

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6720130号
(P6720130)

(45) 発行日 令和2年7月8日(2020.7.8)

(24) 登録日 令和2年6月19日(2020.6.19)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
請求項の数 42 外国語出願 (全 78 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-244233 (P2017-244233)	(73) 特許権者	509012625
(22) 出願日	平成29年12月20日(2017.12.20)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2015-535805 (P2015-535805) の分割		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
原出願日	平成25年10月4日(2013.10.4)	(74) 代理人	110002077
(65) 公開番号	特開2018-85989 (P2018-85989A)		園田・小林特許業務法人
(43) 公開日	平成30年6月7日(2018.6.7)	(72) 発明者	キア, メアリー
審査請求日	平成30年1月16日(2018.1.16)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80, サウス サンフランシスコ, デ ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッ ド
(31) 優先権主張番号	61/710,656		
(32) 優先日	平成24年10月5日(2012.10.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/860,422		
(32) 優先日	平成25年7月31日(2013.7.31)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患の診断治療方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

50mgから220mgの間のフラット用量の抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片を含む治療に対する炎症性腸疾患に罹患した被検体の応答を予測する方法であって、

(a) 治療前の被検体の生物学的試料において、インテグリンベータ7又はCD3イプシロンを発現する細胞のベースライン数を測定すること、

(b) (a)で測定されたインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数を、ヒト被検体群から得られたインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞の基準数と比較すること、及び

(c) (a)で測定されたインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数が、インテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞の基準数より多い場合に、被検体が治療に対し応答する可能性が高いと予測すること、及び(c) (a)で測定されたインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数が、インテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞の基準数より多くない場合に、被検体が治療に対し応答する可能性が低いと予測すること、を含み、

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片が、

(i) 配列番号：1、配列番号：7、配列番号：8、又は配列番号：9で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域1(HVR-L1)；

(ii) 配列番号：2で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域2(HVR-L2)

);
(i i i) 配列番号 : 3 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 3 (H V R - L 3) ;
(i v) 配列番号 : 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 1 (H V R - H 1) ;
(v) 配列番号 : 5 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 2 (H V R - H 2) ; 及び
(v i) 配列番号 : 6、配列番号 : 17、又は配列番号 : 19 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 3 (H V R - H 3) を含む、方法。

【請求項 2】

50 mg から 220 mg の間のフラット用量の抗インテグリンベータ 7 抗体又はその抗原結合断片を含む治療に対する炎症性腸疾患の被検体の応答を予測する方法であって、
 治療前の被検体の生物学的試料において、インテグリンベータ 7 又は CD 3 イプシロンを発現する細胞のベースライン数を決定することを含み、

ここで、ヒト被検体群から得られる、インテグリンベータ 7 発現細胞又は CD 3 イプシロン発現細胞の基準数と比較した、インテグリンベータ 7 発現細胞又は CD 3 イプシロン発現細胞のベースライン数の上昇により、治療に対し応答する可能性が高い被検体であることが同定され、

抗インテグリンベータ 7 抗体又はその抗原結合断片が、

(i) 配列番号 : 1、配列番号 : 7、配列番号 : 8、又は配列番号 : 9 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 1 (H V R - L 1) ;

(i i) 配列番号 : 2 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 2 (H V R - L 2) ;

(i i i) 配列番号 : 3 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 3 (H V R - L 3) ;

(i v) 配列番号 : 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 1 (H V R - H 1) ;

(v) 配列番号 : 5 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 2 (H V R - H 2) ; 及び

(v i) 配列番号 : 6、配列番号 : 17、又は配列番号 : 19 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 3 (H V R - H 3) を含む、方法。

【請求項 3】

50 mg から 220 mg の間のフラット用量の抗インテグリンベータ 7 抗体又はその抗原結合断片を含む治療に対し応答する可能性が高い炎症性腸疾患に罹患した被検体を同定する方法であって、

(a) 治療前の被検体の生物学的試料において、インテグリンベータ 7 又は CD 3 イプシロンを発現する細胞のベースライン数を測定すること、

(b) (a) で測定されたインテグリンベータ 7 発現細胞又は CD 3 イプシロン発現細胞のベースライン数を、ヒト被検体群から得られたインテグリンベータ 7 発現細胞又は CD 3 イプシロン発現細胞の基準数と比較すること、及び

(c) (a) で測定されたインテグリンベータ 7 発現細胞又は CD 3 イプシロン発現細胞のベースライン数が、インテグリンベータ 7 発現細胞又は CD 3 イプシロン発現細胞の基準数より多い場合に、被検体が治療に対し応答する可能性が高いと同定すること、を含み、

抗インテグリンベータ 7 抗体又はその抗原結合断片が、

(i) 配列番号 : 1、配列番号 : 7、配列番号 : 8、又は配列番号 : 9 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 1 (H V R - L 1) ;

(i i) 配列番号 : 2 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 2 (H V R - L 2) ;

(i i i) 配列番号 : 3 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖超可変領域 3 (H V R - L

10

20

30

40

50

3) ;

(i v) 配列番号 : 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 1 (H V R - H 1) ;

(v) 配列番号 : 5 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 2 (H V R - H 2) ; 及び

(v i) 配列番号 : 6、配列番号 : 17、又は配列番号 : 19 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖超可変領域 3 (H V R - H 3) を含む、方法。

【請求項 4】

炎症性腸疾患を有する被検体を治療するための抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片の 50 mg から 220 mg の間のフラット用量を含む、医薬であって、

請求項 3 に記載の方法によって医薬に対し応答する可能性が高いと同定された被検体に投与される、医薬。

10

【請求項 5】

フラット用量が 50 mg、約 100 mg、約 150 mg、約 200 mg、及び 220 mg からなる群から選択される、請求項 1 ~ 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

フラット用量が 50 mg、約 100 mg、約 150 mg、約 200 mg、及び 220 mg からなる群から選択される、請求項 4 に記載の医薬。

【請求項 7】

治療が、4週間毎に一回、約 100 mg の抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片の被検体に対する皮下投与を含む、請求項 1 ~ 3、及び 5 の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 8】

約 100 mg の抗インテグリンベータ7抗体又は抗原結合断片が、4週間毎に一回、被検体に皮下投与される、請求項 4 又は 6 に記載の医薬。

【請求項 9】

被検体がヒトである、請求項 1 ~ 3、5、及び 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

被検体がヒトである、請求項 4、6、及び 8 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 11】

被検体が TNF 不十分レスポンドー (TNF - I R) である、請求項 1 ~ 3、5、7、及び 9 の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 12】

被検体が TNF 不十分レスポンドー (TNF - I R) である、請求項 4、6、8、及び 10 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 13】

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項 1 ~ 3、5、7、9、及び 11 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 14】

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である、請求項 4、6、8、10、及び 12 の何れか一項に記載の医薬。

40

【請求項 15】

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎であって、応答が臨床応答、粘膜治癒、及び寛解からなる群から選択される、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎であって、応答が臨床応答、粘膜治癒、及び寛解からなる群から選択される、請求項 14 に記載の医薬。

【請求項 17】

生物学的試料が血液試料、又は消化管由来の試料である、請求項 1 ~ 3、5、7、9、11、13、及び 15 の何れか一項に記載の方法。

50

【請求項 18】

生物学的試料が血液試料、又は消化管由来の試料である、請求項 4、6、8、10、12、14、及び16 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 19】

生物学的試料が腸組織である、請求項 1～3、5、7、9、11、13、15、及び17 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 20】

生物学的試料が腸組織である、請求項 4、6、8、10、12、14、16、及び18 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 21】

免疫組織化学的方法によってインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数を測定することを含む、請求項 1～3、5、7、9、11、13、15、17、及び19 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 22】

免疫組織化学的方法によってインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数を測定することを含む、4、6、8、10、12、14、16、18、及び20 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 23】

測定が、試料をインテグリンベータ7タンパク質又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する試薬と接触させること、及び形成された複合体の量を検出すること、及びそれによって、インテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数を測定すること、を含む、請求項 1～3、5、7、9、11、13、15、17、19、及び21 の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項 24】

測定が、試料をインテグリンベータ7タンパク質又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する試薬と接触させること、及び形成された複合体の量を検出すること、及びそれによって、インテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数を測定すること、を含む、請求項 4、6、8、10、12、14、16、18、20、及び22 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 25】

試料におけるインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数が、試料における全細胞数により割られる、請求項 1～3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、及び23 の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項 26】

試料におけるインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数が、試料における全細胞数により割られる、請求項 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、及び24 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 27】

光学顕微鏡における高倍率視野でインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数が決定される、請求項 1～3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、及び25 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 28】

光学顕微鏡における高倍率視野でインテグリンベータ7発現細胞又はCD3イプシロン発現細胞のベースライン数が決定される、請求項 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、及び26 の何れか一項に記載の医薬。

【請求項 29】

基準数が中央値である、請求項 1～3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、及び27 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 30】

基準数が中央値である、請求項 4、6、8、10、12、14、16、18、20、22

50

2、24、26、及び28の何れか一項に記載の医薬。

【請求項31】

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片の投与が、(1)メイヨークリニックスコア(MCS)においてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア、(2)0又は1の内視鏡サブスコア、(3)>1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2の、一又は複数を生じさせる、請求項1~3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、及び29の何れか一項に記載の方法。

【請求項32】

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片の投与が、(1)メイヨークリニックスコア(MCS)においてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア、(2)0又は1の内視鏡サブスコア、(3)>1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2の、一又は複数を生じさせる、請求項4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、及び30の何れか一項に記載の医薬。

10

【請求項33】

抗インテグリンベータ7抗体がモノクローナル抗体である、請求項1~3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、及び31の何れか一項に記載の方法。

【請求項34】

抗インテグリンベータ7抗体がモノクローナル抗体である、請求項4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、及び32の何れか一項に記載の医薬。

20

【請求項35】

抗インテグリンベータ7抗体がキメラ抗体、ヒト抗体、及びヒト化抗体からなる群から選択される、請求項1~3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、及び33の何れか一項に記載の方法。

【請求項36】

抗インテグリンベータ7抗体がキメラ抗体、ヒト抗体、及びヒト化抗体からなる群から選択される、請求項4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、及び34の何れか一項に記載の医薬。

30

【請求項37】

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片が、
 (i)配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
 (ii)配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-L2；
 (iii)配列番号：3のアミノ酸配列を含むHVR-L3；
 (iv)配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
 (v)配列番号：5のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び
 (vi)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、を含む、
 請求項1~3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、及び35の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項38】

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片が、
 (i)配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-L1；
 (ii)配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-L2；
 (iii)配列番号：3のアミノ酸配列を含むHVR-L3；
 (iv)配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H1；
 (v)配列番号：5のアミノ酸配列を含むHVR-H2；及び
 (vi)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、を含む、
 請求項4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、及び34の何れか一項に記載の医薬。

50

0、32、34、及び36の何れか一項に記載の医薬。

【請求項39】

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片が、配列番号：24のアミノ酸配列を含む可変軽鎖と配列番号：31のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む、請求項1～3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、及び37の何れか一項に記載の方法。

【請求項40】

抗インテグリンベータ7抗体又はその抗原結合断片が、配列番号：24のアミノ酸配列を含む可変軽鎖と配列番号：31のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む、請求項4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、及び38の何れか一項に記載の医薬。

10

【請求項41】

抗インテグリンベータ7抗体がエトロリズマブである、請求項1～3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、及び39の何れか一項に記載の方法。

【請求項42】

抗インテグリンベータ7抗体がエトロリズマブである、請求項4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、及び40の何れか一項に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

(関連出願とのクロスリファレンス)

この出願は、2013年7月31日に提出された米国仮出願第61/860422号及び2012年10月5日に提出された米国仮出願第61/710656号の優先権を主張するものであり、その双方は出典明示によってその全体がここに援用される。

【0002】

(配列表)

本出願は、EFS-WebによりASCIIフォーマットで提出された配列表を含んでおり、出典明示によってその全体がここに援用される。2013年9月23日に作成された前記ASCIIコピーはP4989R1WO__SL.txtとの名前が付けられ、サイズは19125バイトである。

30

【0003】

(分野)

抗ベータ7インテグリンサブユニット抗体を含むインテグリンベータ7アンタゴニストに対する応答性を予測するバイオマーカーとそのようなバイオマーカーを使用する方法が提供される。また潰瘍性大腸炎及びクローン病を含む炎症性腸疾患などの胃腸炎症性障害を治療する方法が提供される。また提供されるのは、潰瘍性大腸炎及びクローン病を含む炎症性腸疾患の治療のためにそのような予測バイオマーカーを使用する方法である。

【背景技術】

40

【0004】

炎症性腸疾患(IBD)は、胃腸(GI)管の慢性炎症性自己免疫状態であり、臨床的には潰瘍性大腸炎(UC)又はクローン病(CD)を表す。CDはGI管全体の如何なる部分にも影響する可能性のある慢性貫壁性炎症性疾患であり、UCは結腸の粘膜炎である。双方の状態は臨床的には頻繁な腸運動、栄養障害、及び脱水症によって特徴付けられ、日常生活の活動に混乱をもたらす。CDはしばしば吸収障害、狭窄、及び瘻孔の発生を合併し、度重なる手術を必要としうる。UCは、頻度は低いが重症の血性下痢及び中毒性巨大結腸症を合併し得、また手術を必要としうる。双方のIBD状態は、GI管の悪性腫瘍の増加リスクを伴う。IBDの病因学は複雑であり、病変形成の多くの態様が不明なままである。

50

【 0 0 0 5 】

中程度ないしは重症のIBDの治療は治療医に重要な課題を提起し、なぜなら副腎皮質ステロイド及び免疫調節療法（例えば、アザチオプリン、6メルカプトプリン、及びメトトレキセート）による一般的な治療は副作用及び不耐性を伴い、維持療法（ステロイド）における利益が証明されていないからである。腫瘍壊死因子アルファ（TNF- α ）を標的にするモノクローナル抗体、例えばインフリキシマブ（キメラ抗体）及びアダリムマブ（完全ヒト抗体）が、CDの管理において現在使用されている。またインフリキシマブは効果を示しており、UCにおける使用が承認されている。しかしながら、CDを伴う患者のおよそ10% - 20%は抗TNF治療に対する主要な非応答者であり、CD患者の更に~20% - 30%は経時的に応答を失う（Schnitzler等, Gut 58:492-500 (2009)）。抗TNFに伴う他の有害事象（AE）は、結核を含む細菌感染症の割合の増加、より希にはリンパ腫及び脱髄を含む（Chang等, Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatology 3:220 (2006) ; Hoentjen等, World J. Gastroenterol.15(17):2067 (2009)）。現在利用可能な治療は、慢性疾患を伴うIBD患者の20% - 30%超において持続寛解が達成されていない（Hanauer等, Lancet 359:1541-49 (2002) ; Sandborn等, N Engl J Med 353:1912-25 (2005)）。加えて、殆どの患者では、真の疾患改変と相関する臨床転帰である持続ステロイドフリー寛解及び粘膜治癒は達成されていない。従って、慢性使用に最適化されたIBDにおけるより標的化された治療法を開発する必要性がある（抗TNF治療薬に決して応答しないか又は時間と共に応答を失う患者を含む、患者の大部分において、持続寛解、特にステロイドフリー寛解及び長期合併症の防止を伴う改善された安全性プロファイル）。

10

20

【 0 0 0 6 】

インテグリンは、白血球接着、シグナル伝達、増殖及び遊走を含む多くの細胞プロセスにおいて、並びに遺伝子制御において役割を果たすアルファ/ベータヘテロ二量体細胞表面糖タンパク受容体である（Hynes, R. O., Cell, 1992, 69:11-25 ; 及びHemler, M. E., Annu.Rev. Immunol., 1990, 8:365-368）。それらは、内皮、上皮、及び細胞外マトリックスタンパク質上の異なる細胞接着分子（CAM）に特異的に結合する2つのヘテロ二量体で、非共有結合的に相互作用する及び膜貫通サブユニットからなる。このように、インテグリンは、血液からほぼ全組織部位へ高度に制御された形で白血球の動員を援助する組織特異的細胞接着受容体として機能し得、正常組織及び炎症の部位への白血球のホーミングにおいて役割を果たす（von Andrian等, N Engl J Med 343:1020-34 (2000)）。免疫系では、インテグリンは、炎症性プロセス中において白血球輸送、接着及び浸潤に關与する（Nakajima, H.等, J. Exp.Med., 1994, 179:1145-1154）。インテグリンの差次的発現は細胞の接着特性を調節し、異なるインテグリンは異なる炎症性反応に關与する。（Butcher, E. C.等, Science, 1996, 272:60-66）。 α 7含有インテグリン（すなわち、アルファ4ベータ7及びアルファEベータ7）は主に単球、リンパ球、好酸球、好塩基球、及びマクロファージ上に発現されるが、好中球上には発現されない（Elices, M. J.等, Cell, 1990, 60:577-584）。

30

【 0 0 0 7 】

α 4 β 7インテグリンは、腸管粘膜及び関連リンパ組織、例えば小腸におけるパイエル板、大腸におけるリンパ濾胞、及び腸間膜リンパ節への細胞の遊走において重要である白血球 - ホーミング受容体である。腸では、白血球ローリング及び粘膜内皮への接着は、ケモカインからのシグナルによって開始され、粘膜アドレシン細胞接着分子（MAdCAM）- 1 関連シアリルルイスXに媒介される。ケモカインシグナル伝達は α 4 β 7インテグリンに、低から高MAdCAM - 1 結合親和性への変化を誘導する。ついで、白血球は捕らえられ、血管内皮を通る下層組織への血管外漏出プロセスを開始する。この血管外漏出プロセスは、正常免疫細胞再循環状態及び炎症状態の双方において生じると信じられている（上掲のvon Andrian等）。浸潤における α 4 β 7⁺細胞の数及びリガンドMAdCAM - 1の発現は、慢性炎症の部位、例えばUC又はCDの患者の腸管において高い（Briskin等, Am J Pathol 151:97-110 (1997) ; Souza等, Gut 45:856-63 (1999)）。 α 4 β 7は、MAdCAM - 1 及び血管細胞接着分子（VCAM）- 1を発現する高内皮細静脈に

40

50

、並びに細胞外マトリックス分子フィブロネクチン断片CS-1に優先的に結合する(Chan等, J Biol Chem 267:8366-70 (1992); Ruegg等, J Cell Biol 17:179-89 (1992); Berlin等, Cell 74:185-95 (1993))。腸粘膜血管において構成的に発現されるMAdCAM-1と共に、 $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンは白血球腸向性において選択的役割を果たすが、末梢組織又はCNSへの白血球のホーミングには寄与しないようである。代わりに、末梢リンパ輸送は、VCAM-1との $\alpha 4 \beta 1$ 相互作用を伴う(Yednock等, Nature 356:63-6 (1992); Rice等, Neurology 64:1336-42 (2005))。

【0008】

Tリンパ球上にもっぱら発現され粘膜組織に伴う $\alpha 7 \beta 1$ インテグリンファミリーの別のメンバーはE $\alpha 7 \beta 1$ インテグリンであり、CD103としても知られる。E $\alpha 7 \beta 1$ インテグリンは、上皮細胞上のE-カドヘリンに選択的に結合し、上皮内リンパ球区画の粘膜組織におけるT細胞の保持に役割を果たすことが提案されている(Cepek等, J Immunol 150:3459-70 (1993); Karecla等 Eur J Immunol 25:852-6 (1995))。粘膜固有層におけるE $\alpha 7 \beta 1$ 細胞は、ストレスを受け又は感染した上皮細胞に対して細胞傷害性を呈することが報告されている(Hadley等, J Immunol 159:3748-56 (1997); Buri等, J Pathol 206:178-85 (2005))。E $\alpha 7 \beta 1$ の発現はCDにおいて増加し(Elewaut等, Acta Gastroenterol Belg 61:288-94 (1998); Oshitani等, Int J Mol Med 12:715-9 (2003))、抗E $\alpha 7 \beta 1$ 抗体治療はマウスにおいて実験的大腸炎を減弱することが報告されており、IBDの実験モデルにおけるE $\alpha 7 \beta 1$ リンパ球の役割を示す(Ludviksson等, J Immunol 162:4975-82 (1999))。

【0009】

E $\alpha 7 \beta 1$ に対するモノクローナル抗体の投与は、IL-2 β マウスにおける免疫化誘発大腸炎を防止し回復させることが報告されており、炎症性腸疾患の発症及び維持がE $\alpha 7 \beta 1$ を発現する粘膜固有層CD4 $^{+}$ リンパ球の結腸局在に依存することを示唆する(Ludviksson等, J Immunol.1999, 162(8):4975-82)。抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体(ナタリズマブ)は、CDの患者の治療において効果的であることが報告されており(Sandborn等, N Engl J Med 2005;353:1912-25)、抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体(MLN-02, MLN0002, ベドリズマブ)は、UCを有する患者において効果的であることが報告されている(Feagan等, N Engl J Med 2005;352:2499-507)。第二の抗アルファ4/ベータ7抗体(AMG181)もまた開発中であり、臨床試験が最近始まった(clinicaltrials(dot)gov identifier, NCT01164904, 2012年9月)。これらの研究と知見は、 $\alpha 4 \beta 7$ を治療標的として立証し、 $\alpha 4 \beta 7$ 及びMAdCAM-1間の相互作用がIBDの病変形成を媒介することを裏付ける。従って、ベータ7インテグリンのアンタゴニストは、IBDの治療における治療剤として大きな可能性を持つ。

【0010】

$\alpha 7 \beta 1$ インテグリンサブユニットを標的にするヒト化モノクローナル抗体がこれまでに記述されている。例えば国際特許公開番号WO2006/026759を参照のこと。一つそのような抗体であるrhUMA $\beta 7$ (エトロリズマブ)は、ラット抗マウス/ヒトモノクローナル抗体FIB504から得られている(Andrew等1994)。それはヒトIgG1重鎖及び $\kappa 1$ 軽鎖フレームワークを含むように操作された。国際特許公開番号WO2006/026759。所定の投薬レジメンに従ってのヒト患者へのエトロリズマブの投与がこれまでに記述されている。例えば国際特許公開番号WO2012/135589を参照のこと。

【0011】

rhUMA $\beta 7$ (エトロリズマブ)は $\alpha 4 \beta 7$ (Holzmann等, Cell 56:37-46 (1989); Hu等, Proc Natl Acad Sci USA 89:8254-8 (1992))及びE $\alpha 7 \beta 1$ (Cepek等, J Immunol 150:3459-70 (1993))に結合し、これは腸管粘膜におけるリンパ球サブセットの輸送及び保持をそれぞれ制御する。臨床試験はCDの治療についての抗 $\alpha 4 \beta 7$ 抗体(ナタリズマブ)の効果を実証し(Sandborn等, N Engl J Med 353:1912-25 (2005))、有望な結果がUC(Feagan等, N Engl J Med 352:2499-507 (2005), Feagan等, N Engl J Med 369(8

10

20

30

40

50

) : 699-710 (2013))、また CD (Sandborn等, N Engl J Med 369(8) : 711-721 (2013)) の治療における抗 4 7 抗体 (LDP02 / MLN02 / MLN0002 / ベドリズマブ) について報告されている。これらの知見は 4 7 を潜在的治療標的として立証し、4 7 及び粘膜アドレシン細胞接着分子 1 (MadCAM1) 間の相互作用が炎症性腸疾患 (IBD) の病変形成に寄与するという仮説を裏付ける。

【 0012 】

4 に結合し、従って 4 1 及び 4 7 双方に結合するナタリズマブとは異なり、rhumAb ベータ 7 は 4 7 及び E 7 の 7 サブユニットに特異的に結合するが、4 又は 1 インテグリン個別サブユニットには結合しない。これは抗体が 100 nM ほどの高濃度で血管細胞接着分子 1 (VCAM1) への 4 1 + 4 7 - Ramos 細胞の接着を阻害できないことにより実証された。重要なことは、rhumAb ベータ 7 の特性が選択性 (4 1 を発現するが 7 を発現しない T 細胞サブセットは、rhumAb ベータ 7 に直接影響されないはずである) を示すことである。

10

【 0013 】

白血球ホーミングに対する rhumAb ベータ 7 の腸特異性効果の裏付けは、幾つかのインビボ非臨床試験からきている。CD45RB^{high} CD4 + T 細胞で再構成された重症複合免疫不全 (SCID) マウス (大腸炎の動物モデル) では、rhumAb ベータ 7 は炎症結腸への放射標識リンパ球ホーミングを阻止したが、末梢リンパ器官である脾臓へのホーミングは阻止しなかった。例えば国際特許公開番号 WO2006 / 026759 を参照のこと。加えて、ラット - マウスキメラ抗マウス 7 (抗 7 , muFIB504) は、多発性硬化症の動物モデルである実験的自己免疫性脳炎 (EAE) を有するミエリン塩基性タンパク質 T 細胞受容体 (MBP - TCR) トランスジェニックマウスにおいて、中枢神経系 (CNS) 炎症の組織学的程度を低減させることができず、また疾患生存率を改善することができなかった。同文献。更に、カニクイザルにおける 2 つの安全性試験では、rhumAb ベータ 7 は、ヒトにおける腸 - ホーミングメモリー / エフェクター T 細胞に表現型的に類似したサブセットである CD45RA^{high} 末梢血 T 細胞の顕著な (およそ 3 ~ 6 倍) 増加に主に起因する末梢血リンパ球数の中程度の増加を誘導した。例えば、国際特許公開番号 WO2009 / 140684 ; Stefanich 等, Br. J. Pharmacol. 162:1855-1870 (2011) を参照のこと。対照的に、rhumAb ベータ 7 は、ヒトにおけるナイーブ T 細胞に表現型的に類似したサブセットである CD45RA⁺ 7 中間体末梢血 T 細胞の数に最低限から無の影響であり、ヒトにおける末梢ホーミングメモリー / エフェクター T 細胞に表現型的に類似したサブセットである CD45RA^{low} 末梢血 T 細胞の数に影響せず、腸ホーミングリンパ球亜集団に対する rhumAb ベータ 7 の特異性を確かにする。国際特許公開番号 WO2009 / 140684 ; Stefanich 等, Br. J. Pharmacol. 162:1855-1870 (2011)。

20

30

【 0014 】

臨床試験では CD の治療について抗 4 抗体 (ナタリズマブ) の効果が実証され (Sandborn 等, N Engl J Med 353:1912-25 (2005))、有望な結果が UC の治療において抗 4 7 抗体 (LDP02 / MLN02 / MLN0002 / ベドリズマブ) について報告されたが、これらの障害の治療における更なる改善に対する必要性が残る。例えば、ナタリズマブ治療は、ナタリズマブ及び免疫抑制剤で併用療法を受けたクローン病 (また別には多発性硬化症) を有する患者における進行性多巣性白質脳症 (PML) の確認された症例と関連していた。PML は脳におけるポリオーマウイルス (JC ウイルス) 及び活動性ウイルス複製の再活性化に関連した潜在的に致死的な神経学的状態である。生じたとしても、PML を確かに防止するか又は PML を十分に治療できる知られた介入治療はない。ベドリズマブ治療の一つの制限は静脈内に投与されることであり、これは患者にとって不都合な場合があり、また所望されないか又は有害な事象、例えば注入部位反応を付随しうる。従って、IBD などの胃腸炎症性障害、例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病の治療への改善された治療アプローチ、並びに望ましい投与レジメンに対する必要性がある。

40

【 0015 】

50

患者が特定の治療剤又は治療剤クラスに应答するかどうかは、治療前には知られていないことがしばしばである。従って、一般にIBD患者、特にUC及びCD患者が治療法を探す場合、特定の患者に対して効果的な治療剤を探すのにかなりの試行錯誤がなされる。よって、どの患者がどの治療に应答するかを決定し、そのような決定をIBD患者に対するより効果的な治療レジメン中に導入するためのより効果的な手段が必要である。

【0016】

従って、抗ベータ7インテグリンサブユニット抗体を含む様々なIBD治療剤での治療に应答する最も可能性のある患者を客観的に同定するために使用できる、予測診断法を含む更なる診断法があることは非常に有利であろう。よって、潰瘍性大腸炎、クローン病並びに他の炎症性腸疾患に関連し、抗ベータ7インテグリンサブユニット抗体に対する应答を予測できる新規バイオマーカーを同定する絶えない必要性がある。また、そのような関連性に関する統計的かつ生物学的に有意で再現可能な情報は、TNF-IR患者のような、UC又はCD患者の特定のサブセットを同定する試みにおける不可欠な構成要素として利用することができ、かかる患者では、例えば治療剤が特定のUC又はCD患者亜集団において治療的恩恵があるか又は臨床試験において治療的恩恵があることが示される場合、抗ベータ7インテグリンサブユニット抗体での治療からの有意な恩恵が期待されるであろう。

10

【0017】

ここに記載の発明は、所定の上述の必要性を満たし、また他の利益をもたらす。

【0018】

特許出願及び刊行物を含む、ここに引用される全ての文献は、如何なる目的についてもその全体が出典明示によって援用される。

20

【発明の概要】

【0019】

本発明の方法は、少なくとも部分的には、腸生検中及び末梢全血中の所定の遺伝子のmRNA発現レベル、並びに腸生検中の所定の遺伝子の細胞タンパク質発現レベルが、インテグリンベータ7アンタゴニストでの治療に対する胃腸炎症性障害に罹患した患者の应答性を予測するとの発見に基づいている。

【0020】

従って、一態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に対する胃腸炎症性障害に罹患した患者の应答を予測する方法が提供される。所定の実施態様では、生物学的試料は患者から得られ、mRNA発現レベルが測定される。一実施態様では、ベータ7mRNAの発現が測定される。一実施態様では、インテグリンアルファEmRNAの発現が測定される。一実施態様では、CD3イプシロンの発現が測定される。一実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される二又は三のmRNAの組み合わせの発現が測定される。一実施態様では、生物学的試料は組織生検試料である。一実施態様では、生検は腸組織から得られる。一実施態様では、生物学的試料は末梢全血である。一実施態様では、末梢全血はPAXgene管に採取される。所定の実施態様では、mRNA発現レベルはPCR法によって測定される。一実施態様では、PCR法はqPCRである。所定の実施態様では、mRNA発現レベルは中央値と比較される。一実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、又はCD3イプシロンの一又は複数のmRNA発現レベルが、所定の実施態様では中央値である基準値と比較して上昇しているならば、患者はインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に应答すると予測される。一実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、又はCD3イプシロンの一又は複数のmRNA発現レベルが、所定の実施態様では中央値である基準値と比較して低いならば、患者はインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に应答しないと予測される。一実施態様では、应答は臨床的寛解である。一実施態様では、应答は粘膜治癒である。一実施態様では、应答は臨床应答である。所定の実施態様では、患者における寛解は、絶対メイヨークリニックスコア (absolute Mayo Clinic Score) 2で、>1の個々のサブスコアがない場合、誘導されていると

30

40

50

決定され、これはまた臨床的寛解と称される。所定の実施態様では、患者が軟性S状結腸鏡検査によって評価して0又は1の内視鏡検査サブスコアを有すると決定される場合に粘膜治癒が生じたと決定される。そのような所定の実施態様では、粘膜治癒を経験する患者は0の内視鏡検査サブスコアを有していると決定される。

【0021】

他の態様では、インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対する胃腸炎症性障害患者の応答性を予測する方法が提供される。一実施態様では、患者からの生物学的試料中のインテグリンベータ7のmRNA発現レベルが決定される。一実施態様では、患者からの生物学的試料中のインテグリンアルファEのmRNA発現レベルが決定される。一実施態様では、患者からの生物学的試料中のCD3イプシロンのmRNA発現レベルが決定される。一実施態様では、患者からの生物学的試料中のインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される二又は三のmRNAのmRNA発現レベルが決定される。所定の実施態様では、生物学的試料において検出される、基準値、例えば中央値と比較したインテグリンベータ7mRNA発現の上昇、又は基準値、例えば中央値と比較したインテグリンアルファEmRNA発現の上昇、又は基準値、例えば中央値と比較したCD3イプシロンmRNA発現の上昇が、インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対して応答する可能性が高い者として患者を同定する。

【0022】

更に他の態様では、生物学的試料は患者から得られ、所定のタンパク質の一つ又は組み合わせを発現する細胞の数が測定され、細胞の全数と比較され、あるいはタンパク質発現細胞の数が光学顕微鏡での高倍率視野で決定される。一実施態様では、インテグリンベータ7発現細胞の数が測定される。一実施態様では、インテグリンアルファE発現細胞の数が測定される。一実施態様では、CD3イプシロン発現細胞の数が測定される。一実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される二又は三のタンパク質の組み合わせを発現する細胞の数が測定される。一実施態様では、生物学的試料は組織生検試料である。一実施態様では、生検は腸組織から得られる。一実施態様では、生物学的試料はホルマリン中に配され、場合によってはパラフィンブロックに包埋される。所定の実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、又はCD3イプシロンの一又は組み合わせを発現する細胞の数が免疫組織化学的方法によって測定される。所定の実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、又はCD3イプシロンの一又は組み合わせを発現する細胞の数が、与えられた領域における細胞の全数と比較される。一実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、又はCD3イプシロンの一又は複数を発現する細胞の数が基準値、例えば中央値と比較して上昇している（又は高い）場合には、患者はインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に反応すると予測される。一実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、又はCD3イプシロンの一又は複数を発現する細胞の数が基準値、例えば中央値と比較して少ない場合には、患者はインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に反応しないと予測される。一実施態様では、反応は臨床的寛解である。一実施態様では、反応は粘膜治癒である。一実施態様では、反応は臨床反応である。所定の実施態様では、患者における寛解は、絶対メイヨークリニックスコア 2で>1の個々のサブスコアがない場合に誘導されると決定され、これはまた臨床的寛解とも称される。所定の実施態様では、粘膜治癒は、患者が、軟性S状結腸鏡検査によって評価して0又は1の内視鏡検査サブスコアを有していると決定される場合に生じたと決定される。所定のそのような実施態様では、粘膜治癒を経験する患者は0の内視鏡検査サブスコアを有していると決定される。

【0023】

更に他の態様では、胃腸炎症性障害に罹患した患者をインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に反応する可能性がある者として同定する方法が提供される。所定の実施態様では、該方法は、(a)患者からの生物学的試料中の少なくとも一の遺伝子のmRNA発現レベルを測定する工程であって、少なくとも一の遺伝子がインテグリンベータ7、

10

20

30

40

50

インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、(b)(a)において測定されたmRNA発現レベルを基準レベルと比較する工程と、(c)(a)において測定されたmRNA発現レベルが基準レベルよりも高い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する工程とを含む。一実施態様では、患者はヒトである。一実施態様では、患者はTNF不十分レスポナー(TNF-IR; TNF inadequate responder)である。一実施態様では、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎であり、応答は臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される。

【0024】

更なる態様では、胃腸炎症性障害に罹患した患者を治療する方法が提供される。所定の実施態様では、該方法は、(a)患者からの生物学的試料中の少なくとも一の遺伝子のmRNA発現レベルを測定する工程であって、少なくとも一の遺伝子がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、(b)(a)において測定されたmRNA発現レベルを基準レベルと比較する工程と、(c)(a)において測定されたmRNA発現レベルが基準レベルよりも高い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する工程と、(d)(a)において測定されたmRNA発現レベルが基準レベルよりも高い場合に治療を施し、それによって胃腸炎症性障害を治療する工程とを含む。一実施態様では、100mgのインテグリンベータ7アンタゴニストが4週間毎に一回、皮下投与される。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストの420mgのフラット負荷投与量が皮下的に投与され、負荷投与量の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第二の皮下投与が続き、第二の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第三の皮下投与が続き、第三の投与の4週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続き、その後4週間毎に一回インテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続く。一実施態様では、患者はヒトである。一実施態様では、患者はTNF不十分レスポナー(TNF-IR)である。一実施態様では、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎であり、応答は臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与は、(1)MCSにおいてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア、(2)0又は1の内視鏡サブスコア、(3)>1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2の、一又は複数を生じさせる。

【0025】

更にまた他の態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に対する胃腸炎症性障害に罹患した患者の応答を予測する方法が提供される。所定の実施態様では、該方法は、患者から生物学的試料を得る工程と、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を測定する工程と、試料において測定された発現細胞の数を基準レベルと比較する工程と、治療に対する患者の応答を予測する工程を含み、ここで、基準レベルと比較した発現細胞の増加した数が治療に対する応答を示し、基準レベルと比較した発現細胞の低い数が治療に対する非応答を示す。一実施態様では、患者はヒトである。一実施態様では、患者はTNF不十分レスポナー(TNF-IR)である。一実施態様では、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎であり、応答は臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される。一実施態様では、生物学的試料は腸組織である。一実施態様では、該方法は免疫組織化学的方法によって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、測定は、インテグリンベータ7タンパク質、インテグリンアルファEタンパク質、又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する薬剤に試料を接触させ、形成さ

10

20

30

40

50

れた複合体の量を検出し、それによって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、試料中の発現細胞の数は試料中の全細胞数によって割られる。一実施態様では、光学顕微鏡での高倍率視野で発現細胞の数が決定される。一実施態様では、基準レベルは中央値である。

【 0 0 2 6 】

他の態様では、インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対する胃腸炎症性障害患者の応答性を予測する方法が提供される。所定の実施態様では、該方法は、患者からの生物学的試料における、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を決定することを含み、ここで、基準レベルと比較した発現細胞の数の上昇が、インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対して応答する可能性が高い者として患者を同定する。一実施態様では、患者はヒトである。一実施態様では、患者はTNF不十分レスポnder (TNF-IR)である。一実施態様では、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎であり、応答は臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される。一実施態様では、生物学的試料は腸組織である。一実施態様では、該方法は免疫組織化学的方法によって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、測定は、インテグリンベータ7タンパク質、インテグリンアルファEタンパク質、又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する薬剤に試料を接触させ、形成された複合体の量を検出し、それによって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、試料中の発現細胞の数は試料中の全細胞数によって割られる。一実施態様では、光学顕微鏡での高倍率視野で発現細胞の数が決定される。一実施態様では、基準レベルは中央値である。

【 0 0 2 7 】

更に他の態様では、胃腸炎症性障害に罹患した患者をインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する方法が提供される。所定の実施態様では、該方法は、(a)患者からの生物学的試料中の少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を測定する工程であって、少なくとも一のタンパク質がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、(b)(a)において測定された細胞の数を基準レベルと比較する工程と、(c)(a)において測定された細胞の数が基準レベルよりも多い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する工程とを含む。一実施態様では、患者はヒトである。一実施態様では、患者はTNF不十分レスポnder (TNF-IR)である。一実施態様では、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎であり、応答は臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される。一実施態様では、生物学的試料は腸組織である。一実施態様では、該方法は免疫組織化学的方法によって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、測定は、インテグリンベータ7タンパク質、インテグリンアルファEタンパク質、又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する薬剤に試料を接触させ、形成された複合体の量を検出し、それによって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、試料中の発現細胞の数は試料中の全細胞数によって割られる。一実施態様では、光学顕微鏡での高倍率視野で発現細胞の数が決定される。一実施態様では、基準レベルは中央値である。

【 0 0 2 8 】

更にまた他の態様では、胃腸炎症性障害に罹患した患者を治療する方法が提供される。所定の実施態様では、該方法は、(a)患者からの生物学的試料中の少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を測定する工程であって、少なくとも一のタンパク質がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、(b)(a)において測定された発現細胞の数を基準レベルと比較する工程と、(c)(a)において測定された発現細胞の数が基準レベルよりも多い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する工程と

10

20

30

40

50

、(d)(a)において測定された発現細胞の数が基準レベルよりも多い場合に治療を施し、それによって胃腸炎症性障害を治療する工程とを含む。一実施態様では、100mgのインテグリンベータ7アンタゴニストが4週間毎に一回、皮下投与される。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストの420mgのフラット負荷投与量が皮下的に投与され、負荷投与量の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第二の皮下投与が続き、第二の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第三の皮下投与が続き、第三の投与の4週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続き、その後4週間毎に一回インテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続く。一実施態様では、患者はヒトである。一実施態様では、患者はTNF不十分レスポンドー(TNF-IR)である。一実施態様では、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎又はクローン病である。一実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎であり、応答は臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与は、(1)MCSにおいてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア、(2)0又は1の内視鏡サブスコア、(3)>1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2の、一又は複数を生じさせる。一実施態様では、生物学的試料は腸組織である。一実施態様では、該方法は免疫組織化学的方法によって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、測定は、インテグリンベータ7タンパク質、インテグリンアルファEタンパク質、又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する薬剤に試料を接触させ、形成された複合体の量を検出し、それによって発現細胞の数を測定することを含む。一実施態様では、試料中の発現細胞の数は試料中の全細胞数によって割られる。一実施態様では、光学顕微鏡での高倍率視野で発現細胞の数が決定される。一実施態様では、基準レベルは中央値である。

【0029】

更にまた他の態様では、胃腸炎症性障害に罹患した患者の治療において使用するためのインテグリンベータ7アンタゴニストが提供される。所定の実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一の遺伝子のmRNA発現レベルが基準レベルよりも高い場合に患者は治療され又は治療のために選択される。所定の実施態様では、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数が基準レベルと比較して上昇しているか又は高い場合に、患者が治療され又は治療のために選択される。一実施態様では、基準レベルは中央値である。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストは患者の治療に使用するためのものであり、100mgが4週間毎に一回、皮下投与される。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストは患者の治療に使用するためのものであり、インテグリンベータ7アンタゴニストの420mgのフラット負荷投与量が皮下的に投与され、負荷投与量の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第二の皮下投与が続き、第二の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第三の皮下投与が続き、第三の投与の4週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続き、その後4週間毎に一回インテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続く。

【0030】

更なる態様では、インテグリンベータ7mRNA、インテグリンアルファEmRNA、CD3イプシロンmRNA、インテグリンベータ7タンパク質、インテグリンアルファEタンパク質、及びCD3イプシロンタンパク質から選択されるバイオマーカーに特異的に結合する少なくとも一の薬剤のインビトロでの使用が提供される。所定の実施態様では、該少なくとも一の薬剤は、胃腸炎症性障害に罹患した患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定し又は選択するために使用され、ここで、基準レベルよりも上の、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、

及び/又はCD3イプシロンmRNA発現のレベル、又はインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及び/又はCD3イプシロン発現細胞の数が、患者が治療に应答する可能性が高いと同等し又は選択する。一実施態様では、基準レベルは中央値である。

【0031】

更に他の態様では、患者における胃腸炎症性障害を治療する方法が提供される。所定の実施態様では、患者から得られた生物学的試料において、上昇したmRNA発現レベルの一又は複数の所定の遺伝子を発現することが決定された場合に、治療的有効量のインテグリンベータ7アンタゴニストが患者に投与される。一実施態様では、試料は中央値と比較して上昇したインテグリンベータ7mRNAを発現することが決定されている。一実施態様では、試料は中央値と比較して上昇したインテグリンアルファEmRNAを発現することが決定されている。一実施態様では、試料は中央値と比較して上昇したCD3イプシロンmRNAを発現することが決定されている。一実施態様では、試料は、中央値レベルの同じmRNAと比較して、上昇したmRNAレベルの二又は三のインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンを発現することが決定されている。所定の実施態様では、患者は、同じ遺伝子又は遺伝子群の中央値と比較して所定の遺伝子の上昇したmRNA発現レベルに基づいて、治療に対して選択される。一実施態様では、患者は、中央値と比較して上昇したインテグリンベータ7mRNA発現に基づいて治療に対して選択されている。一実施態様では、患者は、中央値と比較して上昇したインテグリンアルファEmRNA発現に基づいて治療に対して選択されている。一実施態様では、患者は、中央値と比較して上昇したCD3イプシロンmRNA発現に基づいて治療に対して選択されている。一実施態様では、患者は、同じmRNAに対して中央値と比較して、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンの二又は三の上昇したmRNA発現に基づいて治療に対して選択されている。一実施態様では、生物学的試料は組織生検試料である。一実施態様では、生物学的試料は末梢全血である。一実施態様では、末梢全血はPAXgene管で採取される。所定の実施態様では、mRNA発現レベルはPCR法によって測定される。一実施態様では、PCR法はqPCRである。所定の実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストの投与は、次の結果：(1)MCSにおいてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア、(2)0又は1の内視鏡サブスコア、(3)>1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2の、一又は複数を生じさせる。一実施態様では、100mgのインテグリンベータ7アンタゴニストが4週間毎に一回、皮下投与される。一実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストの420mgのフラット負荷投与量が皮下的に投与され、負荷投与量の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第二の皮下投与が続き、第二の投与の2週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの第三の皮下投与が続き、第三の投与の4週間後にインテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続き、その後4週間毎に一回インテグリンベータ7アンタゴニストの300mgの皮下投与が続く。

【0032】

上記実施態様の所定のものでは、胃腸炎症性障害は炎症性腸疾患であり、所定のそのような実施態様では、炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎(UC)又はクローン病(CD)であり、所定のそのような実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストはモノクローナル抗ベータ7抗体である。所定のそのような実施態様では、抗ベータ7抗体はキメラ抗体、ヒト抗体、及びヒト化抗体から選択される。ある実施態様では、抗ベータ7抗体は抗体断片である。ある実施態様では、抗ベータ7抗体は6つの超可変領域(HVR)を含み、ここで、

(i)HVR-L1がアミノ酸配列A1-A11を含み、A1-A11がRASESVDTYLH(配列番号:1);RASESVDSLH(配列番号:7)、RASESVDTLH(配列番号:8)、又はRASESVDLH(配列番号:9)又は配列番号:1、7、8又は9の変異体(配列番号:26)であり、アミノ酸A2がA、G、S、T、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A3がS、G、I、K、N、P

10

20

30

40

50

、Q、R、及びTからなる群から選択され、及び/又はA4がE、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、及びRからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A5がS、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A6がV、R、I、A、G、K、L、M、及びQからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A7がD、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、及びTからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A8がD、G、N、E、T、P及びSからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A9がL、Y、I及びMからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A10がL、A、I、M、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A11がH、Y、F、及びSからなる群から選択され；

(ii) HVR-L2がアミノ酸配列B1-B8を含み、B1-B8がKYASQSI S (配列番号：2)、RYASQSI S (配列番号：20)、又はXaaYASQSI S (配列番号：21、Xaaは何れかのアミノ酸を表す)又は配列番号：2、20又は21の変異体(配列番号：27)であり、アミノ酸B1がK、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y及びXaa(Xaaは何れかのアミノ酸を表す)からなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B4がS及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B5がQ及びSからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B6がS、D、L、及びRからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B7がI、V、E、及びKからなる群から選択され；

(iii) HVR-L3がアミノ酸配列C1-C9を含み、C1-C9がQQGNSLPNT (配列番号：3)又は配列番号：3の変異体(配列番号：28)であり、アミノ酸C8がN、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、IL、及びMからなる群から選択され；

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

(v) HVR-H2がアミノ酸配列E1-E17を含み、E1-E17がGYISYSGSTSYNPSLKS (配列番号：5)、又は配列番号：5の変異体(配列番号：29)であり、アミノ酸E2がY、F、V、及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E6がS及びGからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E10がS及びYからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E12がN、T、A、及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E13がP、H、D、及びAからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E15がL及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E17がS及びGからなる群から選択され；かつ

(vi) HVR-H3が、アミノ酸配列F2-F11を含み、F2-F11がMTGSSGYFDF (配列番号：6)又はRTGSSGYFDF (配列番号：19)であるか；又はアミノ酸配列F1-F11を含み、F1-F11がAMTGSSGYFDF (配列番号：16)、ARTGSSGYFDF (配列番号：17)、又はAQTGSSGYFDF (配列番号：18)、又は配列番号：6、16、17、18、又は19の変異体(配列番号：30)であり、アミノ酸F2がR、M、A、E、G、Q、Sであり、及び/又はアミノ酸F11がF及びYからなる群から選択される。所定のそのような実施態様では、抗ペータ7抗体は、3つの重鎖超可変領域(HVR-H1-H3)配列と3つの軽鎖超可変領域(HVR-L1-L3)配列を含み、ここで、

(i) HVR-L1は配列番号：7、配列番号：8又は配列番号：9を含み；

(ii) HVR-L2は配列番号：2を含み；

(iii) HVR-L3は配列番号：3を含み；

(iv) HVR-H1は配列番号：4を含み；

(v) HVR-H2は配列番号：5を含み；かつ

(vi) HVR-H3は配列番号：6又は配列番号：16又は配列番号：17又は配列番号：19を含む。

所定の実施態様では、抗ペータ7抗体は、配列番号：24のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。所定の実施態様では、抗ペータ7抗体は、配列番号：31のアミノ酸配列を含

10

20

30

40

50

む可変重鎖を含む（配列番号：31は、配列番号：25のHVR-H3のアミノ酸配列（MTGSSGYFDF（配列番号：6）又はAMTSSGYFDF（配列番号：16））はそれぞれRTGSSGYFDF（配列番号：19）又はARTGSSGYFDF（配列番号：17）で置換されていることを除いて、配列番号：25に対応する）。所定の実施態様では、抗ベータ7抗体は配列番号：24のアミノ酸配列を含む可変軽鎖と配列番号：31のアミノ酸配列を含む可変重鎖を含む。所定の実施態様では、抗ベータ7抗体は、ここではエトロリズマブとも称されるrhUMAβベータ7である。

【0033】

他の態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストはモノクローナル抗アルファ4/ベータ7抗体である。所定の実施態様では、抗アルファ4/ベータ7抗体はベドリズマブである。所定の実施態様では、抗アルファ4/ベータ7抗体はAMG181である。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1A】図1Aは次のコンセンサス配列及び抗ベータ7サブユニット抗体配列に対する可変軽鎖及び重鎖の配列のアラインメントを示す：軽鎖ヒトサブグループカッパIコンセンサス配列（図1A，配列番号：12）、ラット抗マウスベータ7抗体（Fib504）可変軽鎖（図1A，配列番号：10）、及びヒト化抗体変異体：ヒト化hu504Kgraft可変軽鎖（図1A，配列番号：14）、変異体hu504-5、hu504-16、及びhu504-32（ヒト化hu504Kグラフトからのアミノ酸変異体を図1Aに示す）（軽鎖）（出現の順にそれぞれ配列番号：22-24）。

【図1B】図1Bは次のコンセンサス配列及び抗ベータ7サブユニット抗体配列に対する可変軽鎖及び重鎖の配列のアラインメントを示す：重鎖ヒトサブグループIIIコンセンサス配列（図1B，配列番号：13）、ラット抗マウスベータ7抗体（Fib504）可変重鎖（図1B，配列番号：11）、及びヒト化hu504Kグラフト変異体重鎖（図1B，配列番号：15）、及び変異体hu504-5、hu504-16、及びhu504-32（配列番号：25）については図1B（重鎖）。

【図2】図2は実施例1に記載されたフェーズII臨床試験の試験スキームを示す。

【図3】図3は、実施例2に記載された腸生検においてベースラインベータ7遺伝子発現レベル（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化された、プラセボ（点描バー）、100mg/用量のエトロリズマブ（ハッチングバー）、又は300mg/用量のエトロリズマブ（白抜きバー）で治療された患者の10週での寛解（A）、10週での粘膜治癒（B）、又は10週での臨床応答（C）を示す割合を示す。

【図4】図4は、実施例2に記載された腸生検においてベースラインCD3イプシロン遺伝子発現レベル（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化され、プラセボ（点描バー）、100mg/用量のエトロリズマブ（ハッチングバー）、又は300mg/用量のエトロリズマブ（白抜きバー）で治療された患者の10週での寛解（A）、10週での粘膜治癒（B）、又は10週での臨床応答（C）を示す割合を示す。

【図5】図5は、実施例2に記載されたIBD患者（白抜きドット）及び健常なコントロール（中実ドット）双方において、qPCRによって検出された末梢血中のベータ7遺伝子発現レベルに対するCD45+細胞、CD3+細胞及びCD19+細胞におけるFACS分析によって検出されたベータ7発現レベルの相関を示す。

【図6】図6は、実施例2に記載された末梢血においてベースラインベータ7遺伝子発現レベル（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化された、プラセボ（点描バー）、100mg/用量のエトロリズマブ（ハッチングバー）、又は300mg/用量のエトロリズマブ（白抜きバー）で治療された患者の10週での寛解（A）、10週での粘膜治癒（B）、又は10週での臨床応答（C）を示す割合を示す。

【図7A-B】図7は、実施例2に記載された免疫組織化学的検査又はqPCRによって決定された腸生検におけるインテグリンアルファE発現を示す。（A）非IBD患者（上段パネル）、クローン病患者（中段パネル）、又はUC患者（底部パネル；それぞれの場合、陽性染色領域が最も暗い）から得られた結腸（左側パネル）又は回腸（右側パネル）

10

20

30

40

50

組織におけるアルファE免疫組織化学検査；(B)非IBD患者、UC患者、及びCD患者からの示された結腸、回腸、又は空腸組織における全細胞の割合としてのアルファE + 細胞のコンピュータ自動カウント。

【図7C - D】図7は、実施例2に記載された免疫組織化学的検査又はqPCRによって決定された腸生検におけるインテグリンアルファE発現を示す。(C)非IBD、UC結腸及び腸切除術を受けたことが示されているクローン病患者の結腸、回腸又は空腸からの全層生検におけるGAPDHに対するアルファE遺伝子発現；(D)スクリーニングでフェーズIIエトロリズマブ治験に登録され、TNFナীব(グラフの左側)又はTNF - IR(グラフの右側)として同定された患者から得られた生検組織中の全細胞の割合としてのアルファE + 細胞のコンピュータ自動カウント、点描ドット：エトロリズマブ寛解者、白抜きドット：エトロリズマブ非寛解者、黒いドット：プラセボ、破線は中央値を示す。

10

【図7E - G】図7は、実施例2に記載された免疫組織化学的検査又はqPCRによって決定された腸生検におけるインテグリンアルファE発現を示す。(E)フェーズIIエトロリズマブ治験に登録された患者からの生検のスクリーニングにおける例示的アルファE染色、左側パネル：アルファE高患者、右側パネル：アルファE低患者；それぞれの場合、陽性染色領域は最も暗い；(F)スクリーニングでフェーズIIエトロリズマブ治験に登録され、TNFナীব(グラフの左側)又はTNF - IR(グラフの右側)として同定された患者から得られた生検組織中のGAPDH発現に対するアルファE遺伝子発現、点描ドット：エトロリズマブ寛解者、白抜きドット：エトロリズマブ非寛解者、黒いドット：プラセボ、破線は中央値を示す；(G)IHC(水平軸)によって測定されたアルファEタンパク質発現に対するqPCR(垂直軸)によって測定されたアルファE遺伝子発現の関係を示すグラフ；点描ドット：エトロリズマブ寛解者、白抜きドット：エトロリズマブ非寛解者、破線は中央値を示す。

20

【図8】図8は、実施例2に記載されたように、腸生検においてベースラインアルファE遺伝子発現レベル(低、中間値未満対高、中間値以上)によって層別化され、プラセボ(点描バー)、100mg/用量のエトロリズマブ(ハッチングバー)、又は300mg/用量のエトロリズマブ(白抜きバー)で治療され、10週で寛解で(A)、10週で粘膜治癒を示し(B)、又は10週で臨床応答(C)を示すか、あるいは腸生検においてベースラインアルファEタンパク質発現(低、中間値未満対高、中間値以上)によって層別化され、プラセボ(点描バー)、100mg/用量のエトロリズマブ(ハッチングバー)、又は300mg/用量のエトロリズマブ(白抜きバー)で治療され、10週で寛解で(D)、10週で粘膜治癒を示し(E)、又は10週で臨床応答(F)を示す、患者の割合(パーセント)を示す。

30

【図9】図9は、実施例2に記載されたように、腸生検においてベースラインアルファE遺伝子発現レベル(低、中間値未満対高、中間値以上)によって層別化され、プラセボ(点描バー)、100mg/用量のエトロリズマブ(ハッチングバー)、又は300mg/用量のエトロリズマブ(白抜きバー)で治療され、10週で寛解で(A)、10週で粘膜治癒を示し(B)、又は10週で臨床応答(C)を示すか、あるいは腸生検においてベースラインアルファEタンパク質発現(低、中間値未満対高、中間値以上)によって層別化され、プラセボ(点描バー)、100mg/用量のエトロリズマブ(ハッチングバー)、又は300mg/用量のエトロリズマブ(白抜きバー)で治療され、10週で寛解で(D)、10週で粘膜治癒を示し(E)、又は10週で臨床応答(F)を示す、TNFナীব患者の割合(パーセント)を示す。

40

【図10】図10は、実施例2に記載されたように、スクリーニング時に末梢血中のベースラインアルファE遺伝子発現レベル(低、中間値未満対高、中間値以上)によって層別化され、プラセボ(点描バー)、100mg/用量のエトロリズマブ(ハッチングバー)、又は300mg/用量のエトロリズマブ(白抜きバー)で治療され、10週で寛解で(A)、10週で粘膜治癒を示し(B)、又は10週で臨床応答(C)を示すか、あるいは1日目に末梢血中のアルファE遺伝子発現(低、中間値未満対高、中間値以上)によって

50

層別化され、プラセボ（点描バー）、100mg/用量のエトロリズマブ（ハッチングバー）、又は300mg/用量のエトロリズマブ（白抜きバー）で治療され、10週で寛解で（D）、10週で粘膜治癒を示し（E）、又は10週で臨床応答（F）を示す、患者の割合（パーセント）を示す。

【図11】図11は、実施例2に記載されたように、スクリーニング時に末梢血中のベースラインアルファE遺伝子発現レベル（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化され、プラセボ（点描バー）、100mg/用量のエトロリズマブ（ハッチングバー）、又は300mg/用量のエトロリズマブ（白抜きバー）で治療され、10週で寛解で（A）、10週で粘膜治癒を示し（B）、又は10週で臨床応答（C）を示すか、あるいは1日目に末梢血中のアルファE遺伝子発現（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化され、プラセボ（点描バー）、100mg/用量のエトロリズマブ（ハッチングバー）、又は300mg/用量のエトロリズマブ（白抜きバー）で治療され、10週で寛解で（D）、10週で粘膜治癒を示し（E）、又は10週で臨床応答（F）を示す、TNFナীব患者の割合（パーセント）を示す。

10

【図12】図12は実施例1に記載されたフェーズII非盲検継続投与臨床試験の試験スキームを示す。

【図13】図13は、腸生検においてベースラインアルファE遺伝子発現（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化され、臨床的寛解（A）であるか又は臨床応答（B）を示し；又は腸生検においてベースラインアルファEタンパク質発現（低、中間値未満対高、中間値以上）によって層別化され、臨床的寛解（C）であるか又は臨床応答（D）を示し；又は末梢血中のアルファE遺伝子発現によって層別化され、臨床的寛解（E）であるか又は臨床応答（F）を示す非盲検継続投与試験からのTNF-IR患者のパーセントを示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0035】

別段の定めがある場合を除き、ここで使用される技術的及び科学的用語は、この発明が属する分野の通常の技術者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。Singleton等、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2版、J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994)、及びMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4版、John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992)は、当業者に本出願において使用されている多くの用語に対する一般的なガイドを提供する。

30

【0036】

所定の定義

この明細書を解釈する目的には、次の定義が適用され、適切な場合には、単数で使われる用語は複数をまた含み、その逆もある。以下に記載される何れかの定義が、出典明示によりここに援用される何れかの文献と矛盾している場合には、以下に記載の定義が優先する。

【0037】

この明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」及び「the」は、文脈が明らかに他の定義を示していない限り、複数形を含む。よって、例えば「a protein」との記載は複数のタンパク質を含み；「a cell」との記載は細胞の混合物を含む等々である。

40

【0038】

明細書及び添付の特許請求の範囲において与えられる範囲は、端点及び端点間の全ての点の双方を含む。従って、例えば2.0~3.0の範囲は、2.0、3.0、及び2.0及び3.0の間の全ての点を含む。

【0039】

「治療」、「治療する」及びその文法的変形語は、治療される個体又は細胞の自然の経過を変化させる試みにおける臨床的介入を意味し、予防のため、又は臨床病理経過中に実施することができる。治療の所望する効果には、疾患の発症又は再発の予防、症状の緩和

50

、疾病の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減少、疾病の進行速度の低減、病状の回復又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。一部の実施態様では、本発明の抗体は、疾病又は疾患の進行を遅延化させるために使用される。

【0040】

「治療法（治療レジメン）」は、第2の医薬の添加を伴うか又は伴わない、投与量、投与頻度、又は治療期間の組み合わせを意味する。

【0041】

「有効な治療法（治療レジメン）」は、治療を受ける患者に恩恵のある応答を提供する治療法を意味する。

【0042】

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

【0043】

ここで使用される場合、「完全寛解」又は「CR」は、炎症の全兆候の消失又は治療への応答による寛解を意味する。これは必ずしも疾患が治癒したことを意味しない。

【0044】

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

【0045】

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

【0046】

ここで使用される場合、「非応答」又は「応答の欠如」又は類似の用語は、インテグリンベータ7アンタゴニストでの治療に対して完全寛解、一部寛解、又は有益な応答がないことを意味する。

【0047】

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

【0048】

ここで使用される「試料」又は「試験試料」なる用語は、例えば物理的、生化学的、化学的及び/又は生理学的特徴に基づいて、特徴付けられ及び/又は同定される、細胞性及び/又は他の分子実体を含んでいる対象とする被検体から得られるか又は被検体由来の組成物を指す。一実施態様では、この定義には、血液及び生物起源の他の液体試料、及び生検試料などの組織試料又は組織培養物又はこれら由来の細胞が包含される。組織試料の供給源は、新鮮な、凍結された及び/又は保存されていた臓器や組織試料又は生検もしくは吸引による固形組織；血液又は任意の血液構成成分；体液；及び被検体の妊娠期又は発生の任意の時期の細胞ないし血漿であってもよい。「試料」又は「試験試料」なる用語には、試薬による処理、可溶化又は特定成分、例えばタンパク質又はポリヌクレオチドの濃縮、又は切断のための半固形又は固形マトリックスへの包埋といった、調達後に何れかの

10

20

30

40

50

方法で操作されている生物学的試料が含まれる。ここでの目的では、組織試料の「切片」は、組織試料の一部又は断片、例えば、組織の薄切り又は組織から切り取られた細胞を意味する。試料は、限定されるものではないが、全血、血液誘導細胞、血清、血漿、リンパ液、滑液、細胞抽出物、及びそれらの組み合わせを含む。一実施態様では、試料は臨床試料である。他の実施態様では、試料は診断アッセイにおいて使用される。

【0049】

ここで使用される「基準試料」は比較目的に使用される任意の試料、標準、又はレベルを意味する。一実施態様では、基準試料は同じ被検体又は患者の体の健常な及び/又は非罹患部分から得られる。他の実施態様では、基準試料は同じ被検体又は患者の体の未治療組織及び/又は細胞から得られる。更に他の実施態様では、基準試料は被検体又は患者ではない個体の健常な及び/又は非罹患部分から得られる。更に他の実施態様では、基準試料は被検体又は患者ではない個体の未治療組織及び/又は細胞部分から得られる。

10

【0050】

「ベータ7インテグリンアンタゴニスト」又は「ベータ7アンタゴニスト」は一又は複数の生物学的活性を阻害する任意の分子又はベータ7インテグリンのその関連する一又は複数の分子との結合の阻害するものを意味する。本発明のアンタゴニストは、限定されるものではないが、アルファ4インテグリンサブユニットとの関連、アルファEインテグリンサブユニットとの関連、アルファ4ベータ7インテグリンのMAdCAM、VCAM-1又はフィブロネクチンへの結合、及びアルファEベータ7インテグリンのE-カドヘリンへの結合を含む、ベータ7関連効果の一又は複数の態様を調節するために使用することができる。これらの効果は、ベータ7サブユニット又はアルファ4ベータ7又はアルファEベータ二量体インテグリンへのリガンド結合の阻害を含む任意の生物学的に関連する機構によるか、及び/又は二量体インテグリンの形成が阻害されるようにアルファ及びベータインテグリンサブユニット間の結合を破壊することによって調節され得る。本発明の一実施態様では、ベータ7アンタゴニストは抗ベータ7インテグリン抗体（又は抗ベータ7抗体）である。一実施態様では、抗ベータ7インテグリン抗体は、ヒト化抗ベータ7インテグリン抗体、より具体的には組換えヒト化モノクローナル抗ベータ7抗体（又はrhuma beta 7）である。幾つかの実施態様では、本発明の抗ベータ7抗体は、アルファEインテグリンサブユニットとのベータ7サブユニットの結合、アルファ4インテグリンサブユニットとの関連、アルファ4ベータ7インテグリンのMAdCAM、VCAM-1又はフィブロネクチンへの結合及びアルファEベータ7インテグリンのE-カドヘリンへの結合を阻害又は阻止する抗インテグリンベータ7アンタゴニスト抗体である。

20

30

【0051】

「ベータ7サブユニット」又は「7サブユニット」とはヒト7インテグリンサブユニットを意味する（Erle等、(1991) J. Biol. Chem. 266:11009-11016）。ベータ7サブユニットはアルファ4インテグリンサブユニット、例えばヒト4サブユニットと結合する（Kilger及びHolzmann (1995) J. Mol. Biol. 73:347-354）。アルファ4ベータ7インテグリンは成熟リンパ球の大部分、並びに胸腺細胞、骨髄細胞及び肥満細胞の一部集団において発現されることが報告されている。（Kilshaw及びMurant (1991) Eur. J. Immunol. 21:2591-2597; Gurish等、(1992) 149: 1964-1972; 及びShaw, S. K. and Brenner, M. B. (1995) Semin. Immunol. 7:335）。ベータ7サブユニットはまたアルファEサブユニット、例えばヒトアルファEインテグリンサブユニットとも結合する（Cepek, K. L.等 (1993) J. Immunol. 150:3459）。アルファEベータ7インテグリンは腸上皮内リンパ球（IEL）上に発現される（上掲のCepek, K. L. (1993)）。

40

【0052】

「アルファEサブユニット」又は「アルファEインテグリンサブユニット」又は「Eサブユニット」又は「Eインテグリンサブユニット」又は「CD103」とは上皮内リンパ球上のベータ7インテグリンに結合することが見出されたインテグリンサブユニットを意味し、このアルファEベータ7インテグリンはE-カドヘリンを発現する腸上皮へのIELの結合を媒介する（Cepek, K. L.等 (1993) J. Immunol. 150:3459; Shaw, S. K.

50

及びBrenner, M. B. (1995) *Semin. Immunol.* 7:335)。

【0053】

「MAdCAM」又は「MAdCAM-1」は本発明の文脈においては互換的に使用され、タンパク質粘膜炎細胞接着分子-1を意味し、これは短い細胞質テール部、膜貫通領域及び3つの免疫グロブリン様ドメインよりなる細胞外配列を含む一本鎖ポリペプチドである。マウス、ヒト及びマカクのMAdCAM-1のcDNAがクローニングされている(Briskin等, (1993) *Nature*, 363:461-464; Shyjan等, (1996) *J. Immunol.* 156:2851-2857)。

【0054】

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

10

【0055】

「CD45」はプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)ファミリーのタンパク質を意味する。PTPは細胞増殖、分化、分裂周期、及び癌化を含む種々の細胞過程を制御するシグナル分子であることが知られている。このPTPは細胞外ドメイン、1つの膜貫通セグメント及び2つのタンデムな細胞室内触媒ドメインを含み、よってレセプタータイプのPTPに属する。この遺伝子は造血細胞において特異的に発現される。このPTPはT細胞及びB細胞抗原レセプターシグナル伝達の必須の調節因子であることが知られている。それは抗原レセプター複合体の構成要素との直接相互作用によるか又は抗原レセプターシグナル伝達に必要な種々のSrcファミリーキナーゼを活性化することによって機能する。このPTPはまたJAKキナーゼを抑制し、よってサイトカインレセプターシグナル伝達の調節因子として機能する。別のアイソフォームをコードする、この遺伝子の4つの選択的スプライシング転写変異体が報告されている。(Tchilian EZ, Beverley PC (2002). "CD45 in memory and disease." *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 50 (2): 85-93. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S等 (2004). "Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation." *Leuk. Lymphoma* 44 (9):1477-81.

20

【0056】

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

30

【0057】

「腸ホーミングリンパ球」は、腸リンパ節及び組織に選択的にホーミングするが、末梢リンパ節及び組織にホーミングしないことを特徴とするリンパ球のサブユニットを意味する。このリンパ球のサブグループは、限定されるものではないが、CD4、CD45RA及びベータ7の組み合わせを含む複数の細胞表面分子の組み合わせのユニークな発現パターンによって特徴付けられる。典型的には、末梢血CD4⁺リンパ球の少なくとも2つのサブユニットはCD45R及びベータ7、CD45RA⁻7^{high}、及びCD45RA⁻7^{low}CD4⁺細胞のマーカーに基づいて細分される。CD45RA⁻7^{high}CD4⁺細胞は腸リンパ節及び組織に選択的にホーミングする(Rott等1996; Rott等1997; Williams等1998; Rose等1998; Williams及びButcher 1997; Butcher等1999)。腸ホーミングリンパ球は従ってフローサイトメトリーアッセイにおいてCD45RA⁻7^{high}CD4⁺として同定されるリンパ球の明確なサブユニットである。このリンパ

40

50

球の群を同定する方法は当該分野でよく知られている。

【 0 0 5 8 】

表面マーカーに関してここで使用される場合、記号「 + 」は細胞表面マーカーのポジティブな発現を示す。例えば、CD4⁺リンパ球はその細胞の表面上に発現するCD4を有するリンパ球の集団を示す。

【 0 0 5 9 】

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

【 0 0 6 0 】

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

【 0 0 6 1 】

「炎症性腸疾患」又は「IBD」は本明細書においては互換的に使用され、炎症及び/又は潰瘍を誘発する腸の疾患を指し、限定しないが、クローン病及び潰瘍性大腸炎を包含する。

【 0 0 6 2 】

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

【 0 0 6 3 】

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

【 0 0 6 4 】

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

【 0 0 6 5 】

10

20

30

40

50

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

【0066】

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

10

【0067】

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

【0068】

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

20

【0069】

ここで使用される場合、「患者」なる用語は治療が望まれる任意の単一の被験体を指す。所定の実施態様では、ここでの患者はヒトである。

【0070】

ここでの「被験体」は典型的にはヒトである。所定の実施態様では、被験体は非ヒト哺乳動物である。例示的な非ヒト哺乳動物は、実験動物、家畜、ペット、スポーツ、及び畜産動物、例えばマウス、ネコ、イヌ、ウマ及びウシを含む。典型的には、被験体は、例えば胃腸炎症性障害の治療のような治療に対して適格性がある。

【0071】

「抗体」及び「イムノグロブリン」なる用語は、互換性をもって広義の意味で使われ、モノクローナル抗体（例えば完全長又はインタクトなモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体（例えば所望の生物学的活性を示す限り、二重特異性抗体）を含み、（本明細書で更に詳細に記載される）所定の抗体断片がまた含まれる。抗体はヒト、ヒト化及び/又は親和性成熟したものであり得る。

30

【0072】

「抗体断片」はインタクトな抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、インタクトな抗体に存在する場合にその一部に通常伴う機能の少なくとも一、典型的にはその殆ど又は全てを保持するのが好ましい。一実施態様では、抗体断片はインタクトな抗体の抗原結合部位を含み、よって抗原結合能を保持する。他の実施態様では、抗体断片は、

40

【0073】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる自然に生じる可能性がある突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的で

50

あり、単一の抗原に対するものである。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的には含む一般的なポリクローナル抗体調製物とは異なり、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基に対するものである。

【 0 0 7 4 】

ここでのモノクローナル抗体は、特に、重鎖及びノ又は軽鎖の一部が特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列に一致するか又は類似し、鎖の残りが他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列に一致するか又は類似する「キメラ」抗体、並びに所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片を含む（米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号；及び Morris on 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984)）。

10

【 0 0 7 5 】

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

20

【 0 0 7 6 】

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

30

40

【 0 0 7 7 】

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

50

アミノ酸配列の残基を得るのに十分な程度まで、あるいは(3)クーマシーブルーあるいは銀染色を用いた還元又は非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性まで、精製されるであろう。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツの抗体が含まれるが、これは抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないからである。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製されるであろう。

【0078】

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

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

【0079】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、VLの24-36又は24-34(L1)、46-56又は49-56又は50-56又は52-56(L2)及び89-97(L3)と、VHの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号が付される。

【0080】

フレームワーク」又は「FR」残基は、ここに定められるように、高頻度可変領域残基以外のその可変ドメイン残基である。

【0081】

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

【0082】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の改変を有する抗体であって、そのような改変を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が向上している。所定の実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル又は更にはピコモル単位の親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生

産される。Marks等、Bio/Technology, 10:779-783(1992)は、V_HドメインとV_Lドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。C D R及び/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas等、Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等、Gene, 169:147-155 (1995); Yelton等、J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson等、J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995); 及びHawkins等、J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992)に記載されている。

【0083】

ここで使用される「実質的に類似」又は「実質的に同じ」なる句は、当業者が2つの数値（一般的には、本発明の抗体に関連するものと参照/比較抗体に関連する他のもの）の差異に、該値によって測定される生物学的性質上僅かに又は全く生物学的及び/又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が十分に高く類似していることを意味する。

10

【0084】

一般的に「結合親和性」は、分子（例えば抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合的な相互作用の合計強度を意味する。特に明記しない限り、ここでは、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば抗体と抗原）間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数（K_d）として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に知られた一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は一般的に抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は一般的に抗原により早くより長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で知られており、それらの何れかを本発明のために用いることができる。

20

【0085】

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

30

【0086】

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

40

【0087】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この領域は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この配置において、各可変ドメインの3つの高頻度可変領域が相互に作用してV_H-V_L二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つの高頻度可変領域が抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な3つの高頻度可変領域のみを含むFvの半分）でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

50

【0088】

またF a b断片は、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(C H 1)を有する。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖C H 1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でF a b断片とは異なる。F a b'-S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持しているF a b'に対するここでの命名である。F (a b')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するF a b'断片の対として生産された。抗体断片の他の化学結合もまた知られている。

【0089】

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

10

【0090】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられうる。免疫グロブリンには5つの主なクラス: I g A、I g D、I g E、I g G及びI g Mがあり、更にこれらの幾つかは、例えばI g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及びI g A₂等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、
、
、
、
及びμと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、一般に、例えばAbbas等 Cellular and Mol. Immunology, 4版 (W .B. Saunders, Co., 2000)に記載されている。抗体は、抗体と一又は複数の他のタンパク質又はペプチドとの共有的又は非共有的結合によって形成される大きな融合分子の一部であってもよい。

20

【0091】

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

【0092】

ここでの目的の「ネイキッド抗体」は、細胞障害性部分又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体である。

【0093】

ここでの「F c領域」なる用語は、天然配列F c領域及び変異形F c領域を含む、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のF c領域の境界は変化するかも知れないが、通常、ヒトI g G重鎖F c領域はC y s 2 2 6の位置又はP r o 2 3 0からの位置のアミノ酸残基からF c領域のカルボキシル末端まで伸長すると定義される。F c領域のC末端リジン(E U番号付けシステムによれば残基4 4 7)は、例えば、抗体の産生又は精製中に、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組み換え遺伝子操作することによって取り除かれてもよい。従って、インタクトな抗体の組成物は、全てのK 4 4 7残基が除去された抗体群、K 4 4 7残基が除去されていない抗体群、及びK 4 4 7残基を有する抗体と有さない抗体の混合物を含む抗体群を含みうる。

30

【0094】

特に明記しない限り、ここでの免疫グロブリン重鎖の残基の番号付けは、出典明示によってここに明示的に援用されるKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (19 91)のE Uインデックスのものである。「K a b a tのE Uインデックス」はヒトI g G 1 E U抗体の残基番号を指す。

40

【0095】

「機能的F c領域」は、天然配列F c領域の「エフェクター機能」を有する。例示的な「エフェクター機能」には、C 1 q結合、補体依存性細胞障害作用(C D C)、F cレセプター結合、抗体依存性細胞媒介性細胞障害作用(A D C C)、食作用、細胞表面レセプター(例えばB細胞レセプター; B C R)の下方制御などが含まれる。そのようなエフェ

50

クター機能は、通常、F c領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変ドメイン）と組み合わせることを必要とし、例えばここに開示される様々なアッセイを使用して評価される。

【0096】

「天然配列のF c領域」は、天然に見出されるF c領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を包含する。天然配列のヒトF c領域は、天然配列のヒトI g G 1 F c領域（非A及びAアロタイプ）；天然配列のヒトI g G 2 F c領域；天然配列のヒトI g G 3 F c領域；及び天然配列のヒトI g G 4 F c領域；並びに、これらの自然に生じる変異体が含まれる。

【0097】

「変異体F c領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾により、天然配列のF c領域とは異なるアミノ酸配列を含む。所定の実施態様では、変異体F c領域は、天然配列のF c領域もしくは親ポリペプチドのF c領域と比較した場合、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば、天然配列のF c領域又は親のポリペプチドのF c領域におよそ1からおよそ10のアミノ酸置換、好ましくはおよそ1からおよそ5のアミノ酸置換を有する。所定の実施態様では、ここでの変異体F c領域は、天然配列のF c領域及び/又は親ポリペプチドのF c領域と、少なくともおよそ80%の相同性、又は少なくともおよそ90%の相同性、又は少なくともおよそ95%の相同性を有するであろう。

【0098】

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、インタクトな抗体に様々な「クラス」をあてがうことができる。インタクトな抗体の5種の主要なクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g Mがあり、これらの幾つかは更に「サブクラス」（アイソタイプ）、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、及びI g A 2に分けることができる。抗体の異なったクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なったクラスのサブユニット構造及び3次元構造はよく知られている。

【0099】

「抗体依存性細胞媒介細胞障害活性」及び「ADCC」は、F cレセプター（F c R）（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）を発現する非特異性細胞障害性細胞が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介反応を意味する。ADCCを媒介する第一の細胞であるNK細胞はF c R I I Iのみを発現するのに対し、単球はF c I、F c I I及びF c I I Iを発現する。造血細胞上のF c R発現はRavetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92(1991)の464ページの表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するために、例えば米国特許第5500362号又は5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイが実施されうる。このアッセイで使用できるエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む。他に、又は更に対象とする分子のADCC活性は、例えばClynes等PNAS(USA)95:652-656(1998)に記載されている様な哺乳動物のモデルでインビボの評価がされうる。

【0100】

「ヒトエフェクター細胞」は、一つ以上のF c Rを発現する白血球であり、エフェクター機能を果たす。所定の実施態様では、細胞は、少なくともF c R I I Iを発現し、ADCCエフェクター機能を果たす。ADCCを媒介するヒト白血球の例は、末梢血単核細胞（PBMC）、ナチュラルキラー（NK）細胞、単球、細胞傷害性T細胞及び好中球を含む。エフェクター細胞は、その天然源から、例えばここに記載の血液又はPBMCから単離されうる。

【0101】

「F cレセプター」又は「F c R」という用語は、抗体のF c領域に結合するレセプターを記述するために使用される。所定の実施態様では、F c Rは、天然配列ヒトF c Rである。更に、F c Rは、I g G抗体（レセプター）に結合するものであり、F c R I、F c R I I及びF c R I I Iサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプター

10

20

30

40

50

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

【0102】

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

【0103】

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

【0104】

「親和性成熟」抗体は、その1つ以上のCDRに1つ以上の改変を有する抗体であって、そのような改変を有しない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性が向上している。所定の実施態様では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対して、ナノモル又は更にはピコモル単位の親和性を有する。親和成熟抗体は、当技術分野において既知の方法により生産できる。Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992)は、V_HドメインとV_Lドメインのシャフリングによる親和成熟を開示している。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダムな突然変異誘発が、Barbas等, Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813(1994)；Schier等, Gene, 169:147-155 (1995)；Yelton等, J. Immunol., 155:1994-2004 (1995)；Jackson等, J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995)；及びHawkins等, J. Mol. Biol.,

10

20

30

40

50

226:889-896 (1992)に開示されている。

【0105】

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

10

【0106】

ここでの「グリコシル化変異形」抗体は、主要種の抗体に付着した一又は複数の炭水化物部分と異なる一又は複数の接着した炭水化物部分を有する抗体である。ここでのグリコシル化変異体の例には、抗体のFc領域に付着した、G0オリゴ糖構造の代わりに、G1又はG2オリゴ糖構造を有する抗体、抗体の1又は2つの軽鎖に接着した1又は2の炭水化物部分を有する抗体、抗体の1又は2つの重鎖に接着する炭水化物のない抗体など、及びグリコシル化変更の組合せを有する抗体が含まれる。抗体がFc領域を有する場合、オリゴ糖構造は、例えば、残基299において（298、残基のEu番号付け）抗体の一又は二の重鎖に結合してもよい。

20

【0107】

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

30

【0108】

「サイトカイン」という用語は、一つの細胞集団から放出されるタンパク質であって、他の細胞に対して細胞間メディエータとして作用するものの包括的な用語である。このようなサイトカインの例としては、リンフォカイン、モノカイン、及び伝統的なポリペプチドホルモンを挙げることができる。サイトカインには、成長ホルモン、例えばヒト成長ホルモン、N-メチオニルヒト成長ホルモン、及びウシ成長ホルモン；副甲状腺ホルモン；チロキシン；インスリン；プロインスリン；リラクシン；プロリラクシン；卵胞刺激ホルモン（FSH）のような糖タンパク質ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン（TSH）、及び黄体形成ホルモン（LH）；肝臓成長因子；繊維芽細胞増殖因子；プロラクチン；胎盤ラクトゲン；腫瘍壊死因子-及び-；ミューラ-阻害物質；マウス性腺刺激ホルモン関連ペプチド；インヒピン；アクチピン；血管内皮成長因子；インテグリン；トロンボポエチン（TPO）；NGF-等の神経成長因子；血小板成長因子；TGF-あるいはTGF-のようなトランスフォーミング成長因子（TGF）；インスリン様成長因子I及びII；エリスロポイエチン（EPO）；オステオインダクティブ因子；インターフェロン、のようなインターフェロン；マクロファージCSF（M-CSF）のようなコロニー刺激因子（CSF）；顆粒球マクロファージCSF（GM-CSF）及び顆粒球CSF（G-CSF）；IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12等のインターロイキン（IL）；腫瘍壊死因子、例えばTNF-又はTNF-；及びLIF及びキットリガンド（KL）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。ここで使用され

40

50

る場合、サイトカインなる用語は天然源由来あるいは組換え細胞培養由来のタンパク質及び天然配列サイトカインの生物的に活性な等価物を含む。

【0109】

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

【0110】

ここで使用される「寛解させる」又は「寛解」なる用語は、異常又は症状を含む状態、疾患、障害、又は表現型の低下、低減又は除去を指す。

【0111】

疾患又は障害(例えば炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病)の「症状」は、何れかの病的兆候又は被験体が経験する構造、機能、又は感覚における正常からの逸脱及び疾患の兆候である。

【0112】

10

20

30

40

50

「治療的に有効な量」なる発現は、疾患又は障害（例えば炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎又はクローン病）を予防、寛解、又は治療するのに有効な量を指す。例えば、抗体の「治療的に有効な量」は、特定の疾患又は障害を予防、寛解、又は治療するのに有効な抗体の量を指す。同様に、抗体と第二化合物の組合せの「治療的に有効な量」は、組合せにおいて特定の疾患又は障害を予防、寛解、又は治療するのに有効な抗体の量及び第二化合物の量を指す。

【0113】

2つの化合物「の組合せ」なる用語は、必ずしも化合物が互いに混合されて投与されることを意味しない。従って、このような組合せによる治療又はその使用は、化合物の混合又は化合物の別々の投与を包含し、同じ日又は異なる日の投与を含む。従って、「組合せ」なる用語は、2以上の化合物が治療のために、個別に又は互いに混合されて使用されることを意味する。抗体及び第二化合物が例えば組合せにおいて被験体に投与される場合、抗体及び第二化合物が被験体に個別に又は混合されて投与されるかに関わらず、抗体は、第二化合物も被験体に存在する時に、被験体に存在する。所定の実施態様では、抗体以外の化合物は抗体より前に投与される。所定の実施態様では、抗体以外の化合物は抗体の後に投与される。

10

【0114】

ここでの目的では、「腫瘍壊死因子 - アルファ (TNF - アルファ)」は、Pennica等, Nature, 312:721 (1984)又はAggarwal等, JBC, 260:2345 (1985)に記載されるアミノ酸配列を含んでなるヒトTNF - アルファ分子を指す。

20

【0115】

「TNF - アルファ阻害剤」はここでは、一般的にはTNF - アルファに結合し、その活性を中和することを通してTNF - アルファの生物学的機能のある程度阻害する物質である。ここにおいて特に考えられるTNF阻害剤の例は、エタネルセプト (ENBRELLR)、インフリキシマブ (REMICADEP)、アダリムマブ (HUMIRAR)、ゴリムマブ (SIMPONITM)、及びセルトリズマブペゴル (CIMZIAR)である。

【0116】

「副腎皮質ステロイド」は、天然に生じる副腎皮質ステロイドの効果を模倣するかあるいは増大するステロイドの一般的な化学構造を有する幾つかの合成又は天然に生じる物質の何れか一つを指す。合成副腎皮質ステロイドの例として、プレドニゾン、プレドニゾン (メチルプレドニゾンを含む)、デキサメサゾン、トリアムシノロン及びベタメサゾンが含まれる。

30

【0117】

「アンタゴニスト」は、特定の又は特定されたタンパク質の活性、例えばリガンドの場合は一又は複数の受容体へのその結合、又は受容体の場合は一又は複数のリガンドへの結合を中和、遮断、阻害、抑制、低減又は干渉することが可能な分子を指す。アンタゴニストは、抗体及びその抗原結合断片、タンパク質、ペプチド、糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、多糖、オリゴ糖、核酸、生体有機分子、ペプチド模倣物、薬物及びその代謝物、転写及び翻訳コントロール配列などを含む。アンタゴニストはまた、小分子阻害剤であるタンパク質、及び融合タンパク質、タンパク質に特異的に結合しその標的へのその結合を隔絶する受容体分子及び誘導體、タンパク質のアンタゴニスト変異体、タンパク質に対するアンチセンス分子、RNAアプタマー、及びタンパク質に対するリボザイムを含む。

40

【0118】

「自己注射装置」は、例えば患者又は在宅介護人による、治療剤の自己投与のための医療装置を指す。自己注射装置は、自動注射装置及び自己投与のための他の装置を含む。

【0119】

ここで使用される「オリゴヌクレオチド」とは、少なくとも約7以上のヌクレオチド長で、約250未満のヌクレオチド長である短い一本鎖ポリヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドは合成であってもよい。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド

50

」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上の説明はオリゴヌクレオチドに等しく完全に適用可能である。

【 0 1 2 0 】

「プライマー」なる用語は、核酸にハイブリダイズすることができ、一般的に遊離 3' - OH 基を提供することによって、相補的核酸のハイブリダイゼーションを可能にする一本鎖ポリヌクレオチドを意味する。

【 0 1 2 1 】

「増幅」なる用語は、参照核酸配列又はその相補鎖の一又は複数のコピーを生産するプロセスのことである。増殖は、線形的又は指数関数的（例えば PCR）でありうる。「コピー」は、鋳型配列に対する完全な配列相補性又は同一性を必ずしも意味するものではない。例えば、コピーは、ヌクレオチドアナログ、例えばデオキシイノシン、意図的な配列変化（例えば鋳型に完全には相補的ではないがハイブリダイズすることができる配列を含んでなるプライマーにより導入される配列変化）及び/又は増幅中に起こる配列エラーを含みうる。

【 0 1 2 2 】

「検出」なる用語は、直接的及び間接的な検出を含む検出する任意の手段を含む。

【 0 1 2 3 】

「上昇した発現」又は「上昇したレベル」は、自己免疫疾患、例えば IBD などに罹患していない個体（単数又は複数）などの対照に対して、又は事前に確立された閾値又はカットオフ値に対して、又は患者及び/又は被験体の集団の中央値に対しての、患者における mRNA 又はタンパク質の増加した発現を指す。

【 0 1 2 4 】

「低い発現」又は「低い発現レベル」は、自己免疫疾患、例えば IBD などに罹患していない個体（単数又は複数）などの対照に対して、又は事前に確立された閾値又はカットオフ値に対して、又は患者及び/又は被験体の集団の中央値に対しての、患者における mRNA 又はタンパク質の減少した発現を指す。

【 0 1 2 5 】

「マルチプレックス PCR」なる用語は、単一反応で二以上の DNA 配列を増幅する目的のため、一を越えるプライマーセットを使用して単一供給源（例えば患者）から得られた核酸について実施される単一 PCR 反応を指す。

【 0 1 2 6 】

ここで使用される「バイオマーカー」なる用語は、患者の表現型の指標、例えば、病理学的状態又は治療薬に対する可能な応答性を指し、それらは患者の生物学的試料中において検出されうる。バイオマーカーは、限定されないが、DNA、RNA、タンパク質、炭水化物、又は糖脂質ベースの分子マーカーを含む。

【 0 1 2 7 】

「診断」なる用語は、ここでは、分子又は病理学的状態、疾患又は症状の同定又は分類を意味するために使用される。例えば、「診断」は IBD の特定のタイプ、例えば UC 又はクローン病の特定を意味する。「診断」はまた、例えば病理組織学的基準又は分子的特徴（例えば、特定の遺伝子の一つ又は組み合わせあるいは該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現によって特徴付けられるサブタイプ）による、IBD の特定のサブタイプの特定を指しうる。

【 0 1 2 8 】

「診断補助」なる用語は、ここでは、特定のタイプの症状又は状態の存在、又は性質に関する臨床的決定を行う際に支援する方法を指す。例えば、IBD の診断を支援する方法は、個体からの生物学的試料中における特定の遺伝子の発現を測定することを含みうる。

【 0 1 2 9 】

「予後」なる用語は、ここでは、IBD のような自己免疫疾患の自己免疫疾患起因の疾患徴候の可能性の予測を意味するために使用される。

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

50

「予測」なる用語は、ここでは、患者が薬剤（治療剤）又は一連の薬剤に対して有利又は不利に应答するかどうかの見込みを意味する。一実施態様では、予測はその应答の程度に関する。一実施態様では、予測は、例えば特定の治療的薬剤による治療のような治療後に、又は疾患再発がなく一定期間の間、患者が生存しているか又は改善しているかどうか、及び/又はその可能性に関する。本発明の予測方法を用いて任意の特定の患者のために最も好適な治療様式を選択することによって、治療決定を臨床的に行うことができる。本発明の予測方法は、患者が、治療投薬計画、例えば特定の治療剤や組み合わせの投与、外科的介入、ステロイド治療などを含む特定の治療投薬計画に有利に应答するかどうか、又は治療投薬計画の後に患者が長期に生存しているかどうかを予測する際の有益なツールである。

10

【0131】

「対照被験体」は、特定の疾患、例えばIBDなどを有していると診断されておらず、その疾患に関連した如何なる徴候又は症状も被っていない健全な被験体を指す。

【0132】

「相関」又は「相関する」は、任意の方法で、第一の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果を、第二の分析又はプロトコルの成績及び/又は結果と比較することを意味する。例えば、第二のプロトコルを行う際に第一の分析又はプロトコルの結果を用いてもよいし、及び/又は第一の分析又はプロトコルの結果を用いて、第二の分析又はプロトコルを行うべきかどうかを決定してもよい。遺伝子発現分析又はプロトコルの実施態様に関し、遺伝子発現分析又はプロトコルの結果を用いて、特定の治療投薬計画を実行すべきかどうかを決定してもよい。

20

【0133】

ここで使用される「比較する」なる用語は、個体又は患者からの試料中のバイオマーカーのレベルを、この開示の他の場所で特定されたバイオマーカーの基準レベルと比較することを意味する。ここで使用される比較するとは、対応するパラメータ又は値の比較を通常は意味するものと理解されるべきであり、例えば絶対量が絶対基準量と比較される一方、濃度が基準濃度と比較され、又は試料中のバイオマーカーから得られた強度シグナルが基準試料から得られた強度シグナルと比較される。比較は手作業で又はコンピュータ支援下で実施されうる。よって、比較は（例えばここに開示されたシステムの）計算装置によって実施されうる。個体又は患者からの試料中のバイオマーカーの測定又は検出レベルの値と基準レベルを、例えば互いに比較することができ、該比較は、比較のためのアルゴリズムを実行するコンピュータプログラムによって自動的に実施されうる。上記評価を実施するコンピュータプログラムは適切な出力形式で所望の評価をもたらす。コンピュータ支援比較では、決定された量の値が、コンピュータプログラムによってデータベースに保存されている適切な基準に対応する値と比較されうる。コンピュータプログラムは更に比較の結果を評価し、つまり、適切な出力形式で所望の評価を自動的に提供しうる。コンピュータ支援比較では、決定された量の値が、コンピュータプログラムによってデータベースに保存されている適切な基準に対応する値と比較されうる。コンピュータプログラムは更に比較の結果を評価し、つまり、適切な出力形式で所望の評価を自動的に提供しうる。

30

【0134】

ここで使用される「治療を推奨する」なる語句は、患者を治療で適切に治療されるか又は適切には治療されないかを特定するために患者の試料中のインテグリンベータ7 mRNA又はタンパク質、インテグリンアルファE mRNA又はタンパク質、又はCD3イプシロンmRNA又はタンパク質のレベル又は存在に関して生成された情報又はデータを使用することを意味する。幾つかの実施態様では、治療は、抗インテグリンベータ7抗体、例えばエトリズマブを含むインテグリンベータ7アンタゴニストを含みうる。幾つかの実施態様では、「治療/治療法を推奨する」なる語句は、投与されるインテグリンベータ7アンタゴニストの有効量の適合化を必要とする患者の特定を含む。幾つかの実施態様では、治療を推奨することは、投与されるインテグリンベータ7アンタゴニストの量を適合させることを推奨することを含む。ここで使用される「治療を推奨する」なる語句はまたイ

40

50

ンテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に多かれ少なかれ応答する可能性があるとして特定され又は選択された患者に対してインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療を提案し又は選択するために生成された情報又はデータを使用することを意味する。使用され又は生成される情報又はデータは、文書でも口頭でも又は電子的でも任意の形式でよい。幾つかの実施態様では、生成された情報又はデータを使用することは、伝えること、提示すること、報告すること、保存すること、送ること、移すこと、供給すること、送信すること、分配すること、又はその組み合わせを含む。幾つかの実施態様では、伝えること、提示すること、報告すること、保存すること、送ること、移すこと、供給すること、送信すること、分配すること、又はその組み合わせは、計算装置、アナライザー装置又はその組み合わせによって実施される。幾つかの更なる実施態様では、伝えること、提示すること、報告すること、保存すること、送ること、移すこと、供給すること、送信すること、分配すること、又はその組み合わせは、研究室又は医療専門家によって実施される。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、インテグリンベータ7 mRNA又はタンパク質、インテグリンアルファEmRNA又はタンパク質、又はCD3イプシロンmRNA又はタンパク質のレベルの基準レベルとの比較を含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、インテグリンベータ7 mRNA又はタンパク質、インテグリンアルファEmRNA又はタンパク質、又はCD3イプシロンmRNA又はタンパク質が試料中に存在するか又は不存在かを示すことを含む。幾つかの実施態様では、情報又はデータは、エトロリズマブのような抗インテグリンベータ7抗体を含むインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療で患者が適切に治療されるか又は適切には治療されないかを示すことを含む。

10

20

【0135】

「パッケージ挿入物」は、効能、用途、服用量、投与、配合禁忌、パッケージされている製品と併用される他の治療薬、及び/又はそのような治療薬の使用に関する警告等についての情報を含む、治療製品又は医薬の商業的包装に慣習的に含まれる指示書を指すために使用される。

【0136】

「キット」は、少なくとも一の試薬、例えばUC又はクローン病のようなIBDの治療のための医薬、又は本発明のバイオマーカー遺伝子又はタンパク質を特異的に検出するためのプローブを含む任意の製造品（例えば、パッケージ又は容器）である。所定の実施態様では、製造品は、本発明の方法を実施するためのユニットとして宣伝され、流通され、又は市販される。

30

【0137】

「標的視聴者」は、特に特定の使用、治療又は症状について、マーケティングするか又は宣伝することによって、特定の医薬が販売促進され、又は販売促進が意図される人々の集団又は施設であり、例えば、個々の患者、患者集団、新聞、医学文献及び雑誌の読者、テレビ又はインターネットの閲覧者、ラジオ又はインターネット視聴者、医師、製薬会社などである。

【0138】

「血清試料」なる用語は、個体から得られる任意の血清試料を意味する。哺乳動物から血清を得るための方法は、当該技術分野でよく知られている。

40

【0139】

「全血」なる用語は、個体から得られる任意の全血試料を指す。典型的には、全血は、例えば細胞成分と血漿などの血液成分の全てを含む。哺乳動物由来の全血を得るための方法は当該技術分野でよく知られている。

【0140】

「～に応答しない」、「非応答」なる表現及びその文法的変形は、以前に投与された一又は複数の医薬（治療薬）に対する、被験体又は患者の反応に関する場合、そのような医薬の投与で、治療される疾患の治療の任意の又は十分な徴候を示さなかった、又は医薬に対して臨床的に許容できないほど高い毒性を示した、又は最初にそのような医薬を投与された後で治療の徴候を維持しなかった被験体又は患者を、本明細書で定義される本文脈に

50

において使用される治療なる単語により記述する。「非応答性」なる句は、以前に投与された医薬に対して耐性及び/又は難治性である被験者の記述を含み、被験体又は患者が、彼ないし彼女に与えられている医薬を受けながら進行した状況、及び被験体又は患者が、彼ないし彼女がもはや応答性でなくなるまでの医薬を含むレジメンを完結した後で、12ヶ月以内(例えば6ヶ月以内)に進行した状況を含む。従って、一又は複数の医薬に対する非応答性とは、以前又は現在の治療後に活動性疾患を持ち続ける被験体を含む。例えば、患者は、非応答性である医薬による治療の、およそ1ヶ月から3ヶ月後に、又は3ヶ月から6ヶ月後に、又は6ヶ月から12ヶ月後に活動性疾患の活性を有する場合がある。そのような応答性は問題となっている疾患の治療に熟練した臨床医により評価され得る。

【0141】

医薬に対する非応答の目的では、一又は複数の医薬による過去又は現在の治療からの「臨床的に許容できない高レベルの毒性」を経験する被験体は、経験のある臨床医により重大であると考えられ、それに関連する一以上の負の副作用又は有害事象、例えば、重症感染症、うっ血性心不全、脱髄(多発性硬化症につながる)、重大な過敏症、神経病理学的事象、高度の自己免疫、がん、例えば子宮内膜がん、非ホジキンリンパ腫、乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がん、メラノーマなど、及び結核(TB)などを経験する。

【0142】

所定の疾患又は障害に罹患した患者に対する臨床的利益の増大に関連した、又は特定の治療薬又は治療レジメンに対する応答を予測するバイオマーカーの「量」又は「レベル」とは生物学的試料中での検出可能なレベルである。これらは、当業者に知られており、またここに開示された方法により測定することができる。評価されるバイオマーカーの発現レベル又は量は、治療又は治療薬に対する反応又は予測される反応を決定するために使用することができる。

【0143】

一般に「発現のレベル」又は「発現レベル」なる用語は、交換可能に使用され、一般に、生物学的試料中のポリヌクレオチド又はアミノ酸生成物又はタンパク質の量を指す。「発現」は、一般に、遺伝子コード情報が、細胞中に存在し作動する構造に変換されるプロセスを意味する。従って、ここで使用される場合、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチドへの転写、タンパク質への翻訳、又はタンパク質の翻訳後修飾さえも意味しうる。転写されたポリヌクレオチド、翻訳されたタンパク質、又は翻訳後修飾されたタンパク質の断片はまた、選択的スプライシングにより生成された転写物、又は分解された転写物に由来するか、又は例えばタンパク質分解によるタンパク質の翻訳後プロセッシングに由来しようが、発現したとみなされる。「発現した遺伝子」には、mRNAとしてポリヌクレオチドに転写され、ついでタンパク質に翻訳されたもの、及びRNAに転写はされたが、タンパク質には翻訳されていないもの(例えば、転移及びリボソームRNA)が含まれる。

【0144】

様々な更なる用語が、ここに定義されるか又は特徴づけられる。

【0145】

組成物と方法

A. ベータ7インテグリンアンタゴニスト

ベータ7インテグリンアンタゴニストを投与することによって、被験体、例えばヒトにおける胃腸炎症性障害を治療する方法が提供される。潜在的なアンタゴニストの例には、ベータ7インテグリンとの免疫グロブリンの融合体に結合するオリゴヌクレオチド、及び特に、限定されるものではないが、ポリ及びモノクローナル抗体とその抗体断片、単鎖抗体、抗イディオタイプ抗体、及びそのような抗体又は断片のキメラ又はヒト化型並びにヒト抗体及び抗体断片を含む抗体が含まれる。あるいは、潜在的なアンタゴニストは密接に関連するタンパク質、例えば、リガンドを認識するが、影響は与えず、従ってベータ7インテグリンの作用を競合的に阻害するベータ7インテグリンの変異形態であってもよい。

【0146】

別のベータ7インテグリンアンタゴニストとなり得るものは、アンチセンス技術を使用

10

20

30

40

50

して調製されたアンチセンスRNA又はDNAコンストラクトであり、ここで、例えば、アンチセンスRNA又はDNA分子は、標的mRNAにハイブリダイズし、タンパク質の翻訳を阻害することにより直接mRNAの翻訳を妨げるように働く。三重らせん体形成又はアンチセンスDNAもしくはRNAによって、アンチセンス技術は遺伝子発現を制御するのに用いることができ、どちらの方法もポリヌクレオチドのDNA又はRNAへの結合に基づく。例えば、ここでのベータ7インテグリンをコードするポリヌクレオチド配列の5'コード部分は、長さが約10~40塩基対のアンチセンスRNAオリゴヌクレオチドを設計するのに用いられる。DNAオリゴヌクレオチドは、転写に關与する遺伝子の領域に相補的に設計され(三重らせん体 - Lee等, *Nucleic Acids Res.*, 6:3073(1979); Cooney等, *Science*, 241:456(1988); Dervan等, *Science*, 251:1360(1991)参照)、それによりベータ7インテグリンの転写及び産生を阻害する。アンチセンスRNAオリゴヌクレオチドはインピボでmRNAにハイブリダイズし、mRNA分子のベータ7インテグリンへの翻訳を妨げる(アンチセンス - Okano, *Neurochem.*, 56:560(1991); *Oligodeoxynucleotide as Antisense Inhibitors of Gene Expression*(CRC Press:Boca Raton, FL, 1988))。また、上記オリゴヌクレオチドは、アンチセンスRNA又はDNAがインピボでPROポリペプチドの産生を阻害するように発現されうるように、細胞へ送達され得る。アンチセンスDNAが用いられる場合、例えば、標的遺伝子ヌクレオチド配列の約-10および+10位の間である翻訳開始部位由来のオリゴデオキシリボヌクレオチドが典型的である。

10

【0147】

20

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

【0148】

リボザイムは、RNAの特異的開裂を触媒することができる酵素的RNA分子である。リボザイムは、相補的標的RNAへの配列特異的ハイブリダイゼーションと続くヌクレオチド鎖分解性開裂により作用する。潜在的なRNA標的内の特異的リボザイム開裂部位は、既知の技術により特定され得る。詳細については、例えば、Rossi, *Current Biology*, 4:469-471(1994)、及びPCT公報国際公開第97/33551号(1997年9月18日公開)を参照のこと。

30

【0149】

転写を阻害するのに用いられる三重らせん体形成における核酸分子は、一本鎖で、デオキシヌクレオチドにより構成されているべきである。これらのオリゴヌクレオチドの基本組成は、一般的に二本鎖のうち一本鎖の上に相当な長さのプリン又はピリミジンが必要とするフーグスティーン型塩基対則により三重らせん体形成を促進するように設計される。更なる詳細については、例えばPCT公報国際公開第97/33551号参照。これらの小分子は、上述のスクリーニングアッセイの一又は複数により、及び/又は当業者に知られたその他の任意のスクリーニング技術により、同定され得る。

40

【0150】

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

【0151】

アッセイは、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、生化学スクリーニングアッセイ、免疫アッセイ、及び細胞ベースアッセイを含む様々な形式で行うことができ、これらは当

50

該分野でよく特徴付けられている。

【0152】

B. 抗ベータ7インテグリン抗体

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

【0153】

1. ポリクローナル抗体

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

【0154】

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

【0155】

2. モノクローナル抗体

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

【0156】

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

【0157】

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

10

20

30

40

50

【 0 1 5 8 】

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

10

【 0 1 5 9 】

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

【 0 1 6 0 】

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

20

30

【 0 1 6 1 】

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

40

【 0 1 6 2 】

更なる実施態様では、モノクローナル抗体又は抗体断片は、McCafferty等, Nature, 348:552-554 (1990)に記載された技術を使用して産生される抗体ファージライブラリーから分離することができる。Clackson等, Nature, 352:624-628 (1991)及びMarks等, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)は、ファージライブラリーを使用したマウス及びヒト抗体の分離を記述している。続く刊行物は、鎖シャフリングによる高親和性 (nM範囲) のヒト抗体の生成 (Marks等, Bio/Technology, 10:779-783(1992))、並びに非常に大きなファージライブラリーを構築するための方策としてコンビナトリアル感染とインビボ組換え (Waterhouse等, Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266(1993)) を記述している。従って、これら

50

の技術はモノクローナル抗体の分離に対する伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ法に対する実行可能な別法である。

【 0 1 6 3 】

抗体をコードするDNAは、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメイン（CH及びCL）の配列を、相同的マウス配列に代えて置換することによって（米国特許第4816567号；Morrison等，Proc.Nat.Acad.Sci.,USA,81:6851(1984)）、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチド（異種ポリペプチド）のコード配列の全部又は一部を共有結合させることによって修飾してキメラ又は融合抗体ポリペプチドを生成することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常ドメインと置き代わることができるか、又は抗体の1つの抗原結合部位の変域ドメインが置換されて、抗原に対する特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対する特異性を有するもう一つの抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作り出す。

10

【 0 1 6 4 】

例示的な抗ベータ7抗体は、F i b 5 0 4、F i b 2 1、2 2、2 7、3 0（Tidswell, M. J Immunol. 1997 Aug 1;159(3):1497-505）又はそのヒト化誘導体である。F i b 5 0 4のヒト化抗体は、米国特許出願公開第20060093601号（米国特許第7528236号として発行）に詳細に開示されており、その内容の全体を出典明示により援用する（以下の議論もまた参照のこと）。

【 0 1 6 5 】

3 . ヒト及びヒト化抗体

20

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

30

【 0 1 6 6 】

非ヒト抗体をヒト化する方法はこの分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源からそこに導入された一又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者（Jones等，Nature, 321:522-525 (1986)；Riechmann等，Nature, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等，Science, 239:1534-1536 (1988)）の方法に従って、齧歯類CDR又はCDR配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより本質的に実施することができる。従って、このような「ヒト化」抗体は、インタクトなヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換されたキメラ抗体（米国特許第4816567号）である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかのCDR残基と場合によっては幾つかのFR残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。抗体がヒトの治療用途に用いられる場合、抗原性及びHAM A応答（ヒト抗マウス抗体）を低減するには、ヒト

40

50

化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方のヒト可変ドメインの選択が非常に重要である。いわゆる「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を、既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする。齧歯動物のものと同様にヒトVドメイン配列を同定し、その中のヒトフレームワーク(FR)をヒト化抗体に受け入れる(Sims等, J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia等, J. Mol. Biol., 196:901(1987))。他の方法では、軽又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta等, J. Immunol., 151:2623(1993))。更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが重要である。この目標を達成するべく、所定の実施態様によれば、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これらの表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接かつ最も実質的に抗原結合性に関与している。

【0167】

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

【0168】

例示的なヒト化抗ベータ7抗体は、限定するものではないが、インテグリンサブユニット7に対するヒト化モノクローナル抗体であり、ラット抗マウス/ヒトモノクローナル抗体FIB504(Andrew等, 1994 J Immunol 1994;153:3847-61)から誘導された、rhMABベータ7を含む。それは、ヒトイムノグロブリン(Ig)G1重鎖及び1軽鎖フレームワークを含むように操作され、チャイニーズハムスター卵巣細胞によって産生される。この抗体は、消化管のリンパ球サブユニットの輸送と保持を制御し、潰瘍性大腸炎(UC)やクローン病(CD)のような腸管炎症性疾患(IBD)に関連する2つのインテグリン、 $\alpha 4 \beta 7$ (Holzmann等 1989 Cell, 1989;56:37-46; Hu等, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:8254-8)とE7(Cepek等, 1993 J Immunol 1993;150:3459-70)に結合する。rhMABベータ7は $\alpha 4 \beta 7$ とそのリガンド(蛋白粘膜アドレシン細胞接着分子-1[MAcAM]-1、血管細胞接着分子[VcAM]-1、及びフィブロネクチン)の細胞相互作用並びにE7とそのリガンド(Eカドヘリン)の相互作用の強力なインビトロ阻害剤である。rhMABベータ7は可逆的に類似の高い親和性でウサギ、カニクイザル、及びヒトからのリンパ球上の $\alpha 4 \beta 7$ に結合する。それはまたマウス $\alpha 4 \beta 7$ にも高い親和性で結合する。rhMABベータ7とその変異体のアミノ酸配列と調製及び使用については米国特許出願公開第20060093601号(米国特許第7528236号として発行)に詳細が開示されており、その内容の全体が援用される。

【0169】

図1A及び1Bは次の可変軽鎖及び重鎖の配列アラインメントを示す: 軽鎖ヒトサブグループC_HIコンセンサス配列(図1A、配列番号: 12)、重鎖ヒトサブグループI_HIコンセンサス配列(図1B、配列番号: 13)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変軽鎖(図1A、配列番号: 10)、ラット抗マウスベータ7抗体(Fib504)可変重鎖(図1B、配列番号: 11)、及びヒト化抗体変異体: ヒト化hu504Kグラフト可変軽鎖(図1A、配列番号: 14)、ヒト化hu504Kグラフト可変重

鎖（図1B、配列番号：15）、変異体 hu504-5、hu504-16、及び hu504-32（ヒト化 hu504K グラフトからのアミノ酸変異体は、変異体 hu504-5、hu504-16、及び hu504-32 について、図1A（軽鎖）（それぞれ出現の順に配列番号：22-24）及び図1B（重鎖）に示される（配列番号：25））。

【0170】

4. ヒト抗体

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

【0171】

あるいは、ファージディスプレイ技術（McCafferty等、Nature 348:552-553 (1990)）を、非免疫化ドナーからの免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させるために使用することができる。当該技術では、抗体Vドメイン配列は、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdのメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子の何れかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として示される。また、繊維状の粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むので、抗体の機能的性質に基づく選択はこれらの性質を示す抗体をコードする遺伝子を選択する結果となる。このように、ファージはB細胞の幾つかの性質を模倣する。ファージディスプレイは、例えば、Johnson, Kevin S.及びChiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)に総説されたように、多様な形式で行うことができる。V遺伝子セグメントの幾つかの供給源がファージディスプレイのために使用可能である。Clackson等、Nature, 352:624-628 (1991)は、免疫化されたマウス脾臓から得られたV遺伝子の小ランダム組合せライブラリからの抗オキサゾロン抗体の異なった配列を単離した。非免疫化ヒトドナーからのV遺伝子のレパートリーを構築し、抗原（自己抗原を含む）の異なった配列に対する抗体を、Marks等、J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、又はGriffith等、EMBO J. 12:725-734(1993)に記載の技術に本質的に従って単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

【0172】

上で検討した通り、ヒト抗体はインビトロで活性化されたB細胞によって産生されうる（米国特許第5567610号及び同第5229275号を参照のこと）。

【0173】

5. 抗体断片

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

【0174】

抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた（例えば、Morimoto等、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等、Science, 229:81(1985)を参照）。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、抗体断片は上で検討した抗体ファージライブラリから単離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収するこ

10

20

30

40

50

とができ、化学的に結合させて $F(ab')_2$ 断片を形成することができる (Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、 $F(ab')_2$ 断片を組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。他の実施態様では、選択抗体は単鎖 Fv 断片 ($scFv$) である。国際公開第 93/16185 号；米国特許第 5571894 号；及び米国特許第 5587458 号を参照のこと。また、抗体断片は、例えば米国特許第 5641870 号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状抗体断片は単特異的又は二重特異的であってもよい。

【0175】

6. 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、ここに記載した通りベータ7インテグリンの二つの異なるエピトープに結合し得る。他のこのような抗体は、TAT結合部位と、他のタンパク質に対する結合部位とを組み合わせることができる。あるいは、抗ベータ7インテグリンアームは、細胞防護の機序をTAT発現細胞に集中し局在化させるために、T細胞レセプター分子 (例えばCD3) のような白血球上のトリガー分子、又はFcRI (CD64)、FcRII (CD32) 及びFcRIII (CD16) のような、IgGのFcレセプター (FcR) に結合するアームと結合し得る。二重特異性抗体は、TATを発現する細胞に細胞障害性剤を局在化させるために使用することもできる。これらの抗体は、TAT結合アームと、細胞障害性剤 (例えば、サポリン、抗インターフェロン、ピンカアルカロイド、リシンA鎖、メトトレキサート又は放射性同位元素ハプテン) に結合するアームとを有している。二重特異性抗体は、完全長抗体又は抗体断片 (例えば $F(ab')_2$ 二重特異性抗体) として調製することができる。

【0176】

二重特異性抗体を作製する方法は当該技術分野において知られている。完全長二重特異性抗体の伝統的な生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の同時発現に基づく (Milstein等, Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ (クアドローマ) は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常達成されるが、かなり面倒であり、製品収率が低い。同様の手順が国際公開第 93/08829 号、及びTrauncker等, EMBO J., 10:3655-3656 (1991) に開示されている。

【0177】

異なったアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗原 - 抗体結合部位) を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。所定の実施態様では、該融合は、少なくともヒンジの一部、 C_{H2} 及び C_{H3} 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。所定の実施態様では、軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域 (C_{H1}) を、融合の少なくとも一つに存在させる。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしているDNAを、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時トランスフェクトする。これにより、構築に使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす実施態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2または3個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

【0178】

所定の実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対 (第二の結合特異性を提供する) とからなる。二重特異性分子の半分にしか免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異

10

20

30

40

50

性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えばSuresh等, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986)を参照のこと。

【0179】

米国特許第5731168号に記載された他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。所定の実施態様では、界面はC_H3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第1抗体分子の界面からの一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖（例えばチロシン又はトリプトファン）と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャピティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモ二量体のような不要の他の最終産物に対してヘテロ二量体の収量を増大させるメカニズムが提供される。

10

【0180】

二重特異性抗体は架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲートの一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していてもよい。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること（米国特許第4676980号）及びHIV感染の治療（国際公報第91/00360号、国際公報第92/200373号及び欧州特許出願公開第03089号）等の用途が提案されている。ヘテロコンジュゲート抗体は任意の簡便な架橋法を使用して作製される。適切な架橋剤は当該技術分野において周知であり、多くの架橋技術と共に米国特許第4676980号に開示されている。

20

【0181】

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)はインタクトな抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤の亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

30

【0182】

最近の進歩により、大腸菌からF a b'-SH断片を直接回収できるようになり、これを化学的にカップリングさせて二重特異性抗体を形成することができる。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は完全にヒト化された二重特異性抗体F(a b')₂分子を記載している。各F a b'断片は別個に大腸菌から分泌され、インビトロでの定方向化学カップリングによって二重特異性抗体が生成された。このようにして生成された二重特異性抗体はEr b B2レセプターを過剰発現する細胞及び正常なヒトT細胞に結合することができ、またヒト乳房腫瘍標的に対してヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を惹起させた。組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な技術もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモ二量体をヒンジ領域で還元して単量体を形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成する。この方法はまた抗体ホモ二量体の生産に対して使用することができる。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより

40

50

V_L に V_H を結合してなる。従って、一つの断片の V_H 及び V_L ドメインは他の断片の相補的 V_L 及び V_H ドメインと強制的に対形成させられ、よって2つの抗原結合部位を形成する。単鎖 $Fv(sFv)$ 二量体の使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照のこと。

【0183】

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

【0184】

7. ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体もまた本発明の範囲に入る。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため[米国特許第4676980号]及びHIV感染の治療のために[国際公開第91/00360; 国際公開第92/200373; 欧州特許出願公開第03089号]提案されている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することによって、免疫毒素を作成することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミダート、及び例えば米国特許第4676980号に開示されたものが含まれる。

【0185】

8. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインターナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。所定の実施態様では、二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。所定の実施態様では、多価抗体は3ないし約8、典型的には4の抗原結合部位を有する(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも一つのポリペプチド鎖(典型的には2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はVD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は: VH-CH1-柔軟リンカー-VH-CH1-Fc領域鎖; 又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここでの多価抗体は、少なくとも2つ(典型的には4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドを更に有する。ここでの多価抗体は、例えば約2~約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

【0186】

9. エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば抗体の抗原-依存細胞媒介細胞毒性(ADCC)及び/又は補体依存細胞毒性(CDC)を向上させることは望ましい。これは、抗体のFc領域で一又は複数のアミノ酸置換を誘導することによりなされうる。あるいは又は更に、システイン残基をFc領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上したインターナリゼーション能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存細胞性細胞毒性(ADCC)を有する場合がある。Caron等, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992)及びShopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)参照。また、向

10

20

30

40

50

上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff等、Cancer Research 53: 2560-2565 (1993)に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。あるいは、抗体は、2つのFc領域を有するように加工して、それにより補体溶解及びADCC能力を向上させることもできる。Stevenson等、Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)参照。抗体の血清半減期を増大させるために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、抗体(特に抗体断片)へサルベージレセプター結合エピトープを導入してもよい。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因であるIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する。

【0187】

10. 免疫複合体

ここでの方法で使用されるアンタゴニスト又は抗体は、細胞傷害性剤又はサイトカインのような別の薬剤とコンジュゲートさせてもよい。

【0188】

結合は、通常共有結合で達成され、その正確な性質はターゲティング分子及びインテグリンベータ7アンタゴニスト又は抗体ポリペプチド上の結合部位により測定されるであろう。典型的には、非ペプチド性剤は、化学的な修飾によって、抗体に導入されたそのアミノ酸側鎖、糖鎖又は反応基によって、抗ベータ7インテグリン抗体へのコンジュゲートを可能にするリンカーの付加により修飾される。例えば、薬剤は、リジン残基の-NH₂基により、遊離した-NH₂基により、システイン残基に対するジスルフィド交換により、又は、シッフ塩基結合により様々な求核基を含む薬剤の付着を可能にする過ヨウ素酸を有する糖鎖の1,2-ジオールの酸化により付着されてもよい。例として米国特許第4256833号を参照。タンパク質修飾剤には、アミン反応性の試薬(例えば、反応性エステル、イソチオシアネート、アルデヒド及びスルホニルハロゲン化物)、チオール反応性試薬(例えば、ハロアセチル誘導体及びマレイミド)、及びカルボン酸反応性及びアルデヒド反応性試薬が含まれる。インテグリンベータ7アンタゴニスト又は抗体ポリペプチドは、二官能性架橋試薬の使用によってペプチド薬剤に共有結合してもよい。ヘテロ二官能試薬はより一般的に用いられており、2つの異なる反応性分子(例えば、アミン反応性とチオール、ヨードアセトアミド又はマレイミド)の使用によって、2つの異なるタンパク質のカップリングの制御が可能となる。このような連結剤の使用は公知技術である。例として米国特許第4671958号を参照。ペプチドリinkerもまた使用されてよい。あるいは、抗ベータ7インテグリン抗体ポリペプチドは、融合ポリペプチドの調製によってペプチド部分に連結できる。

【0189】

更なる二官能性タンパク質カップリング剤の例は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を含む。

【0190】

11. 免疫リポソーム

ここに開示されている抗ベータ7インテグリン抗体は、免疫リポソームとして製剤化することもできる。「リポソーム」は、哺乳動物への薬物輸送に有用な、種々のタイプの脂質、リン脂質及び/又は界面活性剤からなる小胞体である。リポソームの成分は、通常は生物膜の脂質配向に類似した2層構造に配列される。抗体を含むリポソームは、例えばEpstein等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang等、Proc. Natl. Acad. Sc

10

20

30

40

50

i. USA 77:4030(1980) ; 及び米国特許第 4 4 8 5 0 4 5 号及び同 4 5 4 4 5 4 5 号 ; 及び 1 9 9 7 年 1 0 月 2 3 日に公開の国際公開 9 7 / 3 8 7 3 1 に記載されているように、当該分野において既知の方法により調製される。循環時間が増したリポソームは米国特許第 5 0 1 3 5 5 6 号に開示されている。

【 0 1 9 1 】

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

【 0 1 9 2 】

本発明の抗体の F a b ' 断片は、Martin等, J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームにコンジュゲートされうる。化学療法薬は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等, J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

【 0 1 9 3 】

1 2 . 抗体産生のためのベクター、宿主細胞及び組換え法

また提供されるものは、ここに記載の抗ペータ 7 抗体又はポリペプチド剤をコードする単離された核酸、核酸を含むベクター及び宿主細胞及び抗体産生のための組換え技術である。

【 0 1 9 4 】

抗体の組換え生産では、抗体をコードする核酸が単離され、更なるクローニング (D N A の増幅) 又は発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。別の実施態様では、抗体は、例えば、出典明示によって特に援用される米国特許第 5 2 0 4 2 4 4 号に記載の通り、相同組換えによって産生され得る。モノクローナル抗体をコードする D N A は直ぐに単離され、常套的な手法を用いて (例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用することによって) 配列決定される。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には、一般に、これらに制限されるものではないが、次のものの一又は複数が含まれる : シグナル配列、複製起点、一又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、及び転写終結配列である (例えば、特に出典明示によりここに援用される米国特許第 5 5 3 4 6 1 5 号に記載) 。

【 0 1 9 5 】

ここに記載のベクター中の D N A をクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア (Erwinia)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキャンズ及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びバシリ・リチエフォルミス (licheniformis) (例えば 1 9 8 9 年 4 月 1 2 日に公開された D D 2 6 6 7 1 0 に開示されたバシリ・リチエニフォルミス 4 1 P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌 2 9 4 (A T C C 3 1 4 4 6) であるが、他の大腸菌 B、大腸菌 X 1 7 7 6 (A T C C 3 1 5 3 7) 及び大腸菌 W 3 1 1 0 (A T C C 2 7 3 2 5) のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

【 0 1 9 6 】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、抗ペータ 7 インテグリン抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でここで使用でき、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ ; クルイペロマイセス宿主、例えば K . ラクティス、K . フラギリス (A T C C 1 2 4 2 4)、K . ブルガリカス (A T C C 1

10

20

30

40

50

6045)、K.ウィッケラミイ(ATCC24178)、K.ワルチイ(ATCC56500)、K.ドロソフィラルム(ATCC36906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアナス;ヤローウィア(EP402226);ピチアバストリス(EP183070);カンジダ;トリコデルマ・リーシア(EP244234);アカパンカビ;シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス;及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリボクラジウム、及びコウジカビ属宿主、例えば偽業性コウジ菌及びクロカビが使用できる。

【0197】

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

【0198】

しかしながら、脊椎動物細胞における興味が最もあり、培養(組織培養)中の脊椎細胞の増殖は常套的な手順になった。有用な哺乳動物宿主細胞の例は、SV40(COS-7, ATCC CRL1651)で形質転換させたサル腎CV1細胞株;ヒト胚腎細胞系(293又は懸濁培養で増殖するようにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen Virol. 36:59(1977));ベビーハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL10);チヤイニーズハムスター卵巣細胞/DHFR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216(1980));マウスセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23: 243-251(1980));サル腎細胞(CV1 ATCC CCL70);アフリカミドリザル腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);ヒト頸管腫瘍細胞(HELA, ATCC CCL2);イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL34);バッファローラット肝細胞(BRL3A, ATCC CRL1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB8065);マウス乳房腫瘍細胞(MMT060562, ATCC CCL51);TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68(1982));MRC5細胞;FS4細胞;及びヒト肝臓癌株(Hep G2)である。

【0199】

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

【0200】

本発明の抗ベータ7インテグリン抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハムのF10(Sigma)、最小必須培地(MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及びダルベッコの改良イーグル培地(DMEM), Sigma)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44(1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255(1980), 米国特許第4767704号;同4657866号;同4927762号;同4560655号;又は同5122469号;国際公開第90/03430号;国際公開第87/00195号;又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮増殖因子)、塩類(例えば、塩

10

20

30

40

50

化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばHEPES)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCIN^{T M}薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0201】

組換え技術を使用する場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔内に生成されるか、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内に生成される場合、第1工程として、粒状屑、宿主細胞又は溶菌断片を、例えば遠心分離又は限外濾過によって取り除く。Carter等、Bio/Technology 10:163-167(1992)は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順について記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを酢酸ナトリウム(pH3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフロリド(PMSF)の存在下で、約30分以上かけて解凍する。細胞屑は遠心分離により除去することができる。抗体が培地へ分泌される場合、そのような発現系からの上清が、一般的には、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はMillipore Pelliconの限外濾過ユニットを用いて最初に濃縮される。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記工程の何れかに含めてタンパク質分解を阻害してもよく、抗生物質を含めて外来性汚染物の増殖を防止してもよい。

【0202】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製され得、アフィニティークロマトグラフィーが典型的な精製技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は抗体に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等、J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等、EMBO J. 5: 15671575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。制御孔ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX(商標)樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上のクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラム等)上でのヘパリンSEPHAROSE(商品名)クロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの他のタンパク質精製技術も、回収される抗体に応じて利用可能である。任意の予備精製工程に続いて、対象とする抗体と汚染物を含む混合物に、約2.5 - 4.5のpHでの溶離バッファーを用いて、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーを施してもよく、典型的には低い塩濃度(例えば、約0 - 0.25M塩)で実施される。

【0203】

C. 薬学的製剤

本発明の治療剤、アンタゴニスト又は抗体を含有する治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体を任意の生理学的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 16版, Osol, A.編, (1980))と混合することにより、水溶液、凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態で調製される。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、ヒスチジン及び他の有機酸などのバッファー;アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤;保存料(オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド;ヘキサメトニウムク

10

20

30

40

50

ロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3 - ペンタノール；及びm - クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストランを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn - タンパク質錯体）；及びノ又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

10

【0204】

ここでの製剤は、治療される特定の徴候のために必要な一を越える活性化合物、典型的には互いに悪影響を与えない相補的活性を持つものも含んでいてもよい。そのような分子は、好適には、意図される目的のために有効な量で組み合わせられて存在する。

【0205】

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

20

【0206】

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

【0207】

徐放性調製剤を調製してもよい。徐放性製剤の適切な例として、本発明の免疫グロブリンを含む固形疎水性ポリマーの半透性基質を上げることができ、この基質は、成形品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形態である。徐放性基質の例には、ポリエステル、ハイドロゲル（例えば、ポリ（2 - ヒドロキシエチル - メタクリレート）、又はポリ（ビニルアルコール））、ポリ乳酸（米国特許第3773919号）、Lグルタミン酸及びエチル - L - グルタミンの共重合体、非分解性エチレン - ビニルアセテート、LUPRON DEPOTTM（乳酸 - グリコール酸共重合体及び酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフィア）のような分解性乳酸 - グリコール酸共重合体、並びにポリ - D - (-) 3 - ヒドロキシ酪酸が含まれる。エチレン - ビニルアセテート及び乳酸 - グリコール酸のようなポリマーは、100日に亘る分子の放出を可能にする一方、所定のハイドロゲルは、それよりも短時間に亘ってタンパク質を放出する。カプセル封入された免疫グロブリンは、体内に長時間留まるとき、37 で水分に曝されることにより、変性又は凝集し得、その結果生物学的活性を失い、場合によっては免疫原性が変化する。関与する機序に応じて、安定化のために合理的な戦略を講じることができる。例えば、凝集の機序が、チオ - ジスルフィド交換による分子間S - S結合の形成であることが発見された場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結、水分含有率の制御、適切な添加剤の使用、及び特定のポリマー基質組成物の開発により、安定化させることができる。

30

40

【0208】

D . 投与

治療を行う医師は、体重ベース投与量について個々の被験体に適切な投与を決定でき、又はフラット投与量では、ラベル上の指示に従う。インテグリンベータ7アンタゴニストと組合せて投与される市販の第二治療薬及び他の化合物の調製及び投与スケジュールは、製造者の指示に従って使用されうるか又は熟練の医師によって経験的に決定されうる。

【0209】

50

疾患の予防又は治療では、インテグリンベータ7アンタゴニストと非枯渴抗体との組合せにおいて投与される任意の第二治療薬又は他の化合物の適切な投与は、治療される胃腸炎症性障害のタイプ、例えばIBD、UC、CD、疾患の重症度及び経過、インテグリンベータ7アンタゴニスト又は組合せが予防又は治療目的のために投与されるかどうか、過去の治療、患者のインテグリンベータ7アンタゴニスト又は組合せに対する臨床歴及び応答、及び主治医の裁量に依存する。インテグリンベータ7アンタゴニスト又は組合せは、一回で、又はより典型的には一連の治療にわたって患者に好適に投与される。所定の実施態様では、インテグリンベータ7アンタゴニストは、1週間に一度、又は2週間毎に一度、又は4週間毎に一度、又は6週間毎に一度、又は8週間毎に一度、期間にして1ヶ月(4週間)、又は2ヶ月、3ヶ月、又は6ヶ月、又は12ヶ月、又は18ヶ月、又は24ヶ月、又は患者の生涯にわたって慢性的に投与される。所定の実施態様では、治療は患者によって自身で投与される。

10

【0210】

疾患のタイプ及び重症度に応じて、約0.5mg/kg~4.0mg/kgの抗ベータ7抗体が、例えば一又は複数の別個の投与又は持続点滴による、患者への投与のための初回の候補投与量である。数日又はそれ以上にわたる反復投与では、状態に応じて、治療は疾患症状の所望の抑制が生じるまで持続される。しかしながら、他の投与レジメンが有用な場合もある。

【0211】

例えば、所定の実施態様では、フラット用量の抗ベータ7抗体が患者に投与される。フラット用量は、体重に関係なく全ての患者に投与される抗ベータ7抗体の特定の量である。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約50mg及び450mgの間のフラット用量の抗ベータ7抗体が患者に投与され、これは、一又は複数の別々の注射又は注入又は投与でありうる。このようなフラット用量は、静脈内又は皮下又はここに記載される他の経路によって投与されうる。所定の実施態様では、フラット用量は50mg、又は100mg、又は150mg、又は200mg、又は300mg、又は400mg、又は420mg、又は450mgである。

20

【0212】

所定の実施態様では、抗ベータ7抗体の初回フラット負荷用量の後に、抗ベータ7抗体の一又は複数のフラット維持用量が続く。負荷用量は維持用量より多くの量の抗ベータ7抗体である。所定の実施態様では、負荷用量は約400mg及び450mgの間であり、維持用量は約50mg及び350mgの間である。所定の実施態様では、負荷用量は400mg、又は420mg、又は430mg、又は450mgである。所定の実施態様では、維持用量は50mg、又は100mg、又は150mg、又は200mg、又は300mg、又は350mgである。

30

【0213】

典型的には、臨床医は、発明の抗体(単独で又は第二化合物との組合せにおいて)を、求められる生物学的効果がもたらされる投与量に達するまで投与する。発明の治療の進行は、一般的な技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

【0214】

インテグリンベータ7アンタゴニストは、非経口、外用、静脈内、皮下、腹腔内、肺内、鼻腔内、及び/又は病巣内投与を含む任意の好適な手段で投与されうる。非経口注入は筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。くも膜下腔内投与もまた考えられる(例えばGrillo-Lopezの米国特許出願公開第2002/0009444号を参照)。加えて、インテグリンベータ7アンタゴニストは例えば減衰用量の抗体と共に、パルス注入で好適に投与されうる。所定の実施態様では、投与は静脈内又は皮下に与えられる。各曝露は同じ又は異なる投与手段を使用して提供されうる。一実施態様では、抗ベータ7抗体への各曝露は皮下投与による。一実施態様では、抗ベータ7抗体への第一曝露、例えば負荷用量は静脈内投与であり、それぞれの続く曝露は皮下投与による。

40

【0215】

50

所定の実施態様では、抗ベータ7抗体は、例えば自己注射装置、自動注入装置、又は自己投与のために設計された他の装置を使用して投与される。自動注入装置を含む様々な自己注射装置は当該技術分野で知られており、市販されている。例示的な装置は、限定するものではないが、プレ充填シリンジ（例えば、Becton DickinsonのBD HYPACK SCF（登録商標）、READYFILL™、及びSTERIFILL SCFTM；BaxterのCLEARSHOT™コポリマープレ充填シリンジ；及びWest Pharmaceutical Servicesから入手可能なDaikyo Seiko CRYSTAL ZENITH（登録商標）プレ充填シリンジ）；ディスプレイ型注射装置、例えばBecton DickinsonのBDペン；ウルトラシャープ及びマイクロニードル装置（例えば、Becton DickinsonのINJECT-EASE™及び微量注入装置；及びValeritasから入手可能なHPATCH™）並びに無針注射装置（例えば、Biojectから入手可能なBIOJECTOR（登録商標）及びINJECT（登録商標）；及びMedtronicから入手可能なSOFT-SERTER（登録商標）及びパッチ装置）を含む。所定の実施態様では、rhUMAβベータ7は、2ML（150mg）のrhUMAβベータ7を含むプレ充填シリンジを含んでなる製造品である。所定の実施態様では、rhUMAβベータ7は、1ML（180mg）のrhUMAβベータ7を含むプレ充填シリンジを含んでなる製造品である。

10

【0216】

記載したように、インテグリンベータ7アンタゴニストは単独で又は少なくとも一つの第二治療化合物との組合せにおいて投与されうる。これらの第二治療化合物は一般的に、これまでの記載に使用したのと同じ投与量及び投与経路において、又はこれまでに用いた投与量の約1～99%で使用される。このような第二化合物が使用される場合、それらは、所定の実施態様では、治療によって引き起こされる副作用を排除又は低減するために、インテグリンベータ7アンタゴニストが存在しなかった場合より少ない量で使用される。

20

【0217】

また記載したように（例えば下記を参照）、IBD、例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病の治療のための様々な好適な第二治療化合物が当該技術分野で知られており、このような第二治療化合物の投与量及び投与方法も同様に記載されている。

【0218】

インテグリンベータ7アンタゴニスト及び任意の第二治療化合物の投与は、例えば単一の組成物として、又は同じ又は異なる投与経路を使用した二以上の異なる組成物として同時になされうる。あるいは又は加えて、投与は任意の順で逐次的になされうる。所定の実施態様では、分から日、週、月までの範囲の間隔が、二以上の組成物の投与間に存在しうる。例えば、インテグリンベータ7アンタゴニストが最初に、その後第二治療化合物が投与されうる。しかしながら、同時の投与又はインテグリンベータ7アンタゴニストより前の第二治療化合物の投与も考えられうる。

30

【0219】

中等症活動期ないしは重症活動期のUCの患者のケアの標準は、アミノサリチレート、経口コルチコステロイド、6-メリカプトプリン（6-MP）及び/又はアザチオプリンの標準用量の治療を含む。ここに開示された抗ベータ7インテグリン抗体のようなインテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療は、このような患者の標準的なケアによって達成されるものより優れた、疾患の寛解（迅速な疾患コントロール及び/又は寛解延長）、及び/又は臨床応答の改善の結果となるであろう。

40

【0220】

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

【0221】

50

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

【0222】

これら全ての第二の医薬は、互いに組み合わせて、又は第一の医薬とそれら自体とで使用されてもよく、よって、ここで用いる「第二医薬」なる表現は、それぞれ第一医薬以外の唯一の医薬であることを意味するものではない。従って、第二の医薬は一つの医薬である必要はないが、一つより多い薬剤からなるか、一つより多い薬剤を含みうる。

【0223】

ここでの併用投与には、別々の製剤又は単一の薬学的製剤を用いた共投与(同時投与)、及び両方(全ての)活性剤がその生物学的な活性を同時に示す期間が一般的にはある何れかの順番での連続投与が含まれる。

【0224】

第二の医薬の併用投与には、別々の製剤又は単一の薬学的製剤を用いた共投与(同時投与)、及び両方(全ての)活性剤(医薬)がその生物学的な活性を同時に示す期間が一般的にはある何れかの順番での連続投与が含まれる。

【0225】

E. 治療計画のデザイン

薬剤開発は複雑で費用が嵩むプロセスである。新薬を上市する費用は8億ドルから10億ドルと推察される。フェーズIの臨床試験の10%未満が承認フェーズに行く。後期段階で医薬が失敗する2つの鍵である理由は用量濃度応答と予期しない安全性事象との関係の理解不足である。このシナリオを考慮すると、どのようにして薬剤がインビボで機能し、臨床治療の候補の成功を支援するのかについての予測を補助することを可能にするツールを持つことは重要である(Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK/PD Testing Drug Discovery & Development (2006))。

【0226】

薬物動態(PK)は、薬剤の吸収、分配、代謝、及び排泄の性質を特徴付ける。薬力学(PD)は投与された薬剤に対する生理学的及び生物学的応答を定める。PK/PDモデリングは、これら2つのプロセス間の数学的及び理論的関連を樹立し、薬剤作用のより良い予測を補助する。統合PK/PDモデリングとシミュレーションによるコンピュータ支援治験デザインは、多くの薬剤開発プログラムに組み込まれており、影響が大きくなっている(Lakshmi Kamath, Drug Discovery and Development; Modeling Success in PK/PD Testing Drug Discovery & Development (2006))。

【0227】

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

【0228】

PK/PDモデリングアプローチは、バイオマーカー応答、薬剤レベル、及び投与計画の関係を決定する際に有用であることが分かっている。薬剤候補のPK/PDプロファイルとそれに対する患者の応答を予測する能力は、臨床試験の成功のために決定的である。分子生物学的技術における近年の進歩と様々な疾患に対する標的のより良い理解は、薬剤の治療効果の良い臨床指標としてバイオマーカーを有効にした。バイオマーカーアッセイ(ここに記載のものを含む)とそのようなバイオマーカーアッセイの使用は、薬剤候補に対する生物学的応答の同定を補助する。バイオマーカーが臨床的に有効であると確認されると、治験シミュレーションが効果的にモデル化され得る。バイオマーカーは薬剤開発の臨床結果といつか置き換わりうるサロゲートステータスを達成する可能性がある(上掲のLakshmi Kamath)。

10

20

30

40

50

【0229】

ここに記載されたもののような末梢血中のバイオマーカーの量は、インテグリンベータ7アンタゴニストを用いた治療に対する生物学的応答を同定する際に使用され得、従って候補治療の治療的効能に対する良好な臨床上の指標として機能し得る。

【0230】

薬剤開発における伝統的なPK/PDモデリングは、薬剤用量濃度、薬剤暴露効果、薬剤半減期、時間に対する薬剤濃度、及び時間に対する薬剤効果のようなパラメーターを定める。より広義に使用される場合、薬剤モデリング、疾患モデリング、治験モデリング、及びマーケットモデリングのような定量技術は、全開発過程を支援し得、リスクの明確な考慮と知識のよりよい使用を通してより良い決定を生じる。様々なPK/PDモデリングツールが薬物開発の研究者に利用可能であり、例えばPharsight社 Mountain View, Californiaによって開発されたWinNonlin及びKnowledgebase Server (PKS)である。

10

【0231】

一般的バイオマーカー技術

本発明の実施には、特に明記しない限り、当業者の技量の範囲内である、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、及び免疫学の一般的技術が使用されるであろう。このような技術は、例えば"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2版(Sambrook等, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait編, 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney編, 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel等編, 1987, 及び定期更新版); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis等編, 1994)のような文献に十分に説明されている。

20

【0232】

本発明において用いられるプライマー、オリゴヌクレオチド及びポリヌクレオチドは当該技術分野で知られている標準的な技術を使用して生成されうる。

【0233】

所定の治療剤に対する、UC又はクローン病に罹患した患者を含むIBD患者の応答性の予測に関連した遺伝子発現バイオマーカーがここに提供される。mRNA又は遺伝子によってコードされる個々のタンパク質のこれら発現レベルが、IBD治療剤、UC治療剤、及び/又はクローン病治療剤に対する応答性を予測するためのバイオマーカーを構成する。従って、ここに開示された発明は、様々な設定下、例えば炎症性腸疾患の診断と治療に関連した方法及び組成物において有用である。

30

【0234】

遺伝子発現レベルの検出

ここに記載された方法の何れかに係る核酸は、ゲノムDNAから転写されたRNA又はRNA又はmRNAから生成されたcDNAであり得る。核酸は、脊椎動物、例えば哺乳動物に由来し得る。核酸は、それがその供給源から直接得られた場合、又はそれがその供給源に見出される核酸のコピーである場合に、特定の供給源「に由来する」と言われる。

【0235】

核酸は、核酸のコピー、例えば増幅から生じるコピーを含む。増幅は、特定の場合に、例えば変異を検出するための所望の量の材料を得るために望まれ得る。アンプリコンは、その後、所定の遺伝子の発現を決定するために、以下に記載のもののような変異検出方法に供することができる。

40

【0236】

mRNAのレベルは、市販のキットや試薬の使用を含み、当業者に周知の様々な方法により測定され、定量化されうる。そのような方法の一つは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)である。定量的な使用のための別の方法は、リアルタイム定量的PCR又はqPCRである。例えば、"PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications" (M.A. Innis等編, Academic Press, Inc., 1990); "Current Protocols in Molecular Biology" (F

50

. M. Ausubel等編, 1987,及び定期更新版);及び"PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis等編, 1994)を参照。

【0237】

マイクロアレイは、典型的には、例えば、高ストリンジェンシー条件下で、cDNA又はcRNA試料とハイブリダイズするために、アレイ化した一連の数千もの核酸プローブを使用する多重化技術である。プローブ-標的ハイブリダイゼーションは、典型的には、フルオロフォア、銀、又は化学発光標識化標的の検出によって検出され、定量化され、標的内の核酸配列の相対量を決定する。典型的なマイクロアレイでは、プローブは化学的マトリックスへ共有結合により(エポキシ-シラン、アミノ-シラン、リジン、ポリアクリルアミド等を介して)、固体表面に結合される。固体表面は、例えば、ガラス、シリコンチップ、または微視的ビーズである。様々なマイクロアレイは、例えばAffymetrix社とIllumina社により製造されたものを含み、市販されている。

10

【0238】

生物学的試料は、当業者に知られている所定の方法を使用して得ることができる。生物学的試料は脊椎動物から、特に、哺乳動物から得られうる。所定の場合、生物学的試料は、滑膜組織、血清又は末梢血単核細胞(PBMC)である。そのような体の試料をスクリーニングすることによって、単純な早期診断を、例えば、潰瘍性大腸炎及びクローン病などの疾患のために実現することができる。また、治療の進行は、標的核酸(又はコードされるポリペプチド)の発現レベルの変化に対してそのような体の試料を試験することによって、より容易にモニターすることができる。

20

【0239】

被験体又は組織又は細胞試料が、ここに開示された所定のバイオマーカーの相対量又は遺伝子発現サインを含むことを決定した後に、適切な治療薬の有効量が、被験体の特定疾患、例えばUC又はクローン病などを治療するために被験者に投与されることが考えられる。ここに記載の哺乳動物における様々な病理学的状態の臨床診断は、熟練した医師によってなされうる。例えば、哺乳動物における炎症性腸疾患、例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病の診断又は検出を可能にする臨床診断技術は当該技術分野で利用可能である。

【0240】

キット

ここに記述され又は示唆される用途における使用のため、キット又は製造品もまた提供される。このようなキットは、バイアル、チューブなどのような一又は複数の容器手段を密に閉じ込めて収容するように区画化されている運搬手段を含み得、容器手段の各々は該方法で使用される別個の要素の一つを含む。例えば、容器手段の一つは、検出可能に標識されているか又は検出可能に標識されうるプローブを含みうる。そのようなプローブは、遺伝子発現サインの一又は複数の遺伝子を含むポリヌクレオチドに対して特異的なポリヌクレオチドでありうる。キットが標的核酸を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチドを収容する容器、及び/又は酵素、蛍光又は放射性標識などのレポーター分子に結合した、アビジン又はストレプトアビジンなどのビオチン結合タンパク質のようなレポーター手段を含む容器を有していてもよい。

30

40

【0241】

キットは、典型的には、上述の容器と、商業的及び使用者の観点からみて望ましい材料、例えばバッファー、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用のための指示書を有するパッケージ挿入物を収容する一又は複数のその他の容器を具備する。特定の治療又は非治療的用途に組成物が使用されることを示すラベルが容器上にあってもよく、またそのラベルは上述したもののようインビボ用途又はインビトロ用途の何れかについての指示を示すものであってもよい。キット中の他の任意成分には、一又は複数のバッファー(例えばブロックバッファー、洗浄バッファー、基質バッファーなど)、酵素標識によって化学的に変化する基質などの他の試薬(例えば色素原)、エピトープ探索溶液、コントロール試料(ポジティブコントロール及び/又はネガティブコントロール)、コントロールス

50

ライドなどがある。

【0242】

マーケティング方法

またここでの発明には、ここに開示されるように血清バイオマーカーのレベル又は遺伝子発現サインを示す試料が得られた、特定の疾患、例えば、UC又はクローン病の患者又は患者集団を治療するための薬剤又は薬学的組成物の使用を促し、指示し、及び/又は標的の聴衆に対して特定することを含む、治療剤又はその薬学的に許容可能な組成物をマーケティングするための方法が包含される。

【0243】

マーケティングは、通常、スポンサーが特定されてメッセージが管理される非個人的媒体を通じての有料の通信である。ここでの目的のためのマーケティングには、公報、広告、製品の提供、後援、引受業務、及び販売促進が含まれる。この用語はまた視聴者に訴えて、ここでの発明の購入、後援、又は承認の好ましいパターンに向かって、説得、通知、促進、動機付け又はそれ以外の方法で行動させるようにデザインされた任意の活字媒体に現れるスポンサーがついた情報の告知を含む。

10

【0244】

ここでの診断方法のマーケティングは如何なる手段で達成されてもよい。これらのメッセージを伝えるために使用されるマーケティング媒体の例には、テレビ、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネット及び看板が含まれ、電波媒体に登場するメッセージであるコマーシャルも含まれる。

20

【0245】

使用されるマーケティングの種類は、多くの要因、例えば、病院、保険会社、診療所、医師、看護師、及び患者等の標的とする視聴者の性質、並びにコストの考慮、及び医薬と診断の販売を規定する関連の法律及び規則に依存する。サービスのやりとり、及び/又はユーザーの人口統計及び所在地のようなその他のデータによって規定されるユーザーの特徴に基づいて、マーケティングを個別化又はカスタマイズしてもよい。

【0246】

前記の明細書及び以下の実施例は、当業者が発明を実施するのに十分であると考えられる。ここに示され記載されたものに加えて、発明の様々な変更が先の記述及び以下の実施例から当業者には明らかであり、また添付の特許請求の範囲内となる。

30

【0247】

具体的な問題又は状況に対する本発明の教示の応用は、ここに含まれる教示に照らし当業者の能力の範疇にあらう。

【0248】

本発明の更なる詳細は、以下の非限定的実施例によって例証される。明細書中の全ての引用文献の開示は、出典明示によりここに明示的に援用される。

【実施例】

【0249】

実施例 1

中等症ないしは重症潰瘍性大腸炎患者における rh u M A b ベータ7 (エトロリズマブ) の効能及び安全性を評価するためのフェーズ II 無作為化二重盲検プラセボ対照試験及び非盲検継続投与試験

40

臨床試験の説明

rh u M A b ベータ7 (エトロリズマブ) の説明

rh u M A b ベータ7 (エトロリズマブ) は、ヒト Ig G 1 サブグループ I I I V_H、サブグループ - I V_L コンセンサス配列に基づくヒト化モノクローナル抗体であり、インテグリンヘテロ二量体の α 7 サブユニットに対して特異的に向けられる。高親和性をもって 4×10^7 (約 1.16 pM の K_d) 及び $E \alpha 7$ (約 1.800 pM の K_d) に結合することが示されている。

【0250】

50

この組換え抗体は、IgG1抗体に典型的である鎖間及び鎖内ジスルフィド結合によって共有的に連結される2つの重鎖(446残基)と2つの軽鎖(214残基)を有している。ここに記載の研究では、該抗体はチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において産生された。インタクトの非グリコシル化rhUMAβ7分子の分子量はおよそ144kDaであった。rhUMAβ7の各重鎖は、Asn297に一つの保存されたN結合型糖鎖付加部位を有している。この部位に存在するオリゴ糖はCHO細胞において発現される組換え抗体に観察されるものに典型的であり、主なグリコフォームはアシアロ、二分岐G0、及びG1グリカンである。2つのG0グリカンを含み、C末端リジン残基を持たない最も一般的なrhUMAβ7型の質量はおよそ147kDaであった。

10

【0251】

rhUMAβ7薬剤製品とプラセボはジェネンテックによって準備された。それらは透明ないしは僅かに乳白色、無色ないしは僅かに黄色の水溶液であった。両方の溶液はIV及びSC投与を意図した滅菌された保存料非含有の液体であった。

【0252】

試験デザイン

試験の説明

このフェーズII試験は、中等症ないしは重症UCの患者においてプラセボと比較した2通りのrhUMAβ7用量レベルに対する効能及び安全性を評価するための無作為化二重盲検プラセボ対照多施設試験であった。プライマリー有効性エンドポイントを10週目(試験薬剤の最終用量の投与から2週間後)に評価し、6週目にセカンダリー有効性エンドポイントを評価した。

20

【0253】

0、4、及び8週目に100mgSC(フラット用量)及び0週目に420mgSC(フラット用量)と、続く2、4、及び8週目に300mgSCのrhUMAβ7の用量範囲又は調和プラセボSCに対して1:1:1の比で患者を無作為化した。試験スキームを図2に示す。試験は0-35日のスクリーニング期間、10週間の二重盲検治療期間、18週間の安全性追跡調査期間、及び17ヶ月の進行性多巣性白質脳症(PML)追跡調査期間(無作為化後2年)に分けた。

【0254】

適格であるには、患者は米国消化器病学会(ACG)診療ガイドラインに従って、つまり、ある症例では5のMCS、又はある症例では6のMCS(2の内視鏡検査サブスコアを含む); 1の直腸出血サブスコア(表1参照); 及び肛門縁から最短25cmに疾患活性の内視鏡検査の証拠による中等症ないしは重症疾患の証拠を伴う、病理組織診断報告によって実証された臨床及び内視鏡検査の証拠で、最短12週の期間、UCと診断されていなければならない。この試験のための更なる選択除外基準は国際特許公開第2012/135589号に提供されている。

30

【0255】

表1. 潰瘍性大腸炎活動性の評価のためのメイヨークリニックスコア系

スコア	評価カテゴリー			
	排便回数 ^a	直腸出血 ^b	内視鏡検査の所見	医師の概括評価 ^c
0	この患者の正常排便数	見える出血なし	正常又は非活動性疾患	正常
1	正常より1から2回多い排便	半分以下の排便に血の筋	軽症疾患(紅斑, 血管パターン減少, 軽度の脆弱性)	軽症疾患
2	正常より3から4回多い排便	殆どの排便に明らかな血液	中等症疾患(顕著な紅斑, 血管パターンの欠如, 脆弱性, 糜爛)	中等症疾患
3	正常より5回以上多い排便	血液のみが出る	重症疾患(突発性出血, 潰瘍形成)	重症疾患
	サブスコア:0から3	サブスコア:0から3	サブスコア:0から3	サブスコア:0から3

^a 各患者が排便回数の異常度合いを樹立するためにオウンコントロールとなる。

^b 毎日の出血スコアがその日の最も重症の出血を表す。

^c 医師の概括評価は3つの他の基準、腹部不快感及び一般的な健康感の患者の毎日の回想及び他の観察結果、例えば身体所見及び患者の一般状態を確認する。

10

20

【0256】

無作為化の前に、患者にはUCのための安定用量の併用医薬が投与されていなければならなかった。経口5 - アミノサリチル酸(5 - ASA)及び免疫抑制剤(アザチオプリン[AZA]、6 -メルカプトプリン[6 - MP]、又はメトトレキサート)投薬が、1日目の無作為化の前、少なくとも4週間、安定に維持されていなければならなかった。外用の5 - ASA又はコルチコステロイドを受けている患者は1日目の無作為化の2週間前に中断していなければならなかった。経口コルチコステロイド用量は1日目の無作為化前の2週間、安定に維持されていなければならなかった。高用量のステロイドを受けている患者は1日目の無作為化前の2週間の間、20mg/日に用量を減じなければならなかった。試験治療期間中に経口コルチコステロイドを受けている患者では、毎週5mgのプレドニゾン又はプレドニゾン等価物の割合で2週間、ついで中止まで毎週2.5mgのプレドニゾン又はプレドニゾン等価物の割合で、ステロイドの漸減を10週目に開始しなければならなかった。(経口コルチコステロイド以外の)経口免疫抑制剤を受けている患者では、8週目に免疫抑制剤の漸減を開始しなければならず、患者は10週目までには免疫抑制剤を完全に中止しなければならなかった。抗TNF療法を過去に受けたことがある患者は1日目に試験薬剤を受けるために無作為化の最短8週間前に治療を中断しなければならなかった。試験中にいつでも患者が疾患活動持続又は増大を経験した場合は、ステロイド又は免疫抑制剤用量の増加の形態の救援治療が、研究者の臨床的判断に従って増加させられるか又は開始される場合がある。救援治療を必要とした患者は試験に残ることは許されたが、試験治療は中止され、データ解析中、治療失敗となったと分類された。

30

40

【0257】

患者を評価して、少なくとも一の抗TNF剤を含む一般的治療に应答しなかったかどうかを決定した。ここで使用される場合、抗TNF剤及び免疫抑制剤に対する应答消失及び/又は不耐性とは次のことを意味する。抗TNF剤に関しては、应答消失及び/又は不耐性とは、活動疾患の徴候が、(a)インフリキシマブ:5mg/kgIV、6週にわたって3用量、8週目に評価;(b)アダリムマブ:0週目に1回の160mgSC用量、続いて2週目に1回の80mg用量、ついで4及び6週目に40mg、8週目に評価の一又は複数での過去の治療にもかかわらず持続する;又は過去の应答に続く規則的にスケジュール化された維持投薬中の反復する活動徴候(应答したが应答を失わなかった患者による

50

治療の選択的中止は該当しない) ; 又は少なくとも一種の抗TNF抗体に対する不耐性の経歴(排他的ではなく又は限定されないが、注入関連反応又は注射部位反応、感染、鬱血性心不全、脱髄を含む)を意味する。免疫抑制剤に関しては、応答消失及び/又は不耐性とは、少なくとも8週間の間、毎週アザチオプリン(1.5mg/kg)又は等価用量の6-メルカプトプリンmg/kg(0.75mg/kg)又はメトトレキセート、25mgSC/筋肉内(又は示した通り)の一又は複数での過去の治療にもかかわらず活動疾患の徴候が持続すること; 又は少なくとも一種の免疫抑制剤の不耐性の症歴(排他的ではないが、腭炎、薬剤熱、発疹、吐き気/嘔吐、肝機能検査の高値、チオプリンS-メチルトランスフェラーゼ遺伝子変異、感染を含む)を意味する。

【0258】

試験治療に対する無作為化は、コルチコステロイドとの併用治療(有/無)、免疫抑制剤との併用治療(有/無)、過去の抗TNF曝露(有/無)(合衆国において無作為化された患者は除く)、及び試験施設によって層別化された。

【0259】

UC疾患活動性は、スクリーニングの際(これをベースラインMCSと考えた)、6週目(4週目の投与から2週間後)、及び10週目(試験薬剤の最終用量から2週間後)にMCSを使用して評価された。結腸生検がこれらと同じ時点で実施された軟性S状結腸鏡検査の間に得られた。部分的MCSもまた試験にわたって集められた。患者報告アウトカム(PRO)がまた1日目と6週及び10週目に患者によって記入された簡略炎症性腸疾患質問票(SIBDQ)及びMCSを使用して評価された。また、疾患活動性、毎日の症状、及びUCの影響が、スクリーニング(1日目のおよそ7日前)から、6週及び10週目の試験往診の前まで少なくとも7日間、毎日つけられる患者日誌で集められた。血清及び糞試料がまたバイオマーカー分析のために取得された。バイオマーカーの測定のために便がスクリーニング時及び6、10及び28週目に得られた。測定に考慮された例示的バイオマーカーは、限定しないが、リポカリン、カプロテクチン、及びラクトフェリンを含む。血清及び血漿は、探索バイオマーカーの測定のためにスクリーニング時、1日目及び4、6、10、16及び28週目に得られた。

【0260】

この試験の主要有効性エンドポイントは、10週目までの、1ポイントを越える個々のサブスコアがなく、2であるMCSの絶対的減少として定義される臨床的寛解を達成した患者の割合であった。更なる副次的エンドポイントは以下に記載の試験評価項目に列挙される。

【0261】

評価項目

主要有効性評価項目

主要有効性評価項目は10週目での臨床的寛解であった。臨床的寛解は1ポイントを越える個々のサブスコアがない2のMCSによって定義される(表1参照)。

【0262】

副次的有効性評価項目

この試験のための副次的有効性評価項目は、(1)6週目及び10週目の臨床応答(ここで、臨床応答は、MCSにおけるベースラインからの3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア; (2)6週目での臨床的寛解(上に定義); 及び(3)6週目及び10週目における0の内視鏡検査スコア指標及び直腸出血スコアであった。

【0263】

探索評価項目

この試験のための探索評価項目は応答又は寛解を達成した患者におけるUCの紅斑までの時間であった。この評価項目では、紅斑は3日の連続的直腸出血を伴う部分的MCSにおける2ポイント増加と軟性S状結腸鏡検査での2の内視鏡検査スコアとして定義される。

10

20

30

40

50

【0264】

安全性評価項目

r h u M A b ベータ7の安全性及び認容性は次の評価項目を使用して評価した：(1) 国立がん研究所、有害事象共通用語規準(N C I C T C A E) v 4 . 0 に従って類別された有害事象及び重篤な有害事象の発生率；(2) バイタルサイン及び安全性研究室評価項目における臨床的に有意な変化；(3) 有害事象による中止；(4) 注射部位反応及び過敏症の発生率及び性質；(5) 感染合併症の発生率；及び(6) A T A の発生率によって測定した免疫原性。

【0265】

薬物動態評価項目

薬物動態評価項目は次のものを含んでいた：(1) 最初の用量及び最終用量後の $C_{m a x}$ ；(2) 最初の用量及び最終用量後の最大濃度 ($T_{m a x}$) までの時間；(3) 最終用量後の用量間隔内の血清濃度 - 時間曲線 (A U C) 下の面積；(4) 時間0から最後の検出可能な観察時間までの A U C ($A U C_{1 a s t}$) 又は無限大までの A U C ($A U C_{i n f}$)；(5) 見かけのクリアランス ($C L / F$)；(6) 見かけの分布容積 (V / F)；及び(7) 排出半減期 ($t_{1 / 2}$)。

【0266】

実施例2 - 予測バイオマーカー研究及び解析

エトロリズマブで治療された患者における効能の富化のための予測バイオマーカーインテグリンベータ7及びCD3イプシロンの選択の論拠

上で検討されたように、エトロリズマブは $\alpha 7$ インテグリンに結合し、粘膜内皮細胞上に発現される M A d C A M 1 への結合を阻止する。M A d C A M 1 に対する $\alpha 7$ インテグリンを発現するリンパ球の結合は、小腸、大腸のリンパ濾胞、及び腸間膜リンパ節への細胞の移動において重要な役割を果たしている。我々は、 $\alpha 7$: M A d C A M 相互作用を介しての腸ホーミングリンパ球の移動の増加はUCにおいて進行する炎症を活発にすると思われるので、そのようなリンパ球の腸ホーミング増加の証拠を持つ患者はエトロリズマブでの治療から恩恵を受けるであろうと仮定した。よって、我々は、疾患組織におけるリンパ球移動及び存在によって強く活発化される疾患を有している場合がある患者における効能の増加を探るためにリンパ球及び $\alpha 7$: M A d C A M 1 経路活性を測定した予測診断マーカーを選択した。

【0267】

候補の予測診断マーカーインテグリンベータ7及びCD3イプシロンは臨床的効能結果の分析前に予め選択された。T細胞受容体 - CD3シグナル伝達複合体の成分であるCD3の生検発現が、腸にける疾患を活発にしうるT細胞上のその比較的排他的な発現のため潜在的な予測バイオマーカーとして選択された。また、 $\alpha 7$ インテグリンはリンパ球及び樹状細胞及び他の細胞型上に発現される。前臨床及びフェーズI臨床試験によって予測されるように、そのような $\alpha 7$ 発現細胞は、エトロリズマブで治療された患者では、腸への輸送が阻止されるはずである。従って、我々は生検及び $\alpha 7$ 又は末梢血中の $\alpha 7$ インテグリンのレベルがエトロリズマブでの治療に対する応答を予測したかどうかを決定しようとした。

【0268】

腸生検組織の収集と処理

腸生検をスクリーニング往診時(治療の4週間前まで)に軟性S状結腸鏡検査/完全な結腸内視鏡検査中に試験参加者から集めた。生検は肛門縁の10 - 40 cm内の結腸の最も炎症性の領域から採取した。先に結腸切除術を受けた患者の縫合部位又は潰瘍のある粘膜の壊死領域内の生検は避けた。生検は組織RNA安定化バッファー(RNA later, Qiagen, カタログ番号76104)中に入れられ、出荷のために凍結されていた。受領時に生検試料を解凍し、Tissue Lyzer (Qiagen, カタログ番号69989)を使用して3mmの鋼製ビーズでホモジナイズさせ、RNeasyミニキット(Qiagen, カタログ番号74106)を製造者の説明に従って使用してRNAを単

10

20

30

40

50

離した。RNAの完全性はAgilent RNA 6000 Picoキット (Agilent Technologies, カタログ番号5067-1513) を使用してAgilent 2100 バイオアナライザーで評価した。低RNA品質 (RIN 5) の試料を分析から除いた。ABI大容量RTキット (Life Technologies, カタログ番号4368814) を使用して、RNAをcDNAに逆転写した。遺伝子発現レベル (つまりRNAレベル) を、定量PCR又はqPCRとも称されるリアルタイムPCRによって評価した。リアルタイムPCR反応は、ヒトCD3 (カタログ番号Hs00167894__m1)、E (カタログ番号Hs01025372__m1)、7 (カタログ番号Hs01565750__m1)、及びグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) (カタログ番号Hs99999905__m1) プライマーセット (全てApplied Biosystems [Life Technologies] 製) を使用して製造者の指示に従って、Fluidigmプレ増幅マスターミックス (Life Technologies, カタログ番号4391128) 及び試薬 (Fluidigm, カタログ番号BMK-M10-96.96) と共にBioMarkTM HDシステムで実施した。CD3、E、及び7発現は先に記載されたCT法を使用してGAPDH発現に正規化された。

【0269】

これらの実験の結果は図3A-C (7遺伝子発現) 及び図4A-C (CD3 遺伝子発現) に示される。各棒グラフのプロットにおいて、低遺伝子発現 (フェーズII試験の患者集団に対する中央値未満) は、プラセボ、100mg / 用量エトロリズマブ、及び300mg / 用量エトロリズマブに対してプロットの左半分に示され、高遺伝子発現 (フェーズII試験の患者集団に対する中央値より上) は、プラセボ、100mg / 用量エトロリズマブ、及び300mg / 用量エトロリズマブに対してプロットの右半分に示される。ベースライン時 (スクリーニングとも称される、つまり第一薬剤又はプラセボ投与前) のベータ7遺伝子発現及びCD3 発現の双方について、我々は、上述の臨床試験において10週目に臨床応答 (図3C及び4C; MCSにおいてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコアとして定義)、粘膜治癒 (図3B及び4B; 0又は1の内視鏡サブスコアとして定義) 又は寛解 (図3A及び4A; > 1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2として定義) を達成した患者の割合を評価した。全ての報告値 (棒の上の数) はベータ7高及びベータ7低集団 (図3A-C) 及びCD3 高及びCD3 低集団 (図4A-C) においてプラセボ応答に対して修正した。

【0270】

図3A-Cに見られるように、ベースラインで高レベルのベータ7遺伝子発現を伴う患者は、(i) 寛解 (31%ベータ7高対18%ベータ7低)、(ii) 粘膜治癒 (37%ベータ7高対1%ベータ7低)、及び(iii) 臨床応答 (29%ベータ7高対-3%ベータ7低) の3つ全てのエンドポイントによって測定して、100mg / 用量エトロリズマブでの治療に対して高いプラセボ修正応答を示した。この富化された臨床的恩恵は、粘膜治癒 (14%ベータ7高対16%ベータ7低) 及び寛解エンドポイント (7%ベータ7高対20%ベータ7低) に対しては300mg / 用量のエトロリズマブで観察されなかったが、臨床応答エンドポイント (21%ベータ7高対-1%ベータ7低) に対しては観察された。同様に、ベースラインで高レベルのCD3 遺伝子発現を伴う患者は、臨床応答 (36%CD3 高対-6%CD3 低、100mg / 用量; 10%CD3 高対9%CD3 低、300mg / 用量)、粘膜治癒 (36%CD3 高対5%CD3 低、100mg / 用量; 12%CD3 高対21%CD3 低、300mg / 用量)、及び寛解 (36%CD3 高対15%CD3 低、100mg / 用量; 13%CD3 高対15%CD3 低300mg / 用量) の3つ全てのエンドポイントによって測定して、100mg / 用量エトロリズマブでの治療に対して (300mg / 用量エトロリズマブでは否)、高いプラセボ修正応答を示した。従って、これらの結果は、結腸の炎症領域の腸生検におけるベータ7遺伝子発現及び/又はCD3 遺伝子発現の何れかの中央値よりも高いレベルは

エトロリズマブ治療の臨床上的利点の増加に関連していることを証明しており、この臨床上の利点は、エトロリズマブが100mg/用量で投与される場合に最大である。よって、結腸の炎症領域の腸生検におけるベータ7遺伝子発現及び/又はCD3 遺伝子発現の何れかの中央値よりも高いレベルは、エトロリズマブを含むベータ7インテグリンサブユニットを標的とする治療剤での治療から恩恵を受ける蓋然性が高いUC患者を特定するための予測バイオマーカーとしての可能性を示している。

【0271】

ある場合には、腸生検を得るよりも侵襲性が少ない方法が望ましい。末梢血中の遺伝子発現レベルを評価する方法がそのような侵襲性が少ない方法の例である。よって、我々は、腸生検組織においてベースラインのベータ7遺伝子発現の中央値よりも高いレベルを有していたエトロリズマブ治療患者において見られる増強された臨床上的利点が、末梢全血試料中のベータ7遺伝子発現を評価することによってまた観察できるかどうかを決定しようとした。

【0272】

フェーズIの治験において、我々は、CD3+細胞上にFACS解析によって高いレベルのベータ7を発現した患者が、CD3+細胞上に低いレベルのベータ7を有していた患者よりもエトロリズマブ治療により良好に応答するようである(データは示さず)ことを観察した。その治験において、我々はRNA分析のための末梢血を採取しなかったため、ベータ7RNAレベルとベータ7タンパク質レベルの間の相関関係及びエトロリズマブに対する応答についてその試料を分析することができなかった。よって、フェーズIIの治験からの患者試料を分析する前に、我々は、CD3+細胞及びフェーズII治験に登録されていないIBD患者及び健常なコントロール被験者からの試料中の他の血液細胞集団においてベータ7遺伝子発現レベル(RNAレベル)がベータ7タンパク質発現レベルと相関していたかどうかを決定しようとした。

【0273】

以下に記載の実験では、全血は標準的な手順に従って集められた; RNA研究のための血液は製造者のプロトコルに従ってPAXgene管に集められた。FACS解析には、抗体はBecton Dickinsonから得られた(表2を参照)。末梢血試料からの細胞は、当該技術分野で知られている標準的な手順に従って標識抗体と共にインキュベートされFACSCalibur機で解析された。ベータ7発現はQuantum PE-MESFビーズ(Bangs Laboratory, カタログ番号827)を使用して定量された。我々はまた患者試料がFACS解析実施前に室温で一晩保存され及び/又は輸送された場合にFACS解析によるベータ7発現が最適になると判定した。

表2. FACS解析に使用された抗体

	コンジュゲート	BD カタログ番号
ベータ7	PE	555945
CD45RA	FITC	347723
CD19	FITC	555412
CD27	APC	558664
CD3	APC	340440
CD3	FITC	555332
CD3	PE	347347
CD4	PerCP Cy5.5	341654
IgD	PerCP Cy5.5	561315
マウスアイソタイプ IgG1	FITC	556649
マウスアイソタイプ IgG1	APC	550854
マウスアイソタイプ IgG2a	FITC	554647
マウスアイソタイプ IgG2a	PerCP Cy5.5	552577
マウスアイソタイプ IgG1	PerCP Cy5.5	550795
ラットアイソタイプ IgG2a	PE	555844

10

20

30

40

50

【0274】

qPCRでは、我々は製造者のプロトコルに従ってBioRad iScript Select cDNA合成キット(カタログ番号170-8897)を使用してcDNAを産生させ、ついでインテグリンベータ7、CD3イプシロン、CD20(カタログ番号Hs00544819_m1)、CD45(カタログ番号Hs04189704_m1)及びGAPDHについて製造者のプロトコルに従ってABI Taqmanアッセイを使用してqPCRを実施した。図5はこれらのFACS解析とqPCR測定を相関させるプロットを示す。図5から分かるように、qPCRによって測定されたベータ7RNAレベルはCD3+T細胞又はCD19+B細胞においてベータ7タンパク質レベルと相関していなかった。しかしながら、リンパ球中のベータ7タンパク質レベルはハウスキーピング遺伝子GAPDHのレベル又はCD45のRNAレベルに正規化されたベータ7RNAレベルと有意に相関していた。図5のボックスの矩形、統計的相関(示されたスピアマンr及びp値)を参照。従って、我々は末梢血(PAXgene管に集めた全血)中のベータ7遺伝子発現(RNAレベル)がqPCRによって容易に検出され定量できることを確認した。

10

【0275】

次に我々は上述のフェーズIIプロトコルに従ってエトロリズマブで治療された患者の末梢血中のベータ7遺伝子発現を分析し、末梢血中のベータ7RNAレベルと効能の程度との間の連関を探した。

【0276】

全RNAをKingFisher磁気粒子セパレーターでの自動単離によって凍結PAXgene血液管から単離した。簡単に述べると、管を室温で16時間かけて解凍させた。遠心分離と洗浄を行って白血球ペレットを集めた後、細胞をグアニジウム含有バッファーに溶解させた。KingFisherの実施の準備において結合バッファー及び磁気ビーズを添加する前に有機抽出を実施した。該手順はマイクロRNAの保持のために最適化され、磁気ビーズからの溶出前にデオキシリボヌクレアーゼ処理工程及びクリーンアップを含めた。全RNA試料の純度と量はNanoDrop ND-1000 UV分光光度計を使用して260及び280nmでの吸光度読み値によって決定された。全RNAの完全性は、Nanoアッセイ及びCaliper LabChipシステムを使用して、Agilentバイオアナライザー2100マイクロフルイディック電気泳動によって認定した。

20

【0277】

全RNA(2µgまで)を、製造者の説明書に従ってTaqMan(登録商標)高容量cDNA合成キット(Applied Biosystems[Life Technologies])を使用して20µLの全反応体積で1時間逆転写させた。製造者の説明書に従ってヒト7及びGAPDHプライマーセット(Applied Biosystems[Life Technologies])を使用して、ViiA(商標)リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems[Life Technologies])で高速リアルタイムPCR反応を起こさせた。ベータ7発現はGAPDH発現に正規化された。

30

40

【0278】

結果を図6A-Cに示す。ベースラインで高レベルのベータ7末梢血遺伝子発現を伴う患者は、粘膜治癒エンドポイント(30%ベータ7高対3%ベータ7低)(図6B)及び寛解エンドポイント(42%ベータ7高対11%ベータ7低)(図6A)では、100mg/用量のエトロリズマブでの治療に対して大なるプラセボ修正応答を示した。100mg/用量のエトロリズマブアームで高ベータ7を発現する患者は臨床応答エンドポイントに対して低レベルのベータ7を発現する患者よりもエトロリズマブ治療に対してより高い応答をまた示したが、これらの結果はプラセボ修正されなかった(図6C)。100mg/用量アームの高ベータ7患者に見られる増強された臨床上的利点は、粘膜治癒(図6B)及び臨床応答エンドポイント(図6C)では、300mg/用量のエトロリズマブでは

50

観察されず、しかし寛解エンドポイント（図6A）に対しては観察されたが、但し、高ベータ7患者と低ベータ7患者の間の差の大きさは低かった。従って、これらの結果は、末梢血中のベータ7遺伝子発現の中央値よりも高いレベルはエトロリズマブ治療の臨床上的利点増加と関連していることを証明しており、この臨床上的利点はエトロリズマブが100mg/用量で投与される場合に最も大きい。よって、末梢血中のベータ7遺伝子発現の中央値よりも高いレベルは、エトロリズマブを含むベータ7インテグリンサブユニットを標的とする治療剤での治療から恩恵を受ける蓋然性が高いIBD患者、例えばUC及びクローン病患者を特定するための予測バイオマーカーとしての可能性を示している。

【0279】

エトロリズマブで治療された患者における効能の増強のための予測バイオマーカーインテグリンアルファEの選択の論理的根拠

10

エトロリズマブは7インテグリンに結合し、粘膜内皮細胞上に発現されるMAdCAM1と、上皮細胞上に発現されるE-カドヘリンの双方への結合を阻止する。E-カドヘリンに対するE7インテグリンを発現するリンパ球の結合は、腸上皮に隣接する細胞の位置づけ及び保持を補助しうる。我々は、E7:E-カドヘリンへの結合がUCにおいて進行する炎症にまた重要であり得、よって増加したE7+リンパ球の証拠を持つ患者はエトロリズマブでの治療から恩恵を受けるであろうと仮定した。よって、我々は、疾患組織におけるリンパ球の移動及び存在によって強く活発化される疾患を有している場合がある患者における効能の増加を探するために、我々の7経路マーカーにEを含めるように我々の予測診断マーカーを拡張した。従って、我々は生検及び/又は末梢血中のEインテグリンのレベルがエトロリズマブでの治療に対する応答を予測するかどうかを決定しようとした。

20

【0280】

腸生検が集められ、RNA laterに配され、上述のようにして処理された。更なる生検が採取され、ホルマリン中に入れられ、搬送まで保存された。受領時、第二セットの生検試料がパラフィンブロックに包埋された。このセクションに記載された研究では、腸生検は上述のフェーズII試験中に集められるか、又は上述のフェーズII試験とは無関係の理由で腸生検術を受ける患者から試料が集められる他の供給源から得られた。パラフィンブロックは4µmの切片に加工され、ガラススライドに配された。染色はVentana Benchmark XT (Ventana Medical Systems; Tucson, AZ) 自動染色器で実施された。推奨された時間の間、Cell Conditioner 1を用いて前処理がなされた。一次抗体抗E (ウサギモノクローナルEP R4166 (2), カタログ番号ab129202, Abcam, Cambridge, MA) が1.896µg/mlの濃度で使用され、37°Cで60分スライド上でインキュベートされた。この工程の後にVentana Ultraview (Ventana Medical Systems; AZ) でのスライドのインキュベーションが続いた。Ventana DAB及びヘマトキシリンIIが発色検出及び対比染色に使用された。

30

【0281】

図7に示されるように、Eの免疫組織化学的検査は小さな丸い細胞がリンパ球である可能性が高いことを証明した。これらの細胞の大部分は結腸の上皮細胞腺窩に隣接するか又は結合しており（図7A, 左パネル）、また小腸の絨毛内にある（図7A, 右パネル）。我々はまた表面上皮との結合を観察した（データは示さず）。より拡散した染色の大きな細胞の亜集団もまた観察され、樹状細胞を表し得た。我々は非IBD患者からの結腸、回腸及び空腸組織試料のパネルからの染色切片中のE+細胞を数え上げた。コンピュータを用いた自動カウントを使用して染色スライド上のE+細胞を数え上げた；解析は、組織切片の粘膜領域において放射状の対称を示した細胞に限られた。全細胞当たりのE+細胞の数の増加が結腸組織試料と比較して空腸及び回腸において観察された（図7B）。全細胞のパーセントとしてのE+細胞の数の増加もまたCD患者の回腸及び空腸において観察された（図7B）。最後に、我々は、非IBD患者と比較してのIBD患者からの組織試料中の全細胞のパーセントとしてのE+細胞の差は認めなかった。GAPDH

40

50

に正規化された E の遺伝子発現もまた非 I B D 及び U C 結腸、及び C D 結腸、回腸及び空腸からの試料において実施された (図 7 C)。また、E 遺伝子発現の増加が小腸において観察されたが、I B D 及び非 I B D 組織試料間で差異は観察されなかった。

【 0 2 8 2 】

小腸は、C D 患者の大部分 (5 0 - 6 0 %) が回腸終端部を含む疾患を有しているため、C D において特に興味深い。小腸試料における E + 細胞と E 遺伝子発現の双方の高レベルは、これらの細胞が C D 病理生物学において重要な役割を果たすことを示し得、よってその相対的な豊富さがエトロリズマブでの治療に対する C D 患者における予測マーカーとなりうる。生検試料のスクリーニングにおいてアルファ E 遺伝子発現と共にアルファ E + 細胞を U C におけるエトロリズマブのフェーズ I I 治験における潜在的な予測バイオマーカーと考えた (上述の通り)。

10

【 0 2 8 3 】

フェーズ I I 試験に登録された患者からのパラフィンブロックに包埋されたホルマリン固定スクリーニング組織生検が切片化され、免疫組織化学的検査によって E に対して染色され、上に詳述したようにしてカウントされた。利用できる組織試料を持つ登録患者のスクリーニング生検を使用して全細胞カットオフ当たりの中央値 E + 細胞が樹立された (図 7 D (ここで、点描ドットは寛解に至ったエトロリズマブで治療された患者におけるスクリーニングレベルを表し、白抜きドットは寛解を達成しなかった患者を表し、黒のドットはプラセボを投与された患者を表し; 破線は中央値を示し; T N F ナイーブ及び T N F 不十分レスポンス [T N F - I R] がまた示される)。図 7 E は、中央値よりも上 (E 高) 及び中央値未満 (E 低) であった全細胞当たりの E + 細胞のレベルを有していたフェーズ I I 試験に登録された患者からのスクリーニング生検における E 染色の例を示す。フェーズ I I 試験に登録された患者からのスクリーニング生検における E 遺伝子発現の分布は図 7 F に示され、二つの尺度の関係が図 7 G に示される。

20

【 0 2 8 4 】

患者からの腸生検を使用して遺伝子発現及び免疫組織化学的検査によって決定された E の性能はそれぞれ図 8 A - C 及び 8 D - F に示される。これらの実験において、患者は T N F 状態 (T N F - ナイーブ又は T N F - I R) によっては層別化されなかった。各棒グラフのプロットにおいて、低遺伝子発現又は E + 細胞数 (フェーズ I I 治験からの患者集団の中央値未満) はプラセボ、1 0 0 m g / 用量エトロリズマブ、及び 3 0 0 m g / 用量エトロリズマブに対してプロットの左半分に示され、高遺伝子発現 (フェーズ I I 治験からの患者集団の中央値より上) はプラセボ、1 0 0 m g / 用量エトロリズマブ、及び 3 0 0 m g / 用量エトロリズマブに対してプロットの右半分に示される。全患者からのデータが示される。ベースライン (スクリーニングとも称される、つまり最初の薬剤又はプラセボ投与の前) での E 遺伝子発現及び免疫組織化学的検査では、我々は上述の臨床試験において 1 0 週目に臨床応答 (図 8 C 及び F ; M C S においてベースラインから 3 ポイント減少及び 3 0 % 低下と、直腸出血サブスコアが > 1 ポイント減少又は 0 もしくは 1 の絶対直腸出血スコアと定義)、粘膜治癒 (図 8 B 及び E ; 0 又は 1 の内視鏡検査サブスコアと定義) 又は寛解 (図 8 A 及び D ; > 1 の個々のサブスコアを伴わない M C S < 2 と定義) を達成した患者の割合を評価した。全ての報告値 (バーの上の数) は分析の一部であった各用量群における患者の数 (分母) に対してこのエンドポイントを達成した患者の数 (分子) を表す。

30

40

【 0 2 8 5 】

図 8 A - C から分かるように、スクリーニング時に高レベルの E 遺伝子発現を伴う患者は、粘膜治癒 (1 9 % E 高対 1 3 % E 低)、及び寛解 (3 8 % E 高対 1 3 % E 低) によって測定されて、1 0 0 m g / 用量エトロリズマブでの治療に対してより高いプラセボ修正応答を示した。この増強された臨床上的利点は 3 0 0 m g / 用量のエトロリズマブでは観察されなかった。全細胞当たり高レベルの E + 細胞を持つ患者は、粘膜治癒 (図 8 E ; 1 9 % E 高対 3 % E 低)、及び寛解 (図 8 D ; 5 0 % E 高対 7 % E 低) によって測定して 1 0 0 m g / 用量エトロリズマブでの治療に対してより高いプラセ

50

ボ修正応答を示した。この実験では、スクリーニング時に全細胞当たり高レベルの E + 細胞を持つ 300 mg / 用量が投与された患者においてのみ寛解が増強された (図 8 D ; 14% E 高対 9% E 低)。

【0286】

図 9 A - F は TNF ナイーブ患者における結果を示す。スクリーニング時に高レベルの E 遺伝子発現を伴う TNF ナイーブ患者は、臨床応答 (28% E 高対 13% E)、粘膜治癒 (42% E 高対 17% E)、及び寛解 (67% E 高対 17% E 低) の 3 つ全てのエンドポイントによって測定して、100 mg / 用量のエトロリズマブでの治療に対して高いプラセボ修正応答を示した; 300 mg / 用量エトロリズマブ (50% E 高対 20% E 低, 300 mg / 用量) が与えられた患者においてのみ寛解が増強された (図 9 A - C)。同様に、スクリーニング時に全細胞当たり高レベルの E + 細胞を持つ TNF ナイーブ患者は、粘膜治癒 (図 9 E ; 38% E 高対 25% E, 100 mg / 用量群及び 46% E 高対 25% E, 300 mg / 用量群) 及び寛解 (図 9 D ; 67% E 高対 25% E, 100 mg / 用量群及び 50% E 高対 25% E, 300 mg / 用量群) によって測定して、エトロリズマブでの治療に対して高いプラセボ修正応答を示した。

10

【0287】

これまでに検討されたように、腸生検を得るよりも侵襲性が少ない方法が望ましい。末梢血中における遺伝子発現レベルを評価する方法はそのような侵襲性が少ない方法の例である。我々は末梢全血試料中のベータ7 遺伝子発現レベルを評価することによりエトロリズマブ治療患者における臨床上的利点の増強を既に調べ、ベータ7 は 4 と E の双方と対形成しうるので、我々は次に応答と寛解の増強について試験するためにスクリーニング時及び1日目の E の末梢血遺伝子発現を使用した。これらの実験の結果は図 10 A - F に示される。これらの実験では、患者は TNF 状態 (TNF - ナイーブ又は TNF - IR) によって層別化されなかった。

20

【0288】

図 10 A に示されるように、スクリーニング時に末梢血中に高レベルの E 遺伝子発現を伴う患者は、寛解エンドポイント (図 10 A ; 29% E 高対 8% E 低, 100 mg / 用量群, 19% E 高対 5% E 低, 300 mg / 用量群) についてエトロリズマブでの治療に対して高いプラセボ修正応答を示した。アルファ E 遺伝子発現もまた1日目に末梢血において測定され、100 mg / 用量群の E 高患者が、増加した寛解 (図 10 D ; 33% E 高対 13% E 低) 及び粘膜治癒 (図 10 E ; 27% E 高対 2% E 低) を有していることが見出された。

30

【0289】

図 11 A - F は TNF ナイーブ患者におけるスクリーニング時又は1日目の末梢血遺伝子発現の結果を示している。高レベルの末梢血 E 遺伝子発現を伴う TNF ナイーブ患者はスクリーニング時 (図 11 A ; 29% E 高対 8% E, 100 mg / 用量群及び 40% E 高対 17% E, 300 mg / 用量群) 及び1日目 (図 11 D ; 55% E 高対 20% E) でのエトロリズマブでの治療に対して高いプラセボ修正寛解を示した。

40

【0290】

フェーズ II の治験に登録された患者には、上述のように全ての患者に4週間毎に300 mg / 用量のエトロリズマブが投与された非盲検継続投与試験に登録される選択肢が与えられた。応じなかった患者は10週間の完了後又は安全性追跡調査期間中のいつでも治験に入ることができた。図 12 に示されるように、フェーズ II 試験中に活性薬剤を受けたが10週で応答を示さなかった33名の TNF - IR 患者 (100 mg / 用量アームの14名と300 mg / 用量アームの19名) は投薬レジメンの中断なしに非盲検継続投与試験に登録された。これらの患者は部分的メイヨークリニックスコアを使用して4週後 (最初の用量から14 - 16週後) に寛解のスコアがなされた。部分的メイヨークリニックスコアは内視鏡検査サブスコアを除いて全てのメイヨーサブスコアが集められる9ポイントの臨床スコアである。寛解は 2 ポイントの全スコアとして定義され、応答はベースライ

50

ンの部分的メイヨークリニックスコアの25%及び2ポイントの減少として定義される。

【0291】

10週の主要エンドポイントで応答を有していなかったスクリーニング時に腸生検中のE遺伝子発現が高レベルであったTNF-IR患者は、継続された治療に対して、より高い寛解(図13A; 18% E高対0% E低)と応答(図13B; 53% E高対8% E低)を示した。スクリーニング時に全細胞当たりのE+細胞が高レベルであったTNF-IR患者もまた更なる治療に対して高い寛解(図13C; 22% E高対0% E低)と応答(図13D; 56% E高対17% E低)を示した。末梢血中のEが高レベルであったTNF-IR患者はより高い応答を示した(図13F; 41% E高対15% E低)。

10

【0292】

従って、これらの結果は、結腸の炎症領域の腸生検中の全細胞当たりのE遺伝子発現又はE+細胞の中央値より高いレベル並びに末梢血中のE遺伝子発現の中央値より高いレベルが、患者におけるエトロリズマブ治療の臨床上的利点の増加と関連していることを実証しており、この臨床的恩恵は、エトロリズマブが4週間毎に100mg/用量で皮下的に投与されたときに最も大きかった。よって、結腸の炎症領域の腸生検中のE遺伝子発現又はE+細胞あるいは末梢血中のE遺伝子発現の中央値よりも高いレベルが、エトロリズマブを含むベータ7インテグリンサブユニットを標的とする治療剤での治療から恩恵を受ける蓋然性の高いIBD患者、例えばUC及びクローン病患者を特定するための予測バイオマーカーとしての可能性を示している。

20

<本発明の更なる実施態様>

[実施態様1]

インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に対する胃腸炎症性障害に罹患した患者の応答を予測する方法において、

患者から生物学的試料を得る工程と、

試料中の少なくとも一の遺伝子のmRNA発現レベルを測定する工程であって、遺伝子がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、

試料において検出されたmRNA発現レベルを基準レベルと比較する工程と、

30

mRNA発現レベルが基準レベルと比較して高いと測定された場合に患者が治療に応答すると予測し、mRNA発現レベルが基準レベルと比較して低いと測定された場合に患者が治療に応答しないと予測する工程とを含む方法。

[実施態様2]

インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対する胃腸炎症性障害患者の応答性を予測する方法において、患者からの生物学的試料における、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一の遺伝子のmRNA発現レベルを決定することを含み、基準レベルと比較したmRNA発現レベルの上昇が、インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対して応答する可能性が高い者として患者を同定する、方法。

40

[実施態様3]

胃腸炎症性障害に罹患した患者をインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する方法において、

(a)患者からの生物学的試料中の少なくとも一の遺伝子のmRNA発現レベルを測定する工程であって、少なくとも一の遺伝子がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、

(b)(a)において測定されたmRNA発現レベルを基準レベルと比較する工程と、

(c)(a)において測定されたmRNA発現レベルが基準レベルよりも高い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として

50

同定する工程と
を含む方法。

[実施態様 4]

胃腸炎症性障害に罹患した患者を治療する方法において、

(a) 患者からの生物学的試料中の少なくとも一の遺伝子の mRNA 発現レベルを測定する工程であって、少なくとも一の遺伝子がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、

(b) (a) において測定された mRNA 発現レベルを基準レベルと比較する工程と、

(c) (a) において測定された mRNA 発現レベルが基準レベルよりも高い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に応答する可能性がある者として同定する工程と、

(d) (a) において測定された mRNA 発現レベルが基準レベルよりも高い場合に治療を施し、それによって胃腸炎症性障害を治療する工程とを含む方法。

[実施態様 5]

100mgのインテグリンベータ7アンタゴニストが4週間毎に一回、皮下投与される、実施態様4に記載の方法。

[実施態様 6]

患者がヒトである実施態様1から5の何れか一項に記載の方法。

[実施態様 7]

患者がTNF不十分レスポンドー(TNF-IR)である実施態様6に記載の方法。

[実施態様 8]

胃腸炎症性障害が炎症性腸疾患である実施態様6に記載の方法。

[実施態様 9]

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である実施態様8に記載の方法。

[実施態様 10]

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎であり、応答が臨床応答、粘膜治癒及び寛解から選択される、実施態様9に記載の方法。

[実施態様 11]

生物学的試料が腸組織及び末梢全血から選択される、実施態様6に記載の方法。

[実施態様 12]

mRNA発現レベルがPCR法によって測定される、実施態様6に記載の方法。

[実施態様 13]

PCR法がqPCRを含む実施態様12に記載の方法。

[実施態様 14]

測定が、インテグリンベータ7 mRNA、インテグリンアルファE mRNA、及びCD3イプシロン mRNA の一又は複数を増幅させ、増幅した mRNA を検出し、それによって増幅 mRNA レベルを測定することを含む、実施態様6に記載の方法。

[実施態様 15]

基準レベルが中央値である実施態様6に記載の方法。

[実施態様 16]

患者における胃腸炎症性障害を治療する方法において、患者に治療的有効量のインテグリンベータ7アンタゴニストを投与することを含み、ここで、患者から得られた生物学的試料が、上昇した mRNA 発現レベルの、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一の遺伝子を発現していると決定され、

あるいは

インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一の遺伝子の、患者から得られた生物学的試料中の上昇した mRNA 発現レベルに基づき、患者の治療法が選択される、方法。

10

20

30

40

50

[実施態様 17]

100mgのインテグリンベータ7アンタゴニストが4週間毎に一回、皮下的に投与される、実施態様16に記載の方法。

[実施態様 18]

患者がヒトである実施態様17に記載の方法。

[実施態様 19]

患者がTNF不十分レスポンドー(TNF-IR)である実施態様18に記載の方法。

[実施態様 20]

胃腸炎症性障害が炎症性腸疾患である実施態様18に記載の方法。

[実施態様 21]

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である実施態様20に記載の方法。

10

[実施態様 22]

生物学的試料が生検及び末梢全血から選択される、実施態様18に記載の方法。

[実施態様 23]

mRNA発現レベルがPCR法によって測定される、実施態様22に記載の方法。

[実施態様 24]

PCR法がqPCRを含む実施態様23に記載の方法。

[実施態様 25]

インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に対する胃腸炎症性障害に罹患した患者の応答を予測する方法において、

20

患者から生物学的試料を得る工程と、

インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を測定する工程と、

試料において測定された発現細胞の数を基準レベルと比較する工程と、

タンパク質発現細胞の数が基準レベルと比較して多いと測定された場合に患者が治療に
 応答すると予測し、タンパク質発現細胞の数が基準レベルと比較して少ないと測定された
 場合に患者が治療に
 応答しないと予測する工程と

を含む方法。

[実施態様 26]

インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対する胃腸炎症性障害患者の応答性を予測する方法において、患者からの生物学的試料における、インテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を決定することを含み、基準レベルと比較した発現細胞の数の上昇が、インテグリンベータ7アンタゴニスト治療に対して応答する可能性が高い者として患者を同定する、方法。

30

[実施態様 27]

胃腸炎症性障害に罹患した患者をインテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に
 応答する可能性がある者として同定する方法において、

(a) 患者からの生物学的試料中の少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を測定する工程であって、少なくとも一のタンパク質がインテグリンベータ7、インテグリンアルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、

40

(b) (a)において測定された細胞の数を基準レベルと比較する工程と、

(c) (a)において測定された細胞の数が基準レベルよりも多い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に
 応答する可能性がある者として同定する工程と

を含む方法。

[実施態様 28]

胃腸炎症性障害に罹患した患者を治療する方法において、

(a) 患者からの生物学的試料中の少なくとも一のタンパク質を発現する細胞の数を測定する工程であって、少なくとも一のタンパク質がインテグリンベータ7、インテグリン

50

アルファE、及びCD3イプシロンから選択される工程と、

(b)(a)において測定された発現細胞の数を基準レベルと比較する工程と、

(c)(a)において測定されたタンパク質発現細胞の数が基準レベルよりも多い場合に患者を、インテグリンベータ7アンタゴニストを含む治療に应答する可能性がある者として同定する工程と、

(d)(a)において測定されたタンパク質発現細胞の数が基準レベルよりも多い場合に治療を施し、それによって胃腸炎症性障害を治療する工程とを含む方法。

[実施態様29]

100mgのインテグリンベータ7アンタゴニストが4週間毎に一回、皮下投与される、実施態様28に記載の方法。

10

[実施態様30]

患者がヒトである実施態様25から29の何れか一項に記載の方法。

[実施態様31]

患者がTNF不十分レスポンドー(TNF-IR)である実施態様30に記載の方法。

[実施態様32]

胃腸炎症性障害が炎症性腸疾患である実施態様30に記載の方法。

[実施態様33]

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎又はクローン病である実施態様32に記載の方法。

[実施態様34]

炎症性腸疾患が潰瘍性大腸炎であり、应答が臨床应答、粘膜治癒及び寛解から選択される、実施態様33に記載の方法。

20

[実施態様35]

生物学的試料が腸組織である実施態様30に記載の方法。

[実施態様36]

免疫組織化学法によって発現細胞の数を測定することを含む、実施態様30に記載の方法。

[実施態様37]

測定が、インテグリンベータ7タンパク質、インテグリンアルファEタンパク質、又はCD3イプシロンタンパク質に特異的に結合する薬剤に試料を接触させ、形成された複合体の量を検出し、それによってタンパク質発現細胞の数を測定することを含む、実施態様30に記載の方法。

30

[実施態様38]

試料中の発現細胞の数が試料中の全細胞数によって割られる、実施態様30に記載の方法。

[実施態様39]

光学顕微鏡での高倍率視野で発現細胞の数が決定される、実施態様30に記載の方法。

[実施態様40]

基準レベルが中央値である実施態様30に記載の方法。

[実施態様41]

インテグリンベータ7アンタゴニストの投与が、(1)MCSにおいてベースラインから3ポイント減少及び30%低下と、直腸出血サブスコアが1ポイント減少又は0もしくは1の絶対直腸出血スコア、(2)0又は1の内視鏡サブスコア、(3)>1の個々のサブスコアを伴わないMCS 2の、一又は複数を生じさせる、実施態様10又は実施態様34に記載の方法。

40

[実施態様42]

インテグリンベータ7アンタゴニストがモノクローナル抗ベータ7抗体である、実施態様1から41の何れか一項に記載の方法。

[実施態様43]

抗ベータ7抗体がキメラ抗体、ヒト抗体、及びヒト化抗体から選択される、実施態様4

50

2に記載の方法。

[実施態様44]

抗ペータ7抗体が抗体断片である実施態様43に記載の方法。

[実施態様45]

抗ペータ7抗体が6つの超可変領域(HVR)を含み、ここで、

(i) HVR-L1がアミノ酸配列A1-A11を含み、A1-A11がRASESVDTYLH(配列番号:1); RASESVDSLH(配列番号:7)、RASESVDTLLH(配列番号:8)、又はRASESVDDLH(配列番号:9)又は配列番号:1、7、8又は9の変異体(配列番号:26)であり、アミノ酸A2がA、G、S、T、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A3がS、G、I、K、N、P、Q、R、及びTからなる群から選択され、及び/又はA4がE、V、Q、A、D、G、H、I、K、L、N、及びRからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A5がS、Y、A、D、G、H、I、K、N、P、R、T、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A6がV、R、I、A、G、K、L、M、及びQからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A7がD、V、S、A、E、G、H、I、K、L、N、P、S、及びTからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A8がD、G、N、E、T、P及びSからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A9がL、Y、I及びMからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A10がL、A、I、M、及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸A11がH、Y、F、及びSからなる群から選択され;

(ii) HVR-L2がアミノ酸配列B1-B8を含み、B1-B8がKYASQSISS(配列番号:2)、RYASQSISS(配列番号:20)、又はXaaYASQSISS(配列番号:21、Xaaは何れかのアミノ酸を表す)又は配列番号:2、20又は21の変異体(配列番号:27)であり、アミノ酸B1がK、R、N、V、A、F、Q、H、P、I、L、Y及びXaa(Xaaは何れかのアミノ酸を表す)からなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B4がS及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B5がQ及びSからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B6がS、D、L、及びRからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸B7がI、V、E、及びKからなる群から選択され;

(iii) HVR-L3がアミノ酸配列C1-C9を含み、C1-C9がQQGNSLPNT(配列番号:3)又は配列番号:3の変異体(配列番号:28)であり、アミノ酸C8がN、V、W、Y、R、S、T、A、F、H、I、L、及びMからなる群から選択され;

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

(v) HVR-H2がアミノ酸配列E1-E17を含み、E1-E17がGYISYSGSTSYNPSLKS(配列番号:5)、又は配列番号:5の変異体(配列番号:29)であり、アミノ酸E2がY、F、V、及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E6がS及びGからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E10がS及びYからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E12がN、T、A、及びDからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E13がP、H、D、及びAからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E15がL及びVからなる群から選択され、及び/又はアミノ酸E17がS及びGからなる群から選択され;かつ

(vi) HVR-H3が、アミノ酸配列F2-F11を含み、F2-F11がMTGSSGYFDF(配列番号:6)又はRTGSSGYFDF(配列番号:19)であるか;又はアミノ酸配列F1-F11を含み、F1-F11がAMTGSSGYFDF(配列番号:16)、ARTGSSGYFDF(配列番号:17)、又はAQTGSSGYFDF(配列番号:18)、又は配列番号:6、16、17、18、又は19の変異体(配列番号:30)であり、アミノ酸F2がR、M、A、E、G、Q、Sであり、及び/又はアミノ酸F11がF及びYからなる群から選択される、実施態様43に記載の方法。

[実施態様46]

10

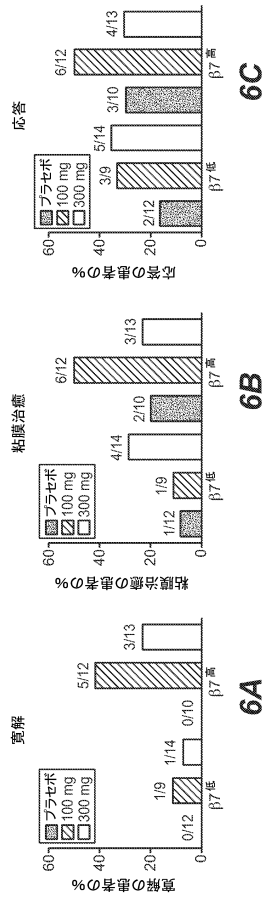
20

30

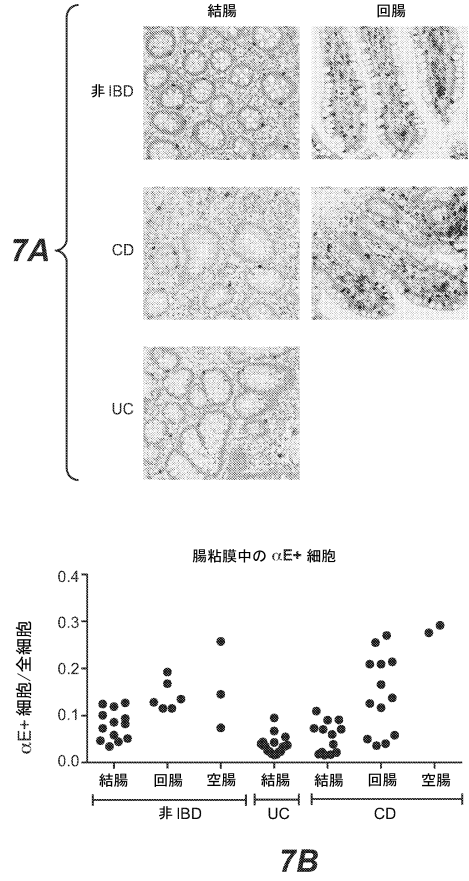
40

50

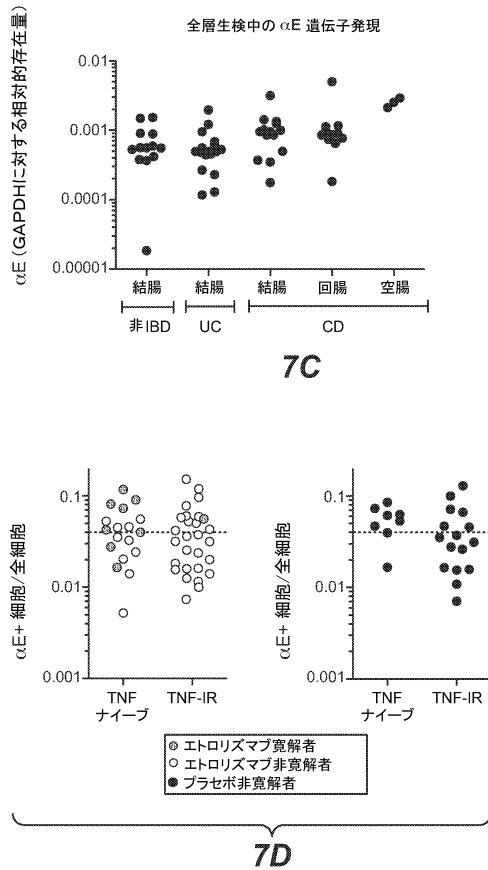
【図6】



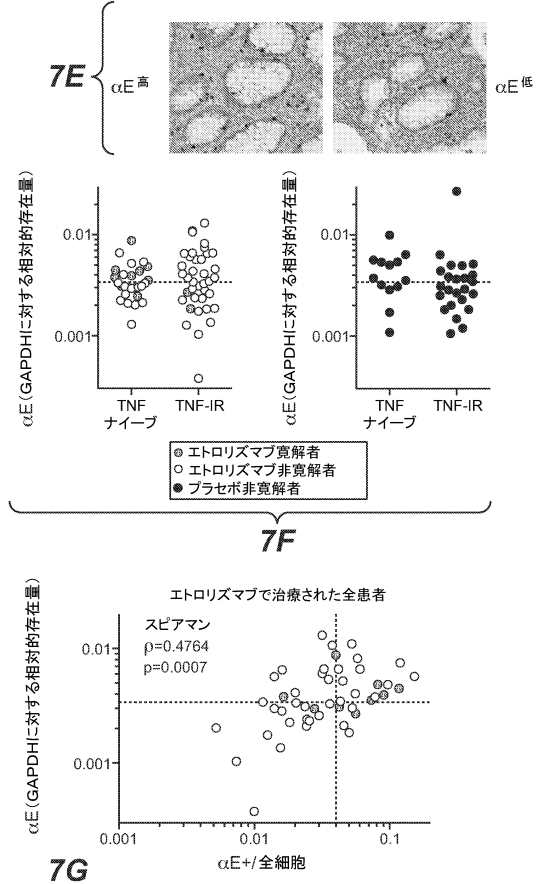
【図7A - B】



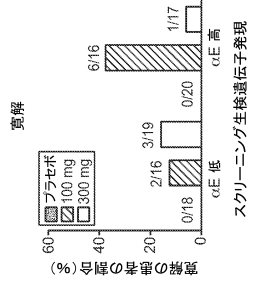
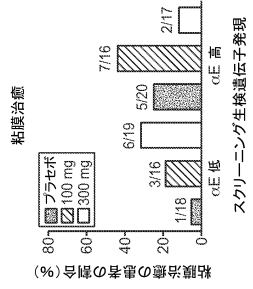
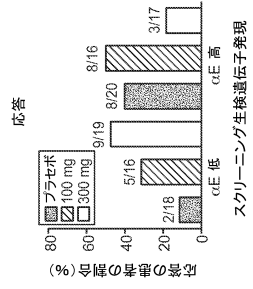
【図7C - D】



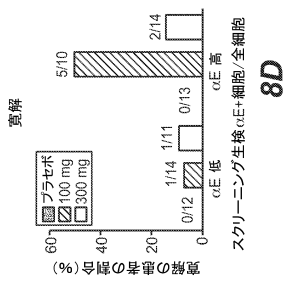
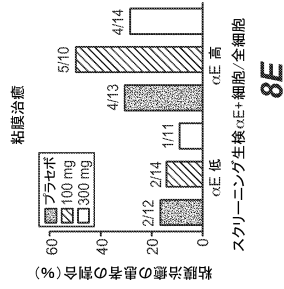
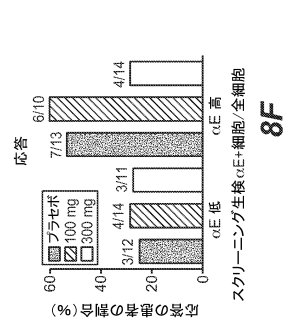
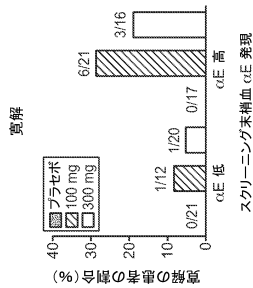
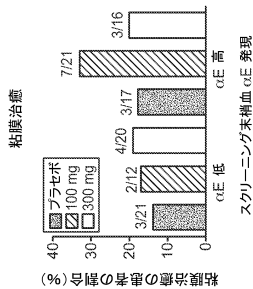
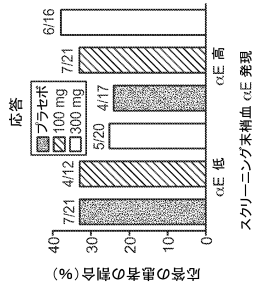
【図7E - G】



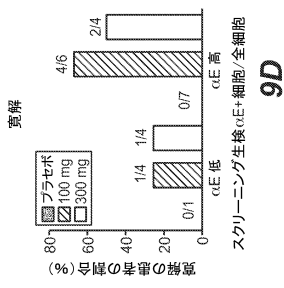
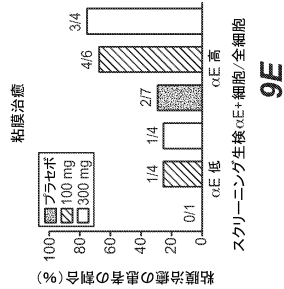
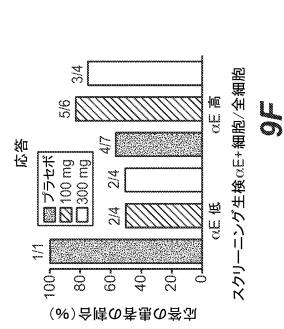
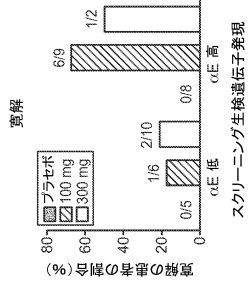
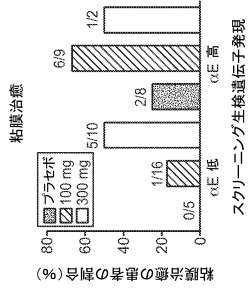
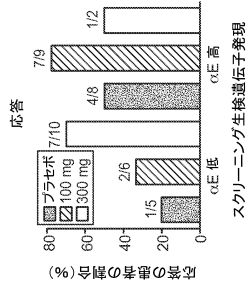
【 図 8 】



【 図 10 】



【 図 9 】



【 図 11 】

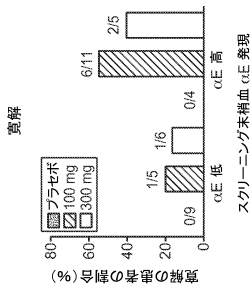
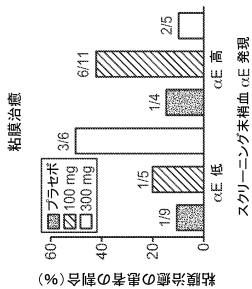
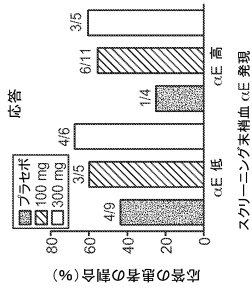
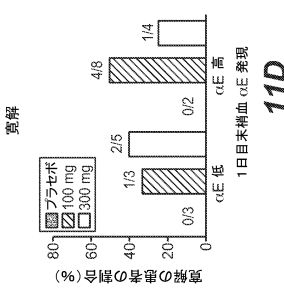
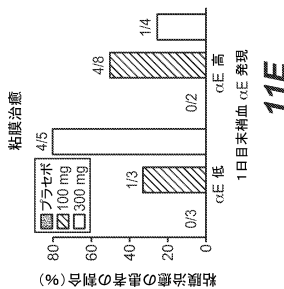
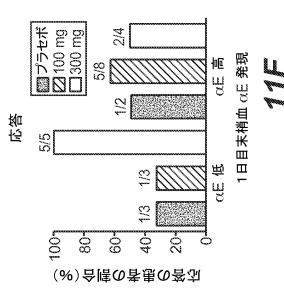
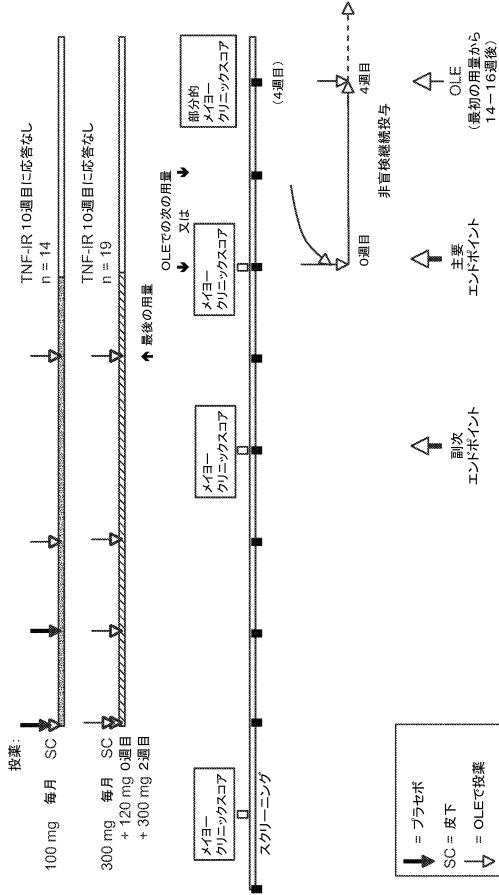


FIG. 11A



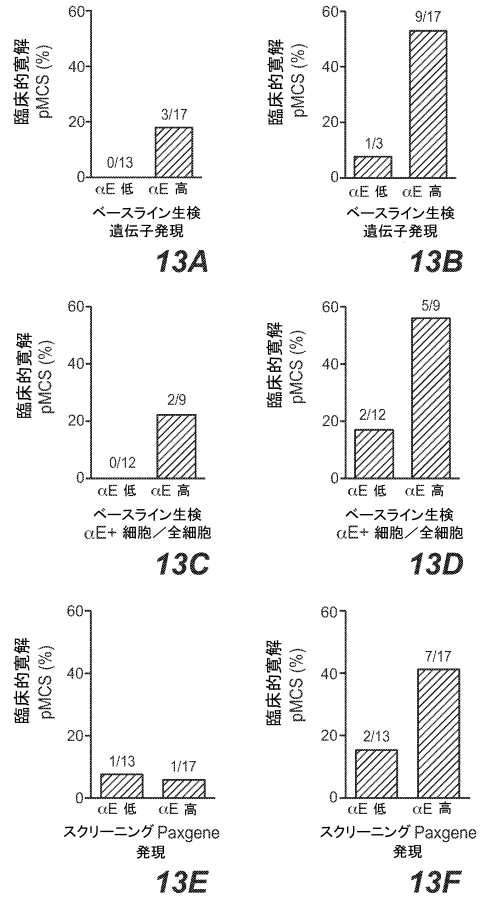
【 図 1 2 】



【 配列表 】

000672013000001.app

【 図 1 3 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/50	P
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		C 1 2 N	15/13	
		C 0 7 K	16/28	

(72)発明者 テュー, ガイク ウェイ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
 ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

審査官 田名部 拓也

(56)参考文献 特表2011-521236(JP,A)
 国際公開第2012/010546(WO,A1)
 特表2009-539097(JP,A)
 特表2008-524230(JP,A)
 Scand. J. Immunol., 1998年 9月, Vol.48, No.3, pp.318-323

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C12N 15/00 - 15/90
 CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

专利名称(译)	炎性肠病的诊断和治疗方法		
公开(公告)号	JP6720130B2	公开(公告)日	2020-07-08
申请号	JP2017244233	申请日	2017-12-20
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
当前申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	キアメアリー テューガイクウェイ		
发明人	キア, メアリー テュー, ガイク ウエイ		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 A61P1/04 A61P43/00 A61K39/395 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/13 C07K16/28		
CPC分类号	A61P1/04 A61P37/02 A61P43/00 C12Q1/6883 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2333/7051 G01N2333/70546 G01N2800/065 G01N2800/52 C07K16/2839 C07K2317/24 G01N33/6872 G01N2800/06		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA A61K45/00 A61P1/04 A61P43/00.111 A61K39/395.N A61K39/395.D G01N33/50.P G01N33/53.Y G01N33/53.D C12N15/13 C07K16/28 C12N15/00.A C12Q1/68.AZN.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/MA16 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZC202 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/CC02 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG04 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA25 4H045/FA74		
优先权	61/710656 2012-10-05 US 61/860422 2013-07-31 US		
其他公开文献	JP2018085989A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了预测对整联蛋白β7拮抗剂包括抗β7整联蛋白亚基抗体的应答性的生物标记,以及提供了使用这些生物标记的方法。另外,提供了治疗胃肠道炎症性疾病的方法,例如包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病在内的炎症性肠病。还提供了使用这种预测性生物标志物治疗炎症性肠疾病包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病的方法。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6720130号 (P6720130)
(45) 発行日 令和2年7月8日(2020.7.8)	(24) 登録日 令和2年6月19日(2020.6.19)	
(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A G I K 45/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A G I P 1/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A G I P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A G I K 39/395 N	
	請求項の数 42 外国出願 (全 78 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2017-244233(P2017-244233)	(73) 特許権者 509012625	
(22) 出願日 平成29年12月20日(2017.12.20)	ジェネンテック、インコーポレイテッド	
(62) 分割の表示 特願2015-535805(P2015-535805)	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス・サンフランシスコ ディー・エヌ・エー・ウェイ 1	
原出願日 平成25年10月4日(2013.10.4)	(74) 代理人 110002077	
(65) 公開番号 特願2018-85989(P2018-85989A)	園田・小林特許業務法人	
(43) 公開日 平成30年6月7日(2018.6.7)	(72) 発明者	
審査請求日 平成30年1月16日(2018.1.16)	キア、メアリー	
(31) 優先権主張番号 61/710,656	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080、サウス・サンフランシスコ、ディー・エヌ・エー・ウェイ 11、シー/オー・ジェネンテック、インコーポレイテッド	
(32) 優先日 平成24年10月5日(2012.10.5)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31) 優先権主張番号 61/860,422		
(32) 優先日 平成25年7月31日(2013.7.31)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(54) 【発明の名称】 炎症性腸疾患の診断治療方法		最終頁に続く