

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-523825
(P2008-523825A)

(43) 公表日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06	4B024
C07K 7/08 (2006.01)	C07K 7/08	4B063
C07K 14/21 (2006.01)	C07K 14/21	4B065
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4C084
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 76 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-547125 (P2007-547125)
 (86) (22) 出願日 平成17年12月21日 (2005.12.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年7月27日 (2007.7.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA2005/001953
 (87) 国際公開番号 W02006/066408
 (87) 国際公開日 平成18年6月29日 (2006.6.29)
 (31) 優先権主張番号 60/637, 448
 (32) 優先日 平成16年12月21日 (2004.12.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506410877
 ヴィヴェンティア バイオテック インコーポレーティッド
 カナダ国 オンタリオ州 ミシサガ スペクトラム ウェイ 5060 スイート405
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 グロバー ニコラス アール。
 カナダ国 オンタリオ州 オークビル デイアラン アヴェニュー 2389

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌特異的抗体および細胞表面タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、癌特異的抗体の重鎖相補性決定領域および軽鎖相補性決定領域のアミノ酸配列ならびに核酸配列を提供する。さらに、本発明は、毒素または標識に連結された癌特異的抗体を含む癌特異的抗体および免疫複合体、ならびにその方法および使用を提供する。本発明はまた、本発明の癌特異的抗体を用いた診断法およびキットに関する。さらに、本発明は、新規の癌関連抗原およびその使用を提供する。

VB1-050

V_L (SEQ ID NOS: 8 and 7)

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT OCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V

ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG
 T I T C R A S Q D I S N Y L A W F Q
 ───────────────────────────────────┐
 CDR1 (L) ───────────────────────────┘

CGG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC
 R K P G K A P K S L I Y A A S S L H
 ───────────────────────────────────┐
 CDR2 (L) ───────────────────────────┘

AGT AAG GTC CCA ACA CAA TTC AGC GGC AGT GGA TGT GGG ACA GAT TTC ACT CTC
 S K V P T Q F S G S G S G T D E T L
 ───────────────────────────────────┘

ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA GAG TAT
 T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q Y
 ───────────────────────────────────┘

AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA
 S T Y P I T F G G G T K V E I K R
 ───────────────────────────────────┘
 CDR3(L) ───────────────────────────┘

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

SEQ ID NO : 1 のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離された軽鎖相補性決定領域 1。

【請求項 2】

請求項 1 記載の軽鎖相補性決定領域 1 をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 3】

SEQ ID NO : 2 のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離された軽鎖相補性決定領域 2。

【請求項 4】

請求項 3 記載の軽鎖相補性決定領域 2 をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 5】

SEQ ID NO : 3 のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離された軽鎖相補性決定領域 3。

【請求項 6】

請求項 5 記載の軽鎖相補性決定領域 3 をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 7】

SEQ ID NO : 4 のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離された重鎖相補性決定領域 1。

【請求項 8】

請求項 7 記載の重鎖相補性決定領域 1 をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 9】

SEQ ID NO : 5 のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離された重鎖相補性決定領域 2。

【請求項 10】

請求項 9 記載の重鎖相補性決定領域 2 をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 11】

SEQ ID NO : 6 のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離された重鎖相補性決定領域 3。

【請求項 12】

請求項 11 記載の重鎖相補性決定領域 3 をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 13】

請求項 1、3、および/もしくは 5 記載の軽鎖相補性決定領域を含む単離された軽鎖可変領域、またはその変異体。

【請求項 14】

請求項 13 記載の軽鎖可変領域をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 15】

請求項 7、9、および/もしくは 11 記載の重鎖相補性決定領域を含む単離された重鎖可変領域、またはその変異体。

【請求項 16】

請求項 15 記載の重鎖可変領域をコードする単離された核酸配列、またはその変異体。

【請求項 17】

SEQ ID NO : 7 (図 1) のアミノ酸配列を含む単離された軽鎖可変領域、またはその変異体。

10

20

30

40

50

- 【請求項 18】
SEQ ID NO : 8 (図1) の軽鎖可変領域を含む単離された核酸配列、またはその変異体。
- 【請求項 19】
SEQ ID NO : 9 (図2) のアミノ酸配列を含む単離された重鎖可変領域、またはその変異体。
- 【請求項 20】
SEQ ID NO : 10 (図2) の重鎖可変領域を含む単離された核酸配列、またはその変異体。
- 【請求項 21】
請求項1、3、および/もしくは5記載の軽鎖相補性決定領域を含む結合タンパク質、またはその変異体。 10
- 【請求項 22】
請求項7、9、および/もしくは11記載の重鎖相補性決定領域を含む結合タンパク質、またはその変異体。
- 【請求項 23】
請求項1、3、および/もしくは5記載の軽鎖相補性決定領域ならびに請求項7、9、および/もしくは11記載の重鎖相補性決定領域を含む結合タンパク質、またはその変異体。
- 【請求項 24】
請求項13もしくは17記載の軽鎖可変領域を含む結合タンパク質、またはその変異体。
- 【請求項 25】
請求項15もしくは19記載の重鎖可変領域を含む結合タンパク質、またはその変異体。 20
- 【請求項 26】
請求項13もしくは17記載の軽鎖可変領域および請求項15もしくは19記載の重鎖可変領域を含む結合タンパク質、またはその変異体。
- 【請求項 27】
グルコース輸送体8またはその変異体に結合する、請求項21～26のいずれか一項記載の結合タンパク質。
- 【請求項 28】
SEQ ID NO : 11～20によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体の任意の1つを含むタンパク質に結合する、請求項21～26のいずれか一項記載の結合タンパク質。
- 【請求項 29】
SEQ ID NO : 11によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体を含むタンパク質に結合する、請求項21～26のいずれか一項記載の結合タンパク質。 30
- 【請求項 30】
SEQ ID NO : 12によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体を含むタンパク質に結合する、請求項21～26のいずれか一項記載の結合タンパク質。
- 【請求項 31】
SEQ ID NO : 13によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体を含むタンパク質に結合する、請求項21～26のいずれか一項記載の結合タンパク質。
- 【請求項 32】
N末端のジロイシンモチーフに改変を有するグルコース輸送体8の癌関連変異体に結合する、請求項21～26のいずれか一項記載の結合タンパク質。 40
- 【請求項 33】
N末端のジロイシンモチーフの改変が、ジロイシンからジアラニンへのものである、請求項32記載の結合タンパク質。
- 【請求項 34】
グルコース輸送体8もしくはその変異体、またはSEQ ID NO : 11～20のアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質に対する結合タンパク質の親和性を増大させるために親和性成熟を用いる、請求項21～33のいずれか一項記載の結合タンパク質。
- 【請求項 35】
グルコース輸送体8の癌関連変異体に特異的である、結合タンパク質。 50

【請求項 36】

グルコース輸送体8の癌関連変異体が、SEQ ID NO: 11によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体を含む、請求項35記載の結合タンパク質。

【請求項 37】

グルコース輸送体8の癌関連変異体が、SEQ ID NO: 12によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体を含む、請求項35記載の結合タンパク質。

【請求項 38】

グルコース輸送体8の癌関連変異体が、SEQ ID NO: 13によって定義されるアミノ酸配列またはその変異体を含む、請求項35記載の結合タンパク質。

【請求項 39】

グルコース輸送体8の癌関連変異体が、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するグルコース輸送体8を含む、請求項35記載の結合タンパク質。

【請求項 40】

N末端のジロイシンモチーフの改変が、ジロイシンからジアラニンへのものである、請求項39記載の結合タンパク質。

【請求項 41】

グルコース輸送体8の癌関連変異体に対する結合タンパク質の親和性を増大させるために親和性成熟を用いる、請求項35～40のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項 42】

競合結合アッセイによって同定することができる、癌細胞上の抗原と結合する能力がある結合タンパク質。

【請求項 43】

競合結合アッセイが以下の工程：

(1) 一定数の癌細胞を、一定数の癌細胞に対する最大の結合をもたらす請求項21～24のいずれか一項記載の最小濃度の結合タンパク質 (Ab1) とインキュベートし、かつAb1の蛍光中央値 (MF_{Ab1}) を測定する工程；

(2) Ab2をAb1および癌細胞に添加することによって、2つまたはそれを上回る濃度の被験結合タンパク質 (Ab2) を試験し、かつ蛍光中央値 ($MF_{(Ab1 + Ab2)}$) を測定する工程；

(3) バックグラウンドの蛍光中央値 (MF_{bgd}) を測定する工程；

(4) $PI = [(MF_{(Ab1 + Ab2)} - MF_{bgd}) / (MF_{Ab1} - MF_{bgd})] \times 100$ である、PIを計算する工程；なら

びに (5) 対照PI値と本PIを比較する工程、

を含み、対照PIとの統計的に有意な差を有するPIが、被験結合タンパク質が癌細胞上の抗原と結合する能力を有することを示す、請求項42記載の結合タンパク質。

【請求項 44】

抗体である、請求項21～43のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項 45】

抗体が抗体断片である、請求項44記載の結合タンパク質。

【請求項 46】

抗体断片が、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ (minibodies)、ダイアボディ (diabodies)、もしくはそれらの多量体、または二重特異性抗体断片である、請求項45記載の結合タンパク質。

【請求項 47】

薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、または安定剤を伴う、請求項21～46記載の結合タンパク質の任意の1つを含む組成物。

【請求項 48】

細胞毒性があるか、細胞増殖抑制性があるか、またはそうでなければ癌細胞が分裂および/もしくは転移する能力を抑制もしくは低下させる癌治療薬 (2) に連結している、癌細胞上の抗原に結合する請求項21～46のいずれか一項記載の結合タンパク質 (1) を含む、免疫抱合体。

10

20

30

40

50

- 【請求項 49】
癌治療薬が細胞毒素である、請求項48記載の免疫抱合体。
- 【請求項 50】
細胞毒素がリボソーム不活性化ポリペプチドである、請求項49記載の免疫抱合体。
- 【請求項 51】
細胞毒素が、ジェロニン (gelonin)、ブーガニン (bougainin)、サボリン、リシン、リシンA鎖、ブリオジン (bryodin)、ジフテリア、レストリクトシン (restrictocin)、および緑膿菌外毒素Aまたはそれらの変異体からなる群より選択される、請求項50記載の免疫抱合体。
- 【請求項 52】 10
毒素が改変されたブーガニンまたはその変異体である、請求項50記載の免疫抱合体。
- 【請求項 53】
毒素がアミノ酸252～608からなる緑膿菌外毒素Aの切断型またはその変異体である、請求項50記載の免疫抱合体。
- 【請求項 54】
免疫毒素が癌細胞によって内在化される、請求項48～53のいずれか一項記載の免疫抱合体。
- 【請求項 55】 20
薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、または安定剤を伴う、請求項48～54のいずれか一項記載の免疫抱合体を含む組成物。
- 【請求項 56】
癌を治療または抑制するための医薬の製造のための、請求項48～54のいずれか一項記載の有効量の免疫抱合体の使用。
- 【請求項 57】
同時的、個別的、もしくは連続的な癌の治療または抑制のための医薬の製造のための1つまたは複数のさらなる癌治療薬剤の使用をさらに含む、請求項56記載の使用。
- 【請求項 58】
癌を治療または抑制するための、請求項48～54のいずれか一項記載の有効量の免疫抱合体の使用。
- 【請求項 59】 30
同時的、個別的、もしくは連続的な癌の治療または抑制のための1つまたは複数のさらなる癌治療薬剤の使用をさらに含む、請求項58記載の使用。
- 【請求項 60】
癌を有することが疑われる対象に請求項48～54のいずれか一項記載の有効量の免疫抱合体を投与する工程を含む、癌を治療または抑制する方法。
- 【請求項 61】
少なくとも1つのさらなる抗癌治療をさらに含む、請求項60記載の方法。
- 【請求項 62】 40
請求項48～54のいずれか一項記載の有効量の免疫抱合体を含む癌を治療または抑制するためのキット、および癌を治療または抑制するためのその使用法。
- 【請求項 63】
以下の工程を含む、対象における癌を検出またはモニターする方法：
(1) 対象から採取した被験試料を、請求項21～46記載の結合タンパク質の任意の1つで、かつ癌細胞上の抗原に特異的に結合する結合タンパク質と接触させ、結合タンパク質抗原複合体を生成する工程；
(2) 被験試料中の結合タンパク質 抗原複合体の量を測定する工程；および
(3) 被験試料中の結合タンパク質 抗原複合体の量を対照と比較する工程。
- 【請求項 64】
癌細胞上の抗原に結合する請求項21～46記載の結合タンパク質の任意の1つおよびその使用説明書を含む、癌を診断するためのキット。 50

【請求項 65】

直接的にまたは間接的に、検出可能なシグナルを生成する標識(2)に連結された癌細胞上の抗原に結合する、請求項21~46のいずれか一項記載の結合タンパク質(1)を含む、診断薬。

【請求項 66】

標識が、放射性アイソタイプ、蛍光化合物、化学発光化合物、酵素、造影剤、または金属イオンである、請求項65記載の診断薬。

【請求項 67】

請求項65または66記載の診断薬およびその使用に関する説明書を含むキット。

【請求項 68】

請求項2、4、6、8、10、12、14、16、18、および20のいずれか一項記載の核酸分子を含む組換え発現ベクター。

【請求項 69】

請求項68記載の組換え発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 70】

請求項21~46記載の結合タンパク質の1つにより特異的に結合され得るアミノ酸配列を含む、単離されたタンパク質。

【請求項 71】

グルコース輸送体8またはその変異体を含む、請求項70記載の単離されたタンパク質。

【請求項 72】

SEQ ID NO: 11~20のアミノ酸配列またはそれらの変異体の任意の1つを含む、請求項70記載の単離されたタンパク質。

【請求項 73】

グルコース輸送体8の癌関連変異体を含む、請求項70記載の単離されたタンパク質。

【請求項 74】

グルコース輸送体8の癌関連変異体が、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するグルコース輸送体8を含む、請求項73記載の単離されたタンパク質。

【請求項 75】

N末端ジロイシンモチーフの改変がジロイシンからジアラニンへのものである、請求項74記載の単離されたタンパク質。

【請求項 76】

SEQ ID NO: 11のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離されたタンパク質。

【請求項 77】

SEQ ID NO: 12のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離されたタンパク質。

【請求項 78】

SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離されたタンパク質。

【請求項 79】

請求項70~78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質をコードする単離された核酸配列。

【請求項 80】

請求項79記載の核酸配列を含む組換え発現ベクター。

【請求項 81】

試料中の細胞上の請求項70~78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質を検出する工程を含む、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を検出またはモニターする方法であって、単離されたタンパク質が細胞上に検出される場合、癌が示唆される、方法。

【請求項 82】

好適な希釈剤または担体と混合した請求項70~78のいずれか一項記載の有効量の単離されたタンパク質またはその断片を含む、薬学的組成物。

【請求項 83】

10

20

30

40

50

アジュバントをさらに含む、請求項82記載の薬学的組成物。

【請求項 8 4】

好適な希釈剤または担体と混合した請求項79記載の有効量の単離された核酸配列を含む、薬学的組成物。

【請求項 8 5】

アジュバントをさらに含む、請求項84記載の薬学的組成物。

【請求項 8 6】

好適な希釈剤または担体と混合した請求項80記載の有効量の組換え発現ベクターを含む、薬学的組成物。

【請求項 8 7】

アジュバントをさらに含む、請求項86記載の薬学的組成物。

【請求項 8 8】

癌を治療または抑制するための医薬の製造における、請求項70～78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質またはその断片の使用。

【請求項 8 9】

対象における免疫反応を誘発するための医薬の製造における、請求項70～78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質またはその断片の使用。

【請求項 9 0】

癌を治療または抑制するための医薬の製造における、請求項79記載の単離された核酸配列の使用。

【請求項 9 1】

対象における免疫反応を誘発するための医薬の製造における、請求項79記載の単離された核酸配列の使用。

【請求項 9 2】

癌を治療または抑制するための医薬の製造における、請求項80記載の組換え発現ベクターの使用。

【請求項 9 3】

対象における免疫反応を誘発するための医薬の製造における、請求項80記載の組換え発現ベクターの使用。

【請求項 9 4】

癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を治療または抑制する方法であって、該対象に請求項70～78のいずれか一項記載の有効量の単離されたタンパク質またはその断片を投与する工程を含む、方法。

【請求項 9 5】

癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を治療または抑制する方法であって、該対象に請求項79記載の有効量の単離された核酸配列を投与する工程を含む、方法。

【請求項 9 6】

癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を治療または抑制する方法であって、該対象に請求項80記載の有効量の組換え発現ベクターを投与する工程を含む、方法。

【請求項 9 7】

請求項70～78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質に対する対象における免疫反応を誘導する方法であって、該対象に請求項70～78のいずれか一項記載の有効量の単離されたタンパク質またはその断片を投与する工程を含む、方法。

【請求項 9 8】

請求項70～78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質に対する対象における免疫反応を誘導する方法であって、該対象に請求項79記載の有効量の単離された核酸配列を投与する工程を含む、方法。

【請求項 9 9】

10

20

30

40

50

請求項70～78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質に対する対象における免疫反応を誘導する方法であって、該対象に請求項80記載の有効量の組換え発現ベクターを投与する工程を含む、方法。

【請求項100】

請求項82～87のいずれか一項記載の薬学的組成物の任意の1つおよびその使用に関する説明書を含むキット。

【請求項101】

対象における癌を治療または抑制するための方法であって、グルコース輸送体8の癌関連変異体の糖の輸送体としての機能を抑制または低下させる工程を含む、方法。

【請求項102】

グルコース輸送体8の癌関連変異体の糖の輸送体としての機能を抑制または低下させるために、請求項21～46のいずれか一項記載の結合タンパク質の任意の1つを使用する、請求項101記載の方法。

【請求項103】

グルコース輸送体8の癌関連変異体の糖の輸送体としての機能を抑制または低下させるために、グルコース輸送体阻害剤を使用する、請求項101記載の方法。

【請求項104】

細胞におけるグルコース輸送体8の癌関連変異体の発現を低下または抑制することによって、グルコース輸送体8の癌関連変異体の機能を抑制または低下させる、請求項101記載の方法。

【請求項105】

以下の工程を含む、癌を抑制または治療する能力について化合物を同定する方法：

(a) 請求項70～78のいずれか一項記載の単離されたタンパク質を発現する細胞を被験化合物と接触させる工程；および

(b) 単離されたタンパク質のグルコースの輸送体としての発現または機能を決定する工程；

(c) 対照と比較した単離されたタンパク質の発現または機能の低下が、癌を抑制または治療するのに有用な化合物を示す、単離されたタンパク質の発現または機能を対照と比較する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、ヒト癌特異的結合タンパク質およびその全ての使用に関する。特に、本発明は、癌細胞上の抗原または分子に特異的な抗体または抗体断片に関し、ならびに本発明の結合タンパク質を含む免疫複合体、およびその使用の方法に関する。本発明はまた、新規の癌関連抗原およびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

2000年に、世界中で推定2,200万人が癌を患い、かつ620万人の死亡がこの部類の疾患に原因があるとされた。毎年、1,000万を越える新しい症例があり、およびこの推定値は次の15年で50%増加すると予想されている(WHO, World Cancer Report. Bernard W. Stewart and Paul Kleihues, 編, IARC Press, Lyon, 2003(非特許文献1))。現在の癌治療は、侵襲的手術法、放射線療法、および化学療法に限られ、その全てが、潜在的に重篤な副作用、非特異的な毒性、ならびに/または人の身体像および/もしくは生活の質に対して精神的外傷を与える変化のいずれかを引き起こす。癌は、化学療法に対して不応性になる可能性があり、さらなる治療の選択肢および成功の可能性を減少させている。ある癌の予後が、その他の癌の予後よりも悪く、および中にはほぼ必ず致命的なものもある。さらに、比較的高い治療成功率のある癌の中には、その高い発生率が原因で依然として主要な死因

10

20

30

40

50

のままであるものもある。

【0003】

現在の癌治療の力不足の原因の1つは、それらの罹患組織および罹患細胞に対する選択性の欠如である。外科的切除は、死亡率および合併症のリスクを増加させる可能性がある「安全域」として、一見正常な組織の除去を必ず伴う。それはまた、腫瘍細胞が散在し得る一部の健全な組織、ならびに罹患器官および罹患組織の機能を潜在的に維持し、または回復させる可能性がある一部の健全な組織を必ず除去する。放射線照射および化学療法は、それらの非特異的な作用様式によって、多くの正常細胞を殺し、または損傷すると考えられる。このことは、後の人生で第2の癌を発生させるリスクを増加させるだけでなく、ひどい吐き気、体重の減少およびスタミナの低下、脱毛などの重篤な副作用をもたらす可能性がある。癌細胞に対するより高い選択性のある治療は、正常細胞を無傷のまま残し、それによって、予後、副作用プロファイル、および生活の質が改善されると考えられる。

10

【0004】

癌細胞上のみ、または主に癌細胞上に存在する分子に特異的である抗体を使用することによって、癌治療の選択性を改善することができる。免疫系を調節し、ならびに患者自身の免疫系による癌の認識および破壊を強化するために、そのような抗体を使用することができる。それらはまた、標的分子の機能を阻害し、または変化させることができ、およびそれによって、癌細胞の機能を阻害し、または変化させることができる。それらはまた、薬物、遺伝子、毒素、またはその他の医学的に意味のある分子を癌細胞に標的するために使用することができる。そのような抗体-薬物複合体は通常、免疫毒素または免疫抱合体と呼ばれ、近年、多数のそのような化合物が試験されている [Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11: 570-578(非特許文献2); Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1: 1117-1129(非特許文献3); Wahli RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73: 989-992(非特許文献4); Grossbard ML, Fidiyas P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76: 107-114(非特許文献5); Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33: 287-314(非特許文献6); Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14: 115-120(非特許文献7); Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18: 195-201(非特許文献8); Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345: 241-247(非特許文献9)]。今日試験されている多くの抗体は、時に分子工学を通じて「ヒト化された」、マウスモノクローナル抗体の形で、公知の癌マーカーに対して作製されている。残念なことに、それらの標的は通常、正常細胞のサブセット上にも存在し、したがって依然として何らかの非特異的な効果を引き起こす。さらに、これらの抗体は基本的に、ヒトの患者の免疫系によって外来タンパク質として見られているマウスタンパク質である。その後の免疫反応および抗体反応は、有効性の消失または副作用をもたらす可能性がある。

20

30

40

【0005】

本発明者らは、彼らの癌治療用の抗体の開発において異なるアプローチを用いた。癌細胞または単離された癌細胞マーカーで実験動物を免疫する代わりに、彼らは患者自身の免疫系によって認識されるマーカー、または言い換えると、免疫系によって外来分子として見られるマーカーのみを模索した。これは、マーカーまたは抗原は通常、正常細胞上に実質的に存在せず、およびしたがって、非特異的な毒性のリスクはさらに軽減されるということを示唆している。癌患者由来リンパ球からハイブリドーマのライブラリーを作製し、かつそれらが分泌する抗体を正常細胞および癌細胞に対する結合について試験する。癌細胞に対する高い選択性を示す抗体のみを、癌治療薬剤または癌診断薬としてのさらなる評価および開発のために保持する。1つのそのような高い選択性の抗体が本特許出願の対象

50

である。選択的であることに加えて、この抗体は、完全なヒトタンパク質であるという点で、患者の免疫系と完全に適合する。本発明の抗体を、診断的利用もしくは治療的利用のために使用することができ、または標的抗原に対するその他の結合分子を人工的に改変するための基礎として使用することができる。本発明の抗体を、標的抗原を同定するために使用することもできる。その後、抗原を新しい癌治療または癌診断を設計するために使用することができる。

【 0 0 0 6 】

抗体分子の基本的な構造は、2本の重鎖および2本の軽鎖という、4本のタンパク質鎖からなる。これらの鎖は、ジスルフィド結合で相互接続している。各々の軽鎖は、軽鎖可変領域および軽鎖定常領域から構成されている。各々の重鎖は、重鎖可変領域および重鎖定常領域から構成されている。軽鎖可変領域および重鎖可変領域はさらに、フレームワーク領域および、相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる、超可変領域に細分化することができる。各々の軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、3つのCDRおよび4つのフレームワーク領域から構成される。

10

【 0 0 0 7 】

グルコース輸送体8 (GLUT8) は、GLUTファミリーのタンパク質のメンバーで、および糖輸送活性を有することが公知である。GLUT8は、ヒト9番染色体上に見られる、slc2a8遺伝子によりコードされている。GLUT8は477アミノ酸長である。それは、~50kDaのII型膜貫通タンパク質である。それは12の膜貫通領域を有する。それはTM1とTM2の間の短い細胞外ループおよびTM9とTM10の間の長い細胞外ループを有する。数回の膜貫通領域を有するにも関わらず、GLUT8は、おそらくN末端のジロイシンモチーフがあるために、細胞内に位置する (Ibberson et al. JBC 275: 4607-4612, 2000; Moadel et al., Cancer Res 65: 698-702, 2005(非特許文献10))。インスリン処理による膜への移行がマウス細胞で観察され (Carayannopoulos et al., PNAS 97: 7313-18, 2000(非特許文献11))、または低酸素ショックもしくはインスリン処理による膜への移行がラット細胞で観察されている (米国特許第09/886,954号 [2002/0038464](特許文献1))。ヒトでは、膜局在は報告されておらず、および移行を誘導する刺激は同定されていない (Widmer et al., Endocrinology 146: 4727-36, 2005(非特許文献12))。

20

【 0 0 0 8 】

GLUT/SLC2Aファミリーの命名法は: Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E974-76, 2002(非特許文献13)で発表されている。その論文に示されているように-GLUT8という名前は、現在GLUT12として公知のものを記載するために過去に用いられていた。N末端のジロイシンモチーフは、全ての哺乳動物のGLUT8配列に見られる (ウシ、ヒト、ラット、マウスが示されている-Zhao et al., Biochimica et Biophysica Acta 1680: 103-113, 2004(非特許文献14)参照)。

30

【 0 0 0 9 】

【特許文献1】米国特許第09/886,954号 [2002/0038464]

【非特許文献1】WHO, World Cancer Report. Bernard W. Stewart and Paul Kleihues, 編, IARC Press, Lyon, 2003

【非特許文献2】Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. Curr Opin Immunol 11: 570-578

40

【非特許文献3】Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. Expert Opin Pharmacother 1: 1117-1129

【非特許文献4】Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. Cancer 73: 989-992

【非特許文献5】Grossbard ML, Fidiias P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. Clin Immunol Immunopathol 76: 107-114

【非特許文献6】Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. Adv Pharmacol 33: 287-314

【非特許文献7】Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of ly

50

mphoma: a UC Davis experience. Hybridoma 14: 115-120

【非特許文献 8】Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. Leuk Lymphoma 18: 195-201

【非特許文献 9】Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. N Engl J Med 345: 241-247

【非特許文献 10】Ibberson et al. JBC 275: 4607-4612, 2000; Moadel et al., Cancer Res 65: 698-702, 2005

【非特許文献 11】Carayannopoulos et al., PNAS 97: 7313-18, 2000

【非特許文献 12】Widmer et al., Endocrinology 146: 4727-36, 2005

【非特許文献 13】Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E974-76, 2002

【非特許文献 14】Zhao et al., Biochimica et Biophysica Acta 1680: 103-113, 2004

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

本発明者らは、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、メラノーマ、肝臓癌、大腸癌、頸癌、頭頸部癌、膀胱癌、胃癌、膵臓癌および子宮内膜癌を含む、数種類の癌細胞に結合するヒト癌特異的抗体を調製した。重要なことに、本抗体は正常組織には有意に結合せず、そのことがそれらを癌治療および癌診断用の好適な候補にしている。

【0011】

本発明者らは、本抗体をクローン化およびシーケンシングし、かつ抗体の軽鎖および重鎖の可変領域ならびに相補性決定領域1、2、および3の配列を決定した。したがって、本発明は、アミノ酸配列

RASQDISNYLA (SEQ ID

NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2) および LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3)

をそれぞれ含む、単離された軽鎖相補性決定領域1、2、および/または3;ならびにアミノ酸配列

NYAMS (SEQ ID NO:4),

AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) および VPYRSTWYPLY (SEQ ID

NO:6)

をそれぞれ含む、単離された重鎖相補性決定領域1、2、および3を提供する。

【0012】

本発明はまた、アミノ酸配列

RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID

NO:2) および LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3)

をそれぞれ含む、軽鎖相補性決定領域1、2、および/または3をコードする単離された核酸配列;ならびにアミノ酸配列

NYAMS (SEQ ID NO:4),

AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) および VPYRSTWYPLY (SEQ ID

NO:6)

をそれぞれ含む、重鎖相補性決定領域1、2、および/または3をコードする単離された核酸配列を提供する。

【0013】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる局面は、本発明の軽鎖相補性決定領域1、2、および/または3 (SEQ ID NO: 1~3) を含む単離された軽鎖可変領域、ならびに本発明の重鎖相補性決定領域1、2、および/または3 (SEQ ID NO: 4~6) を含む単離された重鎖可変領域である。ある態様において、軽鎖可変領域は、図1に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 7) を含む。別の態様において、重鎖可変領域は、図2に示すアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 9) を含む。

【0014】

本発明はまた、本発明の軽鎖可変領域をコードする単離された核酸配列、および本発明の重鎖可変領域をコードする単離された核酸配列を提供する。ある態様において、軽鎖可変領域は、図1に示す核酸配列 (SEQ ID NO: 8) を含む。別の態様において、重鎖可変領域は、図2に示す核酸配列 (SEQ ID NO: 10) を含む。

10

【0015】

本発明の別の局面は、少なくとも1つの本発明の軽鎖相補性決定領域 (すなわち、SEQ ID NO: 1~3の1つもしくは複数) および/または少なくとも1つの本発明の重鎖相補性決定領域 (すなわち、SEQ ID NO: 4~6の1つもしくは複数) を含む、結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片である。本発明はまた、本発明の軽鎖可変領域および/または本発明の重鎖可変領域を含む結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片を提供する。

【0016】

本発明者はまた、本発明の結合タンパク質が結合する抗原を同定した。したがって、本発明は以下のものに結合する結合タンパク質を提供する: グルコース輸送体8 (GLUT8) またはその変異体; SEQ ID NO: 11~20、好ましくはSEQ ID NO: 11~13のアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質; または癌細胞の表面上に発現するGLUT8の癌関連変異体。本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

20

【0017】

さらに、本発明は、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、または安定剤と共に、抗体および抗体断片などの、本発明の結合タンパク質を含む組成物を提供する。

【0018】

本発明の別の局面は、(1) 本発明の結合タンパク質、好ましくは癌細胞上の抗原または分子に結合する抗体または抗体断片を含み、(2) エフェクター分子に連結された免疫抱合体である。本発明のさらなる局面は、(1) 本発明の結合タンパク質、好ましくは癌細胞により内在化された抗原または分子に結合する抗体または抗体断片を含み、(2) エフェクター分子に連結された免疫抱合体である。好ましい態様において、エフェクター分子は、(i) 直接的にもしくは間接的に、検出可能なシグナルを発生させることができる標識、または(ii) 細胞毒性があるか、細胞増殖抑制性があるか、もしくはそうでなければ癌細胞が分裂および/もしくは転移する能力を抑制もしくは低下させるかのいずれかである、癌治療薬剤である。好ましくは、癌治療薬剤は、毒素または細胞毒素である。

30

【0019】

本発明はまた、本発明の免疫抱合体を含む組成物、ならびに癌を治療または抑制するための医薬の製造、および診断目的のための免疫抱合体の使用を提供する。さらに、本発明は、本発明の免疫抱合体および関連キットを用いて癌を治療または抑制する方法を提供する。

40

【0020】

本発明のさらなる局面は、対象における癌を検出またはモニターする方法であって、以下の工程を含む方法である:

(1) 対象から採取した被験試料を、本発明の結合タンパク質で、かつ癌細胞上の抗原に特異的に結合するタンパク質と接触させ、結合タンパク質-抗原複合体を生成する工程;

50

- (2) 被験試料中の結合タンパク質 抗原複合体の量を測定する工程；および
 (3) 被験試料中の結合タンパク質 抗原複合体の量を対照と比較する工程。

【0021】

本発明の別の局面は、エフェクター分子が、直接的または間接的に、検出可能なシグナルを発生させることができる標識である、本発明の免疫抱合体を含む診断薬である。

【0022】

本発明はまた、本発明の結合タンパク質の1つと特異的に結合することができる単離されたタンパク質、その核酸配列および使用を含む。

【0023】

本発明者らは、本発明の結合タンパク質が結合する抗原を同定した。本発明は、癌細胞の表面上に発現するGLUT8の変異体である、新規の癌関連抗原を含む。本発明はまた、癌の治療および診断における、本発明の新規の癌関連抗原の使用を含む。

10

【0024】

本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

【0025】

本発明はまた、試料中の細胞上のGLUT8の癌関連変異体を検出する工程を含む、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を検出またはモニターする方法を含み、GLUT8の癌関連変異体が細胞上に検出される場合、癌が示唆される。

20

【0026】

さらに、本発明は、試料中の細胞内のGLUT8の癌関連変異体の発現を検出する工程を含む、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を検出またはモニターする方法を含み、GLUT8の癌関連変異体の発現が細胞内で検出される場合、癌が示唆される。

【0027】

本発明のさらなる局面は、癌細胞でのGLUT8の機能または発現を調節することによって、対象における癌を治療または抑制する方法である。

30

【0028】

本発明はまた、GLUT8の癌関連変異体またはその断片を用いて、対象における癌を治療または抑制する方法を含む。さらに、本発明は、有効量のGLUT8の癌関連変異体もしくはその断片、有効量のGLUT8の癌関連変異体もしくはその断片をコードする核酸配列、および/または有効量のGLUT8の癌関連変異体もしくはその断片をコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを含む薬学的組成物を含む。

【0029】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明白になると考えられる。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の精神および範囲から逸脱しない範囲内の様々な変更および修正が当業者に明白になると考えられるので、本発明の好ましい態様が示されているものの、詳細な説明および具体的な実施例は例証のみによって与えられるということが理解されるべきである。

40

【0030】

発明の詳細な説明(A) 定義

本明細書において使用する場合、「全身に投与される」という用語は、免疫抱合体および/またはその他の癌治療薬剤が、注射（皮下、静脈内、筋肉内など）、経口投与、吸入、（局所クリームもしくは軟膏などのような）経皮投与もしくは局所適用、坐薬の適用、またはインプラントの手段によるなどの簡便な方法で、全身に投与されてもよいということの意味する。インプラントは、シアラスティック(sialastic)膜などの膜、または織

50

維を含む、多孔性物質、非多孔性物質、またはゼラチン様物質であることができる。坐薬は通常、0.5重量%～10重量%の範囲の活性成分を含む。

【0031】

「アミノ酸」という用語は、改変されたアミノ酸だけでなく、全ての天然のアミノ酸も含む。

【0032】

本明細書において使用する場合、「抗体」という用語は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、およびキメラ抗体を含むことが意図されている。抗体は、組換え供給源由来でもよく、および/またはトランスジェニック動物で産生されてもよい。本明細書において使用する場合、「抗体断片」という用語は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ (minibodies)、ダイアボディ (diabodies)、およびそれらの多量体、ならびに二重特異性抗体断片を含むよう意図されている。抗体は、従来の技術を用いて断片化することができる。例えば、抗体をペプシンで処理することによって、F(ab')₂断片を作製することができる。結果として生じるF(ab')₂断片を、ジスルフィド架橋を還元するよう処理し、Fab'断片を生成することができる。パパイン消化によって、Fab断片の形成をもたらすことができる。Fab、Fab'、およびF(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、ならびにその他の断片を、組換え技術によって合成することもできる。

10

【0033】

本明細書において使用する場合、「本発明の抗体または抗体断片」という用語は、少なくとも1つの本発明の軽鎖相補性決定領域 (すなわち、SEQ ID NO: 1~3の1つもしくは複数) および/または少なくとも1つの本発明の重鎖相補性決定領域 (すなわち、SEQ ID NO: 4~6の1つもしくは複数) を含む。好ましくは、抗体または抗体断片が正常細胞に実質的に結合することなく癌細胞に結合することができるように、抗体または抗体断片は軽鎖CDR配列 (SEQ ID NO: 1~3) および/または重鎖CDR配列 (SEQ ID NO: 4~6) または該配列の機能的変異体を含む。本発明の抗体または抗体断片はまた、グルコース輸送体8 (GLUT8) もしくはその変異体、またはSEQ ID NO: 11~20、好ましくはSEQ ID NO: 11~13のアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質に結合する抗体または抗体断片を含む。

20

【0034】

「少なくとも適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」により、溶液中の2つの相補的な核酸分子間の選択的ハイブリダイゼーションを促進する条件が選択されることを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全てまたは一部に起こってもよい。ハイブリダイズする部分は、典型的には少なくとも15 (例えば、20、25、30、40、または50) ヌクレオチド長である。当業者は、核酸2本鎖、またはハイブリッドの安定性が、ナトリウム含有緩衝剤中での、ナトリウムイオン濃度および温度の関数 ($T_m = 81.5 - 16.6 (\text{Log}_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41 (\% (\text{G}+\text{C}) - 600/l)$ 、または同様の方程式) である、 T_m によって決定されることを認識すると考えられる。したがって、洗浄条件におけるハイブリッドの安定性を決定するパラメーターは、ナトリウムイオン濃度および温度である。公知の核酸分子と同様であるが、同一ではない分子を同定するために、1%のミスマッチが約1の T_m の減少をもたらすと仮定してもよく、例えば、>95%の同一性を有する核酸分子を探索する場合には、最終的な洗浄条件を約5だけ低下させる。これらの考慮に基づいて、当業者は適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択することができると考えられる。好ましい態様において、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を選択する。例として、ストリンジェントなハイブリダイゼーションを達成するために以下の条件を利用してもよい: 上記の方程式に基づき、 $T_m - 5$ で5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム (SSC) /5×デンハルト溶液/1.0% SDSでハイブリダイゼーション、その後、60での0.2×SSC/0.1% SDSの洗浄。適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、42での3×SSC中の洗浄工程を含む。しかしながら、代わりに緩衝剤、塩、および温度を用いて、同等のストリンジェンシーを達成し得ることが理解される。ハイブリダイゼーション条件に関するさらなる手引きを以下に見出すことができる: Current Protocol

30

40

50

s in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y., 2002、および : Sambrook et al., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001。

【0035】

本明細書において使用する場合、「結合タンパク質」という用語は、別の物質に特異的に結合するタンパク質を指す。ある態様において、結合タンパク質は抗体または抗体断片である。

【0036】

本明細書において使用する場合、「本発明の結合タンパク質」という用語は、本発明の抗体または抗体断片を含む。

10

【0037】

「インビボでの投与に好適な生物学的に適合した形態」により、治療効果が任意の毒性効果に優る投与されるべき物質の形態を意味する。

【0038】

本明細書において使用する場合、「癌」という用語は、本発明の結合タンパク質、好ましくは本発明の抗体または抗体断片によって結合され得る任意の癌を含む。

【0039】

本明細書において使用する場合、「グルコース輸送体8の癌関連変異体」という用語は、癌細胞の表面上に発現するグルコース輸送体8の新規の変異体を指す。本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、GLUT8と同じ糖輸送体としての機能を有するが、細胞において異なる局在を有する。例えば、GLUT8の癌関連変異体は、GLUT8と同じ糖輸送体としての機能を有するが、細胞の表面に局在する。別の態様において、グルコース輸送体8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 11によって定義されるアミノ酸配列を含むタンパク質である。さらなる態様において、グルコース輸送体8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 12によって定義されるアミノ酸配列を含むタンパク質である。さらなる態様において、グルコース輸送体8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 13によって定義されるアミノ酸配列を含むタンパク質である。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

20

【0040】

本明細書において使用する場合、「保存的アミノ酸置換」とは、タンパク質の所望の特性を無効にすることなく、あるアミノ酸残基を別のアミノ酸残基と取り替える置換のことである。

30

【0041】

本方法において対照を用いることができる。本明細書において使用する場合、「対照」という用語は、癌を有することが公知であるか、または癌を有さないことが公知であるかのいずれかである対象または対象の集団由来の試料を指す。

【0042】

使用される場合、「放出制御系」という用語は、本発明の免疫抱合体および/またはその他の癌治療薬が制御された方法で投与され得るということを意味する。例えば、マイクロポンプは制御された用量を腫瘍の領域内に直接送達し、それによって薬学的組成物のタイミングおよび濃度を細かく調節することが可能である(例えば、Medical Applications of Controlled Release, 第2巻, 115-138頁におけるGoodson, 1984を参照されたい)。

40

【0043】

「ペプチドの誘導体」という用語は、官能性側基の反応により化学的に誘導体化された1つまたは複数の残基を有するペプチドを指す。そのような誘導体化された分子には、例えば、塩酸アミン、p-トルエンシルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基、またはホルミル基を形成するように遊離のアミノ基が誘導体化された分子が含まれる。遊離のカルボキシル基は、塩、メチルエステルおよびエチルエステル、もしくはその他の種類のエステル、またはヒドラジドを形成するように誘導体

50

化されてもよい。遊離のヒドロキシル基は、O-アセチル誘導体またはO-アルキル誘導体を形成するように誘導体化されてもよい。ヒスチジンのイミダゾール窒素は、N-im-ベンジルヒスチジンを形成するように誘導体化されてもよい。また、20の標準アミノ酸の1つまたは複数の天然アミノ酸誘導体を含むペプチドを誘導体として含んでもよい。例えば：4-ヒドロキシプロリンをプロリンの代わりに置換してもよく；5-ヒドロキシリジンをリジンの代わりに置換してもよく；3-メチルヒスチジンをヒスチジンの代わりに置換してもよく；ホモセリンをセリンの代わりに置換してもよく；およびオルニチンをリジンの代わりに置換してもよい。

【0044】

「癌を検出またはモニターすること」という語句は、対象が癌を有するか、もしくは有さないかを決定し、または癌の程度を決定する方法もしくは処理を指す。さらに、本発明の結合タンパク質を、本疾患の出現および進行を検出またはモニターするために使用することができる。

10

【0045】

本明細書において使用する場合、「直接投与」という用語は、免疫抱合体および/またはその他の癌治療薬を、腫瘍内に、血管内に、および腫瘍周辺に限定されることなく、投与してもよいということの意味する。例えば、腫瘍内への1回もしくは複数回の直接注射によって、腫瘍内への連続的もしくは不連続的な灌流によって、免疫抱合体の貯蔵胞の導入によって、腫瘍内への徐放装置の導入によって、腫瘍内への徐放剤の導入によって、および/または腫瘍への直接適用によって、免疫抱合体を投与してもよい。「腫瘍内への」投与の様式により、腫瘍の領域への、または腫瘍の領域内に実質的に直接流れ込む血管もしくはリンパ管内への、免疫抱合体および/またはその他の癌治療薬剤の導入が含まれる。

20

【0046】

本明細書において使用する場合、「有効量」という語句は、所望の結果を達成するのに必要な投薬量で、および所望の結果を達成するのに必要な期間、有効な量を意味する。免疫抱合体の有効量は、動物の疾患状態、年齢、性別、体重などの要因によって変化してもよい。最適な治療反応を与えるように、投薬計画を調整してもよい。例えば、数回に分けた用量を毎日投与してもよいし、または治療状況の緊急性が示すのに従って、用量を比例的に減少させてもよい。

30

【0047】

「グルコース輸送体8」(GLUT8)は、ヒト9番染色体上に見られる、slc2a8遺伝子によってコードされるタンパク質である。それは、クラスIIIのGLUTファミリーのタンパク質のメンバーで、かつ糖輸送活性を有することが公知である。GLUT8は477アミノ酸長である。それは、~50kDaのII型膜貫通タンパク質である。それは12の膜貫通領域を有する。それは、TM1とTM2の間に短い推定細胞外ループを有し、かつTM9とTM10の間に長い細胞外ループを有する。本用語は、GLUT8の変異体を含む。(GLUT/SLC2Aファミリー命名法：Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E974-76, 2002.)

【0048】

本明細書において使用する場合、「重鎖相補性決定領域」という用語は、抗体分子の重鎖可変領域内の超可変領域を指す。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、重鎖相補性決定領域1、重鎖相補性決定領域2、および重鎖相補性決定領域3と呼ばれる3つの相補性決定領域を有する。

40

【0049】

本明細書において使用する場合、「重鎖可変領域」という用語は、重鎖の可変領域を指す。

【0050】

本明細書において使用する場合、「本発明の免疫抱合体」という用語は、(2)エフェクター分子に連結された(1)本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片を含む。エフェクター分子は、(i)直接的にもしくは間接的に、検出可能なシグナルを

50

発生させることができる標識、または(ii)細胞毒性があるか、細胞増殖抑制性があるか、もしくはそうでなければ癌細胞が分裂および/もしくは転移する能力を抑制もしくは低下させるかのいずれかである毒素などの、癌治療薬剤を含むが、これらに限定されない、癌細胞に送達されることが望まれる任意の分子であることができる。

【0051】

本明細書において使用する場合、「単離された核酸配列」という用語は、組換えDNA技術により生成された場合、細胞性物質もしくは培地を実質的に含まない核酸、または化学合成された場合、化学的前駆体、もしくはその他の化学物質を実質的に含まない核酸を指す。単離された核酸はまた、核酸が由来する、天然では核酸に隣接する配列(すなわち、核酸の5'末端および3'末端に位置する配列)を実質的に含まない。「核酸」という用語は、DNAおよびRNAを含むよう意図され、ならびに2本鎖または1本鎖のいずれかであることができる。

10

【0052】

「単離されたタンパク質」という用語は、組換えDNA技術により生成された場合、細胞性物質もしくは培地を実質的に含まないタンパク質、または化学合成された場合、化学的前駆体、もしくはその他の化学物質を実質的に含まないタンパク質を指す。それは、本発明の軽鎖相補性領域1、2、および3、本発明の重鎖相補性領域1、2、および3、本発明の軽鎖可変領域、本発明の重鎖相補性領域、本発明の結合タンパク質、ならびに本発明の結合タンパク質が結合する抗原を含む。

20

【0053】

本明細書において使用する場合、「軽鎖相補性決定領域」という用語は、抗体分子の軽鎖可変領域内の超可変領域を指す。軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端へ、軽鎖相補性決定領域1、軽鎖相補性決定領域2、および軽鎖相補性決定領域3と呼ばれる3つの相補性決定領域を有する。

【0054】

本明細書において使用する場合、「軽鎖可変領域」という用語は、軽鎖の可変領域を指す。

【0055】

GLUT8における「N末端のジロイシンモチーフの改変」という語句は、GLUT8が細胞、好ましくは癌細胞の表面上に発現するようにGLUT8の局在に影響を及ぼすN末端のジロイシンモチーフの変更を指す。本発明のある態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに変更する。

30

【0056】

本明細書において使用する場合、「改変されたブーガニン(bouganin)」という用語は、PCT/CA2005/000410および米国特許出願第11.084,080号に記載されているような低下した免疫反応を活性化する傾向を有する改変されたブーガニンを意味する。ある例において、改変されたブーガニンは以下のアミノ酸配列(SEQ ID NO:29)を有する。

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNELAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV
 LVDITTTSKKTKVAIDVTDVYVWGYQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT
 SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKLFSIEAIH
 GKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEARFKYIETEVVDRGLYGSFKPNFKVL
 NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWVWVKVSIQSPD
 MGILKFKSSK

40

【0057】

本明細書において使用する場合、「核酸配列」という用語は、天然の塩基、糖、および糖間(骨格)結合からなるヌクレオシドまたはヌクレオチド単量体の配列を指す。本用語はまた、非天然の単量体またはその部分を含む修飾されたまたは置換された配列を含む。

50

本発明の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）またはリボ核酸配列（RNA）であってもよく、ならびにアデニン、グアニン、シトシン、チミジン、およびウラシルを含む天然の塩基を含んでもよい。本配列はまた、修飾された塩基を含んでもよい。そのような修飾された塩基の例として、アザアデニンおよびデアザアデニン、アザグアニンおよびデアザグニン、アザシトシンおよびデアザシトシン、アザチミジンおよびデアザチミジン、ならびにアザウラシルおよびデアザウラシル；ならびにキサンチンおよびヒポキサンチンが含まれる。

【0058】

本明細書において使用する場合、「試料」という用語は、癌についてアッセイすることができる対象由来の任意の体液試料、細胞試料、または組織試料を指す。

10

【0059】

本明細書において使用する場合、「配列同一性」という用語は、2つのポリペプチド配列間の配列同一性の割合を指す。2つのポリペプチド配列間の同一性の割合を決定するために、最上位の一致が2つの配列間で得られるように、配列の1つの全長の少なくとも50%がアラインメントに関わる、好ましくは、Clustal Wアルゴリズム（Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22 (22): 4673-4680）を、BLOSUM 62スコアマトリックス（Henikoff S. and Henikoff J. G., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919）ならびに10というギャップ開始ペナルティおよび0.1というギャップ伸張ペナルティと共に用いて、そのような2つの配列のアミノ酸配列をアラインする。配列をアラインするために使用し得るその他の方法は、最上位の一致が2つの配列間で得られ、かつ同一アミノ酸の数が2つの配列間で決定されるようにSmithおよびWaterman（*Adv. Appl. Math.*, 1981, 2: 482）によって修正されたような、NeedlemanおよびWunschのアラインメント法（*J. Mol. Biol.*, 1970, 48: 443）である。2つのアミノ酸配列間の同一性の割合を計算するその他の方法は、一般に認識される技術であり、かつ例えば、CarilloおよびLiptonによって記載されたもの（*SIAM J. Applied Math.*, 1988, 48: 1073）ならびにComputational Molecular Biology, Lesk, 編, Oxford University Press, New York, 1988, *Biocomputing: Informatics and Genomics Projects*に記載されたものを含む。一般に、そのような計算にはコンピュータプログラムが利用されると考えられる。この関連で使用され得るコンピュータプログラムには、GCG（Devereux et al., *Nucleic Acids Res.*, 1984, 12: 387）、BLASTP、BLASTN、およびFASTA（Altschul et al., *J. Molec. Biol.*, 1990: 215: 403）が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0060】

「N末端のジロイシンモチーフ」という語句は、細胞の細胞内区画へのタンパク質の局在に参与するGLUT8のN末端のジロイシンモチーフを指す。本発明のある態様において、ジロイシンモチーフはGLUT8の位置12~13にある。

【0061】

本明細書において使用する場合、「対象」という用語は、動物界の、好ましくは哺乳動物の、より好ましくはヒトの、任意のメンバーを指す。好ましい態様において、対象は癌を有することが疑われる、または癌を有する。

【0062】

本明細書において使用する場合、「癌を治療する」という語句は、癌細胞増殖を阻害する工程、癌拡大（転移）を阻害する工程、腫瘍増殖を阻害する工程、癌細胞数もしくは腫瘍増殖を減少させる工程、癌の悪性度（例えば、分化の増大）を低下させる工程、または癌関連症状を改善する工程を指す。

40

【0063】

本明細書において使用する場合、「変異体」という用語は、本発明のタンパク質または核酸分子と実質的に同じ機能を、実質的に同じ様に発揮する本発明のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列の修飾体または化学的等価物を含む。例えば、本発明のタンパク質の変異体は、保存的アミノ酸置換を含むが、これに限定されるわけではない。本発明のタンパク質の変異体はまた、本発明のタンパク質に対する付加および欠失を含む。さらに、変異

50

体ペプチドおよび変異体ヌクレオチド配列は、それらの類似体および誘導体を含む。

【0064】

(B) 本発明のタンパク質および核酸

(i) 軽鎖相補性決定領域および重鎖相補性決定領域ならびに軽鎖可変領域および重鎖可変領域

本発明は、アミノ酸配列RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1) を含む単離された軽鎖相補性決定領域1を提供する。本発明はまた、アミノ酸配列AASSLHS (SEQ ID NO:2) を含む単離された軽鎖相補性決定領域2を提供する。さらに、本発明は、アミノ酸配列LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3) を含む単離された軽鎖相補性決定領域3を提供する。

【0065】

本発明は、アミノ酸配列NYAMS (SEQ ID NO:4) を含む単離された重鎖相補性決定領域1を提供する。本発明はまた、アミノ酸配列AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) を含む単離された重鎖相補性決定領域2を提供する。さらに、本発明は、アミノ酸配列VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6) を含む単離された重鎖相補性決定領域3を提供する。

【0066】

本発明は、アミノ酸配列

RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2) および LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3)

をそれぞれ含む単離された軽鎖相補性決定領域1、2、および3; ならびにアミノ酸 NYAMS (SEQ ID NO:4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) および VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)

をそれぞれを含む単離された重鎖相補性決定領域1、2、および3を提供する。

【0067】

本発明はまた、上に開示したCDR配列によって認識される同じエピトープまたは抗原に結合することができるCDR配列の変異体を含む。

【0068】

本発明のさらなる局面は、本発明の軽鎖相補性決定領域1、2、および/または3 (SEQ ID NO:1~3) を含む単離された軽鎖可変領域; ならびに本発明の重鎖相補性決定領域1、2、および/または3 (SEQ ID NO:4~6) を含む単離された重鎖可変領域である。ある態様において、軽鎖可変領域は図1で示したアミノ酸配列 (SEQ ID NO:7) を含み、および重鎖可変領域は図2で示したアミノ酸配列 (SEQ ID NO:9) を含む。

【0069】

本発明はまた、上記で開示された単離された軽鎖可変領域および単離された重鎖可変領域によって認識される、同じエピトープまたは抗原に結合することができる、単離された軽鎖可変領域および重鎖可変領域の変異体を含む。

【0070】

当業者は、本発明が、本発明によって開示された配列に対する化学的等価物を含む、SEQ ID NO:1~6、7、および9のアミノ酸配列に対する変異体を含むことを正しく理解すると考えられる。そのような等価物は、本明細書において開示された特定のタンパク質と実質的に同じ機能を、実質的に同じ様に発揮するタンパク質を含む。CDR配列の機能的変異体はネイティブなCDR配列によって認識される抗原またはエピトープに結合できると考えられる。例えば、等価物は保存的アミノ酸置換を含むが、それに限定されるわけではない。

【0071】

ある態様において、軽鎖相補性決定領域1、2、および3、ならびに重鎖相補性決定領域1、2、および3の変異体アミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO:1~6に対して、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも80%、およびさらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 2 】

別の態様において、軽鎖可変領域および重鎖可変領域の変異体アミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO:7および9に対して、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも80%、およびさらにより好ましくは少なくとも90%の配列同一性を有する。

【 0 0 7 3 】

本発明はまた、本発明の軽鎖可変領域をコードする単離された核酸配列および本発明の重鎖可変領域をコードする単離された核酸配列を提供する。ある態様において、軽鎖可変領域は図1で示した核酸配列 (SEQ ID NO:8) を含む。別の態様において、重鎖可変領域は図2で示した核酸配列 (SEQ ID NO:10) を含む。本発明はまた、本発明の軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする核酸配列に対する変異体を含む。例えば、変異体は、少なくとも適度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、本発明の軽鎖可変領域および重鎖可変領域をコードする核酸配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む。

10

【 0 0 7 4 】

本発明はまた、アミノ酸配列

RASQDISNYLA (SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2) および LQYSTYPIT (SEQ ID NO:3)

をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域1、2、および/または3をコードする単離された核酸配列; ならびに、アミノ酸配列

20

NYAMS (SEQ ID NO:4),

AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) および VPYRSTWYPLY (SEQ ID NO:6)

をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域1、2、および/または3をコードする単離された核酸配列を提供する。本発明はまた、図1で示した軽鎖可変領域をコードする単離された核酸配列 (SEQ ID NO:7)、および図2で示した重鎖可変領域をコードする単離された核酸配列 (SEQ ID NO:9) を提供する。

30

【 0 0 7 5 】

本発明はまた、上記で議論したCDR配列および可変領域配列の変異体をコードする単離された核酸配列を含む。

【 0 0 7 6 】

変異体の核酸配列は、少なくとも適度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、SEQ ID NO:1~6、7、および9で示したアミノ酸配列、ならびにそれらの変異体をコードする核酸配列にハイブリダイズする核酸配列を含む。

【 0 0 7 7 】

(ii) 結合タンパク質

本発明の別の局面は、少なくとも1つの本発明の軽鎖相補性決定領域 (すなわち、SEQ ID NO:1~3のうちの1つもしくは複数) および/または少なくとも1つの本発明の重鎖相補性決定領域 (すなわち、SEQ ID NO:4~6のうちの1つもしくは複数) を含む、結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片である。そのような結合タンパク質を通常、本明細書において、「本発明の結合タンパク質」、または好ましくは「本発明の抗体もしくは抗体断片」と称することができる。

40

【 0 0 7 8 】

ある態様において、結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片は、アミノ酸配列 RASQDISNYLA

(SEQ ID NO:1), AASSLHS (SEQ ID NO:2) および LQYSTYPIT (SQ ID NO:3)

50

をそれぞれ含む軽鎖相補性決定領域1、2、および3；ならびに、アミノ酸配列
NYAMS (SEQ ID NO:4),
AITPSGGSTNYADSVKG (SEQ ID NO:5) および VPYRSTWYPLY (SEQ ID
NO:6)

をそれぞれ含む重鎖相補性決定領域1、2、および3を含む。本発明はまた、図1に示した軽鎖可変領域 (SEQ ID NO : 7) および/または図2に示した重鎖可変領域 (SEQ ID NO : 9) を含む結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片を提供する。

【0079】

10

当業者は、本発明が、上記で開示された結合タンパク質と実質的に同じ機能を、実質的に同じ様に発揮する上記で開示された配列に対する化学的等価物を含む、上記で開示された特定の結合タンパク質に対する変異体を含むということを正しく理解すると考えられる。結合タンパク質の機能的変異体は、上記で開示された結合タンパク質と同じ抗原に結合することができると考えられる。ある態様において、結合タンパク質は、グルコース輸送体8もしくはその変異体、SEQ ID NO : 11 ~ 20、好ましくはSEQ ID NO : 11 ~ 13のアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質、または癌細胞の表面上に発現するGLUT8の癌関連変異体に結合する。

【0080】

20

本発明者らは、癌細胞上に発現するGLUT8の新規の変異体を見出した。したがって、本発明は、グルコース輸送体8の癌関連変異体に特異的である結合タンパク質を含む。ある態様において、グルコース輸送体8の癌関連変異体は、SEQ ID NO : 11 ~ 13によって定義されるアミノ酸配列の任意の1つ、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端ジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端ジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

【0081】

ある態様において、抗体または抗体断片は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgE、IgM、またはIgD定常領域などの、重鎖定常領域の全てまたは一部を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域である。さらに、抗体または抗体断片は、軽鎖定常領域または軽鎖定常領域の全てまたは一部を含むことができる。好ましくは、軽鎖定常領域は、軽鎖定常領域である。

30

【0082】

ヒトモノクローナル抗体を産生するために、癌を有するヒトから抗体産生細胞 (リンパ球) を採取し、かつ標準的な体細胞融合方法によりミエローマ細胞と融合し、その結果、これらの細胞を不死化し、かつハイブリドーマ細胞を産出することができる。そのような技術は、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al., Immunol. Today 4: 72 (1983))、ヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBVハイブリドーマ技術 (Cole et al., Methods Enzymol, 121: 140-67 (1986))、および組み合わせ抗体ライブラリーのスクリーニング (Huse et al., Science 246: 1275 (1989)) などのその他の技術と同様に、当技術分野において周知である (例えば、KohlerおよびMilstein (Nature 256: 495-497 (1975)) により最初に開発されたハイブリドーマ技術)。癌細胞に特異的に反応する抗体の産生について、ハイブリドーマ細胞を免疫化学的にスクリーニングすることができ、およびモノクローナル抗体を単離することができる。

40

【0083】

また、細胞表面の構成要素と共に大腸菌内で発現させた、免疫グロブリン遺伝子、またはその一部をコードする発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、癌細胞上の抗原または分子などの、特定の抗原または分子に対して反応する特異的な抗体または抗体断片を作製してもよい。例えば、ファージ発現ライブラリーを用いて、完全Fab断片、VH領域、およびFV領域を大腸菌内で発現させることができる (例えば、Ward et al., Nature 341: 544-546 (1989); Huse et al., Science 246: 1275-1281 (1989); およびMcCaff

50

erty et al., Nature 348: 552-554 (1990)を参照されたい)。

【0084】

本発明は、本発明の抗体または抗体断片と同じ抗原に結合する全ての抗体および抗体断片を含む。当業者は、本発明の抗体または抗体断片と同じ結合特異性のあるその他の抗体および抗体断片を見つけるために結合アッセイを用いることができるということを正しく理解すると考えられる。以下に例示したように、そのようなその他の抗体を見つけるために競合結合アッセイを用いることができる。

【0085】

フローサイトメトリーを用いて競合アッセイを行なう前に、一定数の癌細胞（例えば、VB1-050用のA-375細胞）に対して最大結合を与える本発明の抗体（Ab1）の最小濃度を決定する。指数関数的に増殖している培養から合計 10^6 細胞を採取し、および4で1時間、様々な抗体濃度でインキュベートする。細胞を洗浄し、および4でさらに1時間、好適な被験抗体とインキュベートする。洗浄後、フローサイトメトリーで細胞を解析する。各々の被験抗体について、抗体濃度に対する蛍光中央値をプロットすることにより、データから飽和曲線を作成する。

10

【0086】

競合アッセイ用に、癌細胞を上記のように調製し、および一定濃度の抗体（Ab1）で2通りに処理する。一定濃度とは、上記で決定したような一定数の癌細胞に対して最大結合を生む抗体の最小濃度である。Ab1の添加後すぐに、各チューブに様々な濃度の潜在的阻害抗体（Ab2）を加え、および混合物を4で1時間、インキュベートする。各々の被験試料についての蛍光中央値の読み取り（Ab1 + Ab2）からバックグラウンド蛍光（PBS-5%FCS）を引くことにより、最大蛍光中央値に対する阻害率および変化率の両方を計算する。その後、Ab1のみの蛍光中央値（最大結合） - バックグラウンドで、結果を割る（下を参照）。阻害率の結果は、100を掛けることにより得られる。反復の平均を、それらのそれぞれの標準偏差と共に、抗体濃度に対してプロットする。阻害率を計算するために以下の公式を用いる：

20

$$PI = [(MF_{(Ab_1 + Ab_2)} - MF_{Bg_d}) / (MF_{Ab_1} - MF_{Bg_d})] \times 100$$

式中、PI = 阻害率； $MF_{(Ab_1 + Ab_2)}$ = Ab1 + Ab2混合物について測定した蛍光中央値；および MF_{Bg_d} = PBS-5%FCSでのバックグラウンド蛍光中央値である。

【0087】

したがって、本発明は、以下の工程を含む方法によって同定することができる、癌細胞上の抗原に結合する能力のある結合タンパク質を提供する：

30

(1) 一定数の癌細胞に対して最大結合を生む最低濃度の本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片（Ab1）と一定数の癌細胞をインキュベートし、かつAb1の蛍光中央値（ MF_{Ab_1} ）を測定する工程；

(2) Ab1および癌細胞にAb2を加えることによって、2つまたはそれより多くの濃度の被験結合タンパク質（Ab2）を試験し、かつ蛍光中央値（ $MF_{(Ab_1 + Ab_2)}$ ）を測定する工程；

(3) バックグラウンド蛍光中央値（ MF_{Bg_d} ）を測定する工程；

(4) $PI = [(MF_{(Ab_1 + Ab_2)} - MF_{Bg_d}) / (MF_{Ab_1} - MF_{Bg_d})] \times 100$ である、PIを計算する工程；
ならびに

40

(5) このPIと対照PI値を比較する工程、

ここで、対照PIとの統計的に有意な差を有するPIにより、被験結合タンパク質が癌細胞上の抗原に結合する能力があることが示される。

【0088】

当業者は、その抗原、グルコース輸送体8またはその変異体に対するその親和性を増大させることによって、本発明の結合タンパク質または免疫抱合体を改変するために、親和性成熟技術を用いることができるということを正しく理解すると考えられる。

【0089】

抗体の結合親和性を増強するために、2つの戦略が日常的に用いられる。1つのアプローチは、抗原結合に関与する主要な残基を同定するためにAb-Agの結晶構造の解像を利用す

50

る (Davies D. R., Cohen G. H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 7-12)。その結果、相互作用を増強するために、それらの残基を突然変異させることができる。もう1つのアプローチは、B細胞によって産生される免疫グロブリンの親和性成熟を促進するインビボ抗原刺激を模倣する。免疫反応の成熟の間に、免疫グロブリンの可変領域は体細胞突然変異を受ける (Mc Heyzer-Williams M. 2003. B-cell signaling mechanism and activation. Fundamental Immunology, 第5版, 195-225)。免疫系に非常に特異的な、この過程は、非常に高い割合での点突然変異の導入によって特徴付けられる。それは可変領域をコードするDNA断片内でのみ起こり、および保存領域を排除する。その後、体細胞突然変異を起こした変異抗体を発現するB細胞は、抗原を介する選択を受け、より高い親和性の免疫グロブリンの選択をもたらす。この現象をインビトロで再現するために、幾つかのアプローチを用いて、ランダムプロセスまたは標的プロセスのいずれかによる突然変異が導入されている。ランダム突然変異は、エラープロードPCR、チェーンシャッフリング (chain shuffling)、または突然変異誘発大腸菌 (*E. coli*) 株を用いて導入することができる (Clackson T. Hoogenboom N. R., Griffiths A. D. and Winter G. 1991 Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-628, Hawkins R. E., Russell S. J. and Winter G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. J. Mol. Biol. 226, 889-896, Low N., Holliger P. and Winter G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. J Mol. Biol. 260, 359-368)。この戦略は、反応性クローンが、リボソーム、ファージ、または酵母などのディスプレイ技術によって選択される大きいライブラリーの作製につながる (Min L. (2000). Applications of display technology in protein analysis. Nat. Biotechnol. 18, 1251-1256)。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 0 】

CDR、特に軽鎖および重鎖のCDR3の標的突然変異は、抗体親和性を増大させるための有効な技術であることが示されている。突然変異誘発のために、CDR3の3~4アミノ酸のブロックまたは「ホットスポット」と呼ばれる特定の領域を標的にする。Yangらは、4つのCDR残基の突然変異による抗HIV gp120 Fab断片の420倍の増加を報告した (Yang W. P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A. T., Burton D. R. and Barbas C. F. III. 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into picomolar range. J. Mol. Biol., 254, 392-403)。C6.5 scFvのVH CDR3中の3つの突然変異と組み合わせたVL CDR3中の1つの突然変異により、1230倍の親和性の増加をもたらされた (Schier R., McCall A., Adams G. P., Marshall K. W., Merritt H., Yin M., Crawford R. S. Weiner L. M., Marks C. and Marks J. D. 1996. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementary determining regions in the center of the antibody binding site. J. Mol. Biol., 263, 551-567)。

【 0 0 9 1 】

「ホットスポット」は、インビボで体細胞超突然変異が生じる配列である (Neuberger M. S and Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. Curr. Opin. Immunol. 7, 248-254)。ホットスポット配列を、特定のコドンにおけるコンセンサヌクレオチド配列として定義することができる。コンセンサヌクレオチド配列は、RGYWという4ヌクレオチドであり、ここでRはAまたはGのいずれかであることができ、YはCまたはTのいずれかであることができ、およびWはAまたはTのいずれかであることができる (Neuberger M. S and Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. Curr. Opin. Immunol. 7, 248-254)。さらに、潜在的ホットスポット配列に相当するTCNによってコードされるセリン残基に対して、ヌクレオチドAGYによってコードされるセリン残基が可変ドメインのCDR領域に主に存在する (Wagner S. D., Milstein C. and Neuberger M. S. 1995. Codon bias targets mutation. Nature, 376, 732)。構造解析により、CDRループ、特にCDR3ループが、抗原結合に最も寄与していることが分かっている (Giudicelli V., Chaume D. and Lefranc M. P. 2004. IMGT/V-

QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 32, 435-440)。したがって、ホットスポット配列およびAGYコドンの存在について、本発明の各抗体の重鎖および軽鎖のCDRのヌクレオチド配列を走査する。International ImMunoGen Ticsデータベース (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest/>) (Davies D. R., Padlan E. A. and Sheriff S. 1990. Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 439-473) を用いて、同定された軽鎖および重鎖のCDR領域のホットスポットを、生殖細胞の重鎖および軽鎖の配列と比較する。生殖系列と同一である配列は、体細胞突然変異が起こっていないことを示唆する；したがって、ランダム突然変異を導入し、インビボで起こる体細胞事象を模倣する。対照的に、異なる配列は、幾つかの体細胞突然変異が既に起こったことを示す。インビボ体細胞突然変異が最適であったかどうかは依然として明らかにされていないと考えられる。CDR内部に埋もれたまたは保存されたアミノ酸をコードするホットスポットは、突然変異を起こさない。これらの残基は通常、全体的な構造にとって重要であり、およびそれらは埋もれているので、抗原と相互作用する可能性が低い。さらに、その配列を、体細胞突然変異が主に起こった生殖系列配列中の予測位置と比較することができる (Tomlinson I. M., Cox J. P. L., Gherardi E., Lesk A. M. and Chotia C. 1995. The structural repertoire of the human V domain. *EMBO J.* 14, 4628-4638, Tomlinson I. M., Walter G., Jones P. T., Dear P. H., Sonnhammer E. L. L. and Winter G. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. *J. Mol. Biol.* 256, 813-817)。同様の戦略がBL22 scFvの親和性成熟に適用された。重鎖のCDR3に導入された点突然変異は、様々なCD22陽性細胞株に対する5~10倍の結合活性の増加をもたらした (Salvatore G., Beers R., Margulies I., Kreitman R. J. and Pastan I. 2002. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. *Clinical Cancer research*, 8, 995-1002)。また、CDR1ループおよびCDR2ループ中の様々なアミノ酸の突然変異も、3倍~7倍の範囲の増加した親和性を有する突然変異体を生み出した (Ho M., Kreitman J., Onda M. and Pastan I. 2005. In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J. Biol. Chem.*, 280, 607-617)。

10

20

30

【0092】

ランダムプロセスまたは標的プロセスのいずれかによって、突然変異を導入した後、抗体を発現させ、かつ機能について評価する。例えば、機能的スクリーニングは結合に基づくことができる。一度機能を評価すれば、その後公知の方法を用いて、選ばれた抗体のDNAシーケンシングを実行することができる。

【0093】

別の態様において、本発明の結合タンパク質または免疫複合体の親和性成熟のために、Harvey, Bらによって記載された固定化ペリプラズム発現 (anchored periplasmic expression) (APEX) 法 (PNAS 2004 June 22; 101 (25): 9193-8) を用いる。

【0094】

したがって、本発明は、グルコース輸送体8もしくはその変異体；SEQ ID NO: 11~20、好ましくはSEQ ID NO: 11~13のアミノ酸配列を含むタンパク質；またはグルコース輸送体8の癌関連変異体に対する結合タンパク質の親和性を増大させるために親和性成熟させた、本発明の結合タンパク質を含む。

40

【0095】

本発明はまた、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、または安定化剤と共に、本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体および抗体断片を含む組成物を提供する。

【0096】

(iii) 新規の癌関連抗原

上記のように、本発明者らは、本発明の結合タンパク質が結合する抗原を同定した。新規の癌関連抗原は癌細胞の表面上に発現し、かつ正常細胞の表面上にはそれほど多くは発

50

現しない。したがって、本発明は、本発明の結合タンパク質の1つと特異的に結合することができる単離されたタンパク質、ならびにその核酸配列および使用を含む。

【0097】

ある態様において、本発明は、グルコース輸送体8またはその変異体を含む単離されたタンパク質を提供する。別の態様において、本発明は、SEQ ID NO : 11 ~ 20のアミノ酸配列またはそれらの変異体の任意の1つを含む、単離されたタンパク質を提供する。さらなる態様において、本発明は、SEQ ID NO : 11のアミノ酸配列またはその変異体を含む、単離されたタンパク質を提供する。本発明はまた、SEQ ID NO : 12のアミノ酸配列またはその変異体を含む単離されたタンパク質を提供する。さらに、本発明は、SEQ ID NO : 13のアミノ酸配列またはその変異体を含む単離されたタンパク質を提供する。その上、本発明は、癌細胞の表面上に発現するグルコース輸送体8の癌関連変異体を提供する。本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO : 11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

10

【0098】

当業者は、本発明が、本発明によって開示された配列に対する化学的等価物を含む、SEQ ID NO : 11 ~ 13のアミノ酸配列に対する変異体を含むということを正しく理解すると考えられる。そのような等価物には、本明細書において開示された特定のタンパク質と実質的に同じ機能を、実質的に同じ様式で発揮するタンパク質が含まれる。例えば、等価物には、保存的アミノ酸置換が含まれるが、それに限定されるわけではない。

20

【0099】

ある態様において、本発明の単離されたタンパク質の変異体アミノ酸配列は、少なくとも50%の、好ましくは少なくとも60%の、より好ましくは少なくとも70%の、最も好ましくは少なくとも80%の、およびさらにより好ましくは少なくとも90%の、SEQ ID NO : 11 ~ 13に対する配列同一性を有する。

【0100】

本発明は、単離されたタンパク質の使用を含む。例えば、癌を治療もしくは抑制するために用いることができ、または対象における癌を検出もしくはモニターするために用いることができる、結合タンパク質および免疫抱合体を作製するための、本発明の単離されたタンパク質の使用。したがって、本発明は、癌を治療もしくは抑制するための医薬の製造における、本発明の単離されたタンパク質の使用を含む。

30

【0101】

(C) 免疫抱合体

本発明はまた、(2)エフェクター分子に連結された(1)本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片を含む免疫抱合体を含む。ある態様において、本発明の結合タンパク質は癌細胞上の抗原または分子に結合する。

【0102】

抗原は、グルコース輸送体8もしくはその変異体 ; SEQ ID NO : 11 ~ 20、好ましくはSEQ ID NO : 11、12、もしくは13によって定義されるアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質 ; またはグルコース輸送体8の癌関連変異体であることができる。本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO : 11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

40

【0103】

好ましい態様において、エフェクター分子は、(i)直接的にもしくは間接的に、検出可能なシグナルを発生させることができる標識、または(ii)細胞毒性があるか、細胞増殖抑制性があるか、もしくはそうでなければ癌細胞が分裂および/もしくは転移する能力を抑制もしくは低下させるかのいずれかである、癌治療薬剤である。そのような免疫抱合

50

体を通常、本明細書において「本発明の免疫抱合体」と称することができる。

【0104】

本発明のある態様において、エフェクター分子は癌治療薬剤である。癌治療薬剤は、好ましくは、細胞毒性があるか、細胞増殖抑制性があるか、またはそうでなければ癌細胞が分裂および/もしくは転移する能力を抑制もしくは低下させるかのいずれかである毒素である。したがって、本発明のある局面は、(1)本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片であって、(2)細胞毒素などの、癌治療薬剤に連結した結合タンパク質を含む免疫抱合体である。

【0105】

別の態様において、免疫抱合体は内在化され、および癌治療薬剤は細胞のタンパク質合成を阻害し、そこで細胞死を引き起こす細胞毒素である。重要なことに、多くの正常細胞は癌細胞上に存在する抗原を広範囲には発現しないので、それらは免疫抱合体に結合し、かつ免疫抱合体を内在化することができず、および毒素またはその他の癌治療薬剤の殺傷効果から保護されている。

10

【0106】

様々なエフェクター分子を本発明の免疫抱合体において使用してもよく、および多数のそのようなエフェクター分子は細胞内で活性のある分子である。したがって、本発明のある態様において、免疫抱合体は癌細胞によって内在化される。

【0107】

好ましい態様において、エフェクター分子は、癌治療薬剤、より好ましくはジェロニン (gelonin)、プーガニン、サポリン、リシン、リシンA鎖、プリオジン (bryodin)、ジフテリア毒素、レストリクトシン (restrictocin)、緑膿菌外毒素Aおよびそれらの変異体を含むが、それらに限定されるわけではない、リボソーム不活性化活性を有するポリペプチドを含む細胞毒素である。タンパク質がリボソーム不活性化タンパク質である場合、免疫抱合体は、タンパク質が細胞に対して細胞毒性があるよう、癌細胞への結合と同時に内在化されなければならない。したがって、本発明のある態様において、エフェクター分子は細胞毒素であり、および免疫抱合体は癌細胞によって内在化される。

20

【0108】

本発明のある態様において、毒素は、プーガニンまたは緑膿菌外毒素A、およびそれらの変異体である。別の態様において、毒素は、細胞結合ドメインを欠く改変されたプーガニンまたは切断型の緑膿菌外毒素Aである。さらなる態様において、毒素は、T細胞エピトープを実質的に欠くプーガニンまたはアミノ酸252~608からなる切断型の緑膿菌外毒素Aである。

30

【0109】

その他の非限定的な態様において、癌治療薬剤は、DNAを破壊するように作用する薬剤を含む。したがって、癌治療薬剤は、エンジイン (例えば、カリケアミシンおよびエスペラミシン) ならびに非エンジイン系小分子薬剤 (例えば、プレオマイシン、メチジウムプロピル-EDTA-Fe(II)) から選択されてもよいが、それらに限定されるわけではない。本発明に従って有用なその他の癌治療薬剤には、ダウノルピシン、ドキソルピシン、ジスタマイシンA、シスプラチン、マイトマイシンC、エクテナサイジン、デュオカルマイシン/CC-1065、およびプレオマイシン/ペプレオマイシンが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

40

【0110】

その他の非限定的な態様において、癌治療薬剤は、チューブリンを破壊するように作用する薬剤を含む。そのような薬剤には、リゾキシシン/マイタンシン、バクリタキセル、ビンクリスチンおよびピンプラスチン、コルヒチン、オーリスタチンドラスタチン10MMAE、ならびにペロルシドAが含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。

【0111】

その他の非限定的な態様において、本発明の免疫抱合体の癌治療部分には、アサレー (Asaley) NSC 167780、AZQ NSC 182986、BCNU NSC 409962、ブスルファンNSC 750、カルボ

50

キシフタラトプラチナムNSC 271674、CBDCA NSC 241240、CCNU NSC 79037、CHIP NSC 256 927、クロラムブシルNSC 3088、クロロゾトシンNSC 178248、シス-プラチナムNSC 119875、クロメゾンNSC 338947、シアノモルフォリノドキシソルピシンNSC 357704、シクロジソンNSC 348948、ジアンヒドロガラクチールNSC 132313、フルオロドーパンNSC 73754、ヘプスルファム (hepsulfam) NSC 329680、ヒカントンNSC 142982、メルファランNSC 8806、メチルCCNU NSC 95441、マイトマイシンC NSC 26980、マイトゾラミドNSC 353451、窒素マスタードNSC 762、PCNU NSC 95466、ピペラジンNSC 344007、ピペラジンジオンNSC 1 35758、ピポプロマンNSC 25154、ポルフィロマイシンNSC 56410、スピロヒダントインマスタードNSC 172112、テロキシロンNSC 296934、テトラプラチンNSC 363812、チオ-テパンSC 6396、トリエチレンメラミンNSC 9706、ウラシル窒素マスタードNSC 34462、およびヨシ (Yoshi) -864 NSC 102627を含むアルキル化剤が含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。

10

【0112】

その他の非限定的な態様において、本発明の免疫抱合体の癌治療剤部分には、アロコルヒチンNSC 406042、ハリコンドリンB NSC 609395、コルヒチンNSC 757、コルヒチン誘導体NSC 33410、ドラスタチン10 NSC 376128 (NG-オーリスタチン由来)、マイタンシンNSC 153858、リゾキシシンNSC 332598、タキソールNSC 125973、タキソール誘導体NSC 608832、チオコルヒチンNSC 361792、トリチルシステインNSC 83265、硫酸ピンブラスチンNSC 4 9842、および硫酸ピンクリスチンNSC 67574を含む抗有糸分裂剤が含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。

20

【0113】

その他の非限定的な態様において、本発明の免疫抱合体の癌治療剤部分には、カンプトテシンNSC 94600、カンプトテシン、ナトリウム塩NSC 100880、アミノカンプトテシンNSC 603071、カンプトテシン誘導体NSC 95382、カンプトテシン誘導体NSC 107124、カンプトテシン誘導体NSC 643833、カンプトテシン誘導体NSC 629971、カンプトテシン誘導体NSC 295500、カンプトテシン誘導体NSC 249910、カンプトテシン誘導体NSC 606985、カンプトテシン誘導体NSC 374028、カンプトテシン誘導体NSC 176323、カンプトテシン誘導体NSC 295501、カンプトテシン誘導体NSC 606172、カンプトテシン誘導体NSC 606173、カンプトテシン誘導体NSC 610458、カンプトテシン誘導体NSC 618939、カンプトテシン誘導体NSC 610457、カンプトテシン誘導体NSC 610459、カンプトテシン誘導体NSC 606499、カンプトテシン誘導体NSC 610456、カンプトテシン誘導体NSC 364830、カンプトテシン誘導体NSC 606497、およびモルフォリノドキシソルピシンNSC 354646を含むトポイソメラーゼI阻害剤が含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。

30

【0114】

その他の非限定的な態様において、本発明の免疫抱合体の癌治療剤部分には、ドキシソルピシンNSC 123127、アモナフィドNSC 308847、m-AMSA NSC 249992、アントラピラゾール誘導体NSC 355644、ピラゾロアクリジンNSC 366140、ピサントレンHCL NSC 337766、ダウノルピシンNSC 82151、デオキシドキシソルピシンNSC 267469、ミトキサントロンNSC 30173 9、メノガリルNSC 269148、N, N-ジベンジルダウノマイシンNSC 268242、オキサントラゾールNSC 349174、ルビダゾンNSC 164011、VM-26 NSC 122819、およびVP-16 NSC 141540を含むトポイソメラーゼII阻害剤が含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。

40

【0115】

その他の非限定的な態様において、本発明の免疫抱合体の癌治療剤部分には、L-アラニンNSC 153353、5-アザシチジンNSC 102816、5-フルオロウラシルNSC 19893、アシピシンNSC 163501、アミノプテリン誘導体NSC 132483、アミノプテリン誘導体NSC 184692、アミノプテリン誘導体NSC 134033、アンチフォルNSC 633713、アンチフォルNSC 623017、ベーカーの可溶性アンチフォルNSC 139105、ジクロロアリルローソンNSC 126771、プレキナールNSC 368390、フトラフル (プロドラッグ) NSC 148958、5, 6-ジヒドロ-5-アザシチジンNSC 264880、メトトレキサートNSC 740、メトトレキサート誘導体NSC 174121、N-(ホスホノアセチル)-L-アスパルタート (PALA) NSC 224131、ピラゾフリンNSC 143095、トリ

50

メトレキサートNSC 352122、3-HP NSC 95678、2'-デオキシ-5-フルオロウリジンNSC 27640、5-HP NSC 107392、-TGDR NSC 71851、アフィディコリングリシナートNSC 303812、アラ-C NSC 63878、5-アザ-2'-デオキシシチジンNSC 127716、-TGDR NSC 71261、シクロシチジンNSC 145668、グアナゾールNSC 1895、ヒドロキシウレアNSC 32065、イノシングリコジアルデヒドNSC 118994、マクベシン (macbecin) II NSC 330500、ピラゾロイミダゾールNSC 51143、チオグアニンNSC 752、およびチオプリンNSC755を含むRNA代謝拮抗剤またはDNA代謝拮抗剤が含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。

【0116】

別の非限定的な態様において、免疫抱合体の治療部分は核酸であってもよい。使用される核酸には、アンチセンスRNA、遺伝子、またはその他のポリヌクレオチド、チオグアニンおよびチオプリンなどの核酸類似体が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0117】

本発明はさらに、(i)本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片であって、(2)間接的にまたは直接的に、検出可能なシグナルを発生させることができる標識である、エフェクター分子に連結された結合タンパク質を含む免疫抱合体を提供する。これらの免疫抱合体は、癌のインビボ検出用などの、研究用または診断適用用に使用することができる。標識は、好ましくは、直接的にかまたは間接的にかのいずれかで、検出可能なシグナルを産生することができる。例えば、標識は、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I などの、放射線不透過物もしくは放射性同位元素であってもよく；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリンなどの、蛍光物質(フルオロフォア)もしくは化学発光物質(クロモフォア)であってもよく；アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、もしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの、酵素であってもよく；造影剤であってもよく；または金属イオンであってもよい。

20

【0118】

別の態様において、免疫抱合体は間接的に検出可能である。例えば、免疫抱合体を検出するために、免疫抱合体に特異的で、かつ検出可能な標識を含む2次抗体を使用することができる。

【0119】

本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片を、結合タンパク質がエフェクター分子と結び付き、または接続することができる任意の手段によって、エフェクター分子に「連結して」もよい。例えば、化学的手段または組換え手段によって、結合タンパク質をエフェクター分子に連結してもよい。融合体または抱合体を調製するための化学的手段は当技術分野において公知であり、かつ免疫抱合体を調製するために用いることができる。結合タンパク質およびエフェクター分子をコンジュゲートするために用いる方法は、結合タンパク質が癌細胞上の抗原と結合する能力を妨げることなく、結合タンパク質をエフェクター分子と結び付けることができなければならない。

30

【0120】

本発明の結合タンパク質をエフェクター分子に間接的に接続してもよい。例えば、数種類のうちの1つのエフェクター分子を含むリポソームに結合タンパク質を直接的に接続してもよい。また、エフェクター分子および/または結合タンパク質を固体表面に結合してもよい。

40

【0121】

ある態様において、結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片、およびエフェクター分子は両方ともタンパク質で、かつ当技術分野において周知の技術を用いてコンジュゲートすることができる。2つのタンパク質をコンジュゲートすることができる利用可能な数百の架橋剤がある。(例えば、「Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking」. 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arborを参照されたい)。架橋剤は通常、利用可能な反応性官能基に基づいて選ばれ、または結合タンパク質、好ましくは抗体もしくは抗体断片、および/もしくはエフェクター分子上に挿入される。さらに、反応基がない場合には、光活性化可能な架橋剤を使用することができる。ある例において、結合タンバ

50

ク質、好ましくは抗体または抗体断片、とエフェクター分子の間のスペーサーを含むことが望ましい場合がある。当技術分野に公知の架橋剤には、ホモ2官能性剤：グルタルアルデヒド、ジメチルアジピミデート、およびビス（ジアゾベンジジン）、ならびにヘテロ2官能性剤：m マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドおよびスルホ-m マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドが含まれる。

【0122】

また、組換えDNA技術を用いて、結合タンパク質-エフェクター分子タンパク質融合体を調製してもよい。そのような場合、結合タンパク質をコードするDNA配列を、エフェクター分子をコードするDNA配列と融合し、結果としてキメラDNA分子を生じる。融合タンパク質を発現する宿主細胞内に、キメラDNA配列をトランスフェクトする。当技術分野において公知の技術を用いて、融合タンパク質を細胞培養から回収し、かつ精製することができる。

10

【0123】

標識である、エフェクター分子を結合タンパク質に連結する例として、Hunter, et al., Nature 144: 945 (1962); David, et al., Biochemistry 13: 1014 (1974); Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40: 219 (1981); Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30: 407 (1982); Wensel and Meares, Radioimmunoimaging And Radioimmunotherapy, Elsevier, N. Y. (1983); および Colcher et al., 「Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice」, Meth. Enzymol., 121: 802-16 (1986) に記載された方法が含まれる。

20

【0124】

(D) 本発明のタンパク質の調製

当業者は、軽鎖相補性決定領域および重鎖相補性決定領域、軽鎖可変領域および重鎖可変領域、抗体および抗体断片、本発明の免疫抱合体および新規の癌関連抗原などの、本発明のタンパク質を、幾つかの方法のうちの任意の方法で調製してもよいが、最も好ましくは組換え法を用いて調製するということを正しく理解すると考えられる。

【0125】

したがって、本発明の核酸分子を、本発明のタンパク質の良い発現を保証する適切な発現ベクターに公知の方法で組み入れてもよい。ベクターが使用される宿主細胞と適合性がある限り、可能な発現ベクターには、コスミド、プラスミド、または改変したウイルス（例えば、複製欠損レトロウイルス、複製欠損アデノウイルス、および複製欠損アデノ随伴ウイルス）が含まれるが、これらに限定されない。発現ベクターは「宿主細胞の形質転換に好適」であり、このことは、発現ベクターが、本発明の核酸分子および核酸分子に機能的に連結される、発現用に使用される宿主細胞に基づいて選択された調節配列を含むということの意味する。機能的に連結されるとは、核酸の発現を可能にする方法で、核酸を調節配列に連結するという意味するよう意図されている。

30

【0126】

したがって、本発明は、本発明の核酸分子、またはその断片、ならびに挿入されたタンパク質配列の転写および翻訳のために必要な調節配列を含む本発明の組換え発現ベクターを企図している。

40

【0127】

好適な調節配列は、細菌遺伝子、真菌遺伝子、ウイルス遺伝子、哺乳動物遺伝子、または昆虫遺伝子を含む、様々な源に由来してもよい。（例えば、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) に記載された調節配列を参照されたい）。適切な調節配列の選択は、以下に議論されたような選ばれる宿主細胞に依存し、および当業者によって容易に達成されてもよい。そのような調節配列の例として：転写プロモーターおよびエンハンサーまたはRNAポリメラーゼ結合配列、翻訳開始シグナルを含む、リボソーム結合配列が含まれる。さらに、選ばれる宿主細胞および利用されるベクターに応じて、複製の開始点、さらなるDNA制限部位、エンハンサー、および転写の誘導能を付与する配列などの、その他の配列を発現ベクターに組

50

み入れてもよい。

【0128】

本発明の組換え発現ベクターはまた、本発明の組換え分子で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞の選択を容易にする選択可能なマーカー遺伝子を含んでもよい。選択可能なマーカー遺伝子の例として、ある種の薬物に対する耐性を与えるG418およびハイグロマイシンなどのタンパク質、 α -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ、または免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン、好ましくはIgGのFc部分などの、その部分をコードする遺伝子がある。選択可能なマーカー遺伝子の転写は、 α -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、またはホタルルシフェラーゼなどの選択可能なマーカータンパク質の濃度 10
の変化によってモニターされる。選択可能なマーカー遺伝子がネオマイシン耐性などの抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする場合、形質転換細胞をG418で選択することができる。その他の細胞は死ぬが、選択可能なマーカー遺伝子を取り込んだ細胞は生き残ると考えられる。これによって、本発明の組換え発現ベクターの発現を可視化およびアッセイすること、ならびに特に発現および表現型に対する突然変異の効果を決定することが可能となる。選択可能なマーカーを関心対象の核酸とは別のベクター上に導入することができるということが正しく理解されると考えられる。

【0129】

組換え発現ベクターはまた、組換えタンパク質の発現の増加；組換えタンパク質の溶解度の増加；および親和性精製でリガンドとして作用することによる標的組換えタンパク質 20
の精製の援助を提供する融合部分をコードする遺伝子を含んでもよい。例えば、融合タンパク質の精製の後で、組換えタンパク質の融合部分からの分離を可能にするために、タンパク質分解的切断部位を標的組換えタンパク質に付加してもよい。典型的な融合発現ベクターには、組換えタンパク質にグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAをそれぞれ融合するpGEX (Amrad社., Melbourne, Australia)、pMal (New England Biolabs, Beverly, MA)、およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) が含まれる。

【0130】

組換え発現ベクターを宿主細胞に導入し、形質転換された宿主細胞を産生することができる。「形質転換された」、「トランスフェクトされた」、「形質転換」、および「トランスフェクション」という用語は、当技術分野において公知の多くの可能な技術1つによ 30
る細胞への核酸 (例えば、ベクター) の導入を包含するよう意図されている。本明細書において使用する場合、「形質転換された宿主細胞」という用語は、本発明の組換え発現ベクターで形質転換された糖鎖修飾の能力がある細胞も含むよう意図されている。例えば、エレクトロポレーションまたは塩化カルシウムを介した形質転換により、原核細胞を核酸で形質転換することができる。例えば、リン酸カルシウム共沈もしくは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、リポフェクチン、エレクトロポレーション、またはマイクロインジェクションなどの従来技術を通じて、哺乳動物細胞 40
に核酸を導入することができる。宿主細胞を形質転換およびトランスフェクトするための好適な方法を、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001)、およびその他の実験用教科書で見つけることができる。

【0131】

好適な宿主細胞には、広範な種類の真核宿主細胞および原核細胞が含まれる。例えば、本発明のタンパク質を酵母細胞または哺乳動物細胞で発現させてもよい。その他の好適な宿主細胞を、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991) で見つけることができる。さらに、本発明のタンパク質を、大腸菌などの、原核生物で発現させてもよい (Zhang et al., Science 303 (5656): 371-3 (2004))。さらに、蛍光菌 (Pseudomonas fluorescens) などの緑膿菌に基づ 50
く発現系を用いることができる (米国特許出願公報番号US 2005/0186666、Schneider, Ja

ne C et al.)。

【0132】

本発明を実行するために好適な酵母宿主細胞および真菌宿主細胞には、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア (*Pichia*) 属またはクルイベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、および様々な種のコウジカビ (*Aspergillus*) 属が含まれるが、これらに限定されない。出芽酵母における発現用ベクターの例として、pYepSec1 (Baldari et al., *Embo J.* 6: 229-234 (1987))、pMFa (Kurjan and Herskowitz, *Cell* 30: 933-943 (1982))、pJRY88 (Schultz et al., *Gene* 54: 113-123 (1987))、およびpYES2 (Invitrogen社, San Diego, CA) が含まれる。酵母および真菌の形質転換のためのプロトコルは、当業者に周知である (Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929 (1978); Itoh et al., *J. Bacteriology* 153: 163 (1983)、およびCullen et al. (*BiolTechnology* 5: 369 (1987) 参照)。

10

【0133】

本発明を実行するために好適な哺乳動物細胞には、とりわけ：COS細胞 (例えば、ATCC番号CRL 1650または1651)、BHK細胞 (例えば、ATCC番号CRL 6281)、CHO細胞 (ATCC番号CCL 61)、HeLa細胞 (例えば、ATCC番号CCL 2)、293細胞 (ATCC番号1573)、およびNS-1細胞が含まれる。哺乳動物細胞での発現を導くための好適な発現ベクターは通常、その他の転写制御配列および翻訳制御配列だけでなく、(例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2型、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40などのウイルス物質由来の) プロモーターも含む。哺乳動物発現ベクターの例として、pCDM8 (Seed, B., *Nature* 329: 840 (1987)) およびpMT2PC (Kaufman et al., *EMBO J.* 6: 187-195 (1987)) が含まれる。

20

【0134】

本明細書において提供された教示を所与とすれば、適切な種類の発現ベクターを植物細胞、鳥類細胞、および昆虫細胞に導入するためのプロモーター、ターミネーター、および方法を容易に達成することも可能である。例えば、ある態様の範囲内において、本発明のタンパク質を植物細胞から発現させることが可能である (アグロバクテリウムリゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) ベクターの使用を概説している、Sinkar et al., *J. Biosci (Bangalore)* 11: 47-58 (1987) を参照されたい; とりわけ、PAPS2022、PAPS2023、およびPAPS2034を含む、植物細胞用の発現ベクターの使用を記載している、Zambryski et al., *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Hollaender and Setlow (編), 第V 1巻, 253-278頁, Plenum Press, New York (1984) も参照されたい)。

30

【0135】

本発明を実行するために好適な昆虫細胞には、ボンビックス (*Bombyx*) 種、トリコプルス (*Trichoplusia*) 種、またはスポドテラ (*Spodotera*) 種由来の細胞および細胞株が含まれる。培養昆虫細胞 (SF9細胞) でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAcシリーズ (Smith et al., *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165 (1983)) およびpVLシリーズ (Lucklow, V. A., and Summers, M. D., *Virology* 170: 31-39 (1989)) が含まれる。本発明の組換えタンパク質の発現に好適な幾つかのバキュロウイルス-昆虫細胞発現系がPCT/US/02442に記載されている。

40

【0136】

あるいは、また、本発明のタンパク質を、ラット、ウサギ、ヒツジ、およびブタなどの非ヒトトランスジェニック動物で発現させてもよい (Hammer et al. *Nature* 315: 680-683 (1985); Palmiter et al. *Science* 222: 809-814 (1983); Brinster et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4438-4442 (1985); Palmiter and Brinster *Cell* 41: 343-345 (1985) および米国特許第4,736,866号)。

【0137】

また、固相合成 (Merrifield, *J. Am. Chem. Assoc.* 85: 2149-2154 (1964); Frische et al., *J. Pept. Sci.* 2 (4): 212-22 (1996)) または均一溶液中での合成 (Houbenweyl, *Method of Organic Chemistry*, E. Wansch編, 第15巻 IおよびII, Thieme, Stuttgart (1987)) などのタンパク質の化学において周知の技術を用いた化学合成によって、本発明

50

のタンパク質を調製してもよい。

【0138】

組換え技術を通じて、融合することによって、タンパク質などの、その他の分子とコンジュゲートした本発明のタンパク質を含むN末端またはC末端の融合タンパク質を調製してもよい。結果として生じる融合タンパク質は、本明細書において記載されたような選択されたタンパク質またはマーカータンパク質に融合した本発明のタンパク質を含む。また、公知の技術によって、本発明の組換えタンパク質をその他のタンパク質とコンジュゲートしてもよい。例えば、国際公開公報第90/10457号に記載されたようなヘテロ2官能性チオール含有リンカーである、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ-プロプリオネート)またはN-スクシニミジル-5チオアセテートを用いて、タンパク質を共役させてもよい。融合タンパク質または抱合体を調製するために使用し得るタンパク質の例として、免疫グロブリン、ホルモン、増殖因子、レクチン、インスリン、低密度リポタンパク質、グルカゴン、エンドルフィン、トランスフェリン、ボンベシン、アシアロ糖タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ヘマグルチニン (HA)、および切断されたmycなどの細胞結合タンパク質が含まれる。

10

【0139】

したがって、本発明は、軽鎖相補性決定領域および重鎖相補性決定領域、軽鎖可変領域および重鎖可変領域、抗体および抗体断片などの、結合タンパク質、本発明の免疫抱合体、ならびに本発明の新規の単離されたタンパク質などの本発明のタンパク質をコードする核酸配列を含む組換え発現ベクターを提供する。さらに、本発明は、本発明の組換え発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。

20

【0140】

(E) 本発明の結合タンパク質および免疫毒素の治療法および薬学的組成物

本発明者らは、本発明の結合タンパク質が、グルコース輸送体8もしくはその変異体；SEQ ID NO：11～20、好ましくは11、12、もしくは13によって定義されるアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質；またはグルコース輸送体8の癌関連変異体に結合することを示した。本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO：11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

30

【0141】

さらに、本発明者らは、本発明の結合タンパク質が癌細胞に対する特異性を示すこと、およびそれらが細胞によって内在化されることを示した。したがって、本発明の結合タンパク質を、造影剤、放射性薬剤、または細胞毒性薬剤などの、生物活性があり、または医学的に意味のある薬剤の標的送達のために使用することができる。

【0142】

ある態様において、本発明は、癌細胞を治療または抑制する方法であって、癌を有するまたは癌を有することが疑われる対象に有効量の本発明の免疫抱合体を投与する工程を含む方法を提供する。別の態様において、本発明は、癌を治療または抑制するための医薬の製造のための有効量の本発明の免疫抱合体の使用を提供する。さらに、本発明は、同時的、個別的、もしくは連続的な癌の治療または抑制のための医薬の製造のためのさらなる癌治療剤の使用をさらに含む、有効量の本発明の免疫抱合体の使用を提供する。本発明はまた、癌の治療または抑制のための有効量の本発明の免疫抱合体の使用を提供する。さらに、本発明は、同時的、個別的、もしくは連続的な癌の治療または抑制のためのさらなる癌治療剤の使用をさらに含む、有効量の本発明の免疫抱合体の使用を提供する。

40

【0143】

本発明のある態様において、癌は、頸癌、子宮癌、卵巣癌、膵臓癌、腎臓癌、肝臓癌、頭頸部癌、扁平上皮腫瘍、消化器癌、(癌腫、腺管癌、小葉癌、乳頭癌などの)乳癌、肺癌、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、(急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血

50

病、急性骨髄性白血病、および慢性骨髄性白血病などの)白血病、脳腫瘍、神経芽細胞腫、肉腫、直腸癌、膀胱癌、膵臓癌、子宮内膜癌、形質細胞腫、リンパ腫、およびメラノーマだけでなく、胃癌、大腸癌、前立腺癌も含むが、これらに限定されるわけではない。好ましい態様において、癌は、乳癌、前立腺癌、大腸癌、膀胱癌、頸癌、腎臓癌、メラノーマ、肝臓癌、卵巣癌、膵臓癌、胃癌、および頭頸部癌を含むが、これらに限定されるわけではない。

【0144】

癌細胞株を用いて、本発明の免疫抱合体が癌を有する細胞を選択的に阻害または破壊する能力をインビトロで簡単に試験してもよい。例えば、癌細胞の細胞増殖の選択的抑制を示すことによって、本発明の免疫抱合体の選択的阻害効果を明らかにしてもよい。

10

【0145】

また、細胞の生存率に基づいて毒性を測定してもよく、例えば、免疫抱合体に曝露された癌細胞培養および正常細胞培養の生存率を比較してもよい。トリパンプルー排除アッセイなどの、公知の技術によって、細胞の生存率を評価してもよい。

【0146】

別の例において、本発明の免疫抱合体の有効性を試験するために、多数のモデルを使用してもよい。Thompson, E. Wら (Breast Cancer Res. Treatment 31: 357-370 (1994)) は、腫瘍細胞を介する細胞外マトリックスのタンパク質分解、および再構成基底膜(コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル、またはゼラチン)の腫瘍細胞浸襲を測定することによるヒト乳癌細胞の浸襲性の決定のためのモデルを記載している。その他の適用可能な癌細胞モデルには、培養卵巣腺癌細胞 (Young, T. N. et al. Gynecol. Oncol. 62: 89-99 (1996); Moore, D. H. et al. Gynecol. Oncol. 65: 78-82 (1997))、ヒト濾胞性甲状腺癌細胞 (Demeure, M. J. et al., World J. Surg. 16: 770-776 (1992))、ヒトメラノーマ (A-2058) 細胞株およびヒト線維肉腫 (HT-1080) 細胞株 (Mackay, A. R. et al. Lab. Invest. 70: 781-783 (1994))、ならびに肺扁平上皮 (HS-24) 細胞株および肺腺癌 (SB-3) 細胞株 (Spiess, E. et al. J. Histochem. Cytochem. 42: 917-929 (1994)) が含まれる。無胸腺ヌードマウスにおける腫瘍の移植ならびに腫瘍増殖および転移の測定を伴うインビボ試験系も記載されている (Thompson, E. W. et al., Breast Cancer Res. Treatment 31: 357-370 (1994); Shi, Y. E. et al., Cancer Res. 53: 1409-1415 (1993))。

20

30

【0147】

本発明の免疫抱合体を、インビボでの投与に好適な生物学的に適合性のある形態で、対象への投与用の薬学的組成物に製剤化してもよい。物質を、ヒト、および動物を含む生物に投与してもよい。治療的活性量の本発明の薬学的組成物の投与は、所望の結果を達成するのに必要な投薬量で、および所望の結果を達成するのに必要な期間、有効な量として定義される。例えば、物質の治療的活性量は、個人の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに本発明の組換えタンパク質が個人において所望の反応を引き出す能力などの要因によって、変化してもよい。最適な治療反応を与えるように、投薬計画を調整してもよい。例えば、数回に分けた用量を毎日投与してもよいし、または治療状況の緊急性が示すに従って、用量を比例的に減少させてもよい。

40

【0148】

したがって、本発明は、本発明の免疫抱合体を含む癌を治療または抑制するための薬学的組成物、および薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤を提供する。好ましい態様において、薬学的組成物中の免疫抱合体のエフェクター分子は、癌治療薬剤、より好ましくは毒素である。

【0149】

本発明の免疫抱合体を含む薬学的調製物を全身性に投与してもよい。薬学的調製物を直接癌部位に投与してもよい。投与の経路に応じて、化合物を不活性化し得る酵素、酸、およびその他の自然条件の作用から化合物を保護するための材料で免疫抱合体をコーティングしてもよい。

50

【0150】

本発明のある局面に従って、免疫抱合体を直接投与により患者に送達する。本発明は、薬学的組成物が少なくとも評価項目を達成するのに十分な量で投与されることを企図し、および必要ならば、薬学的に許容される担体を含む。

【0151】

本発明はまた、手術後の合併症のリスクを低下させる方法であって、癌を治療するために、手術前、手術中、または手術後に、有効量の本発明の免疫抱合体を投与する工程を含む方法を提供する。

【0152】

有効量の活性物質が薬学的に許容されるビヒクルと混合物中で混ぜ合わされるように、対象に投与し得る薬学的に許容される組成物の調製のためのそれ自体公知の方法によって、本明細書において記載された組成物を調製することができる。好適なビヒクルは、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences (Remington's Pharmaceutical Sciences, 第20版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., USA, 2000) に記載されている。これに基づいて、組成物は、1つまたは複数の薬学的に許容されるビヒクルまたは希釈剤と結合し、および生理液によって好適なpHでかつ等浸透圧になった緩衝化溶液に含まれる物質の溶液を含むが、これらに限定されない。

10

【0153】

薬学的組成物には、組成物を意図されたレシピエントの組織または血液と実質的に適合させる抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、および溶質をさらに含み得る、凍結乾燥粉末、または水性もしくは非水性の滅菌した注射可能溶液もしくは懸濁液が含まれるが、これらに限定されるわけではない。そのような組成物中に存在し得るその他の成分には、例えば、水、(Tweenなどの)界面活性剤、アルコール、ポリオール、グリセリン、および植物油が含まれる。滅菌粉末、顆粒、錠剤、または濃縮した溶液もしくは懸濁液から、即席の注射溶液および注射懸濁液を調製してもよい。例えば、患者への投与の前に滅菌した水または生理的食塩水で戻す凍結乾燥粉末として、免疫抱合体を供給してもよいが、これに限定するつもりではない。

20

【0154】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体を含んでもよい。好適な薬学的に許容される担体には、薬学的組成物の生物学的活性の有効性を妨げない本質的に化学的に不活性でかつ毒性のない組成物が含まれる。好適な薬学的担体の例として、水、生理的食塩水、グリセロール溶液、エタノール、塩化N-(1(2,3-ジオレイロキシ)プロピル)N,N,N-トリメチルアンモニウム(DOTMA)、ジオレシルホスファチジル-エタノールアミン(DOPE)、およびリポソームが含まれるが、これらに限定されない。そのような組成物は、患者への直接投与のための形態を提供するための好適な量の担体と共に、治療的有效量の化合物を含むべきである。

30

【0155】

組成物は、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来する塩などの遊離のアミノ基で形成される塩、および水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来する塩などの遊離のカルボキシル基で形成される塩を含むが、これらに限定されるわけではない、薬学的に許容される塩の形態であってもよい。

40

【0156】

本発明の様々な態様において、薬学的組成物を全身性に直接投与し、または腫瘍の領域に直接投与する。

【0157】

哺乳動物、好ましくはヒトを含む、癌のある動物を治療するための方法において、薬学的組成物を使用してもよい。投与すべき免疫抱合体の投薬量および種類は、ヒト対象で容易にモニターし得る様々な要因に依存すると考えられる。そのような要因には、癌の病因

50

論ならびに重症度（悪性度および病期）が含まれる。

【0158】

本発明の免疫抱合体を用いた癌治療の臨床結果は、医師などの、関連技術分野の当業者によって容易に認識される。例えば、癌の臨床マーカーを測定するための標準的な医学的検査は、治療の有効性の強い指標であり得る。そのような検査には、身体検査、性能尺度、疾患マーカー、12誘導ECG、腫瘍測定、組織生検、細胞検査、細胞学、腫瘍計算の最長直径、放射線撮影法、腫瘍のデジタル画像、バイタルサイン、体重、有害事象の記録、感染エピソードの評価、併用薬の評価、痛みの評価、血液化学または血清化学、検尿、CTスキャン、および薬物動態解析が含まれるが、これらに限定されるわけではない。さらに、単独療法を受けている患者との比較研究によって、免疫抱合体および別の癌治療薬剤を含む併用療法の相乗効果を明らかにすることが可能である。

10

【0159】

本発明の別の態様は、有効量の本発明の免疫抱合体および癌を治療するためのその使用に関する説明書を含む癌を治療または抑制するためのキットである。

【0160】

大多数の承認された抗癌療法において、抗癌療法はその他の抗癌療法と組み合わせて用いられている。したがって、本発明は、少なくとも1つのさらなる抗癌療法と組み合わせて本発明の免疫抱合体を使用する癌を抑制または治療する方法を提供する。免疫抱合体の投与の前に、投与と重複して、投与と同時に、および/または投与の後に、その他の癌療法を施してもよい。同時に投与する場合、免疫抱合体およびその他の癌治療薬を、単一製剤として投与してもよく、または別々の製剤として投与してもよく、および別々の場合には、異なる投与の様式で投与してもよい。1つまたは複数の免疫抱合体および1つまたは複数のその他の癌療法の組み合わせは、腫瘍または癌と闘うのに相乗的に作用する可能性がある。その他の癌療法には、放射線照射およびその他の抗癌療法剤が含まれるが、これらに限定されるわけではない。これらのその他の癌治療薬には、2,2',2"トリクロロトリエチルアミン、6-アザウリジン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、6-メルカプトプリン、アセグラロン、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アルトレタミン、アミノグルテチミド、アミノグルテチミド、アムサクリン、アナストロゾール、アンシタピン、アンジオジェニンアンチセンスオリゴヌクレオチド、アントラマイシン、アザシチジン、アザセリン、アジリジン、パチマスター (batimastar)、bcl-2 アンチセンスオリゴヌクレオチド、ベンゾデパ、ピカルタミド、ピサントレン、プレオマイシン、プセリン、プスルファン、カクチノマイシン、カルステロン、カルボプラチン、カルボコン、カルミノマイシン、カルモフル、カルムスチン、カルビシン (carubicin)、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロラムブシル、クロルナファジン、酢酸クロルマジノン、クロロゾトシン、クロモマイシン、シスプラチン、クラドリピン、シクロホスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デホスファミド、デメコルシン、デノプテリン (denopterin)、デトルピシン、ジアジコン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシソルピシン、ドロロキシフェン、ドロモスタノロン、エダトレキサート、エフロミシン (eflomithine)、酢酸エリプチニウム (elliptinium)、エミテフル、エノシタブun (enocitabun)、エビルピシン、エピチオスタノール、エソルピシン (esorubicin)、エストラムスチン、エトグルシド、エトボシド、ファドロゾール、フェンレチニド、フロキシウリジン、フルダラピン、フルオロウラシル、フルタミド、フォリニック酸、フォルメスタン、ホスフェストール、フォテムスチン、窒化ガリウム、ゲムシタピン、ゴセレリン、ヘキサストール、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イホスファミド、インプロスルファン、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターロイキン-2、L-アスパラギナーゼ、レンチナン、レトロゾール、ロイプロリド、ロムスチン、ロニダミン、マンノムスチン、マルセロマイシン (marcellomycin)、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストール、メレンゲストール、メルファラン、メノガリル、メピチオスタン、メトトレキサート、メツレデパ、ミボプラチン、ミルテフォシン、ミトブロニトール、ミトグアゾン、ミトラ

20

30

40

50

クトール、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、モピダモール、マイコフェノール酸、ニルタミド、ニムスチン、ニトラシン、ノガラマイシン、ノベンピチン (novembichin)、オリボマイシン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペントスタチン、ペプロマイシン、ペルホスファミド、フェナメト (phenamet)、フェネステリン (phenesterine)、ピボプロマン、ピボスルファン、ピラルピシン、ピリトレキシム、プリカマイシン、ポドフィリク酸 2-エチル-ヒドラジド、リン酸ポリエストラジオール、ポルフィマーナトリウム、ポルフィロマイシン、プレドニムスチン、プロカバジン、プロバゲルマニウム、PSK、プテロプテリン、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ラニムスチン、ラゾキサ、ロドルピシン (rodorubicin)、ロキニメクス、シゾフィカン (sizofican)、ソブゾキサ、スピロゲルマニウム、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、タキソテル、テガフル、テモゾロミド、テニボシド、テヌゾニック酸 (tenuzonic acid)、テストラコン (testolacone)、チアミプリン、チオグアニン、チオテパ、トムデックス、トポテカン、トレミフェン、トリアジクオン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、トリロスタン、トリメトレキサート、トリプトレリン、トロフォスファミド、トロンテカン (trontecan)、ツベルシジン、ウベニメクス、ウラシルマスタード、ウレデパ、ウレタン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ジノスタチン、およびゾルピシン、シトシン、アラビノシド、ゲムツズマブ、チオエパ (thioepa)、シクロトスファミド (cyclothosphamide)、代謝拮抗剤 (例えば、メトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル、フルダラビン、ゲムシタビン、ダカルバジン、テモゾアミド (temozoamide))、ヘキサメチルメラミン、LYSODREN、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド (例えば、タキソール、パクリタキセル、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン (CAMPTOSAR, CPT-11)、ピンクリスチン、ピンブラスチンなどのピンカアルカロイド)、ポドフィロトキシシン、エピポドフィロトキシシン、VP-16 (エトボシド)、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、アントラサイクリン (例えば、ダウノルピシン)、リボソーム化ドキシソルピシン、ジヒドロキシアントラシジオン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、アルデスロイキン、アルタミン (allutamine)、ピアオマイシン (biaomycin)、カペシタビン、カルボPLAIN (carboplain)、クロラブシン (chlorabusin)、シクララビン (cyclarabine)、ダクリノマイシン (daclinomycin)、フロキシウリジン、酢酸ラウプロリド (lauprolide)、レバミソール、ロムスリン (lomusline)、メルカプトプリノ (mercaptapurino)、メスナ、ミトランク (mitolanc)、ペガスペルガーゼ (pegaspergase)、ペントスラチン (pentoslatin)、ピカマイシン (picamycin)、リウキシルマブ (riuxlmab)、キャンパス-1 (campath-1)、ストラプトゾシン (straplozocin)、トレチノイン、VEGFアンチセンスオリゴヌクレオチド、ピンデシン、およびピノレルピンが含まれてもよいが、これらに限定されるわけではない。1つまたは複数の癌治療薬剤 (例えば、FLAG、CHOP) を含む組成物もまた本発明により企図されている。FLAGは、フルダラビン、シトシンアラビノシド (Ara-C)、およびG-CSFを含む。CHOPは、シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニソンを含む。当技術分野において公知の癌治療薬剤の完全なリストについては、例えば、The Merck Index and the Physician's Desk Referenceの最新版を参照されたい。

10

20

30

40

【0161】

併用療法のための薬学的組成物にはまた、抗生物質 (例えば、ダクチノマイシン、プレオマイシン、ミトラマイシン、アントラマイシン)、アスパラギナーゼ、バチルス菌およびゲラン菌、ジフテリア毒素、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、抗有糸分裂剤、アルビン、リシンA、緑膿菌外毒素、神経増殖因子、血小板由来増殖因子、組織プラスミノゲン活性化因子、抗ヒスタミン剤、制吐剤などが含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0162】

実際、そのような治療を必要とする患者への有効量の免疫抱合体の投与により、臨床的に有意な有効性を有する別の癌治療薬剤の用量の減量につながる可能性がある。別の癌治

50

療薬剤の用量の減量のそのような有効性は、免疫抱合体の投与がない場合には、観察されない可能性がある。したがって、本発明は、腫瘍または癌を治療するための方法であって、減量した用量の1つまたは複数の別の癌治療薬剤を投与する工程を含む方法を提供する。

【0163】

さらに、そのような治療を必要とする患者に対する免疫抱合体を含む併用療法は、標準的治療計画のサイクルの継続時間または回数と比べて、相対的に短い治療時間を可能にする場合がある。したがって、本発明は、腫瘍または癌を治療するための方法であって、相対的に短い継続時間、および/またはより少ない治療サイクルで、1つまたは複数の別の癌治療薬剤を投与する工程を含む方法を提供する。

10

【0164】

それゆえに、本発明に従って、免疫抱合体およびその他の癌治療薬剤を含む併用療法は、全般的な癌治療の毒性（すなわち、副作用）を低下させる可能性がある。例えば、単剤療法またはその他の併用療法と比較した場合、減量した用量の免疫抱合体および/もしくはその他の癌治療薬剤を送達する時、ならびに/またはサイクルの継続時間（すなわち、単回投与の期間もしくは一連のそのような投与の期間）を減少させる時、ならびに/またはサイクルの回数を減少させる時に、毒性の低下が観察される可能性がある。

【0165】

したがって、本発明は、任意で薬学的に許容される担体中にある、免疫抱合体および1つまたは複数のさらなる抗癌治療薬剤を含む薬学的組成物を提供する。

20

【0166】

本発明はまた、任意で、1つまたは複数のその他の癌治療薬剤と組み合わせた、有効量の免疫抱合体を、癌を治療するためのその使用に関する説明書と共に含むキットを提供する。

【0167】

上記のように、免疫抱合体との併用療法は、さらなる癌治療薬剤の投与に対して癌または腫瘍を敏感にさせる可能性がある。したがって、本発明は、減量した用量の癌治療薬剤の前に、減量した用量の癌治療薬剤の後に、または減量した用量の癌治療薬剤と同時に、有効量の免疫抱合体を投与する工程を含む、抑制し、治療し、および/または癌の再発を抑制するための併用療法を企図している。例えば、免疫抱合体による初回治療は、1用量の癌治療薬剤によるその後の攻撃に対して癌または腫瘍を敏感にさせる可能性がある。この用量は、癌治療薬剤を単独で、もしくは免疫抱合体なしで投与する場合の標準的投薬量の低い限界に近く、または癌治療薬剤を単独で、もしくは免疫抱合体なしで投与する場合の標準的投薬量の低い限界を下回っている。同時に投与する場合、免疫抱合体を癌治療薬剤と別々に投与してもよく、および任意で、異なる様式の投与によって投与してもよい。

30

【0168】

代わりの態様において、さらなる癌治療薬剤の投与は、免疫抱合体または結合タンパク質に対して癌または腫瘍を敏感にさせる可能性がある。そのような態様において、さらなる癌治療薬剤を、免疫抱合体または結合タンパク質の投与の前に与えてもよい。

【0169】

ある態様において、さらなる癌治療薬剤は、約5~10、11~20、21~40、または41~75mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、PLATINOLまたはPLATINOL-AQ (Bristol Myers) などの、シスプラチンを含む。

40

【0170】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約2~3、4~8、9~16、17~35、または36~75mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、PARAPLATIN (Bristol Myers) などの、カルボプラチンを含む。

【0171】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.25~0.5、0.6~0.9、1~2、3~5、6~10、11~20、または21~40mg/kg/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、CYTOXAN (B

50

ristol Myers Squibb) などの、シクロホスファミドを含む。

【 0 1 7 2 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.5~1、2~4、5~10、11~25、26~50 または51~100mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、CYTOSAR-U (Pharmacia & Upjohn) などの、シタラピンを含む。別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約5~50mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、DEPOCYT (Chiron社) などの、シタラピンリポソームを含む。

【 0 1 7 3 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約15~250mg/m²/サイクルまたは約0.2~2mg/kg/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、DTICまたはDTICDOME (Bayer社) などの、ダカルバジンを含む。 10

【 0 1 7 4 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.1~0.2、0.3~0.4、0.5~0.8、または0.9~1.5mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、HYCAMTIN (SmithKline Beecham) などの、トポテカンを含む。

【 0 1 7 5 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約5~9、10~25、または26~50mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、CAMPTOSAR (Pharmacia & Upjohn) などの、イリノテカンを含む。

【 0 1 7 6 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約2.5~5、6~10、11~15、または16~25mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、FLUDARA (Berlex Laboratories) などの、フルダラピンを含む。 20

【 0 1 7 7 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約200~2000mg/m²/サイクル、300~1000mg/m²/サイクル、400~800mg/m²/サイクル、または500~700mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量のシトシンアラビノシド (Ara-C) を含む。

【 0 1 7 8 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約6~10、11~30、または31~60mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、TAXOTERE (Rhone Poulenc Rorer) などの、ドセタキセルを含む。 30

【 0 1 7 9 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約10~20、21~40、41~70、または71~135mg/kg/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、TAXOL (Bristol Myers Squibb) などの、パクリタキセルを含む。

【 0 1 8 0 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.5~5mg/kg/サイクル、1~4mg/kg/サイクル、または2~3mg/kg/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の5-フルオロウラシルを含む。

【 0 1 8 1 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約2~4、5~8、9~15、16~30、または31~60mg/kg/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、ADRIAMYCIN (Pharmacia & Upjohn)、DOXIL (Alza)、RUBEX (Bristol Myers Squibb) などの、ドキシソルピシンを含む。 40

【 0 1 8 2 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約3.5~7、8~15、16~25、または26~50mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、VEPESID (Pharmacia & Upjohn) などの、エトポシドを含む。

【 0 1 8 3 】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.3~0.5、0.6~0.9、1~2、または3~3.6mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、VELBAN (Eli Lilly) などの、ビンブラスチンを含む。 50

【0184】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、または0.7mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量の、例えば、ONCOVIN (Eli Lilly) などの、ビンクリスチンを含む。

【0185】

別の態様において、さらなる癌治療薬剤は、約0.2~0.9、1~5、6~10、または11~20mg/m²/サイクルの範囲にまで及ぶ用量のメトトレキサートをを含む。

【0186】

別の態様において、リツキサン、リツキシマブ、キャンパス-1、ゲムツズマブ、およびトラスツズマブを含むが、これらに限定されるわけではない、少なくとも1つのその他の免疫治療薬剤と組み合わせて、免疫抱合体を投与する。

10

【0187】

別の態様において、薬学的に許容されるそれらの塩を含む、アンジオスタチン、サリドマイド、クリングル5、エンドスタチン、セルピン(セリンプロテアーゼ阻害剤)、抗トロンビン、フィブロネクチンの29kDa N末端タンパク質分解断片および40kDa C末端タンパク質分解断片、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板因子-4の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板因子-4の断片に相当する13アミノ酸ペプチド(Maione et al., 1990, Cancer Res. 51: 2077-2083)、コラーゲンIの断片に相当する14アミノ酸ペプチド(Tolma et al., 1993, J. Cell Biol. 122: 497-511)、トロンボスポンジンIの断片に相当する19アミノ酸ペプチド(Tolsma et al., 1993, J. Cell Biol. 122: 497-511)、SPARCの断片に相当する20アミノ酸ペプチド(Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57: 1329-1334)、ならびにそれらの変異体を含むが、これらに限定されるわけではない、1つまたは複数の抗血管新生剤と組み合わせて、免疫抱合体を投与する。

20

【0188】

別の態様において、放射線療法の治療計画と組み合わせて免疫抱合体を投与する。療法にはまた、外科手術および/または化学療法が含まれてもよい。例えば、放射線療法ならびにシスプラチン(Platinol)、フルオロウラシル(5-FU, Adrucil)、カルボプラチン(Paraplatin)、および/またはパクリタキセル(Taxol)と組み合わせて、免疫抱合体を投与してもよい。免疫抱合体による治療は、例えば、嚥下機能を妨げ、望まない体重減少または脱水症を潜在的にもたらす重篤な咽頭痛の発生を低下させ得る、より少ない用量の放射線および/またはより少ない頻度の放射線治療の利用を可能にする場合がある。

30

【0189】

別の態様において、薬学的に許容されるそれらの塩を含む、リンホカイン、腫瘍壊死因子、腫瘍壊死因子様サイトカイン、リンホトキシン、インターフェロン、マクロファージ炎症タンパク質、顆粒球単球コロニー刺激因子、インターロイキン(インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-6、インターロイキン-12、インターロイキン-15、インターロイキン-18を含むが、これらに限定されるわけではない)、ならびにそれらの変異体を含むが、これらに限定されるわけではない、1つまたは複数のサイトカインと組み合わせて、免疫抱合体を投与する。

【0190】

またさらなる態様において、自己の細胞または組織、非自己の細胞または組織、腫瘍胎児性抗原、 α -フェータンパク質、ヒトコリオゴナドトロピン、BCG生ワクチン、マイコバクテリア細胞壁-DNA複合体、メラノサイト系タンパク質、および突然変異を起こした、腫瘍特異的抗原を含むが、これらに限定されるわけではない、癌ワクチンまたは生物剤と組み合わせて、免疫抱合体を投与する。

40

【0191】

またさらなる態様において、ホルモン療法との関連で免疫抱合体を投与する。ホルモン療法剤には、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト(例えば、フルタミド、タモキシフェン、酢酸ロイプロリド(LUPRON))、およびステロイド(例えば、デキサメタゾン、レチノイド、ベタメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテ

50

ストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステン)が含まれるが、これらに限定されるわけではない。

【0192】

またさらなる態様において、癌を治療または抑制するための遺伝子療法プログラムとの関連で、免疫抱合体を投与する。

【0193】

したがって、併用療法は、投与された免疫抱合体および/またはさらなる癌治療薬剤に対する癌または腫瘍の感受性を高める可能性がある。このように、より短い治療サイクルが可能となり、それによって毒性事象が軽減される可能性がある。サイクルの持続時間は、使用される特定の癌治療薬剤によって様々であってもよい。本発明はまた、連続的もしくは不連続的な投与、または数回の部分投与に分けた毎日の用量を企図している。特定の癌治療薬剤のための適切なサイクル持続時間は、当業者によって正しく理解されと考えられ、および本発明は、各々の癌治療薬剤のための最適な治療スケジュールの継続評価を企図している。当業者のための具体的な指針は、当技術分野において公知である。例えば、Therasse et al., 2000, 「New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada」, J Natl Cancer Inst. Feb 2; 92(3): 205-16を参照されたい。

10

【0194】

注射、経口投与、吸入、経皮的に、または腫瘍内に、などの任意の好適な方法によって、免疫抱合体を投与してもよく、その一方、同じまたは別の投与様式で、任意のその他の癌治療薬剤を患者に送達してもよいということが企図されている。さらに、複数の癌治療薬剤を患者に送達することが意図される場合、ある方法で免疫抱合体および1つまたは複数のその他の癌治療薬剤を送達してもよく、その一方、別の投与様式で、その他の癌治療薬剤を送達してもよい。

20

【0195】

(F) 本発明の結合タンパク質および免疫毒素を用いた診断法および薬剤

本発明の結合タンパク質は、癌細胞または癌細胞によって内在化された分子に選択的に結合し、かつ正常細胞にはそれほど結合しない。したがって、癌の診断において結合タンパク質を使用することができる。上記のように、本発明者らは、本発明の結合タンパク質がグルコース輸送体8もしくはその変異体; SEQ ID NO: 11~20によって定義されるアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質; またはグルコース輸送体8の癌関連変異体に結合することを示した。本発明のある態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

30

【0196】

好ましい態様において、結合タンパク質は、本発明の抗体または抗体断片である。さらに、例えば、癌細胞の試料を入手し、および試料が本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片に結合する能力を決定することによって、癌細胞を評価し、本発明の治療方法に対するそれらの感受性を決定してもよい。

40

【0197】

したがって、本発明は、抗原を発現し、かつ本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体および抗体断片に結合することができる癌細胞が存在するか否かを決定するために、それらだけで、または本発明の治療法の前に、本発明の治療法の間に、もしくは本発明の治療法の後に、使用することができる診断法、診断薬、および診断キットを含む。

【0198】

ある態様において、本発明は、対象における癌を検出またはモニターする方法であって、以下の工程を含む方法を提供する

50

(1) 対象から採取した被験試料を、本発明の結合タンパク質で、かつ癌細胞上の抗原に特異的に結合する結合タンパク質と接触させ、結合タンパク質 抗原複合体を生成する工程；

(2) 被験試料中の結合タンパク質 抗原複合体の量を測定する工程；および

(3) 被験試料中の結合タンパク質 抗原複合体の量を対照と比較する工程。

【0199】

ある態様において、抗原は、グルコース輸送体8もしくはその変異体；SEQ ID NO：11～20、好ましくはSEQ ID NO：11、12、もしくは13によって定義されるアミノ酸配列の任意の1つを含むタンパク質；またはグルコース輸送体8の癌関連変異体である。ある態様において、グルコース輸送体8の癌関連変異体は、変異グルコース輸送体8が細胞膜に局在するように、N末端のジロイシンモチーフにおける突然変異を含む。

10

【0200】

本発明はさらに、癌細胞上の抗原に結合する本発明の結合タンパク質の任意の1つおよび癌を診断するためのその使用に関する説明書を含む癌を診断するためのキットを含む。

【0201】

診断適用における使用のために、本発明の結合タンパク質、好ましくは抗体または抗体断片を、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²³I、¹²⁵I、¹³¹Iなどの、放射線不透過物もしくは放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリンなどの、蛍光（フルオロフォア）化合物もしくは化学発光（クロモフォア）化合物；アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、もしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼなどの、酵素；造影剤；または金属イオンなどの検出可能なマーカーで標識してもよい。上記のように、抗体または抗体断片などの、結合タンパク質に標識を連結する方法は、当技術分野において公知である。

20

【0202】

本発明の別の局面は、対象における癌を検出またはモニターする方法であって、以下の工程を含む方法である

(1) 対象から採取した被験試料中の本発明の抗体の量を測定する工程；および

(2) 被験試料中の本発明の抗体の量を対照と比較する工程。

【0203】

ある態様において、例えばELISAで、被験試料中の本発明の抗体の量を測定することによって、本発明の抗体の量を測定する。別の態様によって、例えばRT-PCRで、被験試料中の本発明の抗体をコードする核酸の発現レベルを測定することによって、本発明の抗体の量を測定する。

30

【0204】

(G) 新規の癌関連抗原の薬学的組成物、方法、および使用

本発明は、癌細胞の表面上に発現し、かつ正常細胞の表面上にはそれほど発現しない新規の癌関連抗原を提供する。したがって、インビボでの免疫反応を誘発するために新規の癌関連抗原またはその断片を使用することを含む、癌を治療または抑制するための療法において新規の癌関連抗原を使用することができる。さらに、本発明は、癌を検出またはモニターするためにGLUT8の新規の癌関連変異体を使用することを含む。

40

【0205】

(i) 薬学的組成物

本発明のある態様は、好適な希釈剤または担体との混合物中の有効量のGLUT8の新規の癌関連変異体またはその断片を含む薬学的組成物である。本発明の別の態様は、好適な希釈剤または担体との混合物中のGLUT8の新規の癌関連変異体またはその断片をコードする有効量の単離された核酸を含む薬学的組成物である。本発明のさらなる局面は、好適な希釈剤または担体との混合物中のGLUT8の新規の癌関連変異体またはその断片をコードする核酸配列を含む有効量の組換え発現を含む薬学的組成物である。

【0206】

例えば、癌を治療または抑制するために、本発明の薬学的組成物を使用することができ

50

る。さらに、対象におけるGLUT8の新規の癌関連変異体に対する免疫反応を誘発するために、薬学的組成物を使用することができる。

【0207】

上記で議論したように薬学的組成物を調製し、かつ投与することができる。上記で議論したように、その他の抗癌治療薬剤と組み合わせて、薬学的組成物を使用することができる。

【0208】

免疫剤（すなわち、GLUT8の新規の癌関連変異体もしくはその断片、および/もしくはそれをコードする核酸配列、および/もしくは組換え発現ベクター）ならびに/または組成物を、投与の形式を問わず、アジュバントと共免疫する場合、免疫原性を顕著に向上させることができる。一般に、アジュバントは、リン酸緩衝生理食塩水中の0.05~1.0パーセント溶液として使用される。アジュバントは、免疫原の免疫原性を高めるが、必ずしもそれ自体で免疫原性があるわけではない。アジュバントは、投与の部位の近くに局所的に免疫原を保持し、免疫系の細胞への緩徐で持続的な免疫原の放出を容易にするデポ効果を生み出すことによって作用する可能性がある。アジュバントはまた、免疫系の細胞を免疫原デポに引き付け、かつ免疫反応を誘発するようにそのような細胞を刺激することができる。そのようなものとして、本発明の態様は、アジュバントをさらに含む薬学的組成物を包含する。

【0209】

アジュバントは、例えば、ワクチンに対する宿主の免疫反応を高めるために、長年にわたって使用されてきた。（リポ多糖などの）内因性アジュバントは通常、ワクチンとして使用される殺された細菌または弱毒化された細菌の構成要素である。外因性アジュバントは、典型的には非共有結合で抗原に接続され、および宿主の免疫反応を増強するために製剤化された免疫調節因子である。このように、非経口で送達される抗原に対する免疫反応を増強するアジュバントが同定されてきた。しかしながら、これらのアジュバントの幾つかは毒性があり、および望まない副作用を引き起こす可能性があり、それらをヒトおよび多くの動物での使用に好適でないものにしてしている。実際、水酸化アルミニウムおよびリン酸アルミニウム（一般にミョウバンと総称される）のみが、ヒトおよび家畜のワクチンにおけるアジュバントとして日常的に使用されている。ジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドに対する抗体反応を増大させる際のミョウバンの効果は、十分に確立されている。それにもかかわらず、それは実際に限界を有する。例えば、ミョウバンは、インフルエンザのワクチン接種には効果がなく、およびその他の免疫原による細胞介在性の免疫反応を一貫性なく誘発する。ミョウバンをアジュバントにした抗原によって誘発される抗体は、マウスでは主にIgG1アイソタイプであり、これは幾つかのワクチン剤による保護に最適でない可能性がある。

【0210】

広範囲の外因性アジュバントが、免疫原に対する潜在的な免疫反応を惹起することができる。これらには、膜タンパク質抗原に対して複合体を形成したサポニン（免疫刺激複合体）、ミネラルオイルとのプルロニック（pluronic）ポリマー、殺されたマイコバクテリアおよびミネラルオイル、フロイントの完全アジュバント、脂質Aだけでなく、ムラミルジペプチド（MDP）およびリポ多糖（LPS）などの細菌産物、ならびにリボソームが含まれる。

【0211】

本発明のある局面において、本明細書において記載された本発明の態様の任意の1つにおいて有用なアジュバントは、以下の通りである。非経口免疫用のアジュバントには、（水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、およびヒドロキシリン酸アルミニウムなどの）アルミニウム化合物が含まれる。標準的なプロトコルに従って、抗原をアルミニウム化合物と共に沈殿させ、またはアルミニウム化合物の上に吸着させることができる。RIBI（ImmunoChem, Hamilton, MT）などのその他のアジュバントもまた、非経口投与で使用することができる。

10

20

30

40

50

【0212】

粘膜免疫用のアジュバントには、細菌毒素（例えば、コレラ毒素（CT）、大腸菌易熱性毒素（LT）、クロストリジウムディフィシル（*Clostridium difficile*）毒素Aおよびパータシス毒素（PT）、またはそれらの組み合わせ、サブユニット、トキシド、もしくは突然変異体）が含まれる。例えば、ネイティブのコレラ毒素サブユニットB（CTB）の精製調製物が有用であることができる。それらがアジュバント活性を保持するならば、任意のこれらの毒素に対する断片、ホモログ、誘導體、および融合体も好適である。好ましくは、減少した毒性を有する突然変異体を使用する。好適な突然変異体が、（例えば、国際公開公報第95/17211号（Arg-7-Lys CT突然変異体）、国際公開公報第96/6627号（Arg-192-Gly LT突然変異体）、ならびに国際公開公報第95/34323号（Arg-9-LysおよびGlu-129-Gly PT突然変異体）に）記載されている。本発明の方法および組成物において使用することができるさらなるLT突然変異体には、例えば、Ser-63-Lys、Ala-69-Gly、Glu-110-Asp、およびGlu-112-Asp突然変異体が含まれる。（様々な源（例えば、大腸菌、サルモネラミネソタ（*Salmonella minnesota*）、サルモネラチフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）、もしくはシゲラフレキシネリー（*Shigella flexneri*））の細菌モノホスホリル脂質A（MP LA）、サポニン、またはポリ乳酸グリコリド（PLGA）マイクロスフェアなどの）その他のアジュバントもまた、粘膜投与で使用することができる。

10

【0213】

粘膜免疫および非経口免疫の両方に有用なアジュバントには、ポリホスファゼン（例えば、国際公開公報第95/2415号）、DC-cho1（3b-(N'(N',N'-ジメチルアミノメタン)-カルパモイル)コレステロール）（例えば、米国特許第5,283,185号および国際公開公報第96/14831号）、ならびにQS-21（例えば、国際公開公報第88/9336号）が含まれる。

20

【0214】

当業者に公知であるような任意の従来の経路によって、GLUT8の癌関連変異体もしくはその断片、それをコードする単離された核酸配列、および/または組換え発現ベクターを含む薬学的組成物で、対象を免疫してもよい。これには、例えば、粘膜（例えば、眼球、鼻腔内、口腔、胃、肺、小腸、直腸、膣、もしくは尿道）表面を経由した免疫、非経口（例えば、皮下、皮内、筋肉内、静脈内、もしくは腹腔内）経路を経由した免疫、または結節内での免疫が含まれてもよい。当業者には明白であると考えられるが、好ましい経路は免疫原の選択に依存する。単一用量でまたは間隔を置いた反復用量で、投与を達成することができる。適切な投薬量は、免疫原そのもの（すなわち、ペプチド対核酸（およびより具体的にはその種類））、投与の経路、ならびにワクチン接種すべき動物の状態（体重、年齢、およびそれらと同様のもの）などの当業者に理解される様々なパラメーターに依存する。

30

【0215】

本発明はまた、任意で、1つまたは複数のその他の癌治療薬剤と組み合わせた、有効量の本発明の薬学的組成物を、その使用に関する説明書と共に含むキットを提供する。

【0216】

(ii) 治療法

上記のように、GLUT8の新規の癌関連変異体は癌細胞上には存在するが、正常細胞上にはそれほど存在しない。したがって、癌を抑制または治療するための治療法において、新規の癌関連抗原を使用することができる。さらに、対象における免疫反応を誘発するために、例えばワクチンとして、新規の癌関連抗原を使用することができる。

40

【0217】

本発明のある態様は、癌を治療または抑制するための医薬の製造におけるGLUT8の癌関連変異体またはその断片の使用である。本発明の別の態様は、対象における免疫反応を誘発するための医薬の製造におけるGLUT8の癌関連変異体またはその断片の使用である。

【0218】

本発明はまた、癌を治療または抑制するための医薬の製造におけるGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする単離された核酸配列の使用を含む。さらに、本発明は、対

50

象における免疫反応を誘発するための医薬の製造におけるGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする単離された核酸配列の使用を含む。

【0219】

本発明のさらなる態様は、癌を治療または抑制するための医薬の製造におけるGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする単離された核酸配列を含む組換え発現ベクターの使用である。また、本発明は、対象における免疫反応を誘発するための医薬の製造におけるGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする単離された核酸配列を含む組換え発現ベクターの使用を含む。

【0220】

本発明のさらなる態様は、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を治療または抑制する方法であって、対象に有効量のGLUT8の癌関連変異体またはその断片を投与する工程を含む方法である。さらに、本発明は、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を治療または抑制する方法であって、対象にGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする有効量の単離された核酸配列を投与する工程を含む方法を含む。さらに、本発明は、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を治療または抑制する方法であって、対象にGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする単離された核酸配列を含む有効量の組換えベクターを投与する工程を含む方法を含む。

10

【0221】

本発明の別の態様は、対象におけるGLUT8の癌関連変異体に対する免疫反応を誘導する方法であって、対象に有効量のGLUT8の癌関連変異体またはその断片を投与する工程を含む方法である。さらに、本発明は、対象におけるGLUT8の癌関連変異体に対する免疫反応を誘導する方法であって、対象にGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする有効量の単離された核酸配列を投与する工程を含む方法を含む。さらに、本発明は、対象におけるGLUT8の癌関連変異体に対する免疫反応を誘導する方法であって、対象にGLUT8の癌関連変異体またはその断片をコードする単離された核酸配列を含む有効量の組換え発現ベクターを投与する工程を含む方法を含む。

20

【0222】

(iii) 診断法

GLUT8の新規の癌関連変異体は癌細胞上に発現し、かつ正常細胞上にはそれほど発現せず、それゆえに、GLUT8の新規の癌関連変異体を癌の診断法として使用することができる。好ましい態様において、GLUT8の癌関連変異体は、SEQ ID NO: 11、12、もしくは13の任意の1つによって定義されるアミノ酸配列、またはその変異体を含む。本発明の別の態様において、GLUT8の癌関連変異体は、N末端のジロイシンモチーフに改変を有するGLUT8を含む。本発明のさらなる態様において、N末端のジロイシンモチーフをジアラニンに改変する。

30

【0223】

本発明のある態様は、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を検出またはモニターする方法であって、GLUT8の癌関連変異体が細胞上で検出されるならば、癌が示唆される、試料中の細胞上のGLUT8の癌関連変異体を検出する工程を含む方法である。

40

【0224】

細胞上のGLUT8の癌関連変異体を検出するために、多数の技術を使用することができる。例えば、GLUT8の癌関連変異体の細胞表面発現を検出するための免疫アッセイにおいて、本発明の結合タンパク質を使用することができる。GLUT8の癌関連変異体の細胞表面発現を検出および/または定量するために、ウェスタンブロット、免疫沈降、その後SDS-PAGE、免疫細胞化学、FACS、タンパク質アッセイ、およびそれらと同様のものを含む、多数の技術を使用することができることを当業者は正しく理解すると考えられる。

【0225】

本発明の別の局面は、癌を有するもしくは癌を有することが疑われる対象における癌を

50

検出またはモニターする方法であって、GLUT8の癌関連変異体の発現が細胞内で検出されるならば、癌が示唆される、試料中の細胞内のGLUT8の癌関連変異体の発現を検出する工程を含む方法である。好ましい例において、細胞内のGLUT8の癌関連変異体の発現を検出するために、GLUT8の癌関連変異体をコードするRNA発現産物を使用する。GLUT8の癌関連変異体もしくはその断片をコードするmRNA、またはGLUT8の癌関連変異体もしくはその断片をコードするmRNAに特異的におよび/もしくは選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、cDNA、DNA、RNA、PCR産物、合成DNA、合成RNA、もしくはその他の天然のもしくは修飾したヌクレオチドの組み合わせを検出することによって、RNA発現産物を検出または定量することができるということを当業者は正しく理解すると考えられる。

【0226】

細胞内のGLUT8の癌関連変異体のRNA発現を検出/または定量するために、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護アッセイおよびS1ヌクレアーゼ保護アッセイなどの、ヌクレアーゼ保護アッセイ、ならびにノーザンプロット、ならびにそれらと同様のものを含む、多数の方法を使用することができる。

【0227】

(H) その他の方法

グルコース輸送体8は、糖輸送活性を有することが示されている。したがって、本発明は、癌細胞上または癌細胞内のグルコース輸送体8の癌関連変異体の活性を調節することによって、対象における癌を治療または抑制する方法を含む。

【0228】

本発明のある態様において、対象における癌を治療または抑制する方法は、グルコース輸送体8の癌関連変異体の糖の輸送体としての機能を抑制または低下させる工程を含む。本発明のある態様において、グルコース輸送体8の癌関連変異体の糖の輸送体としての機能を抑制または低下させるために、本発明の結合タンパク質を使用する。

【0229】

本発明の別の態様において、対象における癌を治療または抑制するために、グルコース輸送体の抗体ではない阻害剤を使用する。

【0230】

フラボノイドファミリーの幾つかのメンバーを含むグルコース輸送体ファミリーの分子の幾つかの公知の阻害剤がある。例えば、フォルスコリン、フロレチン(フラボノイド様化合物)、およびサイトカラシンBは、GLUT1を阻害することが公知であり、ならびにそれらの推定結合部位が、GLUT-1の3次元分子モデルで同定されている(Salas-Burgos et al., *Biophys. J.* 87: 2990-2999, 2004)。フラボノールである、ケルセチンは、GLUT2を介するグルコース輸送を阻害することが示されている(Song et al., *J. Biol. Chem.* 277: 15252-15260, 2002)。エストラジオールおよびイソフラボンフィトエストロゲンのゲニステインもまた、GLUT1を介するグルコース輸送の阻害剤であり、ならびにこれらの分子に対する推定結合部位も提案されている(Afzal et al., *Biochem J.* 365: 707-719, 2002)。グルコース輸送体阻害剤であるフォルスコリン、ジピリダモール、およびイソブチルメチルキサンチン(IBMx)は、GLUT1およびGLUT4の両方に結合する(Hellwig & Joost, *Mol. Pharmacol.* 40: 383-389, 1991)。サイトカラシンBもまた、GLUT4に結合する(Wandel et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1284: 56-62, 1996)。

【0231】

これらの公知の阻害剤に加え、グルコース輸送体の阻害剤を同定することが公知の多数の方法があるということを当業者は正しく理解すると考えられる。例えば、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)卵母細胞またはCHOなどの細胞で、関心対象のGLUT、好ましくはグルコース輸送体8を発現させ、阻害剤の存在下または非存在下でグルコースの取り込みを測定し、および阻害剤が競合的であるか非競合的であるかを決定することによって、グルコース輸送体に対する阻害剤の効果を評価することができる。ひとたび所与のGLUTアイソフォームの配列が公知になれば、数多くの分子に対するその感受性を簡単に試験し、薬物候補を同定することができる。

10

20

30

40

50

【0232】

したがって、本発明は、有効量のグルコース輸送体阻害剤を、それを必要とする対象に投与することによって、対象における癌を治療または抑制する方法を含む。阻害剤には、ケルセチンもしくはゲニステインなどの、フラボノイドファミリーのメンバー、フィロレチンなどの、フラボノイド様分子、エストラジオールもしくはゲニステインを含む、エストロゲン化合物、フォルスコリン、サイトカラシンB、ジピリダモール、および/またはイソブチルメチルキサンチン (IBMX) が含まれる。

【0233】

本発明の別の態様において、細胞内のグルコース輸送体8の癌関連変異体の発現を低下または抑制させることによって、グルコース輸送体8の癌関連変異体の機能を抑制または低下させる。

10

【0234】

細胞内のグルコース輸送体8の癌関連変異体の発現を抑制または低下させるために、グルコース輸送体8遺伝子の癌関連変異体の転写産物に反応性のアンチセンス分子、3重らせん分子、またはリボザイム分子を使用することを含む、標準的な技術を用いることができる。

【0235】

例えば、標準的な技術を用いて、アンチセンス核酸分子、すなわち、関心対象のポリペプチドをコードするセンス核酸に相補的である分子、例えば、2本鎖cDNA分子のコード鎖に相補的な分子またはmRNA配列に相補的な分子の生成に利用することができる。したがって、アンチセンス核酸は、センス核酸に水素結合することができる。アンチセンス核酸は、全コード鎖に、またはそのほんの一部に、例えば、タンパク質コード領域 (またはオープンリーディングフレーム) の全部または一部に、相補的であることができる。アンチセンス核酸分子は、関心対象のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列のコード鎖の非コード領域の全部または一部に対してアンチセンスであることができる。非コード領域 (「5'および3'非翻訳領域」) は、コード領域に隣接し、かつアミノ酸に翻訳されない5'および3'配列である。

20

【0236】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、もしくは50ヌクレオチド長またはそれを上回るヌクレオチド長であることができる。当該技術分野において公知の手順を用いた化学合成および酵素的ライゲーション反応を用いて、本発明のアンチセンス核酸を構築することができる。例えば、天然のヌクレオチドまたは分子の生物学的安定性を増大するようにはしくはアンチセンス核酸とセンス核酸の間で形成される2本鎖の物理的安定性を増大するように設計された様々に修飾されたヌクレオチドを用いて、アンチセンス核酸 (例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド) を化学的に合成することができ、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジンで置換されたヌクレオチドを使用することができる。アンチセンス核酸を作製するために使用することができる修飾されたヌクレオチドの例として、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルキユーオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキユーオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸 (ν)、ワイプトキソシン、シュードウラシル、キユーオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸 (ν)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウ

30

40

50

ラシル、(acp3)_w、および2,6-ジアミノプリンが含まれる。あるいは、核酸がアンチセンス方向でサブクローン化されている（すなわち、挿入された核酸から転写されるRNAが、関心対象の標的核酸に対してアンチセンス方向であると考えられる）発現ベクターを用いて、アンチセンス核酸を生物学的に生成することができる。

【0237】

それらが、関心対象のポリペプチドをコードする細胞のmRNAにハイブリダイズまたは結合し、その結果、例えば、転写および/または翻訳を阻害することによって発現を阻害するように、アンチセンス核酸分子を対象に投与し、またはインサイチューで発生させる。ハイブリダイゼーションは、安定な2本鎖を形成するための従来のヌクレオチド相補性によることができ、または、例えば、DNA 2本鎖に結合するアンチセンス核酸分子の場合、2重らせんの主溝における特定の相互作用を通じてであることができる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与の経路の例として、組織部位での直接注射が含まれる。あるいは、選択された細胞を標的し、その後全身に投与するために、アンチセンス核酸分子を修飾することができる。例えば、全身投与のために、例えば、アンチセンス核酸分子を細胞表面の受容体または抗原と結合するペプチドまたは抗体に接続することによって、それらが、例えば、T細胞または脳細胞などの、選択された細胞上に発現した受容体または抗原に特異的に結合するように、アンチセンス分子を修飾することができる。以下に記載した、例えば、遺伝子治療ベクターなどの、ベクターを用いて、アンチセンス核酸分子を細胞に送達することもできる。十分な細胞内濃度のアンチセンス分子を達成するために、アンチセンス核酸分子が強いpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれているベクター構築物が好ましい。

10

20

【0238】

関心対象のアンチセンス核酸分子は、 α -アノマー核酸分子であることができる。 β -アノマー核酸分子は、通常の β -ユニットと対照的に、鎖が互いに対して平行に走る、相補的RNAとの特異的な2本鎖ハイブリッドを形成する (Gaultier et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641)。アンチセンス核酸分子はまた、2'-*o*-メチルリボヌクレオチド (Inoue et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148) またはキメラRNA-DNA類似体 (Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327-330) を含むことができる。

【0239】

リボザイムは、それらが相補的領域を有する、mRNAなどの、1本鎖核酸を切断する能力があるリボヌクレアーゼ活性のある触媒RNA分子であり、および標準的技術を用いて作製することもできる。したがって、mRNA転写産物を触媒的に切断し、それによってmRNAによりコードされたタンパク質の翻訳を阻害するために、リボザイム（例えば、(Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591に記載された)ハンマーヘッドリボザイム)を使用することができる。GLUT8の癌関連変異体をコードするcDNAのヌクレオチド配列に基づいて、関心対象のポリペプチドをコードする核酸分子に対する特異性を有するリボザイムを設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列が、Cechら、米国特許第4,987,071号；およびCechら、米国特許第5,116,742号における切断されるべきヌクレオチド配列に相補的である、テトラヒメナL-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる。あるいは、RNA分子のプールから特定のリボヌクレアーゼ活性を有する触媒RNAを選択するために、関心対象のポリペプチドをコードするmRNAを使用することができる。例えば、Bartel and Szostak, 1993, Science 261: 1411-1418を参照されたい。

30

40

【0240】

周知の技術を用いて、3重らせん構造を作り出すこともできる。例えば、ポリペプチドをコードする遺伝子の調節領域（例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列を標的し、標的細胞での遺伝子の転写を抑制する3重らせん構造を形成することによって、関心対象のポリペプチドの発現を阻害することができる。一般的に、Helene, 1991, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, 1992, Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; およびMaher, 1992, Bioassays 14(12): 807-15を参照されたい。

50

【0241】

様々な態様において、例えば、分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解度を向上させるために、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において、核酸組成物を修飾することができる。例えば、ペプチド核酸を作製するために、核酸のデオキシリボースリン酸骨格を修飾することができる (Hyrup et al., 1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23参照)。本明細書において使用する場合、「ペプチド核酸」または「PNA」という用語は、デオキシリボースリン酸骨格がシュードペプチド骨格により置き換えられ、および4つの天然ヌクレオ塩基のみが保持される、核酸模倣体、例えば、DNA模倣体を指す。PNAの中性骨格は、低いイオン強度という条件下でのDNAおよびRNAに対する特異的ハイブリダイゼーションを可能にすることが示されている。Hyrup et al., 1996, 前記; Perry-O'Keefe et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675に記載されたような標準的な固相ペプチド合成プロトコルを用いて、PNAオリゴマーの合成を行なうことができる。

10

【0242】

例えば、親油基もしくはその他の助基をPNAに連結することによって、PNA-DNAキメラの形成によって、またはリポソームもしくは当技術分野において公知のその他の薬物送達の技術の使用によって、例えば、それらの安定性または細胞による取り込みを高めるために、PNAを修飾することができる。例えば、PNAおよびDNAの有利な特性を組み合わせ得るPNA-DNAキメラを作製することができる。そのようなキメラは、DNA認識酵素、例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼがDNA部分と相互作用することを可能にし、その一方、PNA部分は高い結合親和性および結合特異性を与えると考えられる。塩基の積み重ね、ヌクレオ塩基間の結合の数、および方向の点から見て選択された適切な長さのリンカーを用いて、PNA-DNAキメラを接続することができる (Hyrup, 1996, 前記)。Hyrup, 1996, 前記、および Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3357-63に記載されたように、PNA-DNAキメラの合成を行なうことができる。例えば、標準的なホスホロアミダイト共役化学反応および修飾されたヌクレオシド類似体を用いて、支持体上でDNA鎖を合成することができる。5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホロアミダイトなどの化合物を、PNAとDNAの5'末端の間の接続として使用することができる (Mag et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 5973-88)。その後、段階的な方法で、PNA単量体を共役させ、5'PNA部分および3'DNA部分のあるキメラ分子を生成する (Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3357-63)。あるいは、5'DNA部分および3'PNA部分によってキメラ分子を合成することができる (Peterser et al., 1975, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124)。

20

30

【0243】

別の態様において、オリゴヌクレオチドは、(例えば、インビボで宿主細胞受容体を標的するための)ペプチドなどのその他の付加基、または細胞膜(例えば、Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 648-652; 国際公報番号WO 88/09810参照)もしくは血液脳関門(例えば、国際公報番号WO 89/10134号参照)を隔てた輸送を促進する薬剤を含んでもよい。さらに、ハイブリダイゼーションが引き金となる切断剤(例えば、Krol et al., 1988, *Bio/Techniques* 6: 958-976を参照)または挿入剤(例えば、Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549を参照)で、オリゴヌクレオチドを修飾することができる。この目的のために、オリゴヌクレオチドを別の分子、例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーションが引き金となる架橋剤、輸送剤、ハイブリダイゼーションが引き金となる切断剤などとコンジュゲートしてもよい。

40

【0244】

本発明の別の局面は、癌を抑制または治療するために使用することができる、グルコース輸送体8の癌関連変異体の発現または活性を調節することができる化合物を同定するための方法である。本発明のある態様において、癌を抑制または治療する能力について化合物を同定するための方法は、以下の工程を含む：

50

(a) グルコース輸送体8の癌関連変異体を発現する細胞を被験化合物と接触させる工程 ; および

(b) グルコース輸送体8の癌関連変異体の発現または機能を明らかにする工程 ;

(c) 対照と比較したグルコース輸送体8の癌関連変異体の発現または機能の低下が、癌を抑制または治療するために有用な化合物であることを示す、グルコース輸送体8の癌関連変異体の発現または機能を対照と比較する工程。

【 0 2 4 5 】

以下の非限定的な実施例は、本発明を例証する。

【 0 2 4 6 】

実施例

実施例1：VB1-050モノクローナル抗体の作製

プールした癌患者試料の白血球からVB1-050モノクローナル抗体を作製した。モノクローナル抗体を作製するための融合相手としてSHFP-1を使用した。VB1-050はIgG1、モノクローナル抗体である。

【 0 2 4 7 】

実施例2：シーケンシング

ハイブリドーマ細胞からメッセンジャーRNA (mRNA) を単離し、および第1鎖相補DNA (cDNA) を合成した。その後、cDNAを使用し、PCRによって抗体H鎖遺伝子および抗体L鎖遺伝子を単離した。H () 鎖アイソタイプおよびL () 鎖アイソタイプのコンセンサスフレームワーク領域に従って、PCRプライマーを設計した (注を参照)。PCR産物は個々にTOPO-pCR2.1ベクターにクローン化し、および大腸菌細胞内に形質転換した。TOPO-pCR2.1中にインサートを含む個々のクローンを単離し、および増殖させた。プラスミドDNAを精製し、およびシーケンシングした。

【 0 2 4 8 】

プライマー :

1) 5' TCT AAA GAA GCC CCT GGG AGC ACA GCT CAT CAC CAT G 3'

(SEQ ID NO:21)

2) 5' GCC CGG GGA GCG GGG GCT TGC CGG CCG TCG CAC TCA 3'

(SEQ ID NO:22)

3) 5' ACC ATG AGT GAG AAA AAC TGG ATT TGT GTG GCA 3' (SEQ ID NO:23)

4) 5' GGA GCC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA 3' (SEQ ID NO:24)

5) 5' CTC ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT 3' (SEQ ID NO:25)

6) 5' GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC 3' (SEQ ID NO:26)

【 0 2 4 9 】

プライマー :

7) 5' GGC TCG AGA TGG ACA TGR RRD YCC HVG YKC ASC TT 3'

(SEQ ID NO:27)

8) 5' CCC GTC GAC CAT CAG ATG GCG GGA AGA T 3' (SEQ ID NO:28)

10

20

30

40

50

【 0 2 5 0 】

注：1本のプライマーを用いて、できるだけ多くの種類を単離するために、特定のコンセンサスプライマー用に、混合塩基を使用した：R=A+G、D=A+T+G、Y=C+T、H=A+C+T、V=A+C+G、K=T+G、S=C+G、W=A+T。

【 0 2 5 1 】

各PCR反応には、50 μ L反応容量中に以下の成分が含まれていた。

10 \times PCR緩衝剤 5 μ L
 2mM dNTPs 5 μ L
 50mM MgCl₂ 2 μ L
 5' プライマー 20pmol
 3' プライマー 20pmol
 Taq DNAポリメラーゼ 2.5U
 DNA鋳型 50ng

10

【 0 2 5 2 】

PCRサイクルの条件は：94 $^{\circ}$ Cで1分間、62 $^{\circ}$ Cで1分間、72 $^{\circ}$ Cで1.5分間を30サイクル、および72 $^{\circ}$ Cで10分間の最終伸長であった。増幅したPCR産物を1%アガロースゲル上で電気泳動的に分離し、切り出し、Qiaquickゲル抽出キットを用いて精製し、TOPO pCR2.1クローニングベクターにクローン化し、その後、373 DNAシーケンサーストレッチを用いてDNAシーケンシングをした (Griffin G. H. and Griffin M. A.: PCR technology, Current innovations. CRC Press, Boca Raton, Florida 3431, USA; クローニングベクター pCR2.1, カタログ番号205184. Invitrogen, Carlsbad, CA; Qiagen, Qiaquickゲル抽出キット, カタログ番号28706. Qiagen社, Mississauga, ON; および373 DNAストレッチ. PE Applied Biosystems, Mississauga ON.)。

20

【 0 2 5 3 】

VB1-050についてのCDR配列を表1に示す。

【 0 2 5 4 】

軽鎖可変領域および重鎖可変領域を、それぞれ図1および図2に示す。

【 0 2 5 5 】

実施例3：腫瘍細胞反応性および正常細胞反応性を測定することによる抗体プロファイリング

30

腫瘍細胞反応性および正常細胞反応性について、VB1-050をフローサイトメトリーで試験した。15の異なる種類の上皮癌を表す1つの腫瘍細胞株のパネルをスクリーニングした。VB1-050の結果を表2にまとめる。VB1-050は、全ての適応症について、>2.0というMF値を有したものの、最も強い反応性は、これらに限定されるわけではないが、乳癌細胞株、メラノーマ細胞株、および卵巣癌細胞株で観察された。比較すると、正常組織細胞株との反応性は、通常、癌細胞株で見られる反応性よりも低かった。乳癌細胞株および前立腺癌細胞株の場合、VB1-050の発現は、平均して癌細胞株上で>9倍であった。2つの例外は腎臓細胞株および肺細胞株であった；しかしながら、それら是对応する腫瘍細胞型よりもずっと低かった。MF値は、各々の適応症における全ての細胞株からの対照抗体に対する蛍光中央値の平均増加倍数の合計から計算された平均を示す。0値は、対照抗体と比較して、測定可能な反応性がないことを示す。

40

【 0 2 5 6 】

実施例4：正常組織マイクロアレイ

膜染色を示し、かつ染色用の最適な条件を明確にするための適切な組織フォーマットを評価するために、まず、フロー陽性の腫瘍細胞株SKBR-3に対してVB1-050を試験した。VB1-050は、全ての実験群において、強い核および/または核膜染色を示した。注目すべきことに、サイトスピンスライドは、約30%の無傷細胞で、細胞膜上における点状染色を示した。凍結切片上で、細胞質における染色(細胞の10%)の他、核/核膜染色(細胞の60%)に加え、同様の細胞膜染色が検出された(細胞の10%)。固定した細胞ペレットについて、本抗体は、核および核膜(細胞の70%)、ならびに細胞質(細胞の10%)を染色した

50

が、非常に稀にしか細胞膜を染めなかった（細胞の3~5%）。（サイトスピンスライド上の固定細胞の染色によって証明されているように）固定は抗原に影響を及ぼさないので、固定した細胞ペレットにおける細胞膜染色の明らかな損失は、凍結細胞と比べて、これらの細胞がより少ない膜の表面領域を有することによる可能性がある。凍結細胞で見られるより大きい膜領域は、もともと、凍結細胞を用いたより厚い切片のみならず、細胞質の萎縮の結果でもある。あるいは、固定後の処置（包埋など）によって、表面抗原が変化した可能性がある。

【0257】

最適な染色条件を同定した時点で、正常組織反応性について、ホルマリン固定したクリティカル正常の低密度（LD）アレイで、アイソタイプ対照（4B5）と比較して、抗体を試験した。VB1-050についてのこれらの結果を表3にまとめる。任意の正常なクリティカル組織の目立った膜染色は観察されなかった。核および/または核膜の強い染色が、多くの組織で見られた。同様に、一貫した細胞膜染色は、試験した1/5について30%の膜染色を示した、精巣を除き、任意の非クリティカル正常組織で見られなかった（表4）。

10

【0258】

実施例5：腫瘍組織マイクロアレイ

クリティカルおよび非クリティカル正常組織スクリーニングとは対照的に、細胞膜反応性が、全てではないが、幾つかの腫瘍組織で観察された。VB1-050は、大腸、前立腺、胃、卵巣、および肝臓の癌で、より頻繁に検出された。最も強い染色（2+）が、胃の腫瘍で一貫して検出された。通常、膜染色がある細胞の割合は、適応症および各々の適応症の範囲内の組織試料により変化した；しかしながら、大腸の腫瘍は、最も高い割合の細胞が染色されていることを実際に示した。表5を参照されたい。肺癌、直腸癌、皮膚癌、および子宮癌由来の組織標本では染色が検出されなかった。

20

【0259】

実施例6：フローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡法によるVB1-050の結合および内在化の評価

VB1-050ならびに腫瘍細胞株A-375に対する強い反応性を示す2つの対照抗体（5E9およびMA-103）を用いて、VB1-050の内在化を評価した。代表的な実験を表6に示す。異なる温度でのVB1-050結合の結果は、内在化する抗体5E9と異ならなかった。37℃で60分後、膜に結合したVB1-050は細胞表面から消失し、蛍光中央値が61.8%減少していた。37℃でのインキュベーション時間の増加は、蛍光中央値のさらなる低下を伴ったが、より低い速度であった。120分までに、蛍光中央値は69.6%減少していた。細胞表面結合を示すフローヒストグラムを図3に例示する。

30

【0260】

細胞表面に結合したVB1-050がA-375の中に内在化したか、細胞膜から遊離したかを確認するために、レーザー走査共焦点顕微鏡法の助けを借りた、蛍光分布および細胞内染色の直接的な可視化によって、抗体処理した細胞をさらに評価した。MA-103および5E9と同様に、60分間、4℃でのA-375とのVB1-050インキュベーションは、蛍光標識の円周表面分布を示した（図4A）。VB1-050抗体が結合した細胞を37℃まで温めることにより、図4Bに示されたように、60分以内に内在化した抗体による強い細胞内染色が示された。

40

【0261】

実施例7：結合親和性状況

抗体-抗原複合体の形成に影響を及ぼす最も重要な要因は、その抗原に対する抗体の親和性である。この結合親和性は、これらの反応物の不変の特性であり、および会合/解離またはKA/KDの比率として測定される平衡定数（K）として表現される。所与の抗体について、観察される親和性の違いは、会合（KA）よりもむしろ解離（KD）に関連し、したがってVB1-050の親和性の尺度として、KDを選んだ。

【0262】

フローサイトメトリーのアプローチを用いて、抗体の親和性を決定した [Benedict, C. A. et al., (1997) 「Determination of the binding affinity of an anti-CD34 singl

50

e-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay」 J. Immunol. Methods 2001, 223-31]。簡潔に述べると、平衡に達するのに十分な量の時間、A-375細胞を、ある範囲の濃度のVB1-050とインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、およびビオチンをコンジュゲートした抗ヒトIgG 2次抗体で処理した。その後、フローサイトメトリーによって腫瘍細胞を解析し、細胞に結合した抗体を検出した。決定された蛍光中央値の逆数を、抗体濃度の逆数の関数としてプロットし、Lineweaver-Burk法によってKDを決定した [Lineweaver, H. et al. (1934) 「The determination of enzyme dissociation constants」 J. Am. Chem. Soc. 56, 658]。

【 0 2 6 3 】

VB1-050とA-375間の相互作用のKD値は、 $4.90 \times 10^{-8} \text{M}$ であると決定された。

10

【 0 2 6 4 】

実施例8：デ-ブーガニン免疫毒素の人工的作製および試験

1) VB6-050の人工的作製

PeIB- V_{H845} - C_H -F-デ-ブーガニン/pSV73プラスミドのEcoRIおよびPvuIIによる消化から得られた、PeIB- V_H -PvuIIインサートを、同じ酵素で予め消化した（シグナルペプチド配列のないPeIBリーダー、PeIB(-S)を含む封入発現用に以前に人工的に作製された）PeIB(-S)- V_{H050} - C_H -F-デ-ブーガニン/psV73ベクターにライゲートした。10Fコンピテント細胞をライゲーション反応物で形質転換し、およびアンピシリンプレート上で選択した。制限部位のマッピングによるコロニーのスクリーニングにより、どのクローンがPeIB- V_{H050} - C_H -F-デ-ブーガニンインサートを含むのかを明らかにした。

20

【 0 2 6 5 】

PeIB(-S)- V_{L050} - C_L 断片をEcoRVおよびXhoIで消化し、かつ同じ酵素で予め消化したSpeI-デ-ブーガニン-PeIB- V_{L845} - C_L /psV73ベクターにライゲートした。その後、10Fコンピテント細胞をライゲーション反応物で形質転換し、およびアンピシリンを添加したLB寒天プレート上にプレーティングした。制限部位のマッピングによるコロニーのスクリーニングにより、どのクローンがSpeI-デ-ブーガニン-PeIB- V_{L050} - C_L インサートを含むのかを明らかにした。その後、EcoRIおよびXhoI制限部位を用いて、SpeI-デ-ブーガニン-PeIB- V_{L050} - C_L インサートをpING3302プラスミドにクローン化した。PeIB- V_{L050} - C_H -F-デ-ブーガニン断片をEcoRIおよびSpeIで消化し、かつ同じ酵素で予め消化したSpeI-デ-ブーガニン-PeIB- V_{L050} - C_L /3302ベクターにライゲートし、VB6-050インサートを作製した。その後、VB6-050インサートを含むプラスミドを単離し、およびE104細胞を形質転換するために使用した。

30

【 0 2 6 6 】

2) 小規模発現の検討

VB6-050を含む形質転換したE104細胞を、37℃で30mLのTB培地（1%接種）を含む250mL振盪フラスコ中で増殖させ、および光学密度（O.D. 600nm）が2に達するまで、約5時間、225rpmで振盪した。この時、培養を最終濃度0.1%のL-(+)アラビノースで誘導し、および37℃で16時間インキュベートした。次に、14000rpmで5分間の遠心分離によって、上清を回収し、ならびに免疫毒素の存在および大きさを確認するために、非還元条件下で、抗軽鎖または抗ヒト軽鎖のいずれかを用いたウェスタンブロットによって解析した。

40

【 0 2 6 7 】

3) マスターセルバンクの作製

MCBを作製するために、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含むLB寒天プレート由来の1個のコロニーを用いて、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを加えた5mLの2 x YTに接種し、および37℃で絶えず振盪しながらインキュベートした。OD₆₀₀が~2に達した時、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のテトラサイクリンを含む50mLの2 x YT培地を含む250mL振盪フラスコに、1.25mLの種培養を接種し、および37℃でインキュベートした。OD₆₀₀が1~1.5に達した時、25mLの30%グリセロールを培養中に混合した。1.5mLのアリコートクライオチューブに収納し、および-80℃で保存した。先に記載したように、発現について、3つの独立したバイアルを試験した。

【 0 2 6 8 】

50

4) 発酵および精製

TB培地を用いて、15LのCHEMAP発酵槽で、VB6-050のフェドバッチ発酵を行なった。OD₆₀₀ 2.0 (ログ中期)で、飼料(50%グリセロール)および誘導剤(200g L-アラビノース)の混合物で培養を誘導した。誘導後30時間で、培養を採取し、および8000rpmで30分間、遠心分離し、その後、CM-セファロースカラムおよびキレート-セファロースカラム、続いてサイズ排除カラムを用いて精製した。簡潔に述べると、上清を、20mMリン酸ナトリウム pH 6.9±0.1で濃縮および透析濾過した。その後、透析濾過し、濃縮した上清を、20mMリン酸ナトリウム、25mM NaCl pH 6.9±0.1で平衡化したCM-セファロースカラム上に注いだ。カラムを、20mMリン酸ナトリウム、25mM NaCl pH 6.9±0.1で洗浄した。次に、結合したVB6 Fab-デ-ブ-ガニン融合体を、20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH7.5±0.1で溶出した。CM-セファロース溶出物を、最終濃度0.25% triton-X100にまで調整し、および荷電したキレートセファロースカラムに注いだ。その後、キレートセファロースカラムを、20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、0.25% triton-X100 pH7.5±0.1で始まり、次に20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH7.5±0.1、次に20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、10mM イミダゾールpH7.5±0.1という3つの異なる洗浄緩衝液で洗浄した。結合したVB6 Fab-デ-ブ-ガニン融合体を、20mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、250mM イミダゾールpH7.5±0.1で溶出し、および2mL分画ごとに回収した。各々の分画についてA_{280nm}における吸収を決定し、および物質を含む分画をプールし、ならびに~80%の純度を得るために、サイズ排除カラムS200上に注いだ。処置の各工程での試料を、抗抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。サイズ排除カラム後の純度を、コロイダルブルー染色によって確認した。

10

20

【0269】

5) VB6-050の生物学的活性

ヒトメラノーマA-375細胞株、ヒトT細胞Daudi細胞株、ヒト卵巣SK-OV-3細胞株、ヒト膵臓Panc-1細胞株、ヒト乳房SKBR-3細胞株およびMB-435S細胞株、ならびにヒト大腸Colo-320細胞株を、ATCCのプロトコル通りに、それらのそれぞれの培地中で増殖させた。90%を超える生存率で、30~40%コンフルエンスの時に、細胞を採取した。

【0270】

a) 結合活性

フローサイトメトリーを用いて、抗原陽性細胞株、SKBR-3、A-375、およびSK-OV-3、ならびに抗原陰性細胞株、Panc-1、Colo-320、およびDaudiをそれぞれ使用して、精製したVB6-050が結合特性を保持することを示した。抗デ-ブ-ガニン抗体を用いて、結合を検出した。簡潔に述べると、試験すべき構築物を、氷上で1.5時間、0.45×10⁶個の腫瘍細胞とインキュベートした。洗浄後、細胞表面に結合した反応性を、氷上で1時間、ウサギ抗デ-ブ-ガニン(1/100)で検出した。細胞を洗浄し、および氷上で30分間、FITCがコンジュゲートした抗ウサギIgGとインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリーによるFab結合の評価のために、ヨウ化プロピジウムを含むPBS 5%FCSで再懸濁した。

30

【0271】

b) 競合アッセイ

抗原陽性細胞を10~750 μg/mLの範囲にまで濃度を増加させたVB6-050とインキュベートすることにより、飽和曲線を作成した。先に記載したように、フローサイトメトリーによって、結合したFab-デ-ブ-ガニンを検出した。その後、飽和点に対応する濃度のFab-デ-ブ-ガニンを、濃度を増加させたもとのIgG抗体の存在下で、抗原陽性細胞とインキュベートした。結合したFab-デ-ブ-ガニンの減少を、フローサイトメトリーによって測定した。4B5 IgGを陰性対照として使用した。

40

【0272】

c) 細胞毒性アッセイ

MTSアッセイによって、VB6-050の細胞毒性を測定した。簡潔に述べると、抗原陽性細胞および抗原陰性細胞を、ウェル当たり1000細胞で播き、および37℃で3時間、インキュベ

50

ートした。その後、様々な濃度のVB6-050およびデ-ブ-ガニンを細胞に添加し、5日後に、細胞の生存率を決定した。

【0273】

結果

1) pING3302発現ベクター中のVB6-050の人工的作製および小規模発現

Fab-デ-ブ-ガニンタンパク質を産生する最初の試みとして、ベクターを、デ-ブ-ガニンに融合したFd部分および軽鎖という、2つの別々の構築物として人工的に作製した。PelBリーダー配列中のペプチドシグナル、PelB(-S)の欠失により、各々の鎖の発現を封入体の中へと導いた。しかしながら、Fd-デ-ブ-ガニンタンパク質の封入体中への発現の欠陥およびVB6-845の可溶性発現の成功によって、VB6-050可溶性Fab-デ-ブ-ガニン構築物を人工的に作製し直すことが合理化された。人工的に作製し直す時間を最小限にするために、および実現可能性に基づき、制限酵素を用いて、Fd-F-デ-ブ-ガニンおよびV_L-C_L断片をペプチドシグナルのあるPelBリーダー配列と接続した。

10

【0274】

050のFdおよび軽鎖の解析により、制限部位EcoRIおよびPvuIIならびにEcoRVおよびXhoIがそれぞれ重鎖および軽鎖に位置することが示され、VB6-845中間構築物を用いたPCR反応を伴わずにVB6-050を人工的に作製し直すことが可能になった。その目的のために、制限部位EcoRIおよびPvuIIを用いて、PelB-V_{H845}-C_H-F-デ-ブ-ガニンのリーダーペプチドのあるPelBインサートを得、かつ同じ酵素で予め消化したPelB(-S)-V_{H050}-C_H-F-デ-ブ-ガニンにライゲートした(図5A)。同様に、PelB(-S)-V_{L050}-C_L/pSV73プラスミドをEcoRVおよびXhoIで消化し、ならびにインサートをEcoRVおよびXhoIで消化したSpeI-デ-ブ-ガニン-PelB-V_{L845}-C_Lベクターにクローン化した。その後、EcoRIおよびXhoI制限部位を用いて、インサート、PelB-V_{L050}-C_Lを3302プラスミドに挿入した(図5B)。その後、PelB-V_{H050}-C_H-F-デ-ブ-ガニン断片を、VB6-050インサートを発現させるEcoRI-SpeI制限部位を介して、E104細胞内に形質転換する3302 DNAプラスミドにライゲートした(図5Cおよび5D)。

20

【0275】

VB6-050の非還元条件下でのウェスタンブロット解析により、抗軽鎖抗体で全長タンパク質が検出されることが示された(図6)。さらに、VB6-050の発現のレベルは、参照として用いたVB6-845と同様である。誘導していないE104培養上清のウェスタンブロッティングによって、対応するバンドがないことが明らかとなり、これらのタンパク質が対応する抗体で特異的に検出されることを示唆している(図6、レーン4)。さらに、VB6-845で観察された分解産物の同様のプロファイルも、各クローンで得られた。

30

【0276】

2) VB6-050の精製

VB6-050を15リットル発酵槽から精製した。各カラムの回収率を評価するために、精製処理の各工程由来のアリコートウェスタンブロットで解析した(図7A)。免疫ブロットを抗ヒト軽鎖とインキュベートした。濃縮および透析濾過工程の濾液中に検出可能な産物は観察されなかった(図7A、それぞれレーン2および4)。1/10希釈した、透析濾過した物質をCM-セファロースカラムに充填した(図7A、レーン5)。ウェスタンブロット解析により、CM溶出物(図7A、レーン8)は全長VB6-050および分解したVB6-050と考えられる断片を含むことが示された。ニッケルカラムのフロースルー、レーン9、は、VB6-050およびその他の産物の大部分がカラムに結合したことを示している。その後、Ni²⁺溶出物、レーン13をSEC 200サイズ排除上に注ぎ、分解した断片からの無傷のVB6-050の分離を可能にした(図7A、レーン14、および図7B、レーン2)。

40

【0277】

3) フローサイトメトリーによるVB6-050タンパク質結合の検出

VB6-050について、各抗体のプロファイリングデータに基づいて、抗原陽性細胞株および抗原陰性細胞株を選択した。結合したFab-デ-ブ-ガニンを、抗ブ-ガニン抗体を用いたフローサイトメトリーによって検出した。予期した通り、抗原陰性細胞とのインキュベ

50

ーション後、フローサイトメトリーによって、結合は検出されなかった。対照的に、抗原陽性細胞株で結合したFab-デ-ブ-プーガニンが検出された。さらに、抗原陽性細胞株を、0~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲にまで及び、様々な濃度のFab-デ-ブ-プーガニンタンパク質とインキュベートし、および結合活性をフローサイトメトリーによって決定した。滴定曲線を作成した(図8)。Lineweaver-Burk法によって K_D を決定するために、決定した蛍光中央値の逆数を抗体濃度の逆数の関数としてプロットした。直線を作成し、曲線の傾きから K_D を計算した。解離定数 K_D を以下の方程式により決定した： $1/F = 1/f_{\text{max}} + (K_D/F_{\text{max}})(1/VB6)$ 、式中、 F = バックグラウンドを差し引いた蛍光中央値、および F_{max} はプロットから計算した(表7)。Fab-デ-ブ-プーガニンについての飽和点を飽和曲線から決定し、および元の抗体との競合アッセイに用いた。0~1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲にまで量が増加するその対応する元のIgGの存在下で、飽和点、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のVB6-050を抗原陽性細胞とインキュベートした。結合したVB6-050を、抗ブ-プーガニン抗体を用いたフローサイトメトリーによって検出した。予期した通り、元のIgGはFab-デ-ブ-プーガニンタンパク質の結合と競合した。結合したFab-デ-ブ-プーガニンの50%を阻害するのに必要なIgGの濃度を、180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と決定した(表7)。

【0278】

4) VB6-050タンパク質の細胞毒性

抗原陰性細胞株および抗原陽性細胞株を、1nM~1 μM までの異なる濃度のVB6-050とインキュベートした。インキュベーション5日後、計算されたVB6-050の IC_{50} は、400nMであった(図9)(表7)。対照的に、抗原陰性細胞株では、 IC_{50} を決定することができなかった。

【0279】

結論

Hybridomics and Immunomine(商標)プラットフォームから選択された、VB1-050 IgGを、フェーリンで切断可能なリンカーを介して V_H - C_H ドメインと遺伝的に接続されたデ-ブ-プーガニンを含む可溶性Fab-デ-ブ-プーガニン融合タンパク質として人工的に作製した。データは、IgGに由来するFab-デ-ブ-プーガニンフォーマットが可溶性発現に好適であり、容易な後続処理をもたらすことを裏付けている。ひとたび精製されれば、フローサイトメトリーのデータによって、VB6フォーマットのプロファイリングデータが元のIgGと一致することが示され、特異性および選択性が保存されていることを示唆している。さらに、IgGはVB6融合タンパク質と競合し、両断片が同じ抗原に結合したことを示している。計算されたVB6フォーマットの親和性は、 $IC_{50} \geq 280\text{nM}$ にまで至るマイクロモルの範囲にあった。

【0280】

実施例9：抗原同定

VB1-050Agの予備的な特徴付け

VB1-050は、脱グリコシル化によって、58.62%(P値0.008)の結合の増加を示した。脱グリコシル化により観察されたこの抗原の結合の増加は、グリカン部分が細胞表面上の抗原性部位を部分的に隠す可能性があること、および脱グリコシル化が抗原の同定において必須の工程である可能性があることを示唆する。

【0281】

免疫沈降

4つの陽性細胞株、MCF-7、MDA-MB-435S、A-375、HepG2、ならびに3つの陰性細胞株、Panc-1、Daudi、およびC-33Aの各々由来の等量の膜調製物をN-グリカナゼで脱グリコシル化し、かつプロテアーゼ阻害剤の存在下、インピボ条件を模倣する条件で、各々40 μg のVB1-050および4B5-IgGと共に振動させた。免疫複合体を遠心分離し、RIP-A溶解緩衝液で洗浄し、および0.2M グリシン pH 2.5で溶出した。

【0282】

ゲルに基づく解析およびウェスタンブロットティング

上述の全ての細胞株由来の免疫沈降物を、還元および非還元条件の試料調製に供し、その後、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットティングによって解析した。結果として得られたプロットを、4B5-IgGおよびVB1-050を同時に、ならびにHRPにコンジュゲートした対応す

10

20

30

40

50

る2次抗体を用いて調べ、化学発光によって免疫沈降したタンパク質を可視化した。全ての細胞株で、1D-PAGEにより、VB1-050免疫沈降物から、~50kDaに1本のバンドが検出され、および2D-PAGEによって、何ら結果が得られなかった。4B5-IgGではバンドが検出されなかった。従来のアプローチにより、異なる形で発現した抗原が何ら示されなかったので、抗原同定のための別の方法を検討した。

【0283】

ナノ-ESI-MS/MSと縦に並んだProteomeLab(商標)PF-2Dを用いたHTP-抗原ID

HepG2、MCF-7、Panc-1およびC-33AのPF2D分画

膜調製物から予め分画したVB1-050免疫沈降物から、高速遠心分離によって、全ての粒子状物質を取り除いた。澄んだ上清を開始緩衝液で平衡化し、および1次元目にクロマトフォーカシングカラムで分画した。pH=7.4~7.6で溶出するピーク分画を、1:4の比にして、溶媒A(0.1% TFA)で平衡化し、および微量のTFAを含む0~100%の勾配のアセトニトリルによって、HPRPカラムで分画した。

10

【0284】

クロマトフォーカシングカラム(CF)での分画によるHepG2およびMCF-7は、それぞれ68分および65分における(#B6および#B7を構成する)2つの分画として、pH 7.4~7.6で溶出する1本の幅広いピークを示した。図10AおよびBで見られるように、HPRPカラムから溶出するHepG2およびMCF-7の膜は、異なる分離プロファイルを示し、完全にVB1-050反応性抗原の存在に依存的であった。陰性細胞株、Panc-1およびC-33Aの膜では、ごくわずかにあり、または全くないように思われた、2つのピークが、陽性細胞株では異なる形で調節されていることが観察された(図10AおよびB)。陽性細胞株(MCF-7およびHepG2)に存在するタンパク質ピークの徹底解析により、ピークが、それぞれ15分および18分の保持時間で、RP-HPLCカラムから溶出することが示された。これらのピークは、抗原陰性細胞株(Panc-1およびC-33A)では観察されなかった。その代わりに、12分よりわずかに早く溶出する1本のピークが、陰性細胞株で観察された。

20

【0285】

ProteoVue(商標)/DeltaVue(商標)ソフトウェアを用いた分画解析

HPRPカラムについて得られたグロマトグラフィーのプロファイルをProteoVue(商標)ファイルにインポートし、DeltaVue(商標)での最終的な解析用に許容されるフォーマットに形式を合わせた。陽性(HepG2およびMCF-7)細胞株および陰性(Panc-1およびC-33A)細胞株の両方からの抗原分画について解析を組み合わせ、細胞株の各々から包括的な膜タンパク質マップを作成するために、ProteoVue(登録商標)ソフトウェアを用いて形式を合わせた。その後、DeltaVue(商標)ソフトウェアで、異なる形で調節されているタンパク質の比較プロファイリングを作成した。両細胞株からの分画のクロマトグラフィーのプロファイルを、ピークからバンドのパターンへと変換し、異なる発現の領域がより容易に分かるようにした。より良い解像度および解析のために、陽性細胞株において異なる形で発現した特定のピーク/バンドに焦点を当てることができた。各実験で得られた陽性および陰性のプロットを重ね合わせることで、タンパク質の過剰発現が陽性細胞株(HepG2およびMCF-7)でのみ見られることが示され、ならびにこれらの分画をペプチド抽出の目的のために使用した。

30

40

【0286】

ピーク分画からのペプチド抽出

20時間のペプチド抽出処置において、シークエンシング等級のトリプシンによるトリプシン消化を行ない、20~50nL/分という作業流速のナノソースが装備された、QSTAR Pulsar-1(ESI-qTOF-MS/MS)で解析されるペプチドの抽出が最終的にもたらされた。ペプチドをイオン化し、およびそれらのそれぞれの質量にまでさらに純化された、2つ、3つ、または4つの電荷を帯びた分子として検出する。同定したタンパク質のデノボシークエンシングも、可能なら何時でも行なった。それが正しい抗原であることを確かめるために、陽性細胞株および陰性細胞株の両方からペプチドを抽出した。質量スペクトルから抽出したペプチド質量を用いて、MASCOT検索エンジンを通じてアクセス可能であるタンパク質データ

50

ベース上で得られたMOWSEスコアにより、抗原を直接同定した。

【0287】

トリプシン消化後、4つの試料全て（MCF-7、HepG2、Panc-1、およびC-33A）からのピーク、15～18分で溶出する分画、からペプチドを抽出し、ならびにそれらをMS解析に供した。15分、18分で溶出する分画に加えて、陽性細胞株および陰性細胞株由来の12分で溶出する分画も同時に処理した。図11～14は、細胞株から得られたペプチドのTOF-MSスキンの結果を示している。図15で見られるように、陰性細胞株では検出できない両方の陽性細胞株由来のグルコース輸送体8に相当するただ1つのタンパク質が同定された。2つのピーク間の溶出の違い（15分 対 18分）は、糖鎖修飾またはその他の翻訳後修飾の変化に起因する可能性があった。

10

【0288】

質量スペクトルの解析

ペプチド解析を2つの方法で行なった：

- ・タンパク質のIDを得るために、回収され、かつそれらの正確な質量にまで再構築された全てのペプチドを、ペプチド質量フィンガープリンティング工程で直接使用した。
- ・「y」イオンおよび「b」イオンを用いて、それらの1次構造を演繹する、さらなるMS/MSイオン断片化のために、豊富にあり、かつよくイオン化されるペプチドを選択した。その後、タンパク質IDに関するタンパク質データベースで、これらの配列を相同性について検索した。

【0289】

ペプチドをイオン化し、およびMALDIでのようなマトリックス支援イオン化による1つの電荷を帯びたものとしての検出とは対照的に、LC-MS/MSシステムによって、2つ、3つ、または4つの電荷を帯びた分子として検出する。その後、質量再構築工程において、異なる電荷を有するペプチドを、それらのそれぞれの質量にまで純化した。その後、マトリックス科学に基づくmascot検索エンジンによって、抗原IDについて、これらのペプチド質量を直接解析した。質量スペクトルから抽出したペプチド質量を用いて、MASCOT、SEQUEST、およびProspectorなどの検索エンジンを通じてアクセス可能であるタンパク質データベース上で得られたMOWSEスコアにより、抗原を直接同定した。QSTAR-pulsar-1の購入は、Pep seaサーバーからの最新のタンパク質データベースの増加分に関するライセンスの購入を含み、かつMASCOTと適合性があるので、この検索エンジンを全てのタンパク質の検索用に選択した。

20

30

【0290】

回収されたペプチドおよびグルコース輸送体8由来の配列に対してそれらがマッピングされた位置のリストは、図15、16、および表8に示した通りである。表示された全てのペプチドを、デノボシーケンシングによって得た。図17は、グルコース輸送体8を抗原として同定している。

【0291】

ペプチドのうち4つ（1401.54 - 466.600000、3+； 1070.785448 - 536.400000、2+； 1998.272862 - 667.098230、3+； 1176.185448 - 589.100000、2+）のMS/MS断片化によって、グルコース輸送体8由来のペプチドにマッピングされた図18～21に示された断片イオンが生じた。これら2つのペプチドは全てTOF-MSで検出されたので、質量フィンガープリンティングから得られたペプチドの他に、これらのペプチドをMS/MSイオン断片化用に使用した。本目的のために、ナノソース上に取り付けられた別個のナノスプレーヘッドを用いた。衝突エネルギーは48Vで、カーテンガスおよびCADガスをそれぞれ25および6で維持し、ならびに安定な質量イオン断片化を得るために、試料を1.667分間（100サイクル）循環させた。スペクトルから得られたペプチドはグルコース輸送体8上の配列と明確に一致し、したがって主要なヒットとして捕捉された。イオン断片化データによって、VB1-050のコグネート（cognate）抗原としてのグルコース輸送体8の同一性がさらに確認されている。

40

【0292】

50

抗原陽性分画のペプチド質量フィンガープリンティングおよびMS/MS断片化によって、VB1-050のコグネート結合抗原としてのグルコース輸送体8/GLUTX1/SLC2A8遺伝子産物の同一性が明らかにされた。グルコース輸送体-8は、N末端が細胞の内部にある、~50kDaのII型膜貫通タンパク質である。配列の34%の範囲が自家で回収したペプチドから得られた。フローで陽性と選択された細胞株は、免疫沈降で抗原の存在を示す。2つの電荷を帯びた分子のように見える、1070.785 (536.40000、2+) ; 3つの電荷を帯びた分子のように見える、1401.54 (466.60000、3+) という、2つのペプチドのMS/MS解析により、それぞれSLASVVVGVIQ (292~303) およびKTLEQITAHFEGR (466~477) という、2つのペプチド配列が同定され、グルコース輸送体8に対応するタンパク質配列と明確に一致した。

【0293】

10

MCF-7から回収された2つのさらなるペプチド、1176.3547および1997.9992のMS/MSシーケンシングによって、7つの位置、すなわち、7、10、12~15、18における、アミノ酸の変化がある、GLUT8由来の対応するペプチドに対して68.2%の相同性がある配列がマッピングされた。組み入れられた変化は、Shinら (2004, J. Neuro. Res. 75: 835) によって報告された12、13でのLLからAAへの位置変化に相当し、それはGLUT8の細胞質から細胞膜への方向性の原因となっている。

【0294】

本発明は、好ましい実施例であると現在考えられていることに関して記載されているが、本発明は、開示した実施例に限定されないということが理解されるべきである。それと反対に、本発明は、付随する特許請求の範囲の精神および範囲から逸脱しない範囲内に含まれる様々な修正および等価な脚色を包含するよう意図されている。

20

【0295】

各々の個々の刊行物、特許、および特許申請が完全な形で参照により組み入れられることが具体的かつ個別的に示された場合と同じ程度に、全ての刊行物、特許、および特許申請が、完全な形で参照により本明細書に組み入れられる。

【0296】

(表1) CDR配列

CDR配列

VB1-050				
L鎖			H鎖	
CDR1	RASQDISNYLA	SEQ ID NO:1	NYAMS	SEQ ID NO:4
CDR2	AASSLHS	SEQ ID NO:2	AITPSGGSTNYADSVKG	SEQ ID NO:5
CDR3	LQYSTYPIT	SEQ ID NO:3	VPYRSTWYPLY	SEQ ID NO:6

30

【0297】

(表2) 腫瘍細胞表面および正常細胞表面のVB1-050との反応性の比較

臨床適応症	代表的腫瘍細胞株	N ¹	MF ²	相対的順位
乳房	MCF-7 ^e , MDA-MB-231 ^d , MDA-MB-435S ^e	3	29.9	1
メラノーマ	A-375, SK-MEL-5 ^{a,b} , SK-MEL-28 ^a	3	22.7	2
卵巣	SK-OV-3 ^e , OVCAR-3	2	21.7	3
前立腺	DU-145 ^{a,b,f} , PC-3 ^{a,b,g} , LNCaP ^{a,b,g}	3	19.6	4
腎臓	Caki-1 ^a , A498 ^a , ACHN ^a	3	18.4	5
直腸	Sw837, NCI-H630	2	15.2	6
肺	A-549, NCI-H460, NCI-H69	3	14.8	7
肝臓	SK-HEP-1, Hep-G2	2	14.6	8
大腸	HT-29 ^a , SW480, WiDr	3	13.3	9
頭部	HeLa, C-41, C-33A	3	11.8	10
頭頸部	SCC-15, SCC-25	2	11.4	11
膀胱	UM-UC-3, T24	2	9.8	12
胃	AGS, NCI-N-87, KATO III	3	9.6	13
膵臓	PANC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2	3	7.6	14
子宮内膜	RL-95-2, HEC-1-A	2	7.0	15
正常細胞型	細胞株			腫瘍：正常
腎臓	HRE	1	12.5	1.5
肺	NHLF	1	8.7	1.7
内皮	HUVEC	1	5.0	N/A
乳房	HMEC	1	3.1	9.6
前立腺	PrEC	1	2.1	9.3

10

¹Nは適応症あたりの試験した細胞株の数を示す。²MF：値は、各々の適応症における全ての細胞株からの対照抗体に対する蛍光中央値の平均増加倍数の合計から計算した平均を示す。0値は、対照抗体と比べて計測可能な反応性がないことを示す。^aは、AntiCancer社から提供された同所性モデルを示す。^bは、GFP（緑色蛍光タンパク質）-トランスフェクタントとして入手可能な細胞株を示す。^cHer2/neu⁻、ER⁺。^dHer2/neu⁻、ER⁻、p53^{wt}、ras^{wt}。^eHer2/neu⁻、ER⁻、p53^{mt}、ras^{wt}。^fアンドロゲン反応性。^gアンドロゲン非反応性。

20

【0298】

(表3) VB1-050についてのホルマリン固定したクリティカル正常組織のLDアレイ

組織	膜染色	スコア範囲 ¹
脳	なし (0/6)	0
大腸 ²	なし (0/4)	0
心臓	なし (0/5)	0
腎臓	なし (0/3)	0
肝臓	なし (0/5)	0
肺	なし (0/4)	0
膵臓	なし (0/4)	0
胃 ³	なし (0/4)	0

30

¹0~3+の規模でスコアを評価し、0=染色なし、および1+未満だが、0よりも大きいものを微量とした。1+~3+の等級は、増加した染色の強度を表し、強い濃褐色の染色を3+とした。通常、6人の異なる患者の1つの標本をスクリーニングした。6人未満の患者がスクリーニングされた場合というのは、中心が欠けていたか、または染色されるべき組織を代表しなかったかのいずれかを示す。括弧内の値は、スコア付けされた範囲における染色された細胞の割合を示す。²隣接する正常組織のみを用いた。³5つのうち4つは、隣接する正常組織標本であった。

40

【0299】

(表4) VB1-050についてのホルマリン固定した正常TMAのHDアレイ

組織	膜染色	スコア範囲*
副腎	なし (0/5)	0
大動脈	なし (0/5)	0
動脈	なし (0/5)	0
膀胱	なし (0/5)	0
脳	なし (0/5)	0
乳房	なし (0/5)	0
ファローピウス管	なし (0/5)	0
リンパ節	なし (0/4)	0
筋肉	なし (0/5)	0
卵巣	なし (0/5)	0
下垂体	なし (0/5)	0
胎盤	なし (0/5)	0
前立腺	0/5	0
皮膚	0/1	
脊髄	なし (0/3)	0
脾臓	なし (0/5)	0
精巣	1/5	1+ (30%)
胸腺	なし (0/1)	0
甲状腺	なし (0/5)	0
尿管	0/2	0
子宮	なし (0/3)	0

10

20

*0~3+の規模でスコアを評価し、0=染色なし、および1+未満だが、0よりも大きいものを微量とした。1+~3+の等級は、増加した染色の強度を表し、強い濃褐色の染色を3+とした。通常、8人の異なる患者の2つの標本をスクリーニングした。8人未満の患者がスクリーニングされた場合というのは、中心が欠けていたか、または染色されるべき組織を代表しなかったかのいずれかを示す。括弧内の値は、スコア付けされた範囲における染色された細胞の割合を示す。

30

【 0 3 0 0 】

(表5) VB1-050についてのホルマリン固定した腫瘍TMAのHDアレイ

組織	膜染色	スコア範囲
膀胱	2/8	2+ (50%)
乳房	1/8	1+ (90%)
頸部	1/8	1+ (30%)
大腸	4/7	1+ (70-90%)
腎臓	1/8	2+ (40%)
肝臓	3/6	1+ (80%)
肺	0/6	N/A
卵巣	3/7	1+ (20%)
脾臓	2/8	2+ (30-80%)
前立腺	4/7	1+ (20-60%)
直腸	0/7	N/A
皮膚	0/4	N/A
胃	4/8	2+ (30%)
子宮	0/8	N/A
頭頸部	2/8	2+ (30-50%)

10

0~3+の規模でスコアを評価し、0=染色なし、および1+未満だが、0よりも大きいものを微量とした。1+~3+の等級は、増加した染色の強度を表し、強い濃褐色の染色を3+とした。通常、8人の異なる患者の2つの標本をスクリーニングした。8人未満の患者がスクリーニングされた場合というのは、中心が欠けていたか、または染色されるべき組織を代表しなかったかのいずれかを示す。頭頸部癌には、咽喉、口唇、喉頭、口腔、扁桃腺、および歯肉表面の腫瘍が含まれていた。括弧内の値は、スコア付けされた範囲における染色された細胞の割合を示す。太字にされた癌の適応症は、VB1-050反応性を示す。

20

【0301】

(表6) 時間および温度の関数としての抗体結合のフローサイトメトリー評価

MAb ID	抗体 ¹	37°Cでのインキュベーション (分)	蛍光中央値 (MF)	MFの増加倍数 ²	MFの減少 % ³
VB1-050	VB1-050	- ⁴	1041.0±23.0	129.1	-
		60	397.5±5.1	49.2	61.8
		120	317.5±4.1	39.3	69.6
内在化しない 対照	MA-103	-	536.1±31.3	112.8	-
		120	535.5±16.8	113.0	-
内在化する 対照	5E9	- ⁴	246±11	60.0	-
		60	53.5±1.5	13.0	78.3
		120	48±4	11.7	80.5

30

40

¹ 代表的な実験を示す。² 陰性対照、マウス骨髄腫IgGまたはヒトIgG(4B5)を上回るMF増加。³ 腫瘍細胞の細胞表面からのMFの減少の割合。⁴ (-) 氷上で120分間インキュベートした細胞。

【0302】

(表7) VB6-050の生物学的特徴付け

	親和性 (M)	VB6飽和濃度 (μg/mL)	IgG濃度 (μg/mL)*	IC ₅₀ (nM)
VB6-008	1.4·10 ⁻⁵	ND	ND	280

ND: 決定されていない。* VB6結合の50%を阻害するIgGの濃度。

50

【 0 3 0 3 】

(表 8) 回収されたペプチドのリスト

観測された	開始	終了	ペプチド	SEQ ID NO.
1998.27	3	22	PEDPSETEPAAPRPGASAPR	12
1151.241	6	15	PSETEPAAPR	13
3140.68	26	56	RVFLAAFAAALGPLSFGFALGYSSPAIPSLQRA	14
2916.29	64	93	RLDDAAASWFGAVVTLGAAAGGVLGGWLVDRA	15
889.04	216	223	RQEAMAALRF	16
2984.32	224	249	RFLWGSEQGWEDPPIGAEQSFHLALLRQ	17
4263.10	427	463	KEFSSLMEVLRPYGAFWLASAFICFVLFVPEIKG	18
1401.54	466	477	KTLEQITAHFEGR	19
	292	302	SLASVVGVVIQ	20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 3 0 4 】

本発明は、ここで以下の図面と関連して記載される。

【 図 1 】 VB1-050の軽鎖可変領域の核酸 (SEQ ID NO : 8) 配列およびアミノ酸 (SEQ ID NO : 7) 配列である。

【 図 2 】 VB1-050の重鎖可変領域の核酸 (SEQ ID NO : 10) 配列およびアミノ酸 (SEQ ID NO : 9) 配列である。

【 図 3 】 フローサイトメトリーで決定された異なる温度でのA-375細胞とのインキュベーション後の抗体の細胞表面結合を示す。4 での細胞懸濁液のインキュベーション後のA-375細胞の蛍光標識 : 4B5 (1) およびVB1-050 (2)。抗体結合細胞を37 まで温めた後のA-375細胞の蛍光標識 : VB1-050、60分間 (3)、120分間 (4)。

【 図 4 】 VB1-050の内在化に関する共焦点顕微鏡法の評価を示す。A-375細胞を4 での抗体とインキュベートし、洗浄し、および37 まで60分間温めた。細胞を固定し、膜透過化し、および蛍光標識2次抗体で標識した。標識の円周表面分布を示す、4 での60分間のVB1-050のインキュベーション後のA-375の蛍光標識、(60X × 4)倍率 (A)。37 での60分間の抗体結合細胞のインキュベーション後、細胞は内在化した抗体による強い細胞内染色を示す、(60X × 4)倍率 (B)。

【 図 5 】 PCR反応物のアガロースゲルを示す。UVランプの下で、エチジウムブロマイドを用いて、DNAを検出した。A) PeIB-V_{H845}-C_H-F-デ-プーガニン/psV73プラスミドおよびPeIB(-S)-V_{H050}-C_H-F-デ-プーガニン/pSV73をEcoRIおよびPvuIIで消化し、ならびにそれぞれレーン1および3上に充填した。*記号は、PeIB-V_{H050}-C_H-F-デ-プーガニン/pSV73を作製するために、予め消化されたPeIB(-S)-V_{H050}-C_H-F-デ-プーガニン/pSV73 (矢印で示した) にライゲートされた、ペプチドリーダー配列のあるEcoRI-PeIB-PvuIIインサートを示す。B) PeIB(-S)-V_{L050}-C_L/pSV73およびSpeI-デ-プーガニン-PeIB-V_{L845}-C_L/pSV73プラスミドをEcoRVおよびXhoIで消化し、ならびにそれぞれレーン2~3および4~5上に充填した。インサートおよびベクターをそれぞれ*記号および矢印で示し、3302プラスミド内にその後挿入するSpeI-デ-プーガニン-PeIB-V_{L845}-C_L/pSV73プラスミドを作製するために使用した。EcoRIおよびSpeIで消化し、ならびにレーン2上に充填した、C) SpeI-デ-プーガニン-PeIB-V_{L845}-C_L/3302プラスミド、およびD) PeIB-V_{H050}-C_H-F-デ-プーガニンインサート (それぞれ、矢印および*記号で示した) をライゲートし、VB6-050/3302を作製した。

【 図 6 】 VB6-050のウェスタンブロットを示す。VB6-845 (レーン1) およびVB6-050 (レーン2) の代表的な上清を、非還元条件下で、SDS-PAGEゲルに充填し、および抗ヒト軽鎖-HRP抗体 (1/1000) で免疫ブロットした。レーン3および4は、それぞれ、誘導していない培養の上清およびラダーに相当する。レーン5は、以前に試験したウェスタンブロットで陽性のVB6-845上清である。

【 図 7 】 E104上清からのVB6-050の代表的な精製物のウェスタンブロットを示す。A) 精製処置の異なる工程で採取された、16 μlの試料を、抗ヒト軽鎖-HRP抗体で免疫ブロットした。矢印は無傷の産物を示す。レーン1 : 培養上清 ; レーン2 : 濃縮した上清の濾液 ; レーン3 : 1/10希釈した濃縮した上清 ; レーン4 : 透析濾過し、濃縮した上清の濾液 ; レーン

10

20

30

40

50

5 : 1/10の透析濾過し、濃縮した上清 ; レーン6 : CM-セファロースカラムのフロースルー ; レーン7 : CM-セファロースカラムの洗浄液 ; レーン8 : CM-セファロースカラムの溶出物またはNi-セファロース出発材料 ; レーン9 : Ni-キレートカラムのフロースルー ; レーン10、11、および12 : Ni-キレートカラムの異なる工程の洗浄液 ; レーン13 : Ni-キレートセファロースカラムの溶出物またはSEC-200出発材料 ; レーン14 : SEC-200分画26~28のプール ; レーン15 : ラダーおよび対照としてのVB6-845。B) VB6-050のクマシー染色。レーン1 : SEC-200出発材料 ; レーン2 : 分画27 ; レーン3 : 精製したVB6-845 ; レーン4 : ラダー。

【図8】VB6-050の滴定曲線を示す。SKBR-3細胞、A-375細胞、およびSK-OV-3細胞を、様々な濃度のVB6-050とインキュベートし、ならびにフローサイトメトリーで中間の蛍光を得た。以下の公式を用いて、蛍光中央値(MF)増加倍数を計算した。MF増加倍数 = 各濃度で測定されたMF/PBSで測定されたMF。

10

【図9】VB6-050のインビトロ細胞毒性を示す。抗原陽性細胞MB-435S(白丸)および抗原陰性細胞Daudi(黒丸)を用いたVB6-050のMTSアッセイ。細胞をウェル当たり1000細胞で播き、Fab-デ-ブ-ガニン精製タンパク質とインキュベートした。インキュベーション5日後、細胞生存率を測定し、および IC_{50} を決定した。

【図10】PF-2DシステムによるHepG2、MCF-7、Panc-1、およびC-33Aの分画プロファイルを示す。2つの陽性細胞株および2つの陰性細胞株間の抗原発現の違いの比較プロファイル。この図は、10~25分のクロマトグラフィーのファイルを表す。分離された抗原の違いの明確な図を、両方の陽性細胞で可視化している。MCF-7およびHepG2は、適度なレベルの疎水性を示す、15分および18分で溶出する2つのピークを示した。Panc-1およびC-33Aは、対応するピークを示さなかった。12分におけるピークは、全ての細胞株で観察された。

20

【図11】試料中の全てのペプチドイオンの存在を検出するための、HepG2細胞株から得られたペプチドのTOF-MSスキャンを示す。静電ナノスプレーによる100~1200amuの範囲の1200~1400Vでの53回のスキャンによって、相当な数のペプチドの回収がもたらされ、解析すると、それらはグルコース輸送体8としてのタンパク質IDを生じた。

【図12】試料中の全てのペプチドイオンの存在を検出するための、Panc-1細胞株から得られたペプチドのTOF-MSスキャンを示す。静電ナノスプレーによる100~1200amuの範囲の1200~1400Vでの30回のスキャンによって、相当な数のペプチドの回収がもたらされ、解析すると、それらはIgGとしてのタンパク質IDを生じた。

【図13】試料中の全てのペプチドイオンの存在を検出するための、MCF-7細胞株から得られたペプチドのTOF-MSスキャンを示す。静電ナノスプレーによる100~1200amuの範囲の1200~1400Vでの27回のスキャンによって、相当な数のペプチドの回収がもたらされ、解析すると、それらはグルコース輸送体8としてのタンパク質IDを生じた。

30

【図14】試料中の全てのペプチドイオンの存在を検出するための、C-33A細胞株から得られたペプチドのTOF-MSスキャンを示す。静電ナノスプレーによる100~1200amuの範囲の1200~1400Vでの30回のスキャンによって、相当な数のペプチドの回収がもたらされ、解析すると、それらはIgGとしてのタンパク質IDを生じた。

【図15】表8に掲載された質量分析の解析から回収されたペプチドの配列の範囲を示す。合計8つのペプチドが、溶液中トリプシン消化から回収され、およびタンパク質の34%の範囲が得られた。下線のある配列は回収されたペプチド配列を表し、および太字の配列は変異体のアミノ酸配列を示す。

40

【図16】VB1-050Agから回収されたペプチドについてのペプチド質量フィンガープリンティングの結果を示す。64を上回るタンパク質スコアを有意とみなした。観察された唯一の有意なタンパク質IDは、グルコース輸送体8として公知の、1つの抗原を提示していた。

【図17】同定された抗原である、グルコース輸送体8が、83という有意なスコアを有することを示す。データベースサーバーおよび類似性/相同性関連タンパク質の性質により、本タンパク質の全てのアイソフォームがヒットとして捕捉された。ペプチドのMS/MS断片化および同一性により、抗原がグルコース輸送体8であることが確認されている。

【図18】3つの電荷を帯びた分子(466.60000、3+)と思われる、分子量1401.54の中性ペプチドのMS/MSイオン断片化を示す。ペプチド配列は、グルコース輸送体8由来のペプチ

50

ドと正確に一致した。

【図19】2つの電荷を帯びた分子（536.40000、2+）と思われる、分子量1070.785の中性ペプチドのMS/MSイオン断片化を示す。ペプチド配列は、グルコース輸送体8由来のペプチドと正確に一致した。

【図20】3つの電荷を帯びた分子（667.098230、3+）と思われる、分子量1997.9992の中性ペプチドのMS/MSイオン断片化を示す。ペプチド配列は、グルコース輸送体8由来の相同ペプチドと比べて；位置7、10、12、13、14、15、および18におけるアミノ酸の変化を示した。

【図21】2つの電荷を帯びた分子（589.100000、2+）と思われる、分子量1176.3547の中性ペプチドのMS/MSイオン断片化を示す。ペプチド配列は、グルコース輸送体8由来の相同ペプチドと比べて；位置7、10、12、13、14、および15におけるアミノ酸の変化を示した。

10

【図1】

VB1-050

V_L (SEQ ID NO: 8および7)

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V

ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG
T I T C R A S Q D I S N Y L A W F Q

┌──────────────────────────┐
 CDR1 (L) ───────────────────────────┘

CGG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC
R K P G K A P K S L I Y A A S S L H

 ┌──────────────────┐
 CDR2 (L) ───────────────────┘

AGT AAG GTC CCA ACA CAA TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC
S K V P T Q F S G S G S G T D F T L

└─┘

ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT
T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q Y

 ┌──────────────────┐
 CDR3 (L) ───────────────────┘

AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA
S T Y P I T F G G G T K V E I K R

CDR3(L) ───────────────────┘

【図2】

VB1-050

V_H (SEQ ID NO: 10および9)

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GAC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCG CTG
E V Q L L E S G G D L V Q P G G S L

AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGC AAC TAT GCC ATG AGC TGG
R L S C A A S G F T F S N Y A M S W

 ┌──────────────────┐
 CDR1 (H) ───────────────────┘

GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCG ATT ACT CCT AGT
V R Q A P G K G L E W V S A I T P S

GGT GGT AGT ACA AAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
G G S T N Y A D S V K G R F T I S R

 ┌──────────────────┐
 CDR2 (H) ───────────────────┘

GAC AAT TCC CAG AAT ACA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GTC GAG GAC
D N S Q N T L Y L Q M N S L R V E D

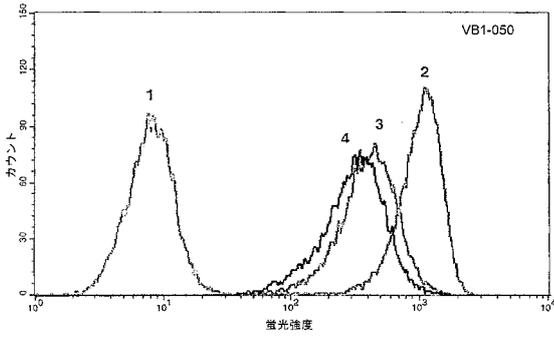
ACG GCC GTA TAT TAC TGT GGG AGA GTC CCA TAT AGA AGC ACT TGG TAC CCT TTA
T A V Y Y C G R V P Y R S T W Y P L

 ┌──────────────────┐
 CDR3 (H) ───────────────────┘

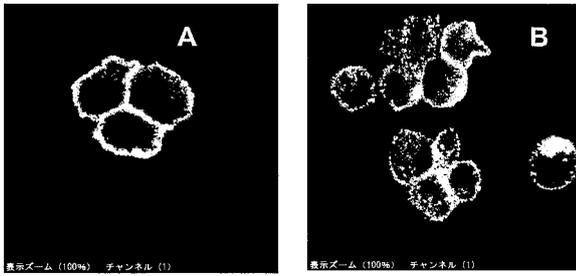
TAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
Y W G Q G T L V T V S S

└─┘

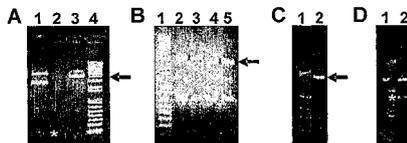
【 図 3 】



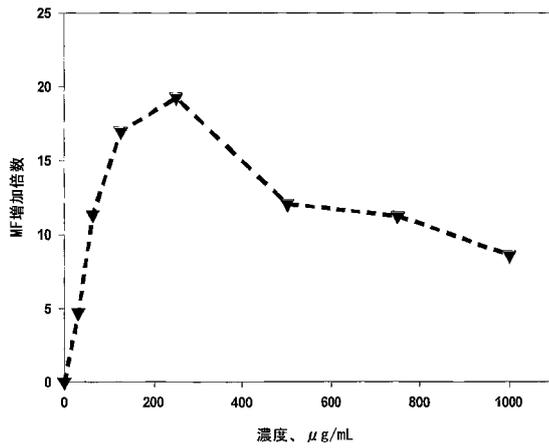
【 図 4 】



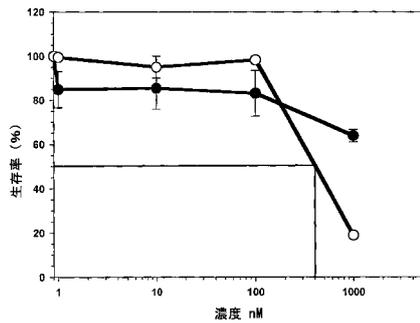
【 図 5 】



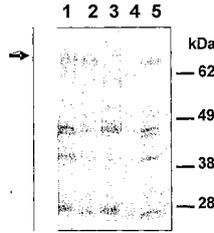
【 図 8 】



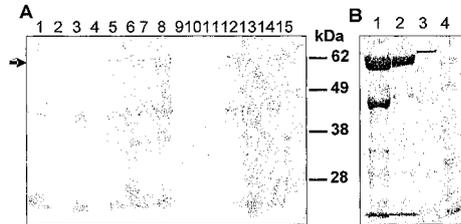
【 図 9 】



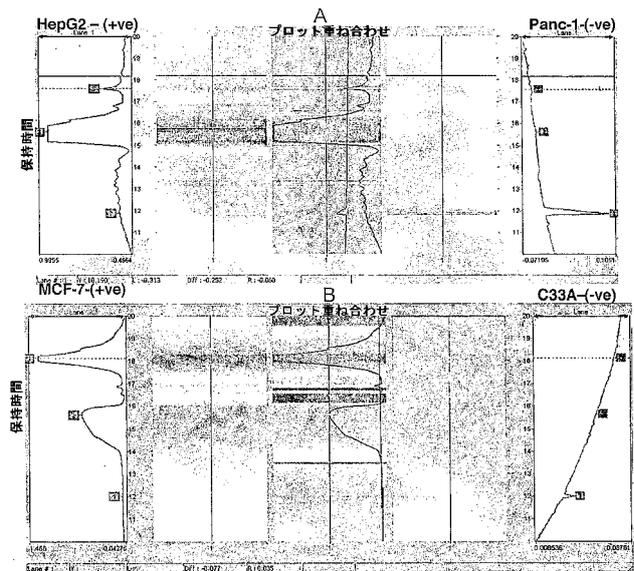
【 図 6 】



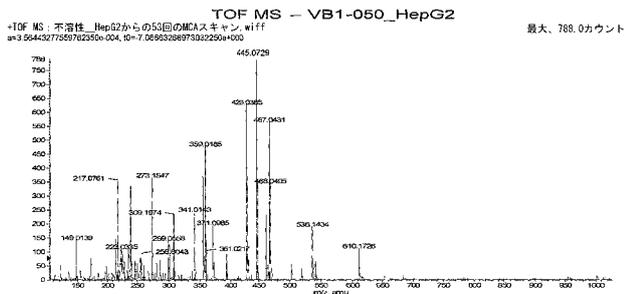
【 図 7 】



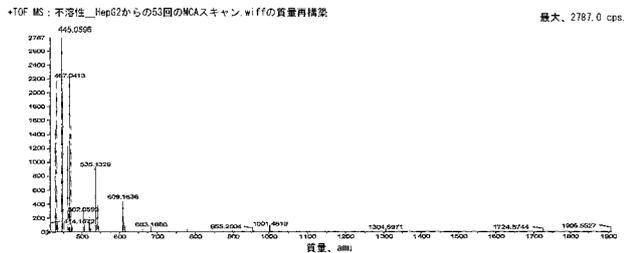
【 図 10 】



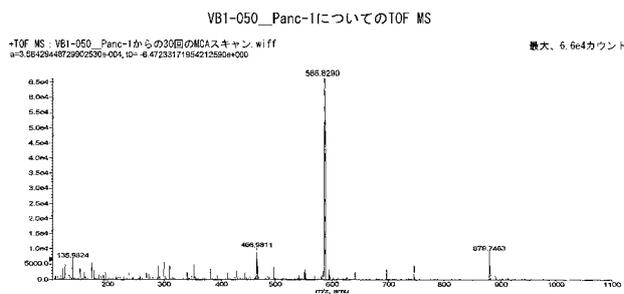
【 図 1 1 】



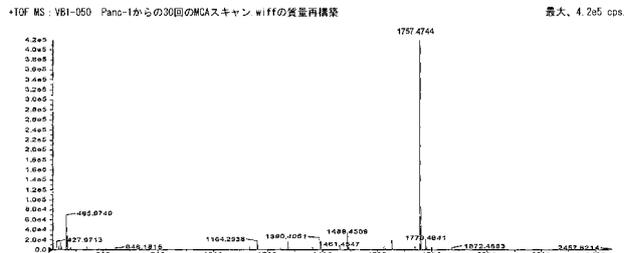
VB1-050_HepG2の質量再構築



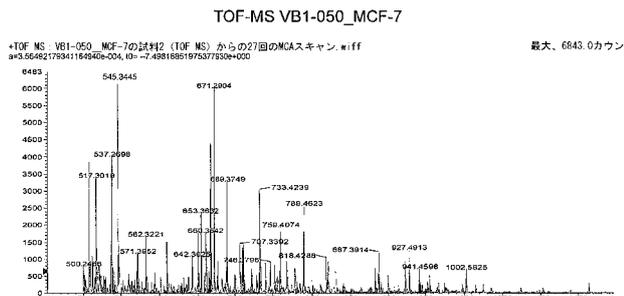
【 図 1 2 】



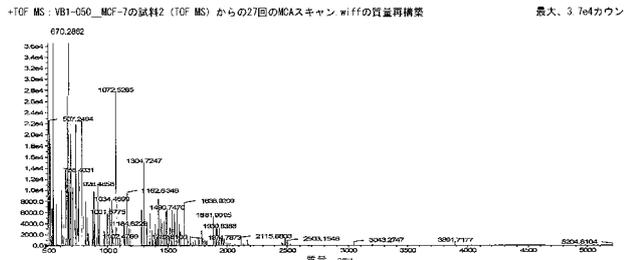
VB1-050_Panc-1の質量再構築



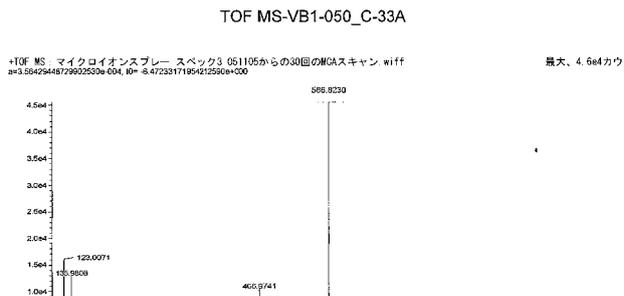
【 図 1 3 】



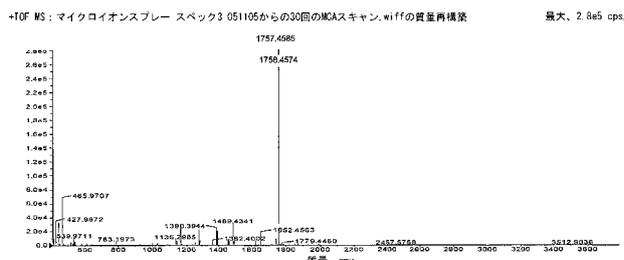
VB1-050_MCF-7の質量再構築



【 図 1 4 】



VB1-050_C-33Aの質量再構築

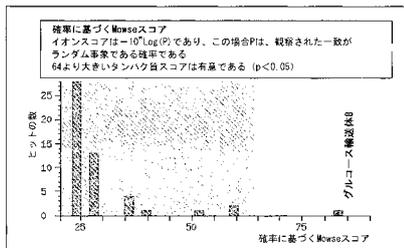


【 図 1 5 】

SEQ ID NO: 11

MTPEDPSETE PAAPRPCASA FRGRVFLAA FAALGLPLSF GFALGYSSPA
 51 IPSLQRAAPP APRLDAAAS WEGAVVTLGA AAGGVLGGWI VDRAGRKLSL
 101 LLCVPEFVAG FAVITAAQDV WMLLGGRLIT GLACGVASLV APVYISEIAY
 151 PAVRGLGSC VQMVVVVIL LAYLAGVWLE WRWLAVLGVV PPSMLLLMC
 201 FMPETPRELL TQRRRQEAMA ALRFLWGSQ GWEDPPIGAE QSFHLLLRQ
 251 PGIYKPLIIG VSLMAFQQLS GVNVMFYAE TIFEBAKFD SSLASVVVGV
 301 IQVIFTAVAA LIMDRAGRRL LVLVSGVWVH FSTSAFGAYF KLTGSGPGNS
 351 SHVAISAPVS AQPVDASVGL AWLAVGNMCL FTAGFAVGVG PIPWLLMSI
 401 PPLHVKGVAT GCVLNLWLM AFLVTKFESS LMSVLRPYGA FWLASAFPCF
 451 SVLEFLFCVP EIKGKLEQI TAREEGR

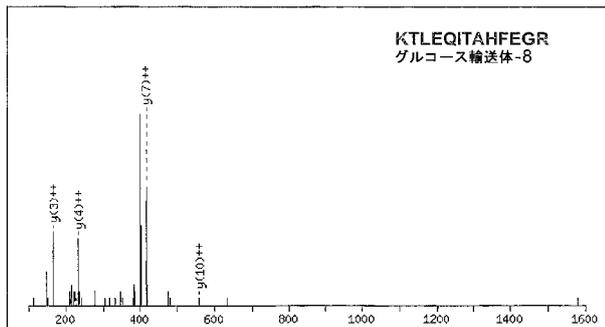
【図 16】



【図 17】

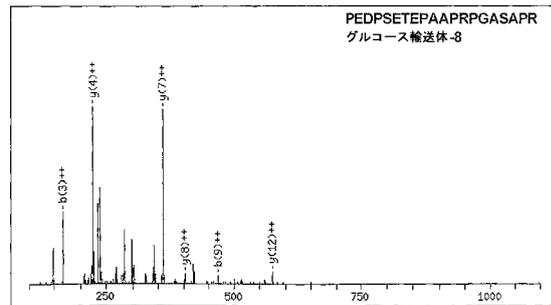
アブセクション	質量	イオンスコア	タンパク質名
1	617018306	50858	グルコース輸送体8 (Homo sapiens)
2	617688146	50792	グルコース輸送体8 (Homo sapiens)
3	6121361449	50818	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
4	6155665089	43470	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
5	6155665088	27790	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
6	6122749173	31126	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
7	6162860046	123247	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
8	6142857033	13184	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
9	6121754605	42167	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
10	61913281	9360	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
11	614100821	36815	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
12	610863977	10834	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
13	6154956676	22023	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
14	610939016	21963	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
15	6120372406	12576	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
16	613283415	23363	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
17	61609465	14106	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
18	6155957604	26342	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
19	614707813	59197	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)
20	6157208269	35223	溶質連動体ファミリー2、(膜タンパク質) グルコース輸送体、メンバー8 (ヒト)

【図 18】



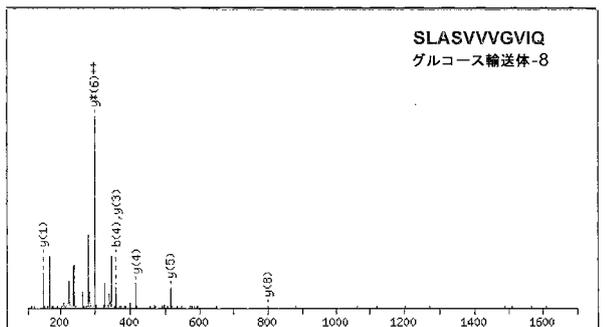
中性ペプチド分子量 (予測) のモノアイソトピック質量: 1401.54 イオンスコア: 73 期待値: $1.3e+02$ 一致 (赤字): 12の最も強いピークを用いた断片イオンの4/140

【図 20】



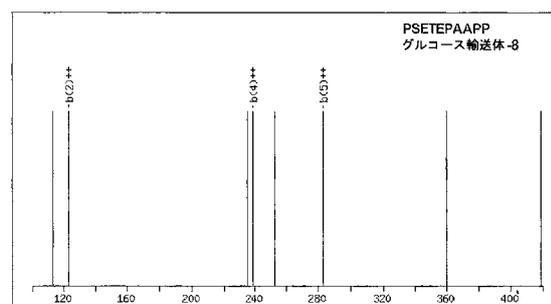
中性ペプチド分子量 (予測) のモノアイソトピック質量: 1987.9982 イオンスコア: 18 期待値: $2.6e+02$ 一致 (赤字): 18の最も強いピークを用いた断片イオンの6/172

【図 19】



中性ペプチド分子量 (予測) のモノアイソトピック質量: 1070.63 イオンスコア: 68 期待値: $5.6e+02$ 一致 (赤字): 36の最も強いピークを用いた断片イオンの7/86

【図 21】



中性ペプチド分子量 (予測) のモノアイソトピック質量: 1176.3547 様々な修飾: N3 酸化 (N) イオンスコア: 11 期待値: 0.64 一致 (赤字): 8つの最も強いピークを用いた断片イオンの3/100

【配列表】

2008523825000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2005/001953
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>G01N 33/574</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01), <i>A61K 31/7088</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: <i>C12N 15/13</i> (2006.01), <i>G01N 33/574</i> (2006.01), <i>G01N 33/53</i> (2006.01), <i>A61K 31/7088</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Delphion (keywords: GLUT8, GLUT-8, cancer, antibod*), Medline (keywords: GLUT8, GLUT-8, cancer, antibod*), GeneSeq (sequences searched: SEQ ID Nos:1-13)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 06-141884 A (HAGIWARA YOSHIHIDE) 24 May 1994. see page 2-3 and claims 2 and 7	1-34, 42-47 48-69
X	AOTSUKA Y ET AL: "Identification of a malignant cell associated antigen recognized by a human monoclonal antibody" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER & CLINICAL ONCOLOGY. May 1988. Vol. 24, number 5, pages 829-838 see whole document	70
X	HAGIWARA H ET AL: "Determination of the antigen/epitope that is recognized by human monoclonal antibody CLN-IgG" HUMAN ANTIBODIES. 2001. Vol. 10, number 2, pages 77-82 see whole document	70
Y	OSUMI K ET AL: "Antibody dependent cell mediated cytotoxicity on human cervical carcinoma cell line, ME-180, with human monoclonal antibody" CANCER LETTERS. 1992. Vol. 62, number 2, pages 179-183 see whole document	63-69
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
*	Special categories of cited documents :	"T"
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Y"
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
		"&"
		document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
6 April 2006 (06-04-2006)		26 April 2006 (26-04-2006)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001(819)953-2476		Authorized officer Kristoffer Wilde (819) 953-0551

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2005/001953

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FENSTERMAKER R ET AL: "Immunotherapeutic strategies for malignant glioma" CANCER CONTROL. May/June 2004. Vol. 11, number 3, pages 181-191 see page 187, left column, 3rd paragraph	63-69
X	SHIKHMAN AR ET AL: "Distinct pathways regulate facilitated glucose transport in human articular chondrocytes during anabolic and catabolic responses" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM. 28 January 2004. Vol. 286, pages E980-E985 see whole document	35, 42-47, 71-73, 79 and 80
X	US 2003/0228592 A1 (ST. VINCENT'S INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 11 December 2003. see whole document	35, 42-47, 71-73 and 79-105
Y	KREITMAN RJ: "Immunotoxins in cancer therapy" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY. 1999. Vol. 11, number 5, pages 570-578 see whole document	48-69
A	MOADEL RM ET AL: "Positherapy: targeted nuclear therapy of breast cancer with ¹⁸ F-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose" CANCER RESEARCH 1 February 2005. Vol. 65, number 3, pages 698-702 see whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2005/001953

Patent Document Cited in Search Report	Date	Publication Member(s)	Patent Family Member(s)	Date	Publication
JP06141884 A	24-05-1994	none			none
US20030228592 A1	11-12-2003	none			none

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2005/001953
--

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

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

1. Claim Nos. : 60, 61, 94-99 and 101-104
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Although claims 60, 61, 94-99 and 101-104 encompass a method of medical treatment of the human/animal body which this Authority is not obliged to search under Rule 39.1 (iv) of the PCT, the search has been carried out based on the alleged effects of the compounds referred to therein.
2. Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. Claim Nos. :
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

This Authority found that unity of invention is not complied with but chose not to invite the applicant to pay additional fees.

Continued in Supplemental box.

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2005/001953**Supplemental Box.**

Continuation of Box No. III

The International Searching Authority found multiple inventions in the present international application, as follows:

1. Claims 1, 2 and partly 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24, 26-34, 44-75 : A light chain CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:1, a nucleic acid encoding said light chain, a binding protein comprising said light chain, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
2. Claims 3, 4 and partly 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24, 26-34, 44-75 :A light chain CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:2, a nucleic acid encoding said light chain, a binding protein comprising said light chain, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
3. Claims 5, 6 and partly 13, 14, 17, 18, 21, 23, 24, 26-34, 44-75 :A light chain CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:3, a nucleic acid encoding said light chain, a binding protein comprising said light chain, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
4. Claims 7, 8 and partly 15, 16, 19, 20, 22, 25-34, 44-75 :A heavy chain CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:4, a nucleic acid encoding said heavy chain, a binding protein comprising said heavy chain, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
5. Claims 9, 10 and partly 15, 16, 19, 20, 22, 25-34, 44-75 :A heavy chain CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:5, a nucleic acid encoding said heavy chain, a binding protein comprising said heavy chain, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
6. Claims 11, 12 and partly 15, 16, 19, 20, 22, 25-34, 44-75 :A heavy chain CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:6, a nucleic acid encoding said heavy chain, a binding protein comprising said heavy chain, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
7. Claims 35-41 and partly 44-75: A binding protein specific to a cancer-associated variant of glucose transporter 8, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
8. Claims 42, 43 and partly 44-75: A binding protein capable of binding an antigen on a cancer cell which is identifiable by a competitive binding assay, an immunoconjugate comprising said binding protein, and compositions, kits and methods thereof, recombinant expression vectors, host cells and proteins which specifically bind to said binding protein.
9. Claims 76 and partly 80-100,105: An isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:11, nucleic acid encoding said protein, recombinant expression vectors, compositions, methods and kits.
10. Claims 77 and partly 80-100, 105::An isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:12, nucleic acid encoding said protein, recombinant expression vectors, compositions, methods and kits.
11. Claims 78 and partly 80-100, 105::An isolated protein comprising the amino acid sequence of SEQ ID No:13, nucleic acid encoding said protein, recombinant expression vectors, compositions, methods and kits.
12. Claims 101-104: A method for treating or preventing cancer by decreasing the function of a cancer-associated variant of glucose transporter 8.

According to Article 3(4)(III) PCT and Rule 13 PCT, a group of inventions may be claimed in one international application provided there is a technical relationship among those inventions involving one or more special technical features. However, the inventions listed above fail to share a common special technical feature, and therefore, they are viewed as encompassing multiple inventions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2005/001953

G01N 21/64 (2006.01), *C12N 15/12* (2006.01), *C07K 16/30* (2006.01), *C07K 14/705* (2006.01),
A61P 35/00 (2006.01), *A61K 47/48* (2006.01), *A61K 47/42* (2006.01)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 5
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	4 C 0 8 6
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/02	A
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
	G 0 1 N 33/543	5 4 5 Z
	G 0 1 N 33/543	5 7 5

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

(72)発明者 マクドナルド グレン

カナダ国 マニトバ州 ウィニペグ ラグラン ロード 4 7 5

(72)発明者 エントウイストル ジョイセリン

カナダ国 マニトバ州 ウィニペグ リンデンウッド ドライブ イースト 3 8 0

(72)発明者 シゼアウ ジーニック

カナダ国 マニトバ州 ウィニペグ ハーグレーブ ストリート 6 0 2 - 1 7 0

(72)発明者 チャハル フランシナ シー

カナダ国 マニトバ州 ウィニペグ ヴィクター ルイス ドライブ 1 8 5

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB02 DA13 DA36 FB07 FB08

4B024 AA01 AA11 BA44 BA45 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09

CA10 CA12 DA02 DA06 EA04 FA02 FA07 FA10 GA05 GA11

GA18 GA19 GA27 HA03 HA08 HA09 HA12 HA14 HA17

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ20 QQ42 QQ53 QQ79 QR08
 QR32 QR33 QR36 QR42 QR48 QR56 QR59 QR62 QR66 QR69
 QR77 QR82 QS05 QS12 QS16 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36
 QX02

4B065 AA26X AA90X AA91X AA92X AA94Y AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
 CA46

4C084 AA01 AA02 AA06 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18
 DA33 DC50 MA02 MA17 MA66 NA14 ZB26 ZB27

4C085 AA13 AA14 CC03 DD61 EE06 FF02 FF13 GG01 HH03 HH11
 JJ02 KA26 KA27 KA29 KB07 KB18 KB55 KB82 LL18

4C086 AA01 AA02 AA03 EA17 EA18 MA01 MA02 MA03 MA04 MA05
 MA16 MA66 NA14 ZB26 ZB27

4C087 BC83 CA12 MA02 MA17 MA66 NA14 ZB26 ZB27

4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA13 BA14 BA15 BA16 BA17 BA41
 BA72 CA11 CA41 DA76 DA83 DA86 EA20 EA28 EA50 EA51
 FA72 FA74 GA26

【要約の続き】

VB1-050

V_L (SEQ ID NO: 8 および 7)

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V

ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG
 T I T C R A S Q D I S N Y L A W F Q

┌────────────────── CDR 1 (L) ───────────────────┐

CGG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC
 R K P G K A P K S L I Y A A S S L H

┌────────── CDR 2 (L) ───┐

AGT AAG GTC CCA ACA CAA TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC
 S K V P T Q F S G S G S G T D F T L

└──┘

ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT
 T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q Y

┌──────────────────┐

AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA
 S T Y P I T F G G G T K V E I K R

CDR 3(L) ┌──────────────────┐