分布を記録した。解剖を行った個人には処理グループ割り当てがわからないようにした。組織検体を、ホルマリン、O C T (M i l e s , I n c . , E l k h a r t , I N)、または液体窒素中での急速凍結のいずれかで固定した。

【 0 1 3 5 】

図 8 F に示されるように、S K O V 3 i p 1 腫瘍保有動物のマウス E G F L 6 s i R N A 単独及びヒト E G F L 6 s i R N A との組み合わせでの処理は、対照 s i R N A で処理された腫瘍保有マウスと比較して腫瘍増殖の顕著な低減をもたらした。ヒト E G F L 6 s i R N A 単独では、腫瘍低減に対する効果はあまりなかった。腫瘍結節の数及び観察された腫瘍負荷に対する E G F L 6 の効果を図 8 F に示す。マウス E G F L 6 s i R N A 単独及びヒト E G F L 6 s i R N A との組み合わせで処理された O V C A R 5 腫瘍保有マウスも、腫瘍重量及び結節の顕著な低減を示した。

【 0 1 3 6 】

m E G F L 6 s i R N A ならびにマウス及びヒト E G F L 6 s i R N A の組み合わせで処理した S K O V 3 i p 1 腫瘍保有動物は、対照 s i R N A で処理された動物と比較して、増殖細胞及び微小血管密度の顕著な低減を示した (図 8 C ~ 8 D)。O V C A R 5 腫瘍保有動物も同様の結果を示した。マウス E G F L 6 s i R N A 配列のオフターゲット効果を決定するために、S K O V 3 i p 1 腫瘍増殖に対する E G F L 6 遺伝子サイレンシングの効果を、2 つの他のマウス s i R N A 配列を使用して確認し、両方の配列が腫瘍増殖及び腫瘍結節の実質的な低減を示した。

【 0 1 3 7 】

抗 E G F L 6 抗体 M a b # 1 3 5 及び # 9 3 (E 2 - 1 3 5 & E 2 - 9 3) での処理は、腫瘍増殖を大きく抑制し (図 8 F)、E G F L 6 抗体処理マウスでは残留癌細胞のみが検出されたが、未処理対照マウスは、腫瘍結節の数として示されるように、大きな腫瘍負荷及び腫瘍拡散を有した。抗 E G F L 6 抗体 (M a b E 2 - 9 3 及び E 2 - 1 3 5) での処理はまた、対照抗体処理グループと比較した場合、癌細胞増殖 (K i 6 7 染色) を阻害し、微小血管密度 (腫瘍血管新生、C D 3 1 I H C 染色) を低減した (図 8 G)。

【 0 1 3 8 】

実施例 8 - 抗 E G F L 6 遮断抗体は内皮細胞における血管新生を低減する

E G F L 6 遮断がその血管新生媒介性機能に影響を及ぼすであろうことを示すために、E G F L 6 機能的遮断抗体を開発し、血管新生に対するその活性について試験した。ヒト及びマウス E G F L 6 に結合したいくつかの E G F L 6 抗体クローンを同等の親和性でスクリーニングした。2 つの抗体 (9 3 及び 1 3 5) は、全ての結合親和性及びインビトロ活性基準を満たし、さらなる研究を実施するのに選択された。図 8 B に示されるように、内皮細胞の E G F L 6 組換えタンパク質での処理は、リン酸化 T i e 2 及び A K T タンパク質の両方の発現を増加させた。これとは対照的に、E G F L 6 遮断抗体 9 3 及び 1 3 5 は、両方のリン酸化タンパク質の発現の低減をもたらした。図 8 D ~ E に示されるように、内皮細胞の E G F L 6 組換えタンパク質での処理は、これらの細胞における遊走及びチ

ューブ形成を向上させた。しかしながら、チューブ形成及び遊走の両方の E G F L 6 媒介性機能効果は、E G F L 6 遮断抗体により顕著に低減された。

【 0 1 3 9 】

抗体の 1 つにヒト化を行い、ヒト I g G 1 骨格内に配置してヒト癌患者における使用を可能にし、抗体の結合親和性及びインビトロ活性がヒト化後に保存されていたことを示した。

【 0 1 4 0 】

実施例 9 - 抗 E G F L 6 遮断抗体は、卵巣癌モデルにおいて抗血管新生及び抗腫瘍効果を有した

上で報告された E G F L 6 のインビトロ活性は、E G F L 6 機能の遮断が、腫瘍血管を損傷する能力を向上させ、これにより抗腫瘍有効性を増加させるであろうことを示した。これを試験するために、E G F L 6 の活性を遮断し、血管新生及び腫瘍増殖及び血管新生を阻害する E G F L 6 の能力について調査した。

【 0 1 4 1 】

S K O V 3 - i p 1 腫瘍保有マウスを、対照抗体及び抗 E G F L 6 抗体で処理した。処理の 5 週間後、腫瘍を採取し、抗腫瘍及び抗血管新生活性について分析した。抗 E G F L 6 抗体での処理は、対照抗体での処理と比較して有効な抗腫瘍活性をもたらした。抗 E G F L 6 抗体 9 3 及び 1 3 5 両方での処理は、腫瘍重量及び腫瘍結節の顕著な低減をもたらした (図 9 E 及び 9 F) 。 E G F L 6 遮断抗体で処理された動物は、対照抗体処理グループと比較して減少した M V D も示し (図 9 F) 、 E G F L 6 活性の遮断が腫瘍増殖及び血管新生を阻害したことを示した。E G F L 6 抗体は、インビトロまたはインビボで創傷治癒を防げず (図 9 G) 、正常な組織修復に影響を及ぼすことなく、腫瘍血管新生を調節することができることを示した。

【 0 1 4 2 】

V . 抗体可変配列

抗 E G F L 6 抗体の可変 D N A 配列を下に示す。

【 0 1 4 3 】

>EI-33H

CAGTCGCTGGAGGAGTCCGAGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACA
CTCACCTGCAAAGCCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCTACTACTACATGTGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCATGCATTTATGCTGGTA
GTAGTGGTAGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCA
AAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACA
CGGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGTGGTGGTAGTACTTATGCTCAATATTTTAA
CTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCAG (SEQ ID NO: 133)

【 0 1 4 4 】

>EI-33K

GAGCTCGATATGACCCANACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACA
GTCAGCATCAATTGCCAGTCCAGTCCGAGTGTTTATAGGCACTACTTATCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACTGGGCTTCCACTCT
GGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCAC
CTCACCATCAGCGGCGTGACGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCG
AATATGCTAGTGATAGTGATAATCATTTTCGGCGGAGGGACCGAGCTGGAGATCC
TAG (SEQ ID NO: 134)

【 0 1 4 5 】

>EI-34H

GAGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTG
ACACTCACCTGCACAGCTTCTGGATTCTCCTTCAGTAGTATTTATTGGATATGCTG
GGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTTGATCGCATGCATTTCAGATTAC
TAGTGGTATCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAA
ATGTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACG
GCCACCTATTTCTGTGGGAGAAGGGGATATGGTGCCTATGCTGGTACTGGTGCCT
CTGACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCTTCAG (SEQ ID NO: 135)

10

【 0 1 4 6 】

>EI-34K

GAGCTCGATCTGACCCAGACTGCATCGTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACCG
TCACCATCAATTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAATAACAACAACCTTAGCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACGAAGCATCCAA
ACTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTC
ACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTATTGTGCAG
GCGGTTATGCTGGCTACATTTGGGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAA
AG (SEQ ID NO: 136)

20

【 0 1 4 7 】

>EI-80H

GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGTTCCAGCCTGGGGGATCCCTG
GCACTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTACCCCTCAATAGTTATTATATGTCCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTGATAGTGATA
GTCCTACTACGACTGCCTACGCGAACTGGGCGAGAGGCCGATTACCATCTCCAA
GACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACAC
GGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGGCTATGGTCCTGTTTCGATTGGATCTCTGGGGC
CAGGGCACCCCTGGTCACCGTCTCTTCAG (SEQ ID NO: 137)

30

【 0 1 4 8 】

>EI-80K

ACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCAGCATCAATT
GCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAAGAACGCCTATTTATCCTACTACTTAGCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACTGGGCTTCCACT
CTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCA
CTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGC
CGAATATAGTAATGATAGTGATAATGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAAT
CAAAG (SEQ ID NO: 138)

40

50

【 0 1 4 9 】

>E1-89H

GAGCAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCTG
ACACTCACCTGCGCAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGCGGCTACTGGATATGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTTATGCTG
GTAGTAGTGGTGGGCACATTTATTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCAT
CTCCCAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCG
GACACGGCCACATATTTCTGTACAAGAGATAATTATGGTGGTGGTGGTTCTGCTT
CCAAATTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCTTCAG (SEQ ID NO: 139)

10

【 0 1 5 0 】

>E1-89K

GAGCTCGTGATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAG
TCACCATCAACTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTTATAGTAACAACCGCTTAGCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGGTCTATTATGCAGCCACT
CTGGCATCTGGGGTCCCGTCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATATGGGACACAGTCC
ACTCTCACCATCGCCGATGTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAG
GATATAAACTGCTGATTCTGATGGTATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGA
AATCAAAG (SEQ ID NO: 140)

20

【 0 1 5 1 】

>E2-93H

CAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGGGATCCCTGACA
CTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGTTATGGAGTGAAGTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCGTATATTGGTCTTAGTAGTG
AGATCACTTACTACGCGGGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCCAAGCCCTC
GTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCAC
CTATTTCTGTGTGAGAGATCTTTATCATAGTAATGGTTTGTGGGGCCCAGGCACC
CTGGTCACCATCTCTTCAG (SEQ ID NO: 141)

30

【 0 1 5 2 】

>E2-93K

GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAG
TCACCGTCAGTTGCCAGGCCAGTGAGAGCGTTTATAATAATAACCGCTTATCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTATGCATCCACT
CTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCA
CTCTCACCATCAGCAGCGTGCAATGTGCTGATGCTGCCACGTATTATTGTGTAGC
CTTTAAAGGTTATGGTACTGACGGCAATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGA
AATCAAAG (SEQ ID NO: 142)

40

50

【 0 1 5 3 】

>E1-38H

GAGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCTG
ACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAATAGCGGCTACTGGGTATGCT
GGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCTTGCATCTATACTA
GTAGTCCTACTGGTGCCATATACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCAT
CTCCCAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCG
GACACGGCCACCTATTTCTGTACAAGAGATAATTTTGGTGGTGGTGGTTCTGCTT
CCAAATTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCTTCAG (SEQ ID NO: 143)

10

【 0 1 5 4 】

>E1-38K

GAGCTCGTGATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTGGGAGGCACAG
TCACCATCGATTGCCAGGCCAGTGAGAGTGTTTATAGTAACAACCGCTGTGCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTATGCATCCACT
CTGGCATCTGGGGTCCCGTCGCGGTTCAAATGCAGTGGATCTGGGACACGGTTCA
CTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGAAGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGG
ATATAAGACTGCCGATTCTGATGGTCTTGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGA
AATCAAA (SEQ ID NO: 144)

20

【 0 1 5 5 】

>E1-52H

GAGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCTG
ACACTCGCCTGCACAGCTTCTGGATTACCCCTCAGTAGCTACTACATGTGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATCGCATGCATTGATACTGATA
ATGATATTAGGACTGCCTACGCGAGCTGGGCGAGGGGGCCGATTACCATCTCCA
GGACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACA
CGGCCACCTATTTCTGTGGGAGAGGCTATGGTGGCCTTCGGTTGGATCTCTGGGG
CCAGGGCCCCTGGTCACCGTCTCTTCAG (SEQ ID NO: 145)

30

【 0 1 5 6 】

>E1-52K

GAGCTCGATCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACA
GTCAGCATCAATTGCCAGTCCAGTCCGAGTGTTTATAGGCACTACTTATCCTGGT
ATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACTGGGCTTCCACTCT
GGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACGCGGCAAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACT
CTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCG
AATATGCTAGTGATAGTGATAATCATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCA
AAG (SEQ ID NO: 146)

40

【 0 1 5 7 】

>E2-36H

CAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGTCGCCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACA
CTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTACCACATGGGCTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAATCATTAATAATTATGGTG
CCACATACTACGCGAGCTGGGCAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGA
CCACGGTGGATCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATT
TCTGTGCCAGAAGTCCTGGGATTCTGGTTATAATTCGTGGGGCCCAGGCACCCT
GGTCACCATCTCCTCAG (SEQ ID NO: 147)

10

【 0 1 5 8 】

>E2-36K

GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCTTCCACGTCTGCGGCTGTGGGAGGCACAG
TCACCATCAACTGCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAGTTACAACCGCTTATCCTG
GTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTACGAAGCATCCAA
ACTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTC
ACTCTCACCATCAGCGGCGTGACGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAG
GCGGTTATGATTGTAGGAGTTCTGATTGTGATGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGT
GGAAATCAAAC (SEQ ID NO: 148)

20

【 0 1 5 9 】

>E1-95H

AGCAGTTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCCGGGGCATCCCTG
ACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTAGCAATTCAATGTGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGATGCATTGCTAGTAGTA
GTAGTCATAGTACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAA
AACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACAT
GGCCACCTATTTCTGTGCGAGAGATTCTGGTAATCGTGGTTACCTTTATGCGGGC
GACTTTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCTTCAG (SEQ ID NO:

30

149)

【 0 1 6 0 】

>E1-95K

40

GAGCTCGTGCTGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGTGGGAGGCACA
GTCACCATCAATTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAATAGTTGGTTATCCTGGTATC
AGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAACCTCCTGATCTACGAAGCATCCACTCTGG
CATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACCATCAGCGGCGTGACGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGT
TATAGTTATAGTAATGTTGATAATAATATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGG
TCAAAG (SEQ ID NO: 150)

50

【 0 1 6 1 】

>E2-116H

CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCTGACA
CTCACCTGCACAGCCTCTGGATTTCGACCTCAGTAGCTCCTACTACATGTGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGTCTGTATTGACGGTGGTG
GGGGTGAGCCCACTGCCTACCCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCGTCTCCA
AAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTTCAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACAC
GGCCACGTATTTCTGTGCGAGACGAGATGCTGGTGCTGGGAACGCCTTTAGCTTG
TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCAG (SEQ ID NO: 151)

10

【 0 1 6 2 】

>E2-116K

GAGCTCGATATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAG
TCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAAAGTGTTTATCTTCAGAACAACTTAGCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTATGCATCCACT
CTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCA
CTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAGGG
CGGTTACAGTGGATATATCAATTCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA
AG (SEQ ID NO: 152)

20

【 0 1 6 3 】

>E2-135H

CAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACA
CTCACCTGCAAAGCCTCTGGATTTCGACTTCAGTAGCAGCTACTTTATGTGCTGGG
TCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGGCTGGAGTGGATCGCATGCATTTATACTGTTAT
TAGTCGTAAGACTTATTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAA
ACCTCGGCGACACACGGTGGATCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACG
GCCACCTATTTCTGTGCGAGATCGGCAACAATTGAAAGATTGGATCTCTGGGGCC
AGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 153)

30

【 0 1 6 4 】

>E2-135K

GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCGCCCGTGTCTGCACCTGTGGGAGGCACAG
TCACCATCAATTGCCAGGCCAGTGAGAGTGTTTATAATAACTACCGCTTATCCTG
GTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTAATCTATGCTGCATCCACT
CTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCA
CTCTCGCCATCAGCGATGTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGTAGG
ATATAAAAGTGGTTATATTGATAGTATTCCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTG
GTCAAAG (SEQ ID NO: 154)

40

【 0 1 6 5 】

>E1-142H

CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCCTGACA
CTCACCTGCACAGCTTCTGGATTCAACATCAATAACTACAACATTAAGTGGGTCC
GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGCACGTATTTGGAATGGTGATG
GCAGCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAACATCTCCAAAACCT
CGTCGACCACGGTGACTCTACAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCA
CCTATTTCTGTGCGAGAAATTTTAACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCAT
CTCTTCAG (SEQ ID NO: 155)

10

【 0 1 6 6 】

>E1-142K

GAGCTCGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGG
CACAGTCACCATCAATTGCCAGTCCAGTGCGAGTGTTTATAGTAACAACACTACTTA
TCCTGGTTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCCCCTGATCTATTATGCAT
CCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTTAAAGGCAGTGGATCTGGGACACA
GTTCACTCTCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGT
GCAGGCGATTATAGTAGTAGTAGTGATATGTGTATTTTCGGCGGAGGGACCGAG
CTGGAAATCAAAG (SEQ ID NO: 156)

20

【 0 1 6 7 】

抗 E G F L 6 抗体の可変アミノ酸配列を下に示す。

【 0 1 6 8 】

>E1-33H

QSLEESEGLVQPEGSLTLTCKASGLDLSSYYVMCWVRQAPGKGLEWCIY
AGSSGSTYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGGGSTY
AQYFNLWGPGLVTISS (SEQ ID NO: 157)

30

【 0 1 6 9 】

>E1-33L

ELDMTTPASVSAAVGGTVSINCQSSPSVYRHYLSWYQQKPGQPPKLLIYWAS
TLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGVQCDDAATYYCAGEYASDSDNHFGGGTE
LEIL (SEQ ID NO: 158)

40

【 0 1 7 0 】

>E1-34H

EQSVKESGGGLVQPEGSLTLTCTASGFSFSSIIYVICWVRQAPGKGLELIACIQI
TSGITYYASWAKGRFTISKMSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCGRRGYGAYAG
TGASDLWGPGLVTVSS (SEQ ID NO: 159)

【 0 1 7 1 】

>E1-34L

ELDLTQTASSVSAAVGGTVTINCQSSQSVYNNNNLAWYQQKPGQPPKLLIYE
ASKLASGVPSRFKGS GSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCAGGYAGYIWAFFGGG
TEVVVK (SEQ ID NO: 160)
【 0 1 7 2 】

>E1-80H

EQSVEESGGGLFQPGGSLALTCKASGFTLNSYYMSWVRQAPGKGLEWIGCID
SDSPTTTAYANWARGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGYGPVR
LDLWGQGT LVT VSS (SEQ ID NO: 161)
【 0 1 7 3 】
>E1-80LK

10

TQTPASVSAAVGGTVSINCQSSQSVYKNAYLSYYLAWYQQKPGQPPKLLIYW
ASTLASGVPSRFKGS GSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAA EYSNDS DNGFGG
GTEVEIK (SEQ ID NO: 162)
【 0 1 7 4 】
>E1-89H

20

EQSLEESGGDLVKPEGSLTLTCAASGFSFSSGYWICWVRQAPGKGLEWIGCIY
AGSSGGHIYYATWAKGRFTISQTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCTRDNYGG
GGSASKLWGP GT LVT ISS (SEQ ID NO: 163)
【 0 1 7 5 】
>E1-89L

30

ELVMTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSQSVYSNNRLAWYQQKPGQPPKLLVYY
AATLASGVPSRFKGS GYGTQSTLTIADVVCDDAATYYCAGYKTADSDGIAFG
GGTEVEIK (SEQ ID NO: 164)
【 0 1 7 6 】
>E2-93H

QSVKESEGG LVQPEGSLTLTCKASGFSFSSYGVNWVRQAPGKGLEWIA YIGLS
SEITYYAGWAKGRFTISKPSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCVRDLYHSNGLW
GPGTLVTISS (SEQ ID NO: 165)
【 0 1 7 7 】
>E2-93L

40

ELDLTQTPSPVSAAVGGTVTVSCQASESVYNNNNRLSWYQQKPGQPPKLLIYY
ASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISVQCADAATYYCVAFKGYGTDGNAFG
GGTEVEIK (SEQ ID NO: 166)
【 0 1 7 8 】

>E1-38H

EQSVKESGGDLVKPEGSLTLTCTASGFSFNSGYWVCWVRQAPGKGLEWIACI
YTSSPTGAIYYATWAKGRFTISQTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCTRDNFGG
GGSASKLWGPGLVTISS (SEQ ID NO: 167)

【 0 1 7 9 】

>E1-38L

ELVMTQTPSSKSVPVGGTVTIDCQASESVYSNNRCAWYQQKPGQPPKLLIYY
ASTLASGVPSRFKCSGSGTRFTLTISGVQCEDAATYYCAGYKTADSDGLGFG
GGTEVEIK (SEQ ID NO: 168)

【 0 1 8 0 】

>E1-52H

EQSVKESEGDVLKPEGSLTLACTASGFTLSSYYMCWVRQAPGKGLEWIACID
TDNDIRTAYASWARGRFTISRTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCGRGYGALR
LDLWGQGTLVTISS (SEQ ID NO: 169)

【 0 1 8 1 】

>E1-52L

ELDLTQTPASVSAAVGGTVSINCQSSPSVYRHYLSWYQQKPGQPPKLLIYWA
STLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISGVQCDDAATYYCAGEYASDSDNHFGGGT
EVEIK (SEQ ID NO: 170)

【 0 1 8 2 】

>E2-36H

QSVKESEGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYHMGWVRQAPGKGLEIYIGINNY
GATYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARSPGIPGYNSWGP
GTLVTISS (SEQ ID NO: 171)

【 0 1 8 3 】

>E2-36L

ELDLTQTPSSTSAAVGGTVTINCQSSQNVYSYNRLSWFQQKPGQPPKLLIYEA
SKLASGVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCAGGYDCRSSDCDAFG
GGTEVEIK (SEQ ID NO: 172)

【 0 1 8 4 】

>E1-95H

SSSVEESGGDLVKPGASLTTLTCTASGFSFSSNSMCWVRQAPGKGLEWIGCIAS
SSSHSTYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADMATYFCARDSGNRGY
LYAGDFNLWGPGLVTVSS (SEQ ID NO: 173)

【 0 1 8 5 】

10

20

30

40

>E1-95L

ELVLTQTPASVEVAVGGTVTINCQASQSINSWLSWYQQKPGQRPKLLIYEAST
LASGVSSRFSGSGGTQFTLTISGVQCDDAATYYCQQGYSSNVDDNIFGGGT
EVVVK (SEQ ID NO: 174)
【 0 1 8 6 】

>E2-116H

QSLEESGGGLVKPEGSLTLTCTASGFDLSSSYMCWVRQAPGKGLEWIVCID
GGGGEPTAYPSWAKGRFTVSKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCARRDAGA
GNAFSLWGPGLVTISS (SEQ ID NO: 175)
【 0 1 8 7 】
>E2-116L

10

ELDMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYLQNNLAWYQQKPGQPPKLLIYY
ASTLASGVSSRFKSGSGGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYSGYINSFGGGT
EVEIK (SEQ ID NO: 176)
【 0 1 8 8 】
>E2-135H

20

QSVKESEGLVKPGASLTLTCKASGFDFSSSYFMCWVRQAPGRGLEWIACIY
TVISRKTYASWAKGRFTISKTSATTVDLQMTSLTAADTATYFCARSATIERL
DLWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 177)
【 0 1 8 9 】
>E2-135L

30

ELDLTQTPSPVSAPVGGTVTINCQASESVYNNYRLSWYQQKPGQPPKLLIYAA
STLASGVPSRFKSGSGGTQFTLAISDVVCDDAATYYCVGYKSGYIDSIPFGGG
TEVVVK (SEQ ID NO: 178)
【 0 1 9 0 】
>E1-142H

QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFTINNYNINWVRQAPGKGLEWIARIWN
GDGSTYYASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARNFNLWGPG
TLVTISS (SEQ ID NO: 179)
【 0 1 9 1 】
>E1-142L

40

ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSASVYSNNYLSWFQQKPGQPPKPLIYYA
STLASGVPSRFKSGSGGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGDYSSSDMCIFGGG
TELEIK (SEQ ID NO: 180)
【 0 1 9 2 】

開示及び特許請求される方法の全ては、本開示に照らして、過度の実験なく行うことが

50

できる。本発明の組成物及び方法は、好ましい実施形態に関して説明されたが、本発明の概念、精神、及び範囲から逸脱することなく、本明細書に記載される方法及び方法のステップまたはステップの順序に変更が適用され得ることは、当業者には明らかとなるであろう。より具体的には、化学的及び生理学的に関連した特定の薬剤が、同じまたは類似の結果を達成しながら、本明細書に記載される試薬で置換され得ることは、明らかとなるであろう。当業者には明らかな全てのこうした類似の置換及び修正は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の精神、範囲、及び概念に含まれるものとする。

【 0 1 9 3 】

参考文献

下記の参考文献は、それらが本明細書に記載されるものを補う例示的な手順または他の詳細を提供する程度まで、本明細書に参照により具体的に組み込まれる。

U.S. Patent Application No. 2002/0172677

U.S. Patent Application No. 2004/0126828

U.S. Patent Application No. 2005/0214860

U.S. Patent No. 3,817,837

U.S. Patent No. 3,850,752

U.S. Patent No. 3,939,350

U.S. Patent No. 3,996,345

U.S. Patent No. 4,196,265

U.S. Patent No. 4,275,149

U.S. Patent No. 4,277,437

U.S. Patent No. 4,366,241

U.S. Patent No. 4,469,797

U.S. Patent No. 4,472,509

U.S. Patent No. 4,606,855

U.S. Patent No. 4,703,003

U.S. Patent No. 4,742,159

U.S. Patent No. 4,767,720

U.S. Patent No. 4,816,567

U.S. Patent No. 4,867,973

U.S. Patent No. 4,870,287

U.S. Patent No. 4,938,948

U.S. Patent No. 4,946,778

U.S. Patent No. 5,021,236

U.S. Patent No. 5,091,513

U.S. Patent No. 5,164,296

U.S. Patent No. 5,196,066

U.S. Patent No. 5,223,409

10

20

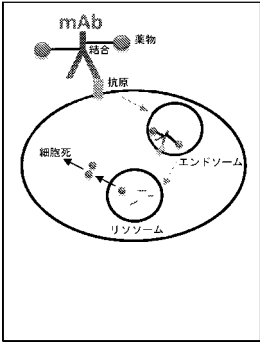
30

40

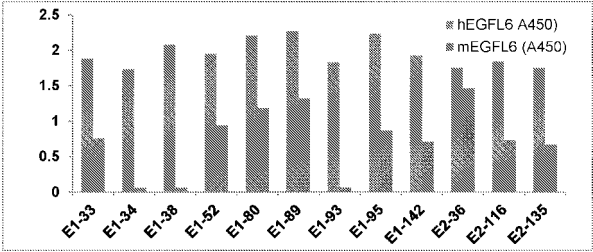
U.S. Patent No. 5,403,484	
U.S. Patent No. 5,420,253	
U.S. Patent No. 5,565,332	
U.S. Patent No. 5,571,698	
U.S. Patent No. 5,627,052	
U.S. Patent No. 5,656,434	
U.S. Patent No. 5,739,169	
U.S. Patent No. 5,760,395	10
U.S. Patent No. 5,770,376	
U.S. Patent No. 5,789,208	
U.S. Patent No. 5,801,005	
U.S. Patent No. 5,821,337	
U.S. Patent No. 5,824,311	
U.S. Patent No. 5,830,880	
U.S. Patent No. 5,844,091	20
U.S. Patent No. 5,846,945	
U.S. Patent No. 5,858,657	
U.S. Patent No. 5,861,155	
U.S. Patent No. 5,871,907	
U.S. Patent No. 5,969,108	
U.S. Patent No. 6,054,297	
U.S. Patent No. 6,165,464	
U.S. Patent No. 6,365,157	30
U.S. Patent No. 6,406,867	
U.S. Patent No. 6,709,659	
U.S. Patent No. 6,709,873	
U.S. Patent No. 6,753,407	
U.S. Patent No. 6,814,965	
U.S. Patent No. 6,849,259	
U.S. Patent No. 6,861,572	40
U.S. Patent No. 6,875,434	
U.S. Patent No. 6,881,557	
U.S. Patent No. 6,891,024	
U.S. Patent No. 6,946,646	

- Ali-Fehmi *et al.*, Expression of cyclooxygenase-2 in advanced stage ovarian serous carcinoma: correlation with tumor cell proliferation, apoptosis, angiogenesis, and survival. *American journal of obstetrics and gynecology* 192, 819-825, 2005.
- Baluk *et al.*, Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development* 15, 102-111, 2005.
- Buckanovich *et al.* Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 852-861, 2007. 10
- Chim *et al.* EGFL6 promotes endothelial cell migration and angiogenesis through the activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of biological chemistry* 286, 22035-22046, 2011.
- Donninger *et al.*, Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene* 23, 8065-8077, 2004.
- Halder *et al.*, Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 4916-4924, 2006. 20
- Landen *et al.*, Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer research* 65, 6910-6918, 2005.
- Langley *et al.*, Tissue-specific microvascular endothelial cell lines from H-2K(b)-tsA58 mice for studies of angiogenesis and metastasis. *Cancer Research* 63, 2971-2976, 2003. 30
- Lu *et al.*, Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma. *Cancer research* 67, 1757-1768, 2007.
- Lu *et al.*, Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. *Cancer cell* 18, 185-197, 2010.
- Oberauer *et al.*, EGFL6 is increasingly expressed in human obesity and promotes proliferation of adipose tissue-derived stromal vascular cells. *Molecular and cellular biochemistry* 343, 257-269, 2010.
- Sood *et al.*, Molecular determinants of ovarian cancer plasticity. *American Journal of Pathology* 158, 1279-1288, 2001. 40
- Thaker *et al.*, Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature medicine* 12, 939-944, 2006.
- Yeung *et al.*, Cloning of a novel epidermal growth factor repeat containing gene EGFL6: expressed in tumor and fetal tissues. *Genomics* 62, 304-307, 1999.

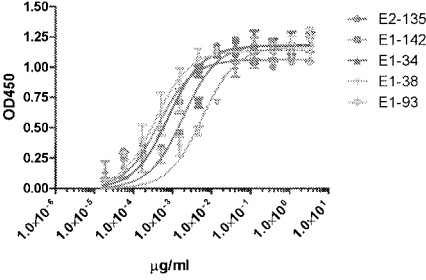
【 図 1 】



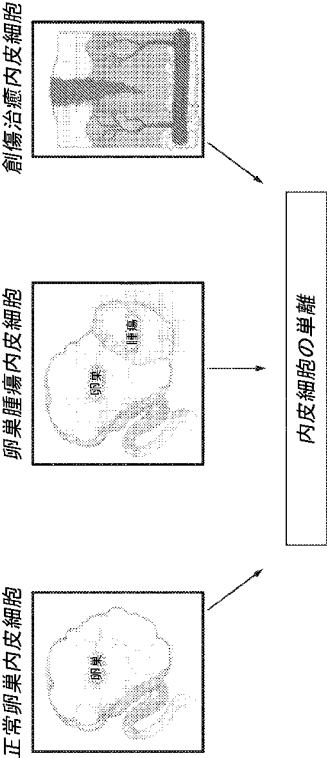
【 図 2 】



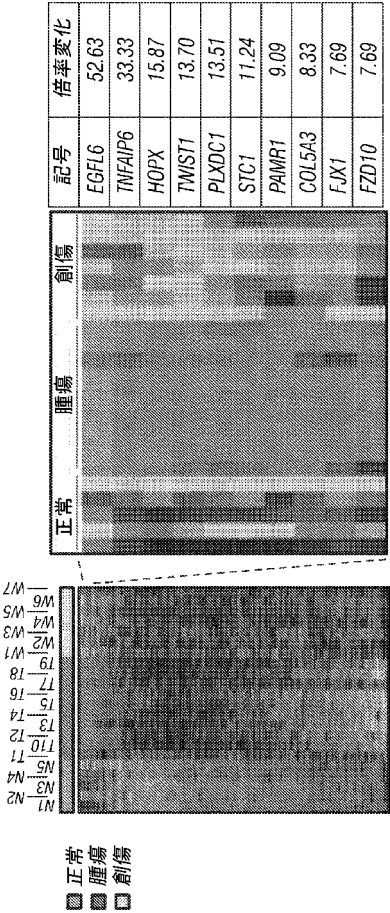
【 図 3 】



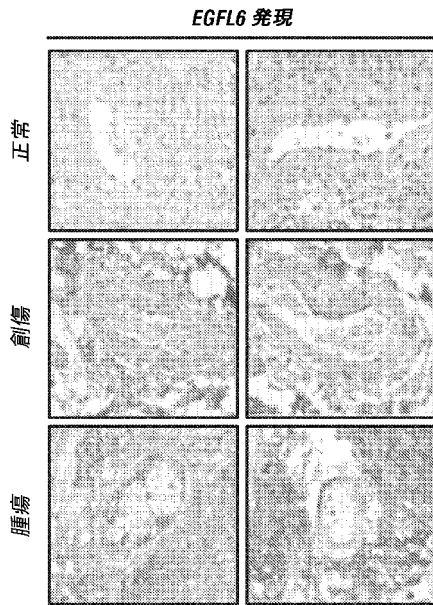
【 図 4 A 】



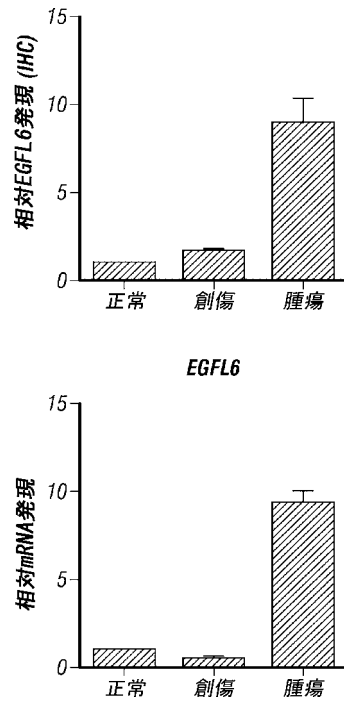
【 図 4 B 】



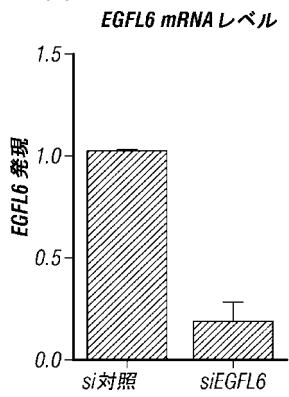
【図 4 C】



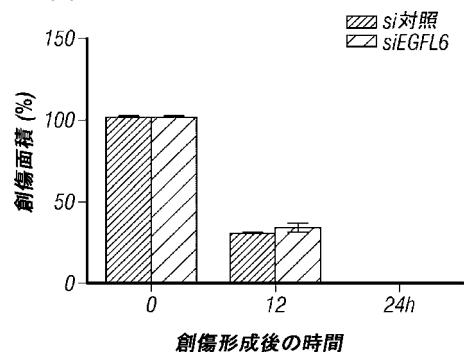
【図 4 D】



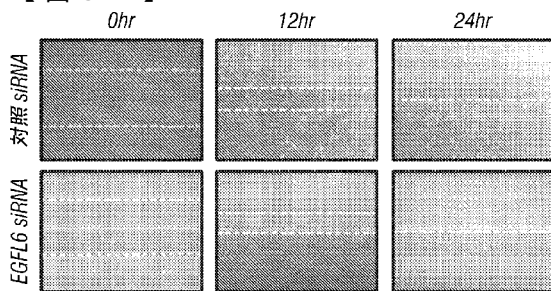
【図 5 A】



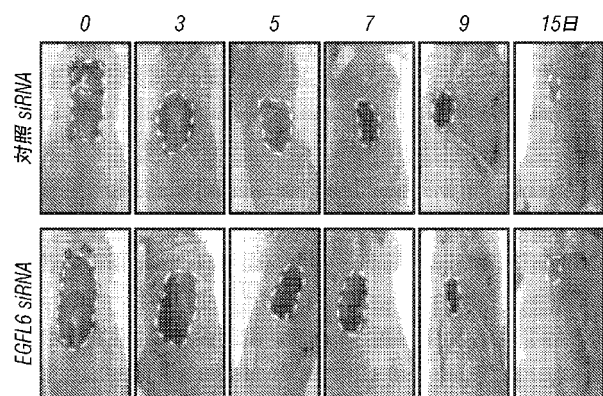
【図 5 C】

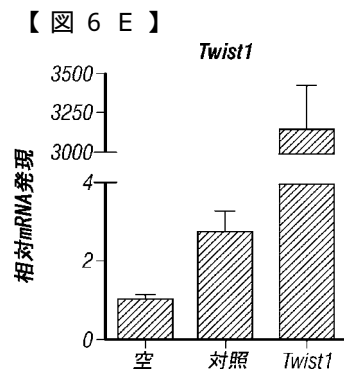
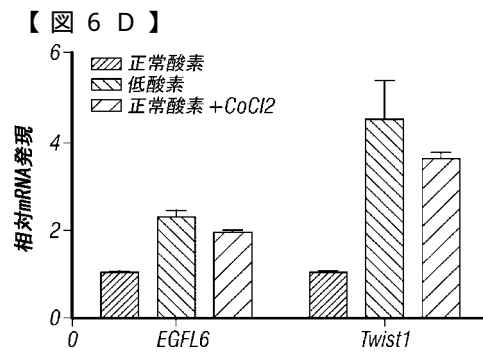
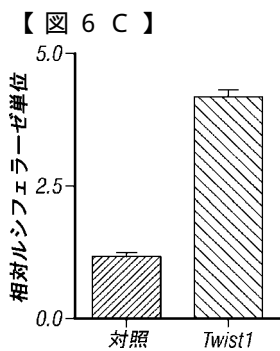
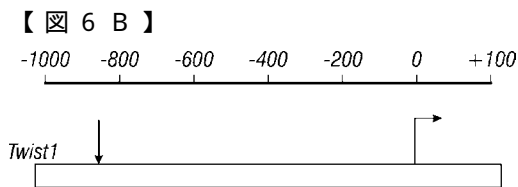
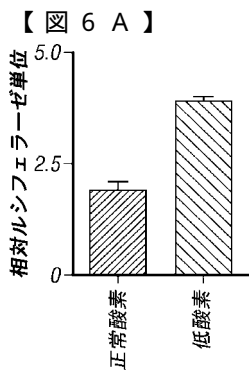
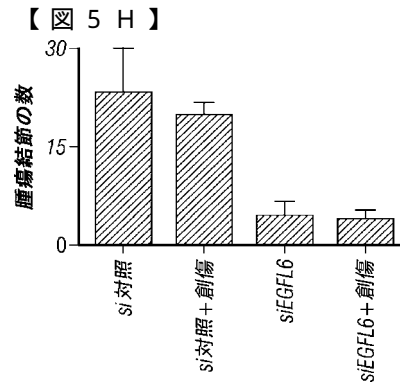
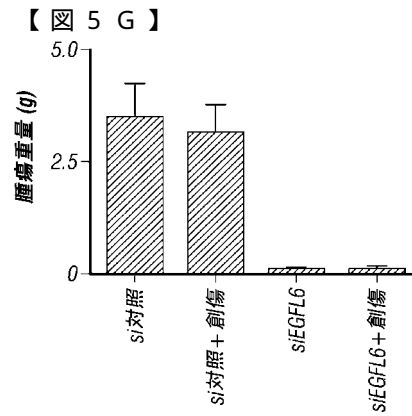
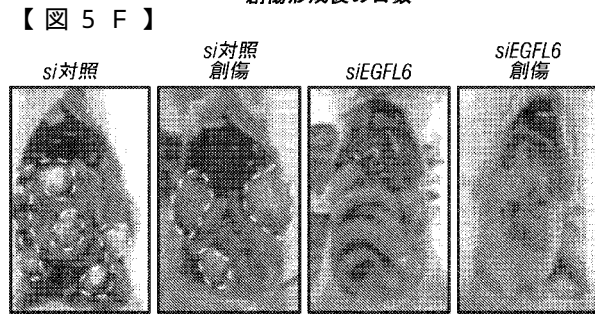
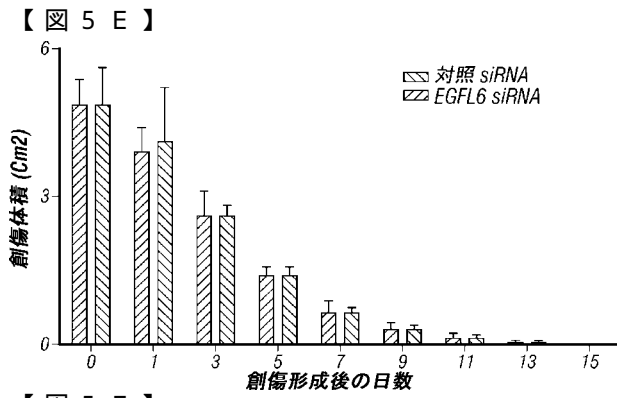


【図 5 B】

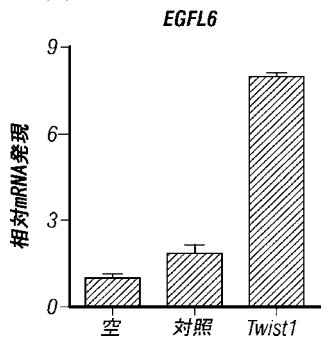


【図 5 D】

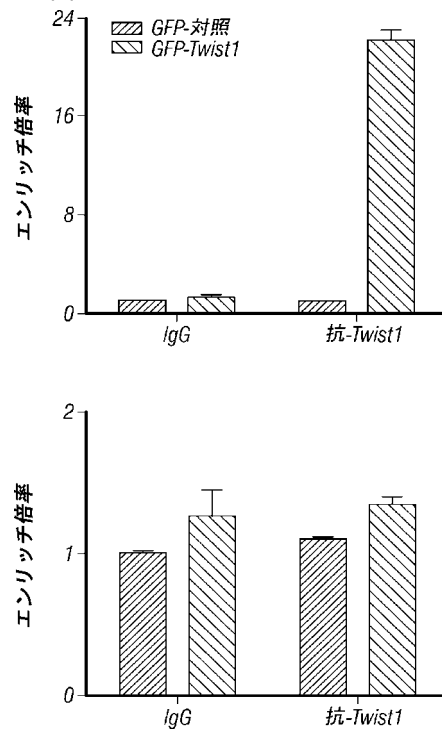




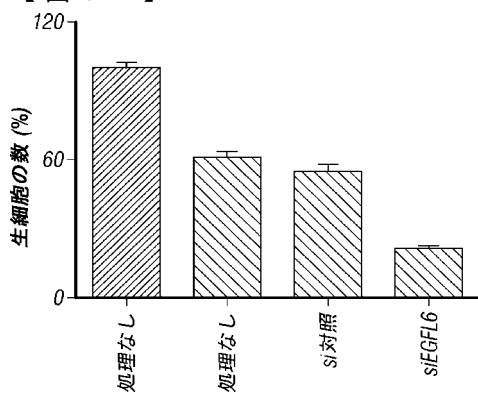
【図 6 F】



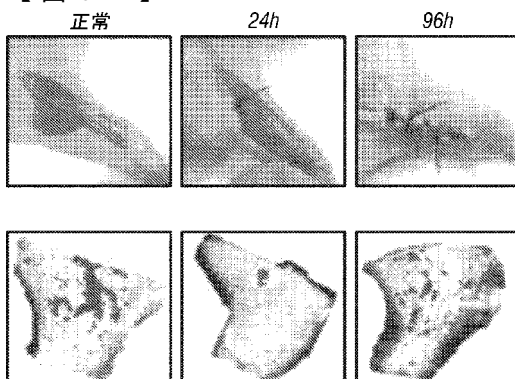
【図 6 G】



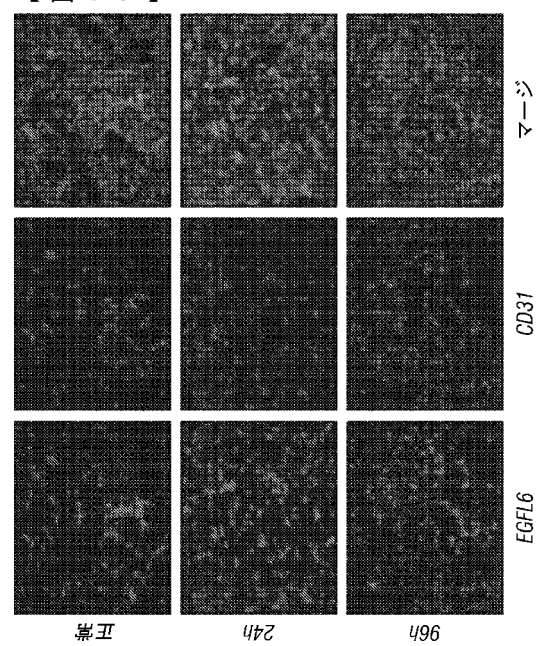
【図 6 H】



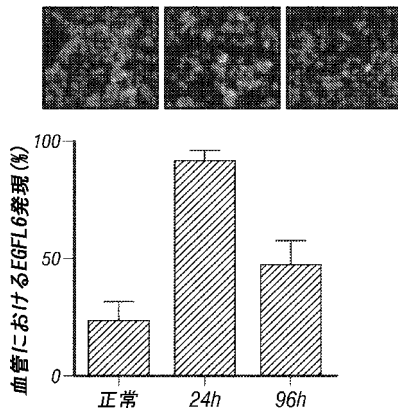
【図 6 I】



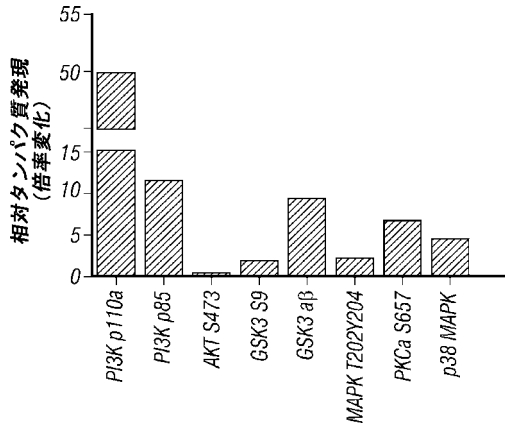
【図 6 J】



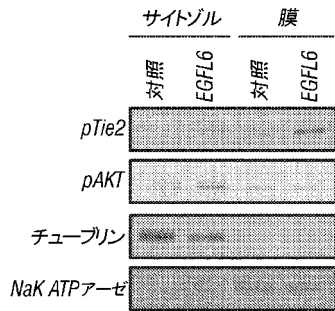
【図 6 K】



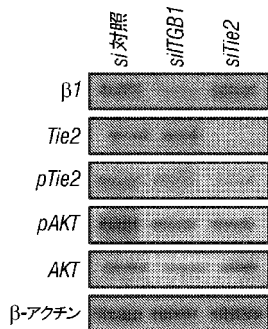
【図 7 A】



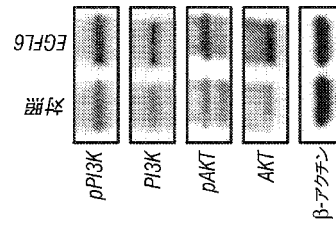
【図 7 E】



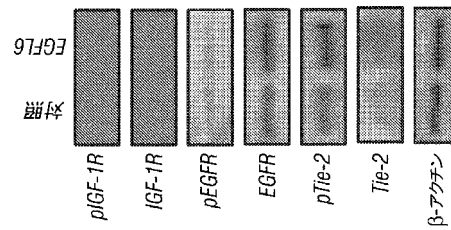
【図 7 F】



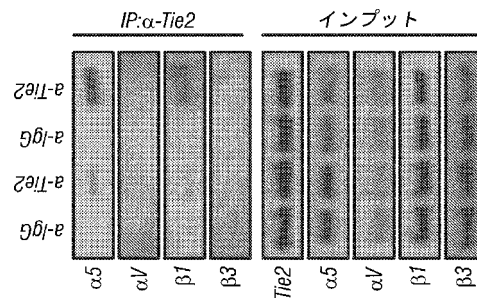
【図 7 B】



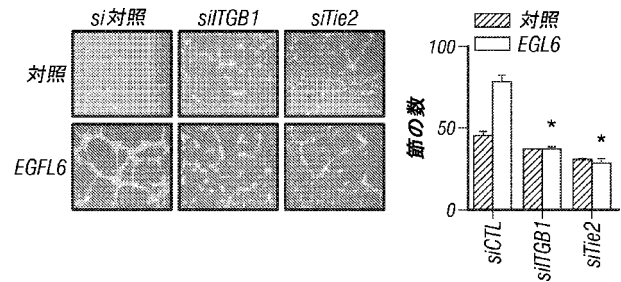
【図 7 C】



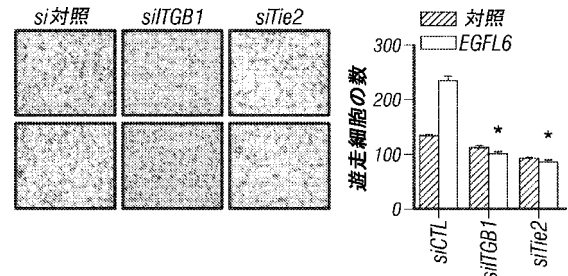
【図 7 D】



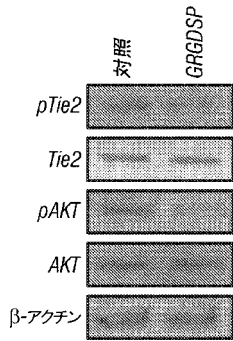
【図 7 G】



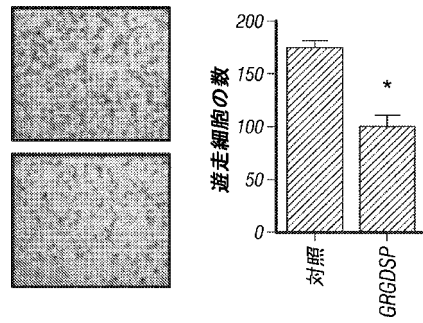
【図 7 H】



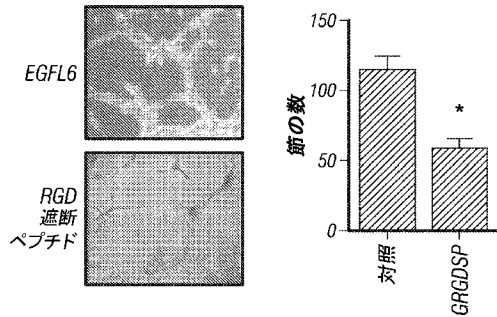
【図 7 I】



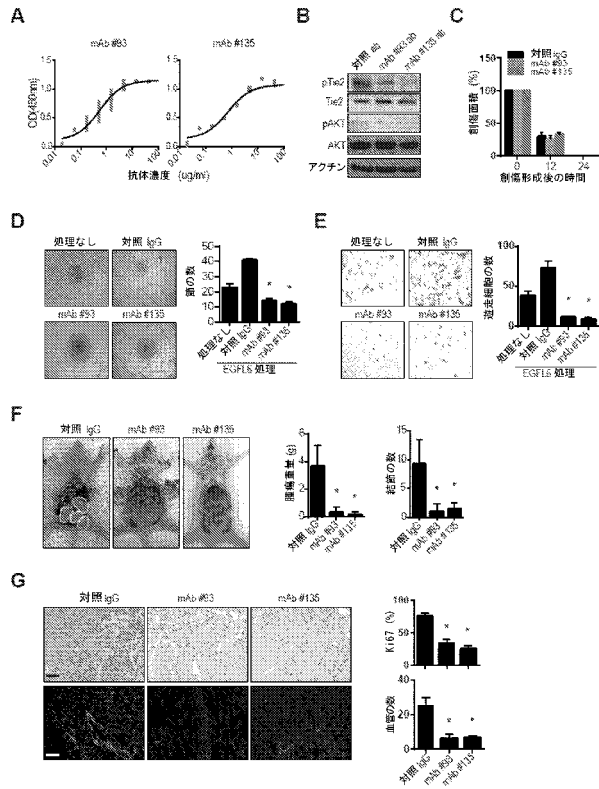
【図 7 K】



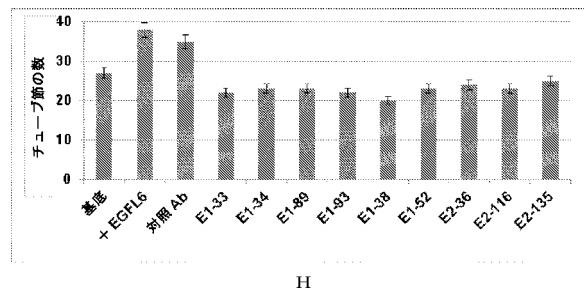
【図 7 J】



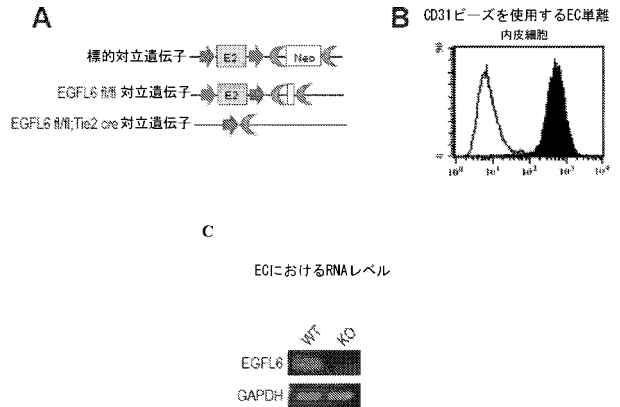
【図 8 - 1】



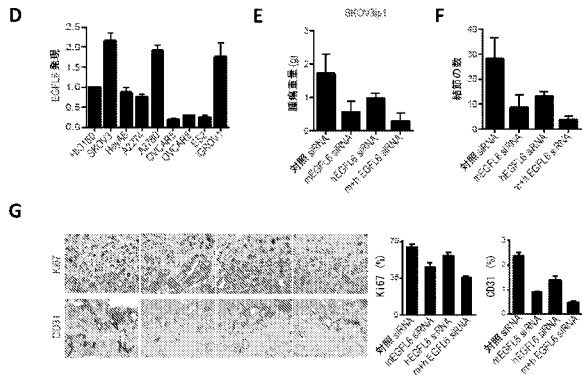
【図 8 - 2】



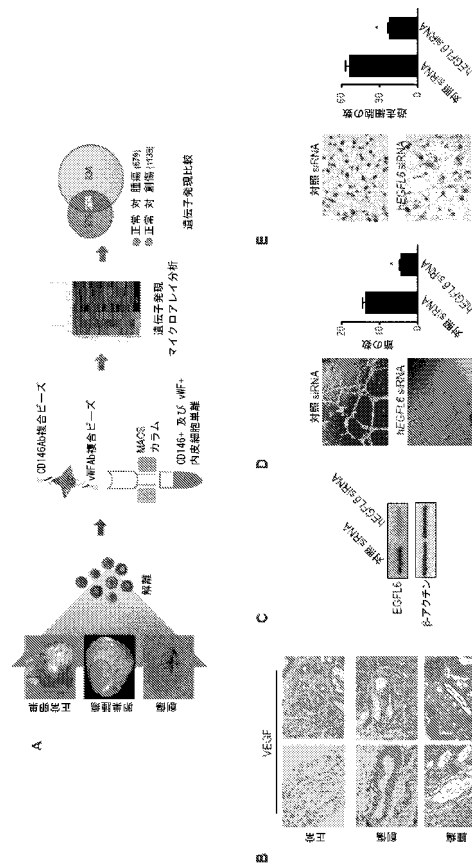
【図 9 - 1】



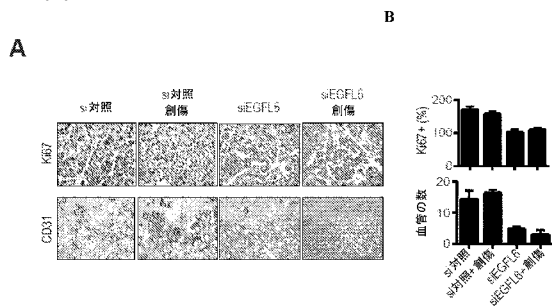
【図 9 - 2】



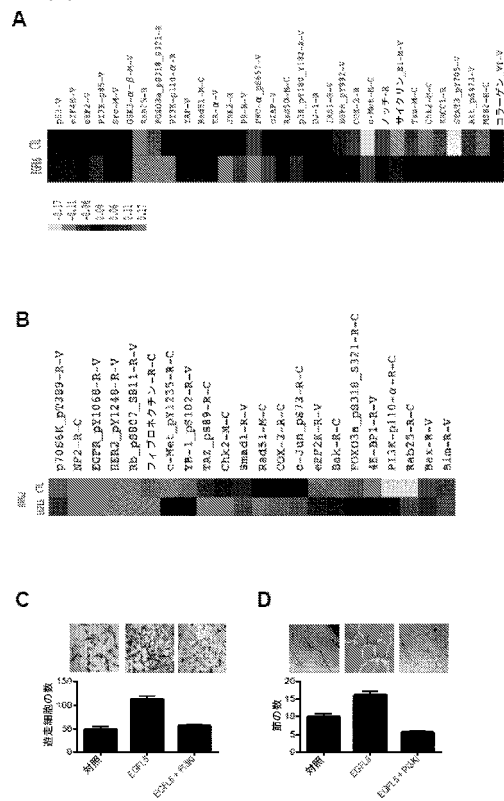
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

2019512210000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/16659

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - A61K 39/395; C07K 16/30, 16/28, 16/22 (2017.01)

CPC - A61K 39/39533, 39/3955, 39/39558; C07K 16/3076, 16/28, 16/22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013/0129735 A1 (GENENTECH, INC.) 23 May 2013; paragraphs [0013], [0016]	1-2, 14-15, 27, 28/1-2, 28/14-15, 28/27, 29, 30/1-2, 30/14-15, 30/27, 31/1-2, 32/1-2, 32/14-15, 32/27, 33/32/1-2, 33/32/14-15, 33/32/27, 34/33/32/1-2, 34/33/32/14-15, 34/33/32/27, 35/33/32/1-2, 35/33/32/14-15, 35/33/32/27, 36/1-2, 36/14-15, 36/27, 37/1-2, 37/14-15, 37/27, 38-39, 40/38-39, 41/1-2, 41/14-15, 41/27, 41/38-39, 42/41/1-2, 42/41/14-15, 42/41/27, 42/41/38-39, 43/1-2, 43/14-15, 43/27, 44/1-2, 44/14-15, 44/27, 45/44/1-2, 45/44/14-15, 45/44/27, 46/44/1-2, 46/44/14-15, 46/44/27, 47/44/1-2, 47/44/14-15,

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 June 2017 (14.06.2017)

Date of mailing of the international search report

10 JUL 2017

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/16659

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2014/150720 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 25 September 2014; page 6, line 19	47/44/27, 48/44/1-2, 48/44/14-15, 48/44/27, 49/44/1-2, 49/44/14-15, 49/44/27, 50/44/1-2, 50/44/14-15, 50/44/27, 51/44/1-2, 51/44/14-15, 51/44/27, 52/51/44/1-2, 52/51/44/14-15, 52/51/44/27, 55 1-2, 14-15, 27, 28/1-2, 28/14-15, 28/27, 29, 30/1-2, 30/14-15, 30/27, 31/1-2, 32/1-2, 32/14-15, 32/27, 33/32/1-2, 33/32/14-15, 33/32/27, 34/33/32/1-2, 34/33/32/14-15, 34/33/32/27, 35/33/32/1-2, 35/33/32/14-15, 35/33/32/27, 36/1-2, 36/14-15, 36/27, 37/1-2, 37/14-15, 37/27, 41/1-2, 41/14-15, 41/27, 42/41/1-2, 42/41/14-15, 42/41/27, 43/1-2, 43/14-15, 43/27, 44/1-2, 44/14-15, 44/27, 45/44/1-2, 45/44/14-15, 45/44/27, 46/44/1-2, 46/44/14-15, 46/44/27, 47/44/1-2, 47/44/14-15, 47/44/27, 48/44/1-2, 48/44/14-15, 48/44/27, 49/44/1-2, 49/44/14-15, 49/44/27, 50/44/1-2, 50/44/14-15, 50/44/27, 51/44/1-2, 51/44/14-15, 51/44/27, 52/51/44/1-2, 52/51/44/14-15, 52/51/44/27
A	(CHIM, SM et al.) EGFL6 Promotes Endothelial Cell Migration and Angiogenesis through the Activation of Extracellular Signal-regulated Kinase. Journal of Biological Chemistry. 24 June 2011; Vol. 286, No. 25; pages 22035-22046; page 22038, column 2, paragraph 3	1-2, 14-15, 27, 28/1-2, 28/14-15, 28/27, 29, 30/1-2, 30/14-15, 30/27, 31/1-2, 32/1-2, 32/14-15, 32/27, 33/32/1-2, 33/32/14-15, 33/32/27, 34/33/32/1-2, 34/33/32/14-15, 34/33/32/27, 35/33/32/1-2, 35/33/32/14-15, 35/33/32/27, 36/1-2, 36/14-15, 36/27, 37/1-2, 37/14-15, 37/27, 41/1-2, 41/14-15, 41/27, 42/41/1-2, 42/41/14-15, 42/41/27, 43/1-2, 43/14-15, 43/27, 44/1-2, 44/14-15, 44/27, 45/44/1-2, 45/44/14-15, 45/44/27, 46/44/1-2, 46/44/14-15, 46/44/27, 47/44/1-2, 47/44/14-15, 47/44/27, 48/44/1-2, 48/44/14-15, 48/44/27, 49/44/1-2, 49/44/14-15, 49/44/27, 50/44/1-2, 50/44/14-15, 50/44/27,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/16859

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/0014958 A1 (BORRAS, L et al.) 19 January 2012; paragraph [0065]; claim 5	51/44/1-2, 51/44/14-15, 51/44/27, 52/51/44/1-2, 52/51/44/14-15, 52/51/44/27 1-2, 14-15, 27, 28/1-2, 28/14-15, 28/27, 29, 30/1-2, 30/14-15, 30/27, 31/1-2, 32/1-2, 32/14-15, 32/27, 33/32/1-2, 33/32/14-15, 33/32/27, 34/33/32/1-2, 34/33/32/14-15, 34/33/32/27, 35/33/32/1-2, 35/33/32/14-15, 35/33/32/27, 36/1-2, 36/14-15, 36/27, 37/1-2, 37/14-15, 37/27, 38, 40/38, 41/38, 42/41/38, 41/1-2, 41/14-15, 41/27, 42/41/1-2, 42/41/14-15, 42/41/27, 43/1-2, 43/14-15, 43/27, 44/1-2, 44/14-15, 44/27, 45/44/1-2, 45/44/14-15, 45/44/27, 46/44/1-2, 46/44/14-15, 46/44/27, 47/44/1-2, 47/44/14-15, 47/44/27, 48/44/1-2, 48/44/14-15, 48/44/27, 49/44/1-2, 49/44/14-15, 49/44/27, 50/44/1-2, 50/44/14-15, 50/44/27, 51/44/1-2, 51/44/14-15, 51/44/27, 52/51/44/1-2, 52/51/44/14-15, 52/51/44/27
A	US 2008/0138894 A1 (MAERTENS, G et al.) 12 June 2008; paragraph [0131]; table 3	38-39, 40/38-39, 41/38-39, 42/41/38-39, 55
A	WO 2014/190273 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 27 November, 2014; paragraph [0019]; claims 16-17	38-39, 40/38-39, 41/38-39, 42/41/38-39
A	US 2010/0119550 A1 (GOMI, Y et al.) 13 May 2010; paragraph [0197]	39, 40/39, 41/39, 42/41/39
A	US 2015/0037349 A1 (TECHNOPHAGE INVESTIGAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EM BIOTECNOLOGIA SA) 05 February 2016; paragraphs [0065], [0222]	55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/16659

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 53-54
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

****Please See Supplemental Page-*****

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-2, 14-15, 27-52, 55; SEQ ID NO: 157 (VH), SEQ ID NO: 4 (CDRH1); SEQ ID NO: 5 (CDRH2), SEQ ID NO: 6 (CDRH3); SEQ ID NO: 158 (VL), SEQ ID NO: 76 (CDRL1), SEQ ID NO: 77 (CDRL2), and SEQ ID NO: 78 (CDRL3)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

International application No.

PCT/US17/16659

-***-Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-52, 55 and SEQ ID NOs: 4, 5, 6, 76, 77, 78, 157 and 158 are directed toward an isolated monoclonal antibody, wherein the antibody specifically binds to EGFL6; a composition comprising the antibody; a nucleic acid sequence encoding the antibody and a host cell comprising the nucleic acid; a method of manufacturing the antibody; and a method for treating a subject having a cancer comprising administering an effective amount of the antibody to the subject.

The antibody, composition, nucleic acid, host cell and methods will be searched to the extent they encompass a VH domain encompassing SEQ ID NO: 157 (first exemplary VH), with a CDR1 encompassing SEQ ID NO: 4 (first exemplary CDRH1); a CDR2 encompassing SEQ ID NO: 5 (first exemplary CDRH2), and a CDR3 encompassing SEQ ID NO: 6 (first exemplary CDRH3); and a VL domain encompassing SEQ ID NO: 158 (first exemplary VL), encompassing a CDR1 encompassing SEQ ID NO: 76 (first exemplary CDRL1), a CDR2 encompassing SEQ ID NO: 77 (first exemplary CDRL2), and a CDR3 encompassing SEQ ID NO: 78 (first exemplary CDRL3). Applicant is invited to elect additional pair(s) of VH and VL polypeptide(s) with specified SEQ ID NO: for each, and associated CDR(s), or specified substitution(s) at specified site(s) of a SEQ ID NO: and/or CDR(s), to be searched. Additional pair(s) of VH and VL sequence(s) and associated CDR sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 14 (in-part), 15 (in-part), 27 (in-part), 28 (in-part), 29 (in-part), 30 (in-part), 31 (in-part), 32 (in-part), 33 (in-part), 34 (in-part), 35 (in-part), 36 (in-part), 37 (in-part), 38 (in-part), 39 (in-part), 40 (in-part), 41 (in-part), 42 (in-part), 43 (in-part), 44 (in-part), 45 (in-part), 46 (in-part), 47 (in-part), 48 (in-part), 49 (in-part), 50 (in-part), 51 (in-part), 52 (in-part) and 55 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 157 (VH), SEQ ID NO: 4 (CDRH1), SEQ ID NO: 5 (CDRH2), SEQ ID NO: 6 (CDRH3), SEQ ID NO: 158 (VL), SEQ ID NO: 76 (CDRL1), SEQ ID NO: 77 (CDRL2), and SEQ ID NO: 78 (CDRL3). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected VH, VL and associated CDR sequence(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a VH domain encompassing SEQ ID NO: 159 (first exemplary elected VH), a CDR1 encompassing SEQ ID NO: 10 (first exemplary elected CDRH1), a CDR2 encompassing SEQ ID NO: 11 (first exemplary elected CDRH2), a CDR3 encompassing SEQ ID NO: 12 (first exemplary elected CDRH3); and a VL domain encompassing SEQ ID NO: 160 (first exemplary elected VL), a CDR1 encompassing SEQ ID NO: 82 (first exemplary elected CDRL1), a CDRL2 encompassing SEQ ID NO: 83 (first exemplary elected CDRL2), and a CDRL3 encompassing SEQ ID NO: 84 (first exemplary elected CDRL3).

No technical features are shared between the VH and/or VL and/or CDR sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: an isolated monoclonal antibody, wherein the antibody specifically binds to EGFL6, comprising a VH comprising a set of 3 VH CDRs; a VL comprising a set of 3 VL CDRs; a composition comprising the antibody and a pharmaceutically acceptable carrier; an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleic acid sequence encoding the antibody; a host cell comprising one or more polynucleotide molecule(s) encoding an antibody; a method of manufacturing an antibody comprising: (a) expressing one or more polynucleotide molecule(s) encoding a VL and VH chain of the antibody in a cell; and (b) purifying the antibody from the cell; a method for treating a subject having a cancer comprising administering an effective amount of the antibody to the subject.

However, these shared technical features are previously disclosed by WO 2014/150720 A1 to The Regents of the University of Michigan (hereinafter 'Michigan') in view of US 2013/0129735 A1 to Genentech, Inc. (hereinafter 'Genentech').

Michigan discloses an isolated monoclonal antibody, wherein the antibody specifically binds to EGFL6 (an isolated monoclonal antibody, wherein the antibody specifically binds to EGFL6; page 2, lines 25-27; page 6, lines 18-21); a composition comprising the antibody and a pharmaceutically acceptable carrier (a composition comprising the antibody and a pharmaceutically acceptable carrier; page 8, lines 12-14; page 27, lines 23-28); and a method for treating a subject having a cancer (a method of inhibiting cancer cell growth; page 3, lines 2-7; page 4, lines 4-6) comprising administering an effective amount of the antibody to the subject (comprising administering an effective amount of the antibody to the subject; page 4, lines 4-6). Michigan further discloses wherein the antibody is purified (wherein the antibody is purified; page 41, lines 14-16); and wherein the antibody is produced by hybridoma cells (wherein the antibody is produced by hybridoma cells; page 45, lines 16-23).

Michigan does not disclose: a VH comprising a set of 3 VH CDRs; a VL comprising a set of 3 VL CDRs; an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleic acid sequence encoding the antibody; a host cell comprising one or more polynucleotide molecule(s) encoding an antibody; a method of manufacturing an antibody comprising: (a) expressing one or more polynucleotide molecule(s) encoding a VL and VH chain of the antibody in a cell; and (b) purifying the antibody from the cell.

Genentech discloses an anti-EGFL antibody (an anti-EGFL antibody; abstract), comprising a VH comprising a set of 3 VH CDRs (comprising a VH comprising a set of 3 VH CDRs; paragraph [0013]); a VL comprising a set of 3 VL CDRs (a VL comprising a set of 3 VL CDRs; paragraph [0013]); an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleic acid sequence encoding the antibody (an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleic acid sequence encoding the antibody; paragraph [0018]); a host cell comprising one or more polynucleotide molecule(s) encoding an antibody (a host cell comprising one or more polynucleotide molecule(s) encoding an antibody; paragraph [0018]); a method of manufacturing an antibody (a method of making (manufacturing) an antibody; paragraph [0018]); comprising: (a) expressing one or more polynucleotide molecule(s) encoding a VL and VH chain of the antibody in a cell (comprising: (a) expressing one or more polynucleotide molecule(s) encoding a VL and VH chain of the antibody in a cell; paragraphs [0013], [0018]); and (b) purifying the antibody from the cell (purifying the antibody from the cell; paragraphs [0018], [0035]).

-***-Continued on Next Supplemental Page-***-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/16659

-***-Continued from Previous Supplemental Page:

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Michigan to have included the specific chains forming the monoclonal antibody disclosed by Michigan, such as a VH comprising a set of 3 VH CDRs; a VL comprising a set of 3 VL CDRs, as well as an isolated polynucleotide molecule comprising a nucleic acid sequence encoding the antibody; a host cell comprising one or more polynucleotide molecule(s) encoding an antibody; a method of manufacturing an antibody comprising: (a) expressing one or more polynucleotide molecule(s) encoding a VL and VH chain of the antibody in a cell; as disclosed by Genentech, and (b) purifying the antibody from the cell, as disclosed by Michigan, in order to better enable a practitioner to make the antibody, or a modified form thereof, such as a humanized antibody, by chimerically grafting the CDRs from the antibody disclosed by Michigan into fully human framework regions, in order to produce an antibody useful for treatments in humans that would produce minimal antigenic response to said antibody.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Michigan and Genentech references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C 0 8 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 51/00 1 0 0	
A 6 1 K 38/05 (2006.01)	A 6 1 K 38/05	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	

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

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 チャン ニンヤン
アメリカ合衆国 7 7 5 8 4 テキサス州 パーランド アビーウッド ドライブ 3 6 1 8

(72)発明者 アン チーチャン
アメリカ合衆国 7 7 5 8 4 テキサス州 パーランド アビーウッド ドライブ 3 6 1 8

(72)発明者 スード アニル ケイ .
アメリカ合衆国 7 7 5 8 4 テキサス州 パーランド レイククレスト ドライブ 2 7 1 9

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32
QR36 QR55 QR62 QS25 QS32 QX01
4B064 AG20 AG26 AG27 BJ12 CA02 CA06 CA09 CA10 CA11 CA19
CC24 DA01
4B065 AA01X AA72X AA87X AA87Y AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AC14

	BA01	CA24	CA25	CA44						
4C076	AA11	AA16	AA22	AA95	BB11	BB13	BB15	BB16	CC27	EE41
	EE59	FF04	FF05	FF06	FF09	FF12	FF16	FF21	FF35	FF43
	FF51	FF52	FF53	FF61						
4C084	AA01	AA02	AA12	AA19	BA01	BA08	BA14	CA62	DA27	MA17
	MA22	MA23	MA66	NA05	NA14	ZB261	ZB262	ZC411	ZC412	ZC751
	ZC752									
4C085	AA14	AA21	BB01	BB11	BB33	BB36	BB37	BB41	BB43	CC01
	CC05	CC07	DD32	DD62	EE01	GG01	GG02	GG03	GG04	GG05
	GG06									
4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40	DA50	DA75	DA76	EA20	FA74