

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-187356

(P2016-187356A)

(43) 公開日 平成28年11月4日(2016.11.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/531 (2006.01)	G O 1 N 33/531 A	4 B 0 6 4
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 5 1 N	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30 Z N A	4 C 0 8 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C 0 8 5

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-148170 (P2016-148170)	(71) 出願人	308031072
(22) 出願日	平成28年7月28日 (2016. 7. 28)		オンコメッド ファーマシューティカルズ
(62) 分割の表示	特願2014-103056 (P2014-103056)		インコーポレイテッド
原出願日	平成20年7月2日 (2008. 7. 2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 レッ
(31) 優先権主張番号	60/947, 611		ドウッドシティー チェサピーク ドライ
(32) 優先日	平成19年7月2日 (2007. 7. 2)	(74) 代理人	100078282
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんを処置および診断するための組成物および方法

(57) 【要約】

【課題】がん患者のためのよりよい診断アッセイおよび治療法を提供する。

【解決手段】本発明は、腫瘍学の分野における組成物および方法に関する。本発明は、LGRタンパク質を介した機能的なシグナル伝達を乱す生体分子、ある種の態様において、R-スポンジン(RSP0)タンパク質とLGR5などのLGRタンパク質との間の相互作用を阻害する分子などを提供する。ある種の態様において、生体分子は抗体である。例えば、ある種の態様において、生体分子は、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体、または少なくとも一種のヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体でありうる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

がんを処置および診断するための組成物および方法など。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2007年7月2日付で出願された米国特許仮出願第60/947,611号の優先権の恩典を主張するものであり、これはその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

発明の分野

本発明は腫瘍学の分野に関し、がんを診断および処置するための新規の組成物および方法を提供する。具体的には、本発明は、充実性腫瘍がん幹細胞を含んだがんを特徴付ける、研究する、診断する、予後診断する、および処置するための手段および方法を提供する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

がんは、先進国世界における死亡の主因の一つであり、米国単独で1年あたり50万人を超える死を招いている。毎年米国では100万人超が、がんを有すると診断され、全体として3人に1人超が一生の間に何らかの形のがんを発症すると推定されている。がんには200を超える種類があるが、その四つ、すなわち乳がん、肺がん、結腸直腸がん、および前立腺がんが、全ての新しい症例の半分超を占める(Jemal et al., 2003, Cancer J. Clin. 53: 5-26)。

【0004】

乳がんは女性に最も多くみられるがんであり、女性の推定12%は一生の間にこの疾患を発生するリスクがある。早期検出および処置の向上のおかげで死亡率は減少したが、乳がんは中年女性の主な死亡原因のままである。さらに、転移性乳がんはいまだに不治の疾患である。発症時に、転移性乳がんを有する大部分の患者は一つまたは二つの器官系だけが冒されているが、疾患が進行するにつれて通常は複数の部位に波及した状態になる。転移性波及が最も多くみられる部位は、胸壁の皮膚および軟組織、ならびに腋窩部分および鎖骨上窩部分における局所再発である。遠隔転移について最も多くみられる部位は骨(遠隔転移の30~40%)であり、続いて肺および肝臓である。そして、新たに乳がんとして診断された女性の約1~5%だけが診断時に遠隔転移を有するが、局所疾患を有する患者の約50%が結局5年以内に転移を伴って再発する。現在のところ、遠隔転移の出現からの生存期間の中央値は約3年である。

【0005】

乳がんを診断および病期分類する現行の方法には、American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. Philadelphia, Pa.: Lippincott-Raven Publishers, 5th ed., 1997, pp171-180、およびHarris, J R: 「Staging of breast carcinoma」、Harris, J. R., Hellman, S., Henderson, I. C., Kinne D. W. (eds.): Breast Diseases. Philadelphia, Lippincott, 1991に記載されているように、腫瘍のサイズ、リンパ節での腫瘍の存在、および遠隔転移の存在に依存する腫瘍-リンパ節-転移(TNM)システムがある。これらのパラメータは、予後診断を提供し、適切な治療法を選択するために使用される。腫瘍の形態学的外見もまた評価することができるが、類似の組織病理学的外見を有する腫瘍が顕著な臨床的変動を示すことがあるため、この取り組みには重大な制限がある。最終的に細胞表面マーカーのアッセイを使用して、ある腫瘍型をサブクラスに分けることができる。例えば、ER陰性腫瘍よりもER陽性乳がんの方が典型的にはタモキシフェンまたはアロマターゼ阻害剤などのホルモン療法に容易に応答することから、乳がんの予後および処置に考慮されている一つの因子として、エストロゲン受容体(ER)の存在がある。これらの分析は

10

20

30

40

50

有用であるが、それにもかかわらず乳房腫瘍の臨床的挙動を部分的に予測するだけであり、乳がんには、現行の診断手段では検出できず、現行の治療法では処置できない大きな表現型多様性が存在する。

【0006】

前立腺がんは、先進国世界の男性に最も多くみられるがんであり、米国における全てのがんの新症例の推定33%に相当し、2番目に多い死亡原因である(Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26)。前立腺特異性抗原(PSA)の血液検査の導入以来、前立腺がんの早期検出は生存率を劇的に向上し、診断時に局所および限局期の前立腺がんを有する患者についての5年生存率は、100%に近づきつつある。それにもかかわらず、患者の50%超がついには局所進行疾患または転移性疾患を発症する(Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16)。

10

【0007】

現在、前立腺全摘除術および放射線療法は、局所前立腺腫瘍の大部分に対して治療を提供する。しかし、進行した症例については治療の選択肢は非常に限られている。転移性疾患については、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニストを、単独でまたは抗アンドロゲンと組み合わせて用いたアンドロゲン除去が、標準的な処置である。それでも最大限のアンドロゲン遮断にかかわらず、疾患はほぼ常に進行し、大部分がアンドロゲン非依存性疾患を発症する。現在のところホルモン難治性前立腺がんについて一律に受け入れられている処置はなく、化学療法方式が一般に使用される(Muthuramalingam et al., 2004, Clin. Oncol. 16:505-16; Trojan et al., 2005, Anticancer Res. 25:551-61)。

20

【0008】

肺がんは、世界中で最も多くみられるがんであり、米国で3番目に多く診断されるがんであり、群を抜いて最も数の多いがんの死亡原因である(Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-96; Jemal et al., 2003, CA Cancer J. Clin. 53:5-26)。喫煙は、全肺がんの推定87%の原因と考えられており、これは、肺がんを最も徹底的に予防できる疾患にしている。肺がんは、全ての肺がんの90%超を占める二つの主要な種類である小細胞肺がん(SCLC)および非小細胞肺がん(NSCLC)に分けられる。SCLCは症例の15~20%を占め、太い中枢気道でのその発生および小さな細胞質を有する小細胞シートの組織組成を特徴とする。SCLCはNSCLCよりも侵襲性であり、急速に成長し、早期に高い頻度で転移する。NSCLCは全症例の80~85%を占め、組織学的性質に基づきさらに三つの主要サブタイプ、腺がん、扁平上皮がん(類表皮がん)、および大細胞未分化がんに分類される。

30

【0009】

肺がんは、典型的にはその経過の後期に症状が出現し、したがって診断後わずか6~12ヶ月の生存中央値およびわずか5~10%の5年全生存率を有する。外科手術が治療の絶好の機会を与えるが、わずかな割合の肺がん患者だけが適格であり、大多数は化学療法および放射線療法に頼る。これらの治療法のタイミングおよび用量や線量の強度を操作する試みにもかかわらず、過去15年間に生存率はほとんど増加していない(Spiro et al., 2002, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166:1166-96)。

【0010】

結腸直腸がんは、世界中で3番目に多くみられるがんであり、4番目に多いがんの死亡原因である(Weitz et al., 2005, Lancet 365:153-65)。全ての結腸直腸がんの約5~10%は遺伝性である。その主要な形態の一つは家族性腺腫性ポリポシス(FAP)であり、FAPは、罹患した個体の約80%が大腸腺腫性ポリポシス(APC)遺伝子に生殖系列突然変異を有する常染色体優性疾患である。結腸直腸がんは、周囲の成長により局所的に、かつリンパ、血行、経腹膜、および神経周囲への拡散によりその他の場所に浸潤する傾向を有する。リンパ外波及が最も多くみられる部位は肝臓であり、肺は最も高頻度に冒される腹部外器官である。血行性拡散のその他の部位には、骨、腎臓、副腎、および脳がある。

40

【0011】

結腸直腸がんの現行の病期分類システムは、腫瘍の腸壁貫通の程度と、リンパ節への波及の有無とに基づく。この病期分類システムは、三つの腫瘍デュークス分類により定義さ

50

れる：デュークスA疾患は、結腸または直腸の粘膜下層に限定される；デュークスB疾患は、固有筋層を通過して浸潤し、結腸壁または直腸壁を貫通できる腫瘍を有し；かつデュークスC疾患は、局所リンパ節転移を有する任意の程度の腸壁浸潤を含む。外科的切除は早期結腸直腸がん極めて有効であり、デュークスAの患者に95%の治癒率を提供するが、この治癒率はデュークスBの患者では75%に減少し、デュークスCの疾患における陽性リンパ節の存在は、5年以内の再発可能性を60%と予測する。術後化学療法を用いたデュークスCの患者の処置は、再発率を40%～50%に減少させるので、今やこれらの患者の標準的治療である。

【0012】

頭頸部上皮がんは、頭頸部の粘膜表面に発生し、典型的には扁平上皮細胞起源である。この分類には副鼻腔、口腔、ならびに鼻咽腔、中咽頭、下咽頭、および喉頭の腫瘍が含まれる。

【0013】

米国における頭頸部がんの年間新症例数は、1年に約40,000例であり、成人悪性腫瘍の約5%を占める。頭頸部がんは一部のその他の国ではさらに多くみられ、世界中の発症数はおそらく年間50万例を超える。北米およびヨーロッパでは、腫瘍は通常は口腔、中咽頭、または喉頭に生じ、鼻咽腔がんは地中海沿岸諸国および極東でより多くみられる。

【0014】

従来様式の治療法(放射線療法、化学療法、およびホルモン療法)は有用であるが、治療抵抗性がん細胞の出現により限定される。明らかに、頭頸部がんおよびがん一般を処置するための標的を同定するための新しい取り組みが必要である。

【0015】

がんは、正常な組織の発達および維持を制御するメカニズムの調節不全から生じ、ますます幹細胞が中心的な役割を果たすと考えられている(Beachy et al., 2004, Nature 432:324)。正常な動物の発生の際に、大部分または全ての組織の細胞は、幹細胞と呼ばれる正常な前駆細胞から派生する(Morrison et al., 1997, Cell 88:287-98; Morrison et al., 1997, Curr. Opin. Immunol. 9:216-21; Morrison et al., 1995, Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 11:35-71)。幹細胞は、(1)大規模な増殖能を有し；(2)非対称細胞分裂を行って、増殖能および/または発生能が低下した一種または複数種の子孫を発生することができ；かつ(3)自己複製または自己保全のために対称細胞分裂を行うことができる細胞である。幹細胞の分化による成体細胞複製の最もよく知られている例は、発生的に未熟な前駆細胞(造血幹細胞および造血前駆細胞)が、分子シグナルに応答して、様々な血液細胞型およびリンパ球型を形成する造血系である。腸、乳管系、および皮膚の細胞を含めたその他の細胞は、各組織中の幹細胞の小集団から絶えず補充され、最近の研究では、脳を含む大部分の他の成体組織もまた幹細胞を内部に有することが示唆されている。

【0016】

充実性腫瘍は、不均一な細胞集団から構成される。例えば乳がんは、がん細胞と、間葉(間質)細胞、炎症細胞、および内皮細胞を含めた正常細胞との混合物である。がんの古典的モデルは、表現型が別個のがん細胞集団の全てが増殖して新しい腫瘍を生む能力を有すると考える。古典的モデルでは、腫瘍細胞の不均一性は、環境因子と、多様な集団の腫瘍形成細胞を生じるがん細胞内で進行中の突然変異とが原因である。このモデルは、全ての腫瘍細胞集団がある程度の腫瘍形成能を有するであろうという考えに基づく(Pandis et al., 1998, Genes, Chromosomes & Cancer 12:122-129; Kuukasjrvi et al., 1997, Cancer Res. 57:1597-1604; Bonsing et al., 1993, Cancer 71:382-391; Bonsing et al., 2000, Genes Chromosomes & Cancer 82:173-183; Beerman H et al., 1991, Cytometry. 12:147-54; Aubele M & Werner M, 1999, Analyt. Cell. Path. 19:53; Shen L et al., 2000, Cancer Res. 60:3884)。

【0017】

観察された充実性腫瘍細胞の不均一性の代替モデルは、充実性腫瘍が「充実性腫瘍幹細胞」(または充実性腫瘍由来「がん幹細胞」)が原因であり、その細胞が続いて対称および

10

20

30

40

50

非対称の両方の細胞分裂の繰り返しにより無秩序な発生を受けるというものである。この幹細胞モデルでは、充実性腫瘍は、独特に限定された(まれな可能性さえある)サブセットの細胞を有し、そのサブセットは、大規模に増殖し、追加の充実性腫瘍幹細胞(自己複製)と、充実性腫瘍内で腫瘍形成能を欠如した大多数との両方を効率的に生じる点で、普通の「幹細胞」と性質を共有する。実際に、長期生存幹細胞集団の中の突然変異は、がん幹細胞の形成を開始するおそれがあり、がん幹細胞は、腫瘍の成長および維持の基礎となり、その存在は現在の治療アプローチが失敗する一因となる。

【0018】

がんの幹細胞的性質は、血液がんである急性骨髄性白血病(AML)で最初に明らかにされた(Lapidot et al., 1994, Nature 17:645-8)。さらに最近では、免疫不全マウスにおいて腫瘍を形成する能力が強化された、がん幹細胞の小さな別個の集団を、悪性ヒト乳房腫瘍が同様に内部に有することが実証された。ESA+、CD44+、CD24-/低、Lin-細胞集団は、未分画腫瘍細胞と比べて腫瘍形成性細胞が50倍濃縮されていることが見出された(Al-Hajj et al., 2003, PNAS 100:3983-8)。さらに、結腸がんにもまた同様の集団が存在する。腫瘍形成がん細胞を将来的に単離できることは、これらの細胞における腫瘍形成性の根底にある重大な生物学的経路の正確な研究を可能にし、したがって、がん患者のためのよりよい診断アッセイおよび治療法の開発を期待させる。本発明が向けられるのは、この目的や本明細書において記載するその他の目的である。

【0019】

本明細書において引用される全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイトならびにアクセッション番号/ポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列の両方を含むデータベース配列は、あたかも、各個々の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイトまたはアクセッション番号/データベース配列が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るのと同じ程度に、全ての目的でその全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【発明の概要】

【0020】

本発明は、腫瘍学の分野における組成物および方法に関する。具体的には、本発明は、一つには、LGR5 (ロイシンリッチリピートを含む、Gタンパク質共役型受容体5)などの、LGR(ロイシンリッチリピートを含む、Gタンパク質共役型受容体)タンパク質が、充実性腫瘍がん幹細胞において過剰発現されるタンパク質であり、かくして、がんの特徴付け、研究、診断および処置において有用ながん幹細胞マーカーであるという発見に基づいている。本発明は、R-スポンジンRSP01とLGR5との間の相互作用を、 β -カテニンシグナル伝達の活性化のための別経路としてさらに特定し、LGR5の機能的遮断が腫瘍増殖を阻害する可能性について示唆する。今回、LGR5とさらなるRSP0タンパク質RSP02、RSP03およびRSP04の各々との間の相互作用も同じように特定された。

【0021】

したがって、ある種の態様において、本発明は、LGRタンパク質を介した機能的なシグナル伝達を乱す生体分子、ある種の態様において、R-スポンジン(RSP0)タンパク質とLGR5などのLGRタンパク質との間の相互作用を阻害する分子などを提供する。ある種の態様において、生体分子は抗体である。例えば、ある種の態様において、生体分子は、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体、または少なくとも一種のヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体でありうる。ある種の態様において、本発明は、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質(例えば、一種、二種、三種または四種のヒトRSP0タンパク質)に特異的に結合し、かつ充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する抗体を提供する。ある種の態様において、少なくとも一種のRSP0タンパク質はRSP01である。ある種の態様において、本発明は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、かつ腫瘍細胞の増殖を阻害する抗体を提供する。ある種の態様において、LGRタンパク質はLGR5である。ある種の態様において、本発明は、腫瘍細胞の増殖を阻害する可溶性LGRタンパク質受容体を提供する。ある種の態様において、可溶性LGRタ

ンパク質受容体は可溶性LGR5受容体である。

【0022】

本発明は、がん幹細胞を含むがんを処置する方法をさらに提供する。ある種の態様において、がんを処置する方法は、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、少なくとも一種のRSP0タンパク質はRSP01である。ある種の態様において、がんを処置する方法は、LGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、LGRタンパク質はLGR5である。ある種の態様において、がんを処置する方法は、可溶性(例えば非膜貫通性の膜結合)LGRタンパク質受容体の治療的有効量を投与する段階を含む。ある種の態様において、可溶性LGRタンパク質受容体は可溶性LGR5受容体である。

10

【0023】

本発明は、(a) ヒトRSP0タンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱す、および/または(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤の治療的有効量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおけるがんを処置するおよび/またはヒトにおける腫瘍の増殖を阻害する方法をさらに提供する。いくつかの態様において、薬剤は抗体である。ある種の態様において、薬剤はヒトRSP0タンパク質に結合する。ある種の態様において、薬剤はヒトLGRタンパク質に結合する。ある種の態様において、薬剤は、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体である。ある種の代替的な態様において、薬剤は二種またはそれ以上のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体である。ある種の代替的な態様において、薬剤は、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。ある種の代替的な態様において、薬剤は、二種またはそれ以上のヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。ある種の態様において、薬剤は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む可溶性受容体である。ある種の態様において、LGRタンパク質はLGR5である。ある種の態様において、がんまたは腫瘍はがん幹細胞を含む。

20

【0024】

さらに、本発明は、(a) ヒトRSP0タンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱す、および/または(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤と腫瘍細胞を接触させる段階を含む、腫瘍細胞における β -カテニンシグナル伝達を阻害する方法を提供する。ある種の態様において、薬剤はヒトRSP0タンパク質に結合する。ある種の態様において、薬剤はヒトLGRタンパク質に結合する。ある種の代替的な態様において、薬剤は、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体である。ある種の代替的な態様において、薬剤は二種またはそれ以上のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体である。ある種の代替的な態様において、薬剤は、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。ある種の代替的な態様において、薬剤は、二種またはそれ以上のヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体である。ある種の態様において、薬剤は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む可溶性受容体である。ある種の態様において、LGRタンパク質はLGR5である。ある種の態様において、この方法はインビトロでの方法である。ある種の態様において、この方法はインビボでの方法である。

30

40

【0025】

本発明は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに結合し、かつ、(a) ヒトRSP0タンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱す; (b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す; および/または(c) β -カテニンシグナル伝達を阻害することにより充実性腫瘍(例えば、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍)の増殖を阻害できる抗体をさらに提供する。本発明は、(a) ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに結合し; (b) ヒトRSP0タンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱し; (c) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱し; (d) β -カテニンシグナル伝達を阻害し; および/または(e) 充実性腫瘍(例えば、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍)の増殖を阻害できる抗体も提供する。ある種の態様において、抗体

50

は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する。ある種の態様において、ヒトLGRタンパク質はLGR5である。ある種の態様において、ヒトRSP0タンパク質はRSP01である。いくつかの代替的な態様において、ヒトRSP0タンパク質はRSP02、RSP03またはRSP04である。抗体を産生する細胞株および抗体を含む組成物がさらに提供される。以下に限定されないが、腫瘍の増殖を阻害することによるなどの、がんを処置するための抗体を含む組成物の治療的有効量を使用する方法がさらに提供される。β-カテニンシグナル伝達を阻害するために、抗体をインビボまたはインビトロで使用方法も提供される。

【0026】

さらに、本発明は、ヒトRSP0タンパク質に結合し、かつ、(a) ヒトRSP0タンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱す；(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す；および/または(c) β-カテニンシグナル伝達を阻害することにより充実性腫瘍(例えば、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍)の増殖を阻害できる抗体をさらに提供する。あるいは、本発明は、(a) ヒトRSP0タンパク質に結合し；(b) ヒトRSP0タンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱し；(c) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱し；(d) β-カテニンシグナル伝達を阻害し；および/または(e) 充実性腫瘍(例えば、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍)の増殖を阻害できる抗体をさらに提供する。ある種の態様において、抗体はヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する。ある種の態様において、ヒトRSP0タンパク質はRSP01である。いくつかの代替的な態様において、ヒトRSP0タンパク質はRSP02、RSP03またはRSP04である。ある種の態様において、このヒトLGRタンパク質はLGR5である。抗体を産生する細胞株および抗体を含む組成物がさらに提供される。以下に限定されないが、腫瘍の増殖を阻害することによるなどの、がんを処置するための抗体を含む組成物の治療的有効量を使用する方法がさらに提供される。β-カテニンシグナル伝達を阻害するために、抗体をインビボまたはインビトロで使用方法も提供される。

【0027】

本発明は、ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗LGR5抗体88M1をさらに提供する。LGR5に特異的に結合し、かつ(a)88M1の重鎖可変領域および/もしくは軽鎖可変領域(それぞれ)に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域および/もしくは軽鎖可変領域を含む；(b)88M1の重鎖および/もしくは軽鎖CDRを含む；(c) 88M1に結合できるエピトープに結合する；ならびに/または(d) 競合的結合アッセイにおいて88M1と競合する抗体も提供される。抗体を産生する細胞株(ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株を含むが、これに限定されない)および抗体を含む組成物がさらに提供される。以下に限定されないが、腫瘍の増殖を阻害することによるなどの、がんを処置するための抗体を含む組成物の治療的有効量を使用する方法がさらに提供される。β-カテニンシグナル伝達を阻害するために、抗体をインビボまたはインビトロで使用方法も提供される。

【0028】

本発明は、がん幹細胞を特定するおよび/または単離する(例えば、LGR5の発現に基づき)、抗がん剤をスクリーニングする、ならびに本明細書に記載する薬剤での処置に対する適合性について患者をスクリーニングする方法をさらに提供する。

【0029】

本発明の局面または態様がマーカッシュ群または代替物に関するその他の群分けにより記載されている場合、本発明は、記載されている群全体をまとめて包含するだけでなく、個別に群の各成員も、主群のなかで可能なあらゆる下位群も包含し、群成員の一つまたは複数を欠いた主群も包含する。本発明は、特許請求する発明における群成員のいずれかの一つまたは複数の明示的な除外も想定する。

[項目1]

ヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)タンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、かつ充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する単離抗体であって、

(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質のLGR (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク

質共役型受容体)タンパク質への結合を乱し、かつ/または

(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す、単離抗体。

[項目2]

ヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)タンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、かつヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質のLGRタンパク質への結合を乱す、単離抗体。

[項目3]

ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、かつR-スポンジン(RSP0)によるLGR (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体)シグナル伝達の活性化を乱す、単離抗体。

[項目4]

ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質に特異的に結合し、かつ充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する単離抗体であって、

(a) RSP0タンパク質のロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)タンパク質への結合を乱し、かつ/または

(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す、単離抗体。

[項目5]

ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質に特異的に結合し、かつRSP0タンパク質のロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)タンパク質への結合を乱す、単離抗体。

[項目6]

ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質に特異的に結合し、かつRSP0によるLGR (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体)シグナル伝達の活性化を乱す、単離抗体。

[項目7]

LGRタンパク質がLGR5である、項目1～3または5のいずれか一項記載の抗体。

[項目8]

細胞外ドメインがヒトLGR5のアミノ酸番号22-564 (SEQ ID NO:1)を含む、項目1～3のいずれか一項記載の抗体。

[項目9]

LGRタンパク質がLGR4またはLGR6である、項目1～3または5のいずれか一項記載の抗体。

[項目10]

ヒトRSP0タンパク質がRSP01である、項目2または4～6のいずれか一項記載の抗体。

[項目11]

ヒトRSP0タンパク質がRSP02、RSP03またはRSP04である、項目2または4～6のいずれか一項記載の抗体。

[項目12]

モノクローナル抗体である、項目1～11のいずれか一項記載の抗体。

[項目13]

キメラ抗体である、項目12記載の抗体。

[項目14]

ヒト化抗体である、項目12記載の抗体。

[項目15]

ヒト抗体である、項目12記載の抗体。

[項目16]

二重特異性抗体である、項目1～11のいずれか一項記載の抗体。

[項目17]

抗体断片である、項目1～11のいずれか一項記載の抗体。

[項目18]

項目1～12のいずれか一項記載の抗体を産生する細胞株。

10

20

30

40

50

[項目19]

ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株。

[項目20]

項目19記載のハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体88M1。

[項目21]

項目20記載の抗体の重鎖CDRおよび/または軽鎖CDRを含む単離抗体。

[項目22]

競合的結合アッセイにおいて項目20記載の抗体と競合する単離抗体。

[項目23]

項目1～17または20～22のいずれか一項記載の抗体と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[項目24]

項目1～17または20～22のいずれか一項記載の抗体と第二の抗がん剤とを含む、薬学的組成物。

[項目25]

(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質およびヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)の結合を乱し、かつ/または(b)RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤の治療的有效量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおける腫瘍の増殖を阻害する方法。

[項目26]

(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質およびヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)の結合を乱し、かつ/または(b)RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤の治療的有效量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおけるがんを処置する方法。

[項目27]

ヒトが、がん幹細胞を含んだ腫瘍を含むか、またはがん幹細胞を含んだ腫瘍が切除されている、項目26記載の方法。

[項目28]

薬剤が、(a) ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインまたは(b) ヒトRSP0タンパク質に結合する抗体を含む、項目25～27のいずれか一項記載の方法。

[項目29]

ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体の治療的有效量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおけるがん幹細胞を含むがんを処置する方法であって、該抗体が

(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質のLGR (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体)タンパク質への結合を乱し、かつ/または

(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す、
方法。

[項目30]

LGRタンパク質がLGR5である、項目25～29のいずれか一項記載の方法。

[項目31]

抗体が、ヒトLGR5のアミノ酸番号22-564 (SEQ ID NO:1)を含む細胞外ドメインに結合する、項目28記載の方法。

[項目32]

ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質に特異的に結合する抗体の治療的有效量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおけるがん幹細胞を含むがんを処置する方法であって、該抗体が

(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質のLGR (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体)タンパク質への結合を乱し、かつ/または

(b) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す、

10

20

30

40

50

方法。

[項目33]

ヒトRSP0タンパク質がRSP01である、項目25～28または32のいずれか一項記載の方法。

[項目34]

ヒトRSP0タンパク質がRSP02、RSP03またはRSP04である、項目25～28または32のいずれか一項記載の方法。

[項目35]

抗体がモノクローナル抗体である、項目28～34のいずれか一項記載の方法。

[項目36]

抗体がキメラ抗体である、項目35記載の方法。

10

[項目37]

抗体がヒト化抗体である、項目35記載の方法。

[項目38]

抗体がヒト抗体である、項目35記載の方法。

[項目39]

ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体88M1の治療的有効量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおいてがんを処置するおよび/または腫瘍の増殖を阻害する方法であって、がんまたは腫瘍が、がん幹細胞を含む、方法。

20

[項目40]

抗体の治療的有効量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおいてがんを処置するおよび/または腫瘍の増殖を阻害する方法であって、がんまたは腫瘍が、がん幹細胞を含み、抗体が、(a)ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体88M1の重鎖CDRおよび/もしくは軽鎖CDRを含み、かつ/または(b)ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株によって産生されるモノクローナル抗体88M1と競合的結合アッセイにおいて競合する、方法。

[項目41]

ヒトに第二の抗がん剤の有効量を投与する段階をさらに含む、項目25～40のいずれか一項記載の方法。

30

[項目42]

充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害するヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む、可溶性受容体。

[項目43]

RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱すヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む、可溶性受容体。

[項目44]

LGRタンパク質がLGR5である、項目42または項目43記載の可溶性受容体。

[項目45]

細胞外ドメインがヒトLGR5のアミノ酸番号22-564 (SEQ ID NO:1)を含む、項目44記載の可溶性受容体。

40

[項目46]

非LGRタンパク質配列をさらに含む、項目44記載の可溶性受容体。

[項目47]

非LGRタンパク質配列がヒトFcを含む、項目46記載の可溶性受容体。

[項目48]

項目42～47のいずれか一項記載の可溶性受容体をコードする核酸を含む、単離ポリヌクレオチド。

[項目50]

ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む可溶性受容体の治療的有効量を投与する段階を含む、がん幹細胞を含むがんを処置する方法。

50

[項目51]

LGRタンパク質がLGR5である、項目50記載の方法。

[項目52]

細胞外ドメインがヒトLGR5のアミノ酸番号22-564 (SEQ ID NO:1)を含む、項目51記載の方法。

[項目53]

可溶性受容体が非LGRタンパク質配列を含む、項目51記載の方法。

[項目54]

非LGRタンパク質がヒトFcを含む、項目53記載の方法。

[項目55]

項目48記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[項目56]

項目48記載のポリヌクレオチドを含む細胞株。

[項目57]

(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質およびヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)の結合を乱し、かつ/または(b)RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤の有効量と腫瘍細胞を接触させる段階を含む、腫瘍細胞における β -カテニンシグナル伝達を阻害する方法。

[項目58]

インビトロでの方法である、項目57記載の方法。

[項目59]

インビボでの方法である、項目58記載の方法。

[項目60]

薬剤が、(a) ヒトLGR5の細胞外ドメインまたは(b) ヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体である、項目57～59のいずれか一項記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】LGR5は充実性腫瘍がん幹細胞において過剰発現される。ヒト結腸腫瘍由来の細胞をFACSによって、がん幹細胞を含む腫瘍形成性の「TG」分画(右棒グラフ)および非腫瘍形成性の「NTG」分画(左棒グラフ)に選別した。mRNAをこれらの分画から単離し、マイクロアレイデータを得た。LGR5は、三つの独立したヒト結腸腫瘍由来のTGがん幹細胞分画においていっそう高いmRNA発現を実証した(各セットの右棒グラフ)。

【図2】LGR5はヒト上皮腫瘍において過剰発現される。示されるのは、正常ヒト組織由来の組織試料と比べた、多数のヒト腫瘍由来のLGR5 mRNA発現に関するマイクロアレイデータである。個々の患者試料におけるLGR5の発現レベルを、表示した各組織型に対する横軸のなかに垂直破線で示してある。LGR5は大部分の腫瘍試料において、対応する正常組織における発現に比べ過剰発現されている。

【図3】LGR6はヒト上皮腫瘍において発現の変化を示す。示されるのは、正常ヒト組織由来の組織試料と比べた、多数のヒト腫瘍由来のLGR6 mRNA発現に関するマイクロアレイデータである。個々の患者試料におけるLGR6の発現レベルを、表示した各組織型に対する横軸のなかに垂直破線で示してある。LGR6の発現は多くの腫瘍試料において、対応する正常組織における発現に比べ発現の変化を示す。

【図4】RSP01は β -カテニンシグナル伝達を活性化する。8×TCFルシフェラーゼレポーター由来のルシフェラーゼ活性(y軸)を、表示濃度のRSP01-Fc(x軸)への曝露後に測定した。RSP01-Fcは用量依存的に β -カテニン応答性プロモーター由来のルシフェラーゼ活性を誘導した。

【図5】可溶性LGR5 (LGR5-Fc)はRSP01による β -カテニンシグナル伝達の誘導を阻害する。8×TCFルシフェラーゼレポーターをトランスフェクトした細胞由来のルシフェラーゼ活性(y軸)を、対照培地(四角形、RSP0なし)または漸増濃度の可溶性LGR5と組み合わせたRSP01-Fc(菱形、RSP02.5 μ g)への曝露に応じて測定した。

10

20

30

40

50

【図 6 A】RSP01およびWnt3Aによる β -カテニンシグナル伝達の相乗的誘導を可溶性LGR5は阻害するが、可溶性FZD10は阻害しない。A) 可溶性LGR5は、RSP01およびWnt3Aによる β -カテニンシグナル伝達の相乗的誘導を阻害する。8×TCFルシフェラーゼレポーターをトランスフェクトした細胞由来のルシフェラーゼ活性(y軸)を、対照培地(菱形、LCM);RSP01およびLCM(四角形、RSP0 + LCM); Wnt3A (三角形); ならびにRSP01に加えてWnt3A (十字形)への曝露に応じて測定した。漸増濃度の可溶性LGR5(x軸)は、RSP01およびWnt3Aによるルシフェラーゼ活性の相乗的誘導を低減した。

【図 6 B】RSP01およびWnt3Aによる β -カテニンシグナル伝達の相乗的誘導を可溶性LGR5は阻害するが、可溶性FZD10は阻害しない。B) 可溶性FZD10は、RSP01およびWnt3Aによる β -カテニンシグナル伝達の相乗的誘導を阻害しない。8×TCFルシフェラーゼレポーターをトランスフェクトした細胞由来のルシフェラーゼ活性(y軸)を、対照培地(菱形、LCM);RSP01およびLCM(四角形、RSP0 + LCM); Wnt3A (三角形); ならびにRSP01に加えてWnt3A(十字形)への曝露に応じて測定した。漸増濃度の可溶性LGR5(x軸)は、RSP01およびWnt3Aによるルシフェラーゼ活性の相乗的誘導を低減した。

【図 7 A】RSP01はLGR5への結合を介して β -カテニンシグナル伝達を活性化する。A)RSP01-CD4TMおよびGFPを一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞を、図のようにLGR5-Fc、LRP6FL-Fc、LRP6E1-2-Fc、またはFZD1-10-Fcとともにインキュベートした。GFP(x軸)およびFc融合タンパク質結合(y軸)に基づくFACSから、RSP01とLGR5との間の結合が実証された(左上)。RSP01だけではLRP6に弱くしか結合できず、いずれのFZDとも相互作用できなかった。

【図 7 B】RSP01はLGR5への結合を介して β -カテニンシグナル伝達を活性化する。B)FLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPを一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞を、ヘパリンの存在下、RSP01-Fc(上)、FZD8-Fc(中央)、または陽性対照としてFLAG抗体(下)とともに(二つ組で)インキュベートした。GFP(x軸)およびFc融合タンパク質結合(y軸)に基づくFACSから、RSP01と、FZD8ではなくLGR5との間の結合が実証された。

【図 7 C】RSP01はLGR5への結合を介して β -カテニンシグナル伝達を活性化する。C)全てのRSP0ファミリーメンバーがLGR5に結合することができる。FLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPを一過的にトランスフェクトしたHEK293細胞をヘパリンの存在下、図のようにRSP01-Fc、RSP02-Fc、RSP03-Fc、RSP04-Fc、FZD8-Fc、または陽性対照としてFLAG抗体とともにインキュベートした。GFP(x軸)およびFc融合タンパク質結合(y軸)に基づくFACSから、各FACSプロットの右上側の枠で囲まれた象限内のFACSシグナルによって示されるように、各RSP0ファミリーメンバーとLGR5との間の結合が実証された。

【図 8】LGR5に対するmAbの特定。FLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPを一過的にトランスフェクトしたHEK 293細胞を、陰性(IgG1対照)として無関係の抗体とともに、もしくはLGR5発現の陽性対照として抗FLAG抗体とともに、またはLGR5に対するmAb(88M1、88M5)とともにインキュベートし、その後、PE結合蛍光抗mAb二次試薬とのインキュベーションを行った。次いで、試料をフローサイトメトリーにより解析した。88M1および88M5は特異的なLGR5結合を示すことが分かった。

【図 9】LGR5へのRSP0の結合を阻害するmAbの特定。HEK 293細胞をFLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPで一過的にトランスフェクトした。融合タンパク質RSP01-Fcとトランスフェクト細胞の結合を、PE結合抗ヒトFcとのインキュベーションによって検出した。RSP0の結合に及ぼす抗LGR5抗体88M1の影響を、図のように88M1との細胞のインキュベーションおよびフローサイトメトリーを用いた解析によって評価した。実験から、88M1がLGR5へのRSP01の結合を低減したことが明らかである。

【発明を実施するための形態】

【0031】

発明の詳細な説明

本発明は、がんを特徴付ける、研究する、診断する、および処置するための組成物および方法を提供する。具体的には、本発明は、充実性腫瘍がん幹細胞のマーカーとしてLGR5を提供し、LGR5とRSP0タンパク質RSP01(ならびにRSP02、RSP03およびRSP04)との間の新規

10

20

30

40

50

の相互作用を、 β -カテニンシグナル伝達の活性化のための別経路と特定する。機能的なLGR5シグナル伝達の妨害を含めて、このLGR5シグナル伝達経路の操作は、がんの処置のための新規の組成物および方法を提供する。

【0032】

本発明は、一つには、樹立された充実性腫瘍の異種細胞集団内の、異なるわずかの細胞サブセットとしての充実性腫瘍幹細胞(がん幹細胞または充実性腫瘍がん幹細胞ともいわれる)の発見に基づいている。これらのがん幹細胞は、広範囲にわたって増殖し、さらなる充実性腫瘍幹細胞(自己再生)も、腫瘍形成能を欠いた充実性腫瘍のうちの腫瘍細胞の大部分も、ともに効率的に生み出すという点で正常幹細胞の特性を持っている。がん幹細胞の特定は、1)大半の非腫瘍形成性の腫瘍細胞からそれらを単離するのに用いられる細胞表面受容体の、そのユニークなパターンの発現と、2)異種移植片動物モデルで評価したときの、その自己再生および増殖の特性との両方に依る。

【0033】

ある種の態様において、本発明はしたがって、がん幹細胞に対する診断剤または治療剤を選択的に標的とするための方法を提供する。ある種の態様において、本発明は、がん幹細胞を選択的に標的とする(例えば本明細書において開示される結腸がん幹細胞がんマーカーの一つに向けられる)生体分子などの薬剤も提供する。ある種の態様において、標的となる幹細胞がんマーカーは、自己再生経路または細胞生存経路の一部である。ある種の態様において、本発明は、抗がん剤をスクリーニングするための;抗がん治療の検査のための;新規の経路を標的とする薬物の開発のための;新しい抗がん治療標的の特定のための;病理標本における悪性細胞の特定および診断のための;充実性腫瘍幹細胞の薬物感受性の検査およびアッセイのための;薬物感受性を予測する、特定因子の測定のための;ならびに患者のスクリーニングのための(例えば乳房エックス線撮影法の補助としての)方法を提供する。

【0034】

がん幹細胞に関するさらなる手引きは、Regents of the University of Michiganによる公開されたPCT特許出願W002/12447およびRegents of the University of MichiganによるPCT特許出願PCT/US02/39191において提供されており、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる。

【0035】

本発明は、がん幹細胞の発現には、非腫瘍形成性の腫瘍細胞と比べてLGR5 (ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体5)のレベルの上昇が含まれると特定するものである。LGR5は、LGR4、LGR5およびLGR6を含む、比較的大きな細胞外ドメインを有するオーファンな7回膜貫通型ドメインタンパク質の小ファミリーの一員である。

【0036】

本発明は、 β -カテニンシグナル伝達の別経路を活性化する、RSP01とLGR5との間の相互作用をさらに特定する。R-スポンジン(RSP0)は、Wntシグナル伝達と似た形で β -カテニンを刺激することが最近になって認識された四つの小分泌タンパク質のファミリーである。興味深いことに、WntおよびRSP0タンパク質は著明な相乗作用を示す。最近では、RSP0による β -カテニンの活性化が、Frizzled受容体ファミリーおよびLRP5,6共受容体ファミリーの成員を通じて媒介されることが示唆されている(Nametal., 2006, JBC 281:13247-57)。

【0037】

Wntシグナル伝達経路は、ある種の腫瘍の経路を活性化する突然変異(例えば、結腸がんではAPC突然変異)の存在と、構成的導入遺伝子として発現された場合にまたはレトロウイルスによる挿入の後に(例えばwWnt1乳房腫瘍モデル)、がんを推進するある種のWNTの能力とに起因して、長い間、がんに関与すると考えられてきた。しかしながら、Wntタンパク質それ自体が、いずれかの自発的なヒト腫瘍を推進するという実証は、驚くほど捉え難いことが分かっている。

【0038】

本発明は、腫瘍細胞において活性化 β -カテニンをもたらす可能性のある、RSP0タンパク質およびLGRタンパク質を介した別経路を特定するものである。理論によって束縛されるわけではないが、このモデルは、 β -カテニンの誘導時にR-スポンジンとWntが示す著明な相乗作用が観察されることから、LGR受容体ファミリーの成員がWntに応答して β -カテニンのレベルをゲート制御する「可変抵抗器」として機能している可能性を示唆する。腫瘍は著しく上昇したLGR5のレベルを示すので、それらは結果的に、「通常」レベルのWntタンパク質にもかかわらず、 β -カテニンの上昇を示しうる。

【0039】

一部これらの発見に基づき、本発明は、ある種の態様において、少なくとも一種のLGRタンパク質(例えばLGR5)への、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質の結合を乱す薬剤を提供する。ある種の態様において、薬剤はRSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す。さらなる態様において、薬剤は、がん幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を含め、腫瘍増殖を阻害する。いくつかの態様において、薬剤は、少なくとも一種のRSP0タンパク質に特異的に結合するまたは少なくとも一種のLGRタンパク質に結合する抗体である。いくつかの態様において、薬剤は、二種もしくはそれ以上のRSP0タンパク質に特異的に結合するまたは二種もしくはそれ以上のLGRタンパク質に結合する抗体である。これらの薬剤を含む組成物およびがん(特に、以下に限定されないが、がん幹細胞を含むもの)の処置におけるその使用がさらに提供される。

【0040】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、下記の詳細な説明から明らかであろう。

【0041】

定義

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および語句を以下に定義する。

【0042】

「抗体」とは、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖質、ポリヌクレオチド、脂質などのような標的を、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも一つの抗原識別部位によって認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子である。本明細書で用いる場合、この用語は、最も広い意味で用いられ、抗体が所望の生物活性を示す限り、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体断片(Fab、Fab'、F(ab')₂およびFv断片などの)、一本鎖Fv(scFv)変異体、少なくとも二つの無傷の抗体から作製された二重特異性抗体などの多重特異性抗体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む改変されたその他任意の免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、それぞれ α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ といわれる重鎖定常ドメインの同一性に基づき、五つの主要なクラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM、またはそのサブクラス(アイソタイプ)(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)のいずれかでありうる。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造および三次元構造を有する。抗体はありのままで、または毒素、放射性同位体などのような他の分子に結合されていてもよい。

【0043】

本明細書で用いる場合、「抗体断片」という用語は、無傷の抗体の一部をいう。抗体断片の例としては直鎖状抗体；一本鎖抗体分子；FcまたはFc'ペプチド、FabおよびFab断片、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されることはない。

【0044】

本明細書で用いる場合、「ヒト化」形態の非ヒト(例えばマウス)抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する配列を最低限含むかまたは含まないキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類などの非ヒト種(ドナー抗体)の超可変領域由来の残基に置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)の残基が、対応

する非ヒト残基に置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にまたはドナー抗体に見られない残基を含むこともできる。これらの改変は一般的に、抗体の性能にさらに磨きをかけるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR残基の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部を含むこともできる。ヒト化抗体を作製するために用いられる方法の例は、Winterらの米国特許第5,225,539号(参照により本明細書に組み入れられる)に記載されている。

【0045】

本明細書で用いる「ヒト抗体」という用語は、ヒトによって産生された抗体、または当技術分野において公知の任意の技術を用いて作出された、ヒトによって産生された抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義には、無傷もしくは全長の抗体、その断片、および/または、例えば、マウス軽鎖およびヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体など、少なくとも一つのヒト重鎖および/または軽鎖ポリペプチドを含む抗体が含まれる。

【0046】

「ハイブリッド抗体」とは、異なる抗原決定領域を有する抗体由来の重鎖および軽鎖の対が組み合わされている免疫グロブリン分子であり、その結果、生じる四量体によって二つの異なるエピトープまたは二つの異なる抗原を認識および結合することができる。

【0047】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が二つまたはそれ以上の種に由来する抗体をいう。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性および能力を有する、一つの哺乳動物種(例えばマウス、ラット、ウサギなど)に由来する抗体の可変領域に対応するが、定常領域は、その種での免疫反応の誘発を回避するために別の種(通常はヒト)に由来する抗体中の配列と相同である。

【0048】

「エピトープ」または「抗原決定基」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、特定の抗体により認識され特異的に結合されうる抗原のその部分をいう。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは連続的なアミノ酸からも、タンパク質の三次元的折り畳みによって近接して並べられた非連続的なアミノ酸からも形成されうる。連続的なアミノ酸から形成されたエピトープは、タンパク質が変性した場合にも典型的には維持されるが、三次元的折り畳みによって形成されたエピトープは、タンパク質が変性すると典型的には失われる。エピトープは、典型的には、特有の空間的配置の中に少なくとも3アミノ酸、より一般的には、少なくとも5アミノ酸または8~10アミノ酸を含む。抗原決定基は抗体との結合で無傷の抗原(すなわち、免疫反応を誘発するために用いられる「免疫原」と競合することができる。

【0049】

抗体がエピトープに「特異的に結合する」、またはエピトープへの「特異的結合」を示すことは、抗体が別の物質よりもエピトープに、高頻度で、迅速に、長い持続時間、および/または高い親和性で反応または会合することを意味する。本明細書で用いる場合、「特異的に結合する」とは、抗体が少なくとも約0.1mM、少なくとも約1 μ M、少なくとも約0.1 μ Mもしくはそれ以下、または0.01 μ Mもしくはそれ以下の K_D でタンパク質に結合することを意味する。第一の標的に特異的に結合する抗体または結合部分は、第二の標的に特異的に結合してもしなくてもよいことが理解されよう。したがって、「特異的結合」とは、排他的な結合、すなわち単一の標的との結合を(含むことができるが)必ずしも必要としない。一般的に、しかし必ずというわけではないが、結合への言及は特異的結合を意味する。

【0050】

本明細書で用いる「非特異的結合」および「バックグラウンド結合」という用語は、抗

10

20

30

40

50

体およびタンパク質またはペプチドの相互作用に関して用いられる場合、特定の構造の存在に依らない相互作用(すなわち、抗体がエピトープなどの特定の構造ではなくタンパク質全般に結合していること)をいう。

【0051】

本明細書で用いる場合、「受容体結合ドメイン」という用語は、細胞接着分子を含め、受容体に対する任意の天然のリガンドまたは対応する天然のリガンドの質的な受容体結合能を少なくとも保持している、そのような天然のリガンドの任意の領域または誘導体をいう。

【0052】

本明細書で用いる場合、「抗体-イムノアドヘシンキメラ」という用語は、抗体の少なくとも一つの結合ドメインを少なくとも一つのイムノアドヘシンと組み合わせた分子を含む。例としては、Bergetal., PNAS (USA) 88:4723-4727 (1991)およびCharnow et al., J. Immunol., 153:4268(1994)に記載されている二重特異性CD4-IgGキメラが挙げられるが、これに限定されることはなく、それらの文献のどちらも参照により本明細書に組み入れられる。

【0053】

濃縮された細胞の集団におけるように「濃縮された」とは、未分画の細胞セットにおける特定のマーカー(例えば表1に示されるように)を有する細胞数と比べて、分画された細胞セットにおけるそのマーカーを有する細胞数の増大に基づき表現型の上で定義することができる。しかしながら、「濃縮された」という用語は、被験マウスにおいて限界希釈頻度で腫瘍を形成する最小の細胞数として、腫瘍形成機能により機能の上で定義することもできる。例えば、500個の腫瘍幹細胞は63%の被験動物に腫瘍を形成するが、63%の被験動物に腫瘍を形成するために5000個の未分画腫瘍細胞が必要ならば、充実性腫瘍幹細胞集団は腫瘍形成活性について10倍濃縮されている。本発明の幹細胞がんマーカーは、濃縮されたがん幹細胞の集団を生成するために用いることができる。いくつかの態様において、幹細胞集団は未分画腫瘍細胞に対して少なくとも1.4倍濃縮されている。他の態様において、幹細胞集団は未分画腫瘍細胞に対して2倍から10倍濃縮されている。さらなる態様において、幹細胞集団は未分画腫瘍細胞に対して20倍濃縮されている。

【0054】

細胞に関して「単離された」とは、細胞の天然環境(充実性腫瘍中などの)から取り出され、かつ単離または分離された細胞であって、天然には一緒に存在するが、細胞が単離された根拠となるマーカーを持たない他の細胞を少なくとも約30%、50%、75%含んでいない、または約90%含んでいない細胞をいう。本発明の幹細胞がんマーカーは、単離されたがん幹細胞の集団を生成するために用いることができる。

【0055】

本明細書で用いる場合、「がん」および「がん性」という用語は、細胞の集団が無秩序な細胞増殖によって特徴付けられる、哺乳動物における生理学的状態をいうかまたは記載する。がんの例としては、がん腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病が挙げられるが、これらに限定されることはない。そのようながんのさらに詳細な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、肺扁平上皮がん、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がん、膵臓がん、膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝細胞腫、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎臓がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝がん、および様々な種類の頭頸部がんが挙げられる。

【0056】

本明細書で用いる「転移」とは、身体の出現部位から他の領域にがんが拡散または移動し、新たな場所での類似のがん性病変の発生を伴う過程をいう。「転移」または「転移性」細胞は、隣接する細胞との接着性接触を失い、疾患の原発部位から血流またはリンパを介して移動し、隣接する身体構造に浸潤する細胞である。

【0057】

本明細書で用いる場合、「被験体」という用語は、特定の処置のレシピエントであるべき、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含むが、これらに限定されない、任意の動物(例えば、哺乳動物)をいう。典型的には、「被験体」および「患者」という用語は本明細書において、ヒト被験体に関して互換的に用いられる。

【0058】

本明細書で用いる場合、「がんを有すると疑われる被験体」という用語は、がんを示す一つもしくは複数の症状(例えば、顕著な腫瘍もしくは塊)を呈する被験体、またはがんについて(例えば、定期検診時に)スクリーニングされている被験体をいう。がんを有すると疑われる被験体は、一つまたは複数のリスク因子を有することもある。がんを有すると疑われる被験体は一般に、がんについて検査されていない。しかしながら、「がんを有すると疑われる被験体」とは、初回診断を受けたもののがんの病期は分からない個体を包含する。この用語は、かつてがんを有した者(例えば、寛解期の個体)をさらに含む。

10

【0059】

本明細書で用いる場合、「がんのリスクがある被験体」という用語は、特定のがんを発症する一つまたは複数のリスク因子を有する被験体をいう。リスク因子には、性別、年齢、遺伝的素因、環境曝露、がんの病歴、がん以外の既存の疾患、および生活様式が含まれるが、これらに限定されることはない。

【0060】

本明細書で用いる場合、「被験体におけるがんを特徴付ける」という用語は、良性組織、前がん組織またはがん組織の存在、がんの病期、および対象の予後を含むがこれらに限定されない、被験体におけるがん試料の一つまたは複数の性質の特定をいう。本明細書において開示されるがんマーカーを含むがこれに限定されない、一つまたは複数のがんマーカー遺伝子の発現の特定によってがんを特徴付けることができる。

20

【0061】

「がん幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「充実性腫瘍幹細胞」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、(1) 高い増殖能を有し；(2) 増殖能または発生能の低下した一つまたは複数の種類の分化した子孫を生じるために非対称細胞分裂が可能であり；(3) 自己再生または自己維持のための対称細胞分裂が可能であり；および(4) 異種移植モデルにおける連続移植によって触知可能な腫瘍を形成することができる、充実性腫瘍由来の細胞集団をいう。「がん幹細胞」、「腫瘍幹細胞」、または「充実性腫瘍幹細胞」のさらに高い増殖能ならびに非対称および対称細胞分裂という性質は、腫瘍を生み出せない大多数の腫瘍細胞に比べ、免疫不全マウスへの連続移植によって触知可能な腫瘍を形成する能力を、それらのがん幹細胞に与える。がん幹細胞は、自己再生対分化を無秩序に起こし、突然変異が生じるにつれて経時的に変化しうる異常な細胞型を持った腫瘍を形成する。本発明の充実性腫瘍幹細胞は、米国特許第6,004,528号によって提供される「がん幹細胞系」とは異なる。その特許においては、「がん幹細胞系」は、それ自体ほとんど突然変異を持たないが、細胞の環境中で起こる腫瘍形成性の変化の結果として非対称細胞分裂よりも対称細胞分裂を起こす増殖の遅い前駆細胞型と定義される。この「がん幹細胞系」仮説はこのように、異常な環境の結果として主に、高度に突然変異した、迅速に増殖する腫瘍細胞が生じ、これは比較的正常な幹細胞を蓄積させ、次にそれらの細胞を腫瘍細胞にさせる突然変異を起こさせると提唱している。米国特許第6,004,528号は、そのようなモデルを用いてがんの診断を促進できると提案している。充実性腫瘍幹細胞モデルは「がん幹細胞系」モデルとは根本的に異なり、その結果として「がん幹細胞系」モデルによっては与えられない有用性を示す。第一に、充実性腫瘍幹細胞は「突然変異を免れて」はいない。米国特許第6,004,528号によって記載されている「突然変異を免れたがん幹細胞系」は、前がん病変と考えられうるが、本発明によって記載される充実性腫瘍幹細胞はそれ自体が、腫瘍形成に関わる突然変異を含んだがん細胞である。すなわち、本発明の充実性腫瘍幹細胞(「がん幹細胞」)は、米国特許第6,004,528号における「がん幹細胞系」とは区別される、高度に突然変異した細胞に含まれると考えられる。第二に、がんに至る遺伝子突然変異は、環境的なものだけではなく、大部分は充実性腫瘍幹細胞内に内在するものであり

30

40

50

うる。単離された充実性腫瘍幹細胞は移植の際に追加の腫瘍を生じることが充実性腫瘍幹細胞モデルから予測される(したがって転移が説明される)が、「がん幹細胞系」モデルによっては、腫瘍形成性であったのはその細胞の異常な環境であったことから、移植された「がん幹細胞系」細胞は新しい腫瘍を生じることができないと予測されよう。実際に、解離されかつ表現型の上で単離されたヒト充実性腫瘍幹細胞をマウスに(通常の腫瘍の環境とはかなり異なる環境へ)移植し、そこでその幹細胞がさらに新しい腫瘍を形成できることから、本発明は「がん幹細胞系」モデルとは区別される。第三に、充実性腫瘍幹細胞は、対称的にも非対称的にも分裂する可能性が高く、したがって対称細胞分裂は絶対的な性質ではない。第四に、充実性腫瘍幹細胞は、多くの可変要素に依って、迅速にも低速にも分裂することができ、したがって遅い増殖速度が決定的な特徴ではない。

10

【0062】

本明細書で用いる場合「腫瘍形成性の」とは、自己再生(さらなる腫瘍形成性のがん幹細胞を生ずる)および他の全ての腫瘍細胞を産生する増殖(分化した、すなわち、非腫瘍形成性の腫瘍細胞を生ずる)という特性を含め、充実性腫瘍幹細胞が腫瘍を形成することを可能にする、充実性腫瘍幹細胞の機能的な特徴をいう。連続移植によって腫瘍を形成できない大多数の腫瘍細胞と比べて、自己再生および他の全ての腫瘍細胞を産生する増殖というこれらの特性は、免疫不全マウスへの連続移植によって触知可能な腫瘍を形成する能力を、本発明のがん幹細胞に付与している。腫瘍細胞、すなわち非腫瘍形成性の腫瘍細胞は、充実性腫瘍から腫瘍細胞を得た後では限られた回数(例えば1回または2回)しか免疫不全マウスへの移植時に腫瘍を形成することができない。

20

【0063】

本明細書で用いる場合、「幹細胞がんマーカー」、「がん幹細胞マーカー」、「腫瘍幹細胞マーカー」、または「充実性腫瘍幹細胞マーカー」という用語は、単独でのまたは他の遺伝子との組み合わせでの発現レベルが、非腫瘍形成性の細胞と比べて腫瘍形成性のがん細胞の存在と相関する、遺伝子、または遺伝子によって発現されるタンパク質、ポリペプチドもしくはペプチドをいう。この相関は、遺伝子発現の増加または減少(例えば、遺伝子によってコードされるmRNAまたはペプチドレベルの増加または減少)のいずれかに関係しうる。

【0064】

本明細書で用いる場合、「未分画腫瘍細胞」、「選別前の腫瘍細胞」、「腫瘍細胞全体」という用語およびそれらの文法的同等語は、細胞表面マーカーの発現に基づき、隔離も分画もされていない患者試料(例えば腫瘍生検または胸水)から単離された腫瘍細胞集団をいうように互換的に用いられる。

30

【0065】

本明細書で用いる場合、「非ESA+CD44+腫瘍細胞」、「非ESA+44+」、「選別された非腫瘍形成性の腫瘍細胞」、「非幹細胞」という用語およびそれらの文法的同等語は、細胞表面マーカーの発現に基づき、ESA+CD44+がん幹細胞が隔離または除去された腫瘍集団をいうように互換的に用いられる。

【0066】

本明細書で用いる場合、「遺伝子発現」という用語は、遺伝子にコードされている遺伝情報を、遺伝子の「転写」を通じて(例えば、RNAポリメラーゼの酵素作用を介して)RNA(例えば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA)に、およびタンパク質をコードしている遺伝子の場合、mRNAの「翻訳」を通じてタンパク質に変換する過程をいう。遺伝子発現は、この過程の多数の段階で制御することができる。「上方制御」または「活性化」とは、遺伝子発現産物(例えば、RNAまたはタンパク質)の産生を増加させる制御をいうが、「下方制御」または「抑制」とは、産生を減少させる制御をいう。上方制御または下方制御に関与する分子(例えば、転写因子)は、それぞれ「活性化因子」および「抑制因子」と呼ばれることが多い。

40

【0067】

遺伝子発現に関して「高レベル」、「レベルの増加」、「高発現」、「発現の増加」、

50

「レベルの上昇」または「上方制御された発現」という用語は、第二の細胞または細胞の集団、例えば、未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞におけるその遺伝子の発現よりも高レベルの、細胞または細胞の集団、特にがん幹細胞またはがん幹細胞の集団における遺伝子の発現をいうように本明細書において互換的に用いられる。遺伝子発現の「レベルの上昇」とは、未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞における遺伝子の発現レベルの2倍またはそれ以上のレベルでのがん幹細胞またはがん幹細胞の集団における遺伝子の発現をいう。遺伝子発現の「レベルの上昇」とは同様に、未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞における遺伝子の発現レベルの6倍またはそれ以上のレベルでの、がん幹細胞またはがん幹細胞の集団における遺伝子の発現をいう。遺伝子発現の「レベルの上昇」は、例えば、定量的RT-PCRまたはマイクロアレイ分析により、未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞と比べて、がん幹細胞におけるポリヌクレオチド(mRNA、cDNAなど)の増加量を検出することによって判定することができる。あるいは遺伝子発現の「レベルの上昇」は、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、定量的免疫蛍光法により、未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞と比べて、がん幹細胞におけるタンパク質の増加量を検出することによって判定することもできる。

10

【0068】

本明細書で用いる場合、遺伝子発現に関して「検出不可能なレベル」または「発現の欠如」という用語は、従来技術によってはバックグラウンドと区別できず、発現が特定されないレベルでの、細胞または細胞の集団、特にがん幹細胞またはがん幹細胞の集団における遺伝子の発現をいう。遺伝子発現の「検出不可能なレベル」は、がん幹細胞において、例えば定量的RT-PCRまたはマイクロアレイ分析によりバックグラウンドを上回るポリヌクレオチド(mRNA、cDNAなど)のレベルを検出できないことによって判定することができる。あるいは遺伝子発現の「検出不可能なレベル」は、がん幹細胞において、例えばELISA、ウエスタンブロット、または免疫蛍光法によりバックグラウンドを上回るタンパク質のレベルを検出できないことによって判定することもできる。

20

【0069】

本明細書で用いる場合、遺伝子発現に関して「低レベル」、「レベルの減少」、「低発現」、「発現の低下」または「発現の減少」という用語は、第二の細胞または細胞の集団、例えば未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞における遺伝子の発現よりも低レベルでの、細胞または細胞の集団、特にがん幹細胞またはがん幹細胞の集団における遺伝子の発現をいうように本明細書において互換的に用いられる。遺伝子発現の「低レベル」は、(1)未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞における遺伝子の発現レベルの2分の1またはそれ以下および(2)従来技術による検出下限のレベルでの、がん幹細胞またはがん幹細胞の集団における遺伝子の発現をいう。遺伝子発現の「低レベル」は、例えば、定量的RT-PCRまたはマイクロアレイ分析により、未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞と比べてがん幹細胞におけるポリヌクレオチド(mRNA、cDNAなど)がほとんど検出不可能な量にまで減少したことを検出することによって判定することができる。あるいは遺伝子発現の「低レベル」は、例えば、ELISA、ウエスタンブロット、または定量的免疫蛍光法により未分画結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞と比べてがん幹細胞におけるタンパク質がほとんど検出不可能な量にまで減少したことを検出することによって判定することもできる。

30

40

【0070】

本明細書で用いる場合、「発現レベルを特異的に検出する試薬」という用語は、一つまたは複数の遺伝子の発現を検出するために用いられる試薬(例えば、本発明のがんマーカーを含むが、これに限定されない)をいう。適当な試薬の例としては、関心対象の遺伝子と特異的にハイブリダイズできる核酸プローブ、アプタマー、関心対象の遺伝子の特異的に増幅できるPCRプライマー、および関心対象の遺伝子によって発現されるタンパク質に特異的に結合できる抗体が挙げられるが、これらに限定されることはない。他の非限定的な例は、以下の説明および例のなかで見出すことができる。

【0071】

50

本明細書で用いる場合、「非がん性対照に比べて発現の減少または増加を検出する」という用語は、非がん性対照試料におけるレベルに比べて遺伝子の発現レベル(例えば、mRNAまたはタンパク質のレベル)を測定することをいう。遺伝子発現は、本明細書に記載するものを含むがこれに限定されない、任意の適当な方法を用いて測定することができる。

【0072】

本明細書で用いる場合、「診断の提供」または「診断の情報」とは、患者が疾患または状態を有するかどうかを判定するうえで、および/あるいは表現型の分類にまたは疾患もしくは状態の予後もしくは処置(一般的な処置または任意の特定の処置のいずれか)に対して予想される反応に関して重要性を有する任意の分類に、疾患または状態を分類するうえで有用な任意の情報をいう。同様に、診断とは、被験体が状態(腫瘍などの)を有する可能性が高いかどうかということを含むがこれに限定されない、任意の種類の診断情報、例えば高リスク腫瘍もしくは低リスク腫瘍のような腫瘍の性質もしくは分類に関する情報、予後に関する情報および/または適切な処置の選択に有用な情報を提供することもいう。処置の選択には、特定の化学療法剤または外科手術もしくは放射線照射などの他の処置法の選択、または治療を控えるか行うかの選択が含まれる。

10

【0073】

本明細書で用いる場合、「予後診断を提供する」、「予後診断の情報」または「予測情報」という用語は、被験体の将来の健康に対するがんの存在(例えば、本発明の診断方法によって判定された)の影響に関する情報(例えば、予想される罹患率または死亡率、がんになる尤度、および転移のリスク)を提供することをいう。

20

【0074】

本明細書で用いる場合、「術後腫瘍組織」という用語は、被験体から(例えば、外科手術の間に)取り出されたがん性組織(例えば、生検組織)をいう。

【0075】

本明細書で用いる場合、「がんと診断された被験体」という用語は、検査されて、がん性細胞を有することが見出された被験体をいう。がんは、生検、X線、血液検査、および本発明の診断方法を含むがこれらに限定されない、任意の適当な方法を用いて診断することができる。

【0076】

本明細書で用いる場合、「生検組織」、「患者試料」、「腫瘍試料」および「がん試料」という用語は、がん幹細胞を含むがん性組織が試料に含まれるかどうかを判定する目的で、またはそのがん性組織の遺伝子発現プロファイルを判定するために、被験体から取り出された細胞、組織または体液の試料をいう。いくつかの態様において、被験体はがんを有すると疑わていれることから、生検組織または体液が得られる。次いでがん、がん幹細胞、および/またはがん幹細胞遺伝子サインの発現の有無を、生検組織または体液を調べる。

30

【0077】

本明細書で用いる場合、「遺伝子移入系」という用語は、核酸配列を含む組成物を細胞または組織に送達する任意の手段をいう。例えば、遺伝子移入系は、ベクター(例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、および他の核酸に基づく送達系)、裸の核酸のマイクロインジェクション、重合体に基づく送達系(例えば、リポソームに基づく系および金属粒子に基づく系)、バイオリスティック注入などを含むが、これらに限定されることはない。本明細書で用いる場合、「ウイルス遺伝子移入系」という用語は、所望の細胞または組織への試料の送達を容易にするウイルス要素(例えば、無傷のウイルス、改変ウイルスおよび核酸またはタンパク質などのウイルス構成成分)を含む遺伝子移入系をいう。本明細書で用いる場合、「アデノウイルス遺伝子移入系」という用語は、アデノウイルス科に属する無傷のまたは改変されたウイルスを含む遺伝子移入系をいう。

40

【0078】

本明細書で用いる場合、「部位特異的な組み換え標的配列」という用語は、組み換え因

50

子のための認識配列および組み換えが行われる位置を提供する核酸配列をいう。

【0079】

本明細書で用いる場合、「核酸分子」という用語は、DNAまたはRNAを含むがこれらに限定されない、任意の核酸含有分子をいう。この用語は、4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニルシトシン、プソイドイソシトシン、5-(カルボキシヒドロキシルメチル)ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、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、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、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-メチルアデニン、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-マンノシルケオシン、5'-メトキシカルボニルメチルウラシル、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-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキソシン、プソイドウラシル、ケオシン、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、N-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、プソイドウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、および2,6-ジアミノプリンを含むが、これらに限定されない、DNAおよびRNAの公知の塩基類似体のいずれかを含む配列を包含する。

【0080】

「遺伝子」という用語は、ポリペプチド、前駆体、またはRNA (例えば、rRNA、tRNA)の産生に必要なコード配列を含む核酸(例えば、DNA)配列をいう。ポリペプチドは、全長または断片の所望の活性または機能的性質(例えば、酵素活性、リガンド結合、シグナル伝達、免疫原性など)が保持される限り、全長のコード配列によりまたはコード配列の任意の部分によりコードされることができる。この用語は、構造遺伝子のコード領域と、コード領域に5'および3'末端の両方で隣接して位置し、いずれかの末端において遺伝子が全長のmRNAの長さに対応するように約1kbまたはそれ以上の距離に及ぶ配列とを包含する。コード領域の5'側に位置し、mRNA上に存在する配列は、5'非翻訳配列といわれる。コード領域の3'側またはその下流に位置し、mRNA上に存在する配列は、3'非翻訳配列といわれる。

「遺伝子」という用語は、cDNAおよびゲノム両方の形態の遺伝子を包含する。ゲノム形態またはクローンの遺伝子は、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」と名付けられた非コード配列によって中断されたコード領域を含む。イントロンは核RNA(hnRNA)に転写される遺伝子のセグメントであり；イントロンは、エンハンサーなどの調節要素を含むことができる。イントロンは、核転写物または一次転写物から除去されるかまたは「スプライシングで切り離され」；それゆえにイントロンは伝令RNA(mRNA)転写物には存在しない。mRNAは翻訳の間に、新生ポリペプチド中のアミノ酸の配列または順序を指定するように機能する。

【0081】

本明細書で用いる場合、「異種遺伝子」という用語は、その自然の環境にはない遺伝子をいう。例えば、異種遺伝子には、別の種に導入されたある種由来の遺伝子が含まれる。異種遺伝子には、生物にとって天然であり、いくつかの方法で改変された(例えば、突然変異された、複数コピーで付加された、非天然の調節配列に連結されたなど)遺伝子も含まれる。異種遺伝子配列が典型的には、染色体中の遺伝子配列と天然に関連していることが見出されないかまたは天然に見出されない染色体の部分(例えば、遺伝子が通常発現されない遺伝子座で発現される遺伝子)と関連しているDNA配列に接続されているという点で、異種遺伝子は内在性遺伝子と区別される。

【0082】

本明細書で用いる場合、「遺伝子発現」という用語は、遺伝子にコードされている遺伝情報を、遺伝子の「転写」を通じて(例えば、RNAポリメラーゼの酵素作用を介して)RNA(例えば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA)に、およびタンパク質をコードしている遺伝子

の場合、mRNAの「翻訳」を通じてタンパク質に変換する過程をいう。遺伝子発現は、この過程の多数の段階で制御することができる。「上方制御」または「活性化」とは、遺伝子発現産物(例えば、RNAまたはタンパク質)の産生を増加させる制御をいうが、「下方制御」または「抑制」とは、産生を減少させる制御をいう。上方制御または下方制御に関与する分子(例えば、転写因子)は、それぞれ「活性化因子」および「抑制因子」と呼ばれることが多い。

【0083】

イントロンを含むことに加えて、ゲノム形態の遺伝子は、RNA転写物上に存在する配列の5'末端および3'末端の両方に位置する配列を含むこともできる。これらの配列は「隣接」配列または領域といわれる(これらの隣接配列は、mRNA転写物上に存在する非翻訳配列の5'側または3'側に位置する)。5'隣接領域は、遺伝子の転写を制御するかまたは遺伝子の転写に影響を与えるプロモーターおよびエンハンサーなどの調節配列を含むことができる。3'隣接領域は、転写の終結、転写後切断およびポリアデニル化を指令する配列を含むことができる。

【0084】

「siRNA」という用語は低分子干渉RNAをいう。いくつかの態様において、siRNAは約18~25ヌクレオチド長の二重鎖または二本鎖領域を含み；siRNAは各鎖の3'末端に約2個から4個の不對ヌクレオチドを含むことが多い。siRNAの二重鎖または二本鎖領域の少なくとも一つの鎖は、標的RNA分子に実質的に相同であるか、または実質的に相補的である。標的RNA分子に相補的な鎖は「アンチセンス鎖」であり；標的RNA分子に相同な鎖は「センス鎖」であり、siRNAアンチセンス鎖に相補的でもある。siRNAはさらなる配列を含むこともでき、このような配列の非限定的な例としては、連結配列またはループ、ならびにステム構造および他の折り畳まれた構造が挙げられる。siRNAは、無脊椎動物および脊椎動物におけるRNA干渉を誘発する際に、および植物における転写後遺伝子サイレンシングの間の配列特異的なRNA分解を誘発する際に鍵となる中間体として機能すると思われる。

【0085】

「RNA干渉」または「RNAi」という用語は、siRNAによる遺伝子発現のサイレンシングまたは減少をいう。これは、サイレンシングされる遺伝子の配列と二重鎖領域が相同なsiRNAによって開始される、動物および植物における配列特異的な転写後遺伝子サイレンシングの過程である。この遺伝子は、生物に内因性であっても外因性であってもよく、染色体に組み込まれて存在してもよいし、ゲノムに組み込まれていないトランスフェクションベクターに存在してもよい。遺伝子の発現は、完全または部分的のいずれかで阻害される。RNAiは、標的RNAの機能を阻害すると考えることもでき；その標的RNAの機能は完全または部分的であってもよい。

【0086】

本明細書で用いる場合、「コードする核酸分子」、「コードするDNA配列」および「コードするDNA」という用語は、デオキシリボ核酸の鎖に沿ったデオキシリボヌクレオチドの順序または配列をいう。これらのデオキシリボヌクレオチドの順序は、ポリペプチド(タンパク質)鎖に沿ったアミノ酸の順序を決定する。すなわち、DNA配列はアミノ酸配列をコードする。

【0087】

本明細書で用いる場合、「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド」および「遺伝子をコードするヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド」という用語は、遺伝子のコード領域を含む核酸配列、または言い換えると遺伝子産物をコードする核酸配列を意味する。コード領域は、cDNA、ゲノムDNAまたはRNA形態で存在してもよい。DNA形態で存在する場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは、一本鎖(すなわち、センス鎖)または二本鎖であってもよい。適切な転写開始および/または一次RNA転写物の正しいプロセッシングを可能とするのに必要な、エンハンサー/プロモーター、スプライス部位、ポリアデニル化シグナルなどのような適当な制御要素を遺伝子のコード領域のすぐ近くに配置してもよい。あるいは、本発明の発現ベクターに利用されるコー

ド領域は、内因性エンハンサー/プロモーター、スプライス部位、介在配列、ポリアデニル化シグナルなど、または内因性および外因性の両方の制御要素の組み合わせを含んでもよい。

【0088】

本明細書で用いる「部分」という用語は、ヌクレオチド配列に関する場合(「所与のヌクレオチド配列の部分」のように)、その配列の断片をいう。この断片は4ヌクレオチドのサイズからヌクレオチド配列全体より1ヌクレオチドを引いたサイズまで、いろいろなサイズでありうる(10ヌクレオチド、20、30、40、50、100、200など)。

【0089】

「ハイブリダイズする」、「選択的にハイブリダイズする」または「特異的にハイブリダイズする」という語句は、配列が複合混合物(例えば、DNAまたはRNAのライブラリ)中に存在する場合に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下で特定のヌクレオチド配列にのみ分子が結合または二重鎖形成することをいう。例えば、Andersen(1998) *Nucleic Acid Hybridization* Springer-Verlag; Ross (ed. 1997) *Nucleic Acid Hybridization* Wileyを参照されたい。

【0090】

「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」という語句は、典型的には核酸の複合混合物の中で、プローブがその標的の部分配列とハイブリダイズするが、他の配列とはハイブリダイズしない条件をいう。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、異なる状況では異なるものである。長い配列ほど、それだけ高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションのための広範囲に及ぶガイドは、Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, 「Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays」(1993)に見出される。一般に、ストリンジェントな条件は、定義したイオン強度での特定の配列に対する熱融解点(T_m)よりも約5~10℃低いように選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が、平衡状態で標的配列とハイブリダイズする(定義したイオン強度、pH、および核酸濃度の下で)温度である(標的配列が過剰に存在する場合、 T_m では、平衡状態でプローブの50%が占有される)。ストリンジェントな条件は、塩濃度がpH7.0から8.3で約1.0M未満のナトリウムイオン、典型的には約0.01から1.0 Mのナトリウムイオン(または他の塩)の濃度であり、短いプローブ(例えば、10から50ヌクレオチド)の場合には温度が少なくとも約30℃であり、長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドを超える)場合には温度が少なくとも約60℃の条件であろう。ストリンジェントな条件は、ホルムアミドなどの不安定化剤の添加によって実現することもできる。高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションの場合、陽性シグナルは少なくともバックグラウンドの2倍、またはバックグラウンドハイブリダイゼーションの10倍である。高ストリンジェンシーまたはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の例としては、以下が挙げられる: 50%ホルムアミド、5×SSCおよび1%SDSにて42℃でインキュベート、または5×SSCおよび1%SDSにて65℃でインキュベートして、0.2×SSCおよび0.1% SDS中にて65℃で洗浄する。PCRの場合、アニーリング温度はプライマーの長さに応じて約32℃から約48℃まで変わりうるが、低ストリンジェンシーの増幅には約36℃の温度が典型的である。高ストリンジェンシーのPCR増幅の場合、高ストリンジェンシーのアニーリング温度はプライマーの長さおよび特異性に応じて、約50℃から約65℃に及びうるが、約62℃の温度が典型的である。高ストリンジェンシーおよび低ストリンジェンシーの増幅の両方に典型的なサイクル条件には、30~120秒間90℃から95℃の変性段階、30~120秒間持続するアニーリング段階、および1~2分間約72℃の伸長段階が含まれる。

【0091】

本明細書で用いる「機能的な組み合わせで」、「機能的な順序で」および「機能的に連結された」という用語は、所与の遺伝子の転写および/または所望のタンパク質分子の合成を指令できる核酸分子が産生されるような形での核酸配列の連結をいう。この用語は、機能的なタンパク質が産生されるような形でのアミノ酸配列の連結もいう。

【0092】

「単離されたオリゴヌクレオチド」または「単離されたポリヌクレオチド」のように、核酸に関して用いられる場合「単離された」という用語は、その天然源において通常結び付いている少なくとも一つの成分または夾雑物から同定および分離された核酸配列をいう。単離された核酸は、天然に見出されるのとは異なる形態または状況で存在するような核酸である。対照的に、単離されていない核酸は、天然に存在する状態で見出される、DNAおよびRNAなどの核酸である。例えば、所与のDNA配列(例えば、遺伝子)は、隣接する遺伝子の近くの宿主細胞染色体上に見出され；特異的タンパク質をコードする特異的mRNA配列などのRNA配列は、多数のタンパク質をコードする多数の他のmRNAとの混合物として細胞に見出される。しかしながら、所与のタンパク質をコードする単離された核酸には、例として、核酸が天然の細胞のものとは異なる染色体位置にあるか、または他の様式で、天然に見出されるものとは異なる核酸配列に隣接しているような、所与のタンパク質を通常発現している細胞中の核酸が含まれる。単離された核酸、オリゴヌクレオチド、またはポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖の形態で存在することができる。単離された核酸、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドをタンパク質の発現のために利用しようとする場合、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは最小限でも、センス鎖またはコード鎖を含む(すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは一本鎖でありうる)が、センス鎖もアンチセンス鎖もともに含むこともできる(すなわち、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドは二本鎖でありうる)。

10

【0093】

20

同様に、ある種の態様において、「単離されたポリペプチド」または「単離された抗体」のように、ポリペプチドに関して用いられる場合「単離された」という用語は、その天然源において通常結び付いている少なくとも一つの成分または夾雑物から分離されたポリペプチド(または抗体)をいう。したがって、単離された抗体または他の単離されたポリペプチドは、天然に見出されるのとは異なる形態または状況で存在する。ある種の態様において、単離されたポリペプチド(例えば、抗体)は、実質的に純粋である。

【0094】

本明細書で用いる場合、「実質的に純粋」とは、少なくとも50%純粋である(すなわち、夾雑物を含まない)、好ましくは少なくとも90%純粋である、より好ましくは少なくとも95%純粋である、さらにより好ましくは少なくとも98%純粋である、または最も好ましくは少なくとも99%純粋である材料をいう。

30

【0095】

「アミノ酸配列」および「ポリペプチド」、「タンパク質」または「ペプチド」などの用語は、列挙したタンパク質分子に関連する完全な、天然のアミノ酸配列にアミノ酸配列を限定するよう意図されるものではない。

【0096】

本明細書で用いる「天然のタンパク質」という用語は、タンパク質がベクター配列によってコードされるアミノ酸残基を含まないことを示す；すなわち、天然のタンパク質は、天然に存在する際にタンパク質に見出されるアミノ酸しか含まない。天然のタンパク質は組み換えにより産生されてもよく、または天然に存在する供給源から単離されてもよい。

40

【0097】

本明細書で用いる「部分」という用語は、タンパク質に関する場合(「所与のタンパク質の部分」のように)、そのタンパク質の断片をいう。この断片は4アミノ酸残基のサイズからアミノ酸配列全体より1アミノ酸を引いたサイズまで、いろいろなサイズでありうる。

【0098】

「サザンブロット」という用語は、サイズに応じてDNAを分画し、続いてゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜などの固体支持体にDNAを転写させるための、アガロースまたはアクリルアミドゲル上でのDNAの分析をいう。次に、固定化されたDNAを標識プローブで探索して、使用したプローブに相補的なDNA種を検出する。DNAは電気泳動の前に制限

50

酵素で切断することができる。電気泳動の後に、固体支持体への転写の前またはその間にDNAを部分的に脱プリン化し、変性させることができる。サザンブロットは、分子生物学者の標準的なツールである(J.Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, NY, pp9.31-9.58 [1989])。

【0099】

本明細書で用いる「ノザンブロット」という用語は、サイズに応じてRNAを分画し、続いてゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜などの固体支持体にRNAを転写させるための、アガロースゲル上でのRNAの電気移動によるRNAの分析をいう。次に、固定化されたRNAを標識プローブで探索して、使用したプローブに相補的なRNA種を検出する。ノザンブロットは分子生物学者の標準的なツールである(J.Sambrook, et al., 前記, pp 7.39-7.52 [1989])。 10

【0100】

「ウェスタンブロット」という用語は、ニトロセルロースまたは膜などの支持体上に固定化されたタンパク質(またはポリペプチド)の分析をいう。タンパク質をアクリルアミドゲル上で泳動して、タンパク質を分離し、続いてゲルからニトロセルロースまたはナイロン膜などの固体支持体へのタンパク質の転写を行う。次に、固定化されたタンパク質を、関心対象の抗原に対して反応性を有する抗体に曝露する。抗体の結合は、放射性標識抗体の使用を含め、さまざまな方法により検出することができる。

【0101】

本明細書で用いる「導入遺伝子」という用語は、例えば、新たに受精した卵または初期胚に外来遺伝子を導入することにより生物中に配置された外来遺伝子をいう。「外来遺伝子」という用語は、実験操作によって動物のゲノムに導入された任意の核酸(例えば、遺伝子配列)をいい、天然遺伝子が存在するのと同じ位置に導入遺伝子が存在しない限り、その動物で見出される遺伝子配列を含みうる。 20

【0102】

本明細書で用いる場合、「ベクター」という用語は、ある細胞から別の細胞にDNAセグメントを移入する核酸分子に関して用いられる。「媒体」という用語が「ベクター」と互換的に用いられることもある。ベクターは多くの場合、プラスミド、バクテリオファージ、または植物もしくは動物ウイルスに由来する。

【0103】

本明細書で用いる「発現ベクター」という用語は、所望のコード配列と、特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の発現に必要なとされる適切な核酸配列とを含んだ組み換えDNA分子をいう。原核生物における発現に必要な核酸配列には、通常、プロモーター、オペレーター(任意)およびリボソーム結合部位があり、多くの場合には他の配列を伴う。真核細胞は、プロモーター、エンハンサー、ならびに終結シグナルおよびポリアダニル化シグナルを利用することが知られている。 30

【0104】

本明細書で用いる場合、「インビトロ」という用語は、人工的な環境をいい、人工的な環境中で行われる過程または反応をいう。インビトロの環境は、試験管および細胞培養からなりうるが、これらに限定されることはない。「インビボ」という用語は、自然の環境(例えば、動物または細胞)をいい、自然の環境中で行われる過程または反応をいう。 40

【0105】

「被験化合物」および「候補化合物」という用語は、身体機能の疾患、疾病、病気または障害(例えば、がん)を処置または予防するために用いる候補である任意の化学的実体、製剤、薬物などをいう。被験化合物は、公知の治療用化合物および潜在的な治療用化合物の両方を含む。被験化合物は、本発明のスクリーニング法を用いたスクリーニングによって治療に役立つ(therapeutic)と判定することができる。本発明のいくつかの態様において、被験化合物にはアンチセンス化合物が含まれる。

【0106】

本明細書で用いる場合、「試料」という用語は、その最も広い意味で用いられる。一つ 50

の意味では、この用語は任意の供給源から得られた標本または培養物、ならびに生体試料および環境試料を含むよう意図される。生体試料は動物(ヒトを含む)から得ることができ、液体、固体、組織および気体を包含する。生体試料には血漿、血清などのような、血液産物が含まれる。環境試料には、表面物質、土壌、水、結晶および工業試料のような環境物質が含まれる。しかし、そのような例は、本発明に適用できる試料の種類を限定するものとみなされるべきではない。

【0107】

「特異的結合」または「特有の結合」とは、薬剤が特定のリガンド、受容体または抗原にのみ結合する場合を意図する。「選択的結合」とは、薬剤が、他に比べて約2倍もしくはそれ以上、約5倍もしくはそれ以上、約8倍もしくはそれ以上、または約10倍もしくはそれ以上の程度、リガンド、受容体または抗原に好ましく結合する場合を意図する。

10

【0108】

本明細書で用いる場合、「約」とは、表示した数の±10%をいう。例えば、「約10%」は9%から11%の範囲を示す。

【0109】

以下に記載されるように最大限一致するよう整列させた場合に二つの配列におけるヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が同じであれば、二つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドの配列は「同一」である、または「同一性」を有するといわれる。二つの配列間の比較は、典型的には、配列類似性の局所的領域を同定かつ比較するために、比較ウィンドウにわたり配列を比較することによって行われる。

20

【0110】

いくつかの態様において、「同一性の割合」は、二つの最適に整列された配列を、少なくとも20個の位置の比較のウィンドウにわたり比較することによって判定され、ここで、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分は二つの配列の最適アライメントの参照配列(付加または欠失を含まない)と比べて、20%もしくはそれ以下、通常5~15%、または10~12%の付加または欠失(すなわちギャップ)を含んでいてもよい。この割合は、両方の配列において同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が現れる位置の数を決定し、適合した位置の数を得て、参照配列における位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)で、適合した位置の数を割り、この結果に100を乗じて配列同一性の割合を得ることによって計算される。いくつかの態様において、比較ウィンドウはさらに小さくてもよい(例えば、7個または10個のアミノ酸)。

30

【0111】

比較のための配列の最適アライメントは、Lasergeneのバイオインフォマティクスソフトウェア一式におけるMegalignプログラム(DNASTAR, Inc., Madison, Wis.)により、デフォルトパラメータを用いて行うことができる。あるいは、% (アミノ酸)同一性は公的に入手可能なBLASTまたはBLAST-2プログラムの一つを用いて得ることもできる。WU-BLAST-2コンピュータプログラム(Altschulet al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996))。% (アミノ酸)配列同一性は配列比較プログラムNCBI-BLAST2(Altschulet al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))を用いて判定することもできる。BLASTプログラムはKarlin and Altschul. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990)のアライメント法に基づいており、Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin And Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993); およびAltschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)に論じられている通りである。

40

【0112】

ある種の態様において、「処置する」または「処置」または「処置すること」などの用語は、(1) 診断された病的状態または障害を治癒する、減速する、その症状を軽減する、および/またはその進行を止める治療的方策も、(2) 標的とする病的状態または障害の発症を予防するまたは遅延する予防的または防止的方策もともにいう。したがって、処置を必要とする者には、障害を既に有する者；障害を有しやすい者；障害を有していた可能性のある者、および障害が再発する可能性のある者；ならびに障害が予防されるべき者

50

が含まれる。ある種の態様において、患者が以下の一つまたは複数を示せば、被験体の「処置」は成功である：がん細胞の数の減少またはその完全な欠如；腫瘍サイズの減少；軟組織および骨へのがんの広がりを含む辺縁器官へのがん細胞浸潤の阻害またはその欠如、腫瘍転移の阻害またはその欠如；腫瘍成長の阻害またはその欠如、特定のがんに関連する一つまたは複数の症状の軽減；罹患率および/または死亡率の低下；生活の質の改善；がん幹細胞の数の減少またはその完全な欠如；充実性腫瘍中のがん幹細胞の割合の減少(がん幹細胞ではない、腫瘍中の細胞に対しての)；がん幹細胞の増殖の阻害；ならびに再発の遅延またはその欠如。

【0113】

ある種の態様において、「治療的有効量」という用語は、被験体における疾患または障害を「処置する」のに有効な抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、小有機分子または他の薬物の量をいう。がんの場合には、治療的有効量の薬物は、ある種の態様において、がん細胞の数を低減する；がん幹細胞の数を低減する；充実性腫瘍中のがん幹細胞の割合(がん幹細胞ではない腫瘍細胞に対しての)を低減する；腫瘍サイズを低減する；辺縁器官へのがん細胞浸潤を阻害するもしくは阻止する；腫瘍転移を阻害するおよび/もしくは阻止する；腫瘍成長を阻害するおよび阻止する；がんに関連する一つもしくは複数の症状をある程度軽減する；がん幹細胞の増殖を阻害する；またはがん細胞に対するこのような作用の組み合わせをもたらすことができる。

【0114】

「阻害する(inhibit)」および「阻害する(inhibiting)」という用語は、本明細書において「破壊する(disrupt)」および「破壊する(disrupting)」と互換的に用いられる。

【0115】

充実性腫瘍幹細胞がんマーカー

本発明は、未分画の結腸腫瘍細胞または非ESA+44+結腸腫瘍細胞と比べて、結腸がん幹細胞において差次的に発現されるマーカーを提供する。そのようなマーカーには乳がんおよび結腸がんを含め、さまざまながんの診断および処置(例えば、治療標的化)に用途がある。ある種の態様において、充実性腫瘍幹細胞マーカーはLGR5である。

【0116】

いくつかの態様において、本発明は、幹細胞がんマーカー(例えば、乳がん幹細胞がんマーカー)の発現の検出のための方法を提供する。いくつかの態様において、発現は(例えば、RNAまたはタンパク質レベルで)直接測定される。いくつかの態様において、発現は組織試料(例えば、生検試料)において検出される。他の態様において、発現は体液(例えば、血漿、血清、全血、粘液、および尿を含むがこれらに限定されることはない)において検出される。本発明は、マーカーの検出のためのパネルおよびキットをさらに提供する。いくつかの態様において、幹細胞がんマーカーの存在は、被験体に予後診断を提供するために用いられる。提供される情報は、処置の方針を指示するためにも使われる。例えば、被験体が、充実性腫瘍幹細胞を示すマーカーを有すると判明したなら、さらなる治療法(例えば、ホルモン療法または放射線療法)を、その治療法が有効である可能性がいつそう高い初期の時点で(例えば、転移の前に)開始することができる。さらに、被験体がホルモン療法に反応しない腫瘍を有すると判明したなら、そのような治療法の費用および不都合を回避することもできる。

【0117】

本発明は上記のマーカーに限定されない。がんまたはがんの進行と相関する任意の適当なマーカーを利用することができる。さらなるマーカーも本発明の範囲内であるものと企図される。任意の適当な方法を利用して、以下の例示的な実施例1に記載されるものを含むがそれに限定されない、本発明の方法で用いるのに適したがんマーカーを同定し、特徴付けることができる。例えば、いくつかの態様において、本発明の遺伝子発現マイクロアレイ法を用いて充実性腫瘍幹細胞で上方制御または下方制御されると同定されたマーカーは、組織マイクロアレイ、免疫組織化学法、ノザンプロット分析、siRNAまたはアンチセンスRNA阻害、突然変異分析、臨床転帰を用いた発現の研究、および本明細書において開

10

20

30

40

50

示される他の方法を用いてさらに特徴付けられる。

【0118】

いくつかの態様において、本発明は、複数のマーカーの分析のためのパネルを提供する。このパネルは複数のマーカーの同時分析を、発がんおよび/または転移と関連付けながら可能にする。被験体に応じて、可能な限り最良の診断および予後診断を提供するために、パネルを単独でまたは組み合わせて分析することができる。パネルに含めるマーカーは、以下の実例に記載されるものを含むがそれに限定されない任意の適当な方法を用い、マーカーの適中率についてスクリーニングすることにより選択される。

【0119】

1. RNAの検出

いくつかの態様において、充実性腫瘍幹細胞がんマーカーの検出は、組織試料(例えば、乳がん組織)中の対応するmRNAの発現を測定することによって検出される。mRNAの発現は、以下に開示されるものを含むがそれに限定されない、任意の適当な方法によって測定することができる。

【0120】

いくつかの態様において、RNAはノザンプロット分析により検出される。ノザンプロット分析は、RNAの分離および相補的な標識プローブのハイブリダイゼーションを伴う。

【0121】

さらなる態様において、RNA (または対応するcDNA)は、オリゴヌクレオチドプローブとのハイブリダイゼーションによって検出される。ハイブリダイゼーションおよび検出のための種々の技術を用いた種々のハイブリダイゼーションアッセイが利用可能である。例えば、いくつかの態様において、TaqManアッセイ(PEBiosystems, Foster City, CA; 例えば、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,962,233号および同第5,38,848号を参照されたい)が利用される。このアッセイはPCR反応の間に行われる。TaqManアッセイでは、AMPLITAQ GOLD DNAポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を利用する。5'-レポーター色素(例えば、蛍光色素)および3'-クエンチャー色素を有するオリゴヌクレオチドからなるプローブがPCR反応に含められる。PCRの間に、プローブがその標的に結合していれば、AMPLITAQ GOLD DNAポリメラーゼの5'-3'核酸分解活性により、プローブはレポーター色素とクエンチャー色素との間で切断される。クエンチャー色素からのレポーター色素の分離によって、蛍光の増加が生じる。シグナルはPCRの各サイクルとともに蓄積し、蛍光光度計でモニタリング可能である。

【0122】

他の態様において、逆転写酵素PCR (RT-PCR)を用いてRNAの発現を検出する。RT-PCRでは、RNAは、逆転写酵素を用いて相補的DNAまたは「cDNA」に酵素的に変換される。次に、このcDNAをPCR反応の鋳型として用いる。PCR産物は、ゲル電気泳動と、DNA特異的染料による染色または標識プローブとのハイブリダイゼーションとを含むがこれらに限定されない、任意の適当な方法によって検出することができる。いくつかの態様において、米国特許第5,639,606号、同第5,643,765号および同第5,876,978号(これらのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる)に記載されている競合的鋳型法の標準化混合物を用いた定量的逆転写酵素PCRが利用される。

【0123】

2. タンパク質の検出

他の態様において、LGR5などの幹細胞がんマーカーの遺伝子発現は、対応するタンパク質またはポリペプチドの発現を測定することによって検出される。タンパク質の発現は、任意の適当な方法によって検出することができる。いくつかの態様において、タンパク質は免疫組織化学法によって検出される。他の態様において、タンパク質は、そのタンパク質に対して作製された抗体とのその結合によって検出される。抗体の作出については以下に記載する。

【0124】

抗体の結合は、当技術分野において公知の技術(例えば、放射免疫アッセイ、ELISA (酵

10

20

30

40

50

素結合免疫吸着アッセイ)、 「サンドイッチ」 免疫アッセイ、 免疫放射定量アッセイ、 ゲル拡散沈降反応、 免疫拡散アッセイ、 インサイチュー免疫アッセイ(例えば、 金コロイド、 酵素または放射性同位体標識を用いる)、 ウエスタンブロット、 沈降反応、 凝集アッセイ(例えば、 ゲル凝集アッセイ、 血球凝集アッセイなど)、 補体結合アッセイ、 免疫蛍光アッセイ、 プロテインAアッセイ、 および免疫電気泳動アッセイなどによって検出される。

【0125】

一つの態様において、 抗体の結合は、 一次抗体上の標識を検出することによって検出される。 別の態様において、 一次抗体は、 一次抗体と二次抗体または試薬との結合を検出することによって検出される。 さらに態様において、 二次抗体は標識されている。 免疫アッセイで結合を検出するための多くの方法が当技術分野において公知であり、 それらの方法は本発明の範囲内である。

10

【0126】

いくつかの態様において、 自動化検出アッセイが利用される。 免疫アッセイの自動化のための方法には、 米国特許第5,885,530号、 同第4,981,785号、 同第6,159,750号および同第5,358,691号に記載されているものがあり、 これらのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。 いくつかの態様において、 結果の解析および提示も自動化される。 例えば、 いくつかの態様において、 がんマーカーに対応する一連のタンパク質の有無に基づき予後診断をもたらすソフトウェアが利用される。

【0127】

他の態様において、 米国特許第5,599,677号および同第5,672,480号に記載されている免疫アッセイであり、 これらのそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0128】

3. cDNAマイクロアレイ技術

cDNAマイクロアレイは、 顕微鏡用スライドガラスなどの固体支持体上の分かっている位置にスポットされた(通常はロボットスポット装置を用いて)複数の(通常は数千の)異なるcDNAからなる。 このcDNAは、 典型的にはプラスミドのベクター骨格部分に相補的な、 または配列が公知の遺伝子ではその遺伝子自体に相補的なプライマーを用いたプラスミドライブラリー挿入断片のPCR増幅により得られる。 マイクロアレイの作製に適したPCR産物は、 典型的には長さが0.5~2.5kBである。 完全長cDNA、 発現配列タグ(EST)、 または関心対象の任意のライブラリーから無作為に選択されたcDNAを選択することができる。 ESTは、 例

30

【0129】

典型的なマイクロアレイ実験では、 マイクロアレイは、 二つの異なる試料に由来する差次的に標識されたRNA、 DNAまたはcDNAの集団とハイブリダイズされる。 通常、 RNA(総RNAまたはポリA+RNAのいずれか)を関心対象の細胞または組織から単離し、 逆転写してcDNAを得る。 標識化は、 通常、 反応混合物に標識ヌクレオチドを組み入れることによって逆転写中に行われる。 さまざまな標識を使用できるが、 通常は、 ヌクレオチドを蛍光色素Cy3またはCy5と結合する。 例えば、 Cy5-dUTPおよびCy3-dUTPを使用することができる。 一つの試料に由来するcDNA(例えば、 特定の細胞型、 組織型または成長状態に相当する)を一つのフルオロフォアで標識し、 もう一つの試料に由来するcDNA(例えば、 異なる細胞型、 組織型または成長状態に相当する)をもう一つのフルオロフォアで標識する。 二つの試料からの類似した量の標識材料をマイクロアレイに同時にハイブリダイズする。 試料がCy5(赤色蛍光を発する)およびCy3(緑色蛍光を発する)で標識されているマイクロアレイ実験の場合、 一次データ(蛍光強度を定量的に検出できる検出器を用いてマイクロアレイをスキャン

40

50

することによって得られた)は、蛍光強度の比(赤色/緑色、R/G)である。これらの比は、マイクロアレイ上に提示されたcDNAにハイブリダイズしたcDNA分子の相対濃度を表し、したがって、マイクロアレイ上に提示された各cDNA/遺伝子に対応するmRNAの相対発現レベルを反映する。

【0130】

各マイクロアレイ実験は、数万のデータ点を提供することができ、そのそれぞれは二つの試料での特定の遺伝子の相対発現を表す。データの適切な構築および解析は特に重要であり、データ解析を容易にするため、標準的な統計ツールを組み入れたさまざまなコンピュータプログラムが開発されている。遺伝子発現データを構築するための一つの基礎は、類似の発現パターンを有する遺伝子をクラスタにまとめることである。マイクロアレイ実験から得られたデータの階層的クラスタ解析および表示を行うための方法は、Eisen et al., 1998, PNAS 95: 14863-14868に記載されている。その中で記載されているように、クラスタリングは、データ点を定量的および定性的に表す色で各データ点を表した一次データのグラフ表示と組み合わせることができる。大きな数表からのデータを視覚的な形式に変換することによって、この過程はデータの直観的な解析を容易にする。数学的ツールおよび/またはクラスタリング手法それ自体に関するさらなる情報および詳細は、例えば、Sokal & Sneath, Principles of numerical taxonomy, xvi, 359, W. H. Freeman, San Francisco, 1963; Hartigan, Clustering algorithms, xiii, 351, Wiley, New York, 1975; Paull et al., 1989, J. Natl. Cancer Inst. 81:1088-92; Weinstein et al. 1992, Science 258:447-51; van Osdel et al., 1994, J. Natl. Cancer Inst. 86:1853-9; および Weinstein et al., 1997, Science, 275:343-9に見出すことができる。

【0131】

本発明において用いられる実験方法のさらなる詳細は、実施例中に見出される。マイクロアレイを作製および使用方法について記載しているさらなる情報は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,807,522号に見出される。市販の部品を用いてマイクロアレイハードウェア(例えば、アレイヤおよびスキャナ)を構築するための説明は、<http://cmgm.stanford.edu/pbr-own/>でおよびCheung et al., 1999, Nat. Genet. Supplement 21:15-19に見出すことができ、これらは参照により本明細書に組み入れられる。マイクロアレイ技術、ならびに試料を調製するためのおよびマイクロアレイ実験を行うためのプロトコルのさらなる論述は、例えばDNA arrays for analysis of gene expression, Methods Enzymol, 303:179-205, 1999; Fluorescence-based expression monitoring using micro arrays, Methods Enzymol, 306:3-18, 1999; およびM. Schena (ed.), DNA Microarrays: A Practical Approach, Oxford University Press, Oxford, UK, 1999に見出される。アレイヤを使用する方法および関連するソフトウェアに関する説明は、参照により本明細書に組み入れられる<http://cmgm.stanford.edu/pbrown/mguide/arrayerHTML/ArrayerDocs.html>で見出される。

【0132】

4. データ解析

いくつかの態様において、検出アッセイにより得られた生データ(例えば、所与のマーカの存在、非存在または量)を臨床医にとって予測価値のあるデータに変換するために、コンピュータに基づく解析プログラムを用いる。臨床医は、任意の適当な手段を用いて予測データにアクセスすることができる。したがって、いくつかの態様において、本発明は、遺伝学または分子生物学の教育を受けている可能性が高くはない臨床医が、生データを理解する必要がないというさらなる利益を提供する。データは、その最も有用なかたちで臨床医に直接提示される。その結果、臨床医は、被験体のケアを最適化するために直ちにその情報を利用することができる。

【0133】

本発明は、アッセイを行う研究室、情報提供者、医療関係者および被験体に、およびそれらから情報を入手、処理および伝達できる任意の方法を企図する。例えば、本発明のいくつかの態様において、試料(例えば、生検または血清もしくは尿試料)を被験体から得て

、世界の任意の地域(例えば、被験体が居住する国または情報が最終的に使用される国とは異なる国)にあるプロファイリングサービス(例えば、医療施設の臨床検査室、ゲノムプロファイリング会社など)に提出し、生データを得る。試料が組織または他の生体試料を含む場合、被験体は医療センターを訪れて、試料を採取してもらいプロファイリングセンターに送ってもらってもよく、または被験体は自分で試料を採集し、それをプロファイリングセンターに直接送ってもよい。試料が以前に判定された生物学的情報を含む場合、被験体はその情報をプロファイリングサービスに直接送ることもできる(例えば、情報を含む情報カードを、コンピュータでスキャンし、電子通信システムを用いてデータをプロファイリングセンターのコンピュータに送信することができる)。プロファイリングサービスによって受け取られるとすぐに、試料は処理され、被験体にとって望ましい診断情報または予後情報に特異的なプロファイル(例えば、発現データ)が作成される。

10

【0134】

次に、プロファイルデータは、処置を行う臨床医による判読に適した形式で用意される。例えば、発現の生データを提供するよりも、用意される形式は、特定処置の選択肢についての推奨以外に、被験体についての診断またはリスク評価を表示することができる。データは任意の適当な方法によって臨床医に提示することができる。例えば、いくつかの態様において、プロファイリングサービスは、(例えばケアの現場で)臨床医のために印刷できるまたはコンピュータ画面上で臨床医に提示できる報告書を作成する。

【0135】

いくつかの態様において、情報はケアの現場でまたは地域の施設で最初に解析される。次に、生データは、さらなる解析のために、および/または生データを臨床医もしくは患者に有用な情報に変換するために中央処理施設に送られる。中央処理施設は、データ解析のプライバシー(全てのデータは一貫した安全プロトコルを有する中央施設に保管される)、速度および均一性という長所を提供する。次に、中央処理施設は、被験体の処置後のデータの成り行きを管理することができる。例えば、中央施設は電子通信システムを用いて、臨床医、被験体または研究者にデータを提供することができる。

20

【0136】

いくつかの態様において、被験体は、電子通信システムを用いてデータに直接アクセスすることができる。被験体は、その結果に基づきさらなる介入または助言を選択することができる。いくつかの態様において、データは研究用途に使われる。例えば、データは、特定の病状または病期の有用な指標としてのマーカーの包含または除外についてさらに最適化するように用いることができる。

30

【0137】

5. キット

他の態様において、本発明は、がんの検出および特徴付けのための、またはLGR5などの一つもしくは複数のがん幹細胞マーカーによって発現されるペプチドの活性を調節するためのキットを提供する。いくつかの態様において、キットは検出試薬および緩衝液に加えて、がんマーカーに特異的な抗体を含む。他の態様において、キットは、mRNAまたはcDNAの検出に特異的な試薬(例えば、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマー)を含む。いくつかの態様において、キットは、全ての対照、アッセイを行うための使用説明書、ならびに結果の解析および提示に必要な任意のソフトウェアを含め、検出アッセイを行うのに必要および/または十分な構成成分の全てを含む。

40

【0138】

本発明の別の態様において、ポリヌクレオチドまたはタンパク質の、例えば組織試料中または体液中での、 α -カテニンサインなどの充実性腫瘍幹細胞遺伝子サインの存在を検査するためのキットを含む。キットは、例えば、ポリペプチドの検出のための抗体またはポリヌクレオチドの検出のためのプローブを含むことができる。さらに、キットは、参照試料または対照試料；試料を処理し、検査を行い、結果を解釈するための説明書；ならびに検査を行うのに必要な緩衝液および他の試薬を含むこともできる。ある種の態様において、キットは、 α -カテニンサインの遺伝子によってコードされる一つまたは複数のタン

50

パク質の発現を検出するための抗体のパネルを含む。他の態様において、キットは、充実性腫瘍幹細胞遺伝子サインの一つまたは複数の遺伝子の発現を検出するためのプライマーの対を含む。他の態様において、キットは、充実性腫瘍幹細胞遺伝子サインの一つまたは複数の遺伝子の発現を検出するためのcDNAまたはオリゴヌクレオチドアレイを含む。

【0139】

6. インビボイメージング

いくつかの態様において、動物(例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物)におけるがんマーカの発現を視覚化するためにインビボイメージング技術を用いる。例えば、いくつかの態様において、がんマーカのmRNAまたはタンパク質は、がんマーカに特異的な標識抗体を用いて標識される。特異的に結合および標識された抗体は、放射性核種イメージング、陽電子放射断層撮影、コンピュータ体軸断層撮影、X線または磁気共鳴映像法、蛍光検出および化学発光検出を含むが、これらに限定されないインビボイメージング法を用いて、個体において検出することができる。本発明のがんマーカに対する抗体を作出するための方法は、以下に記載されている。

【0140】

本発明のインビボイメージング法は、本発明の充実性腫瘍幹細胞がんマーカを発現するがんの診断において(例えば、乳がんにおいて)有用である。インビボイメージングは、がんを示すマーカの存在を視覚化するために用いられる。そのような技術によって、不快な生検を用いずとも診断が可能になる。本発明のインビボイメージング法は、がん患者に予後診断を提供するのにとも有用である。例えば、がん幹細胞を示すマーカの存在を検出することができる。身体他の部分における転移がんを検出するために、本発明のインビボイメージング法をさらに用いることもできる。

【0141】

いくつかの態様において、本発明のがんマーカに特異的な試薬(例えば、抗体)は蛍光的に標識される。標識された抗体は被験体に(例えば、経口的または非経口的に)導入される。蛍光的に標識された抗体は、任意の適当な方法を用いて(例えば、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,198,107号に記載されている装置を用いて)検出される。

【0142】

他の態様において、抗体は放射活性物質により標識される。インビボ診断のための抗体の使用は、当技術分野において周知である。Sumerdonら(Nucl.Med.Biol 17:247-254 [1990])は、標識としてインジウム-111を用いた腫瘍ラジオイムノシンチグラフィイメージング用に最適化された抗体-キレート剤について記載している。Griffinら(JClinOnc 9:631-640 [1991])は、再発結腸直腸がんを有すると疑われる患者での腫瘍の検出にこの薬剤を用いることについて記載している。磁気共鳴映像用の標識として常磁性イオンを有する類似の薬剤を用いることは、当技術分野において公知である(Lauffer,MagneticResonance in Medicine 22:339-342 [1991])。使用される標識は、選択されたイメージング様式に依るであろう。インジウム-111、テクネチウム-99mまたはヨウ素-131などの放射性標識は、平面スキャンまたは単光子放出コンピュータ断層撮影(SPECT)に用いることができる。フッ素-19などの陽電子放出標識を陽電子放出断層撮影(PET)に用いることもできる。MRIの場合、ガドリニウム(III)またはマンガン(II)などの常磁性イオンを用いることができる。

【0143】

スカンジウム-47 (3.5日間)、ガリウム-67 (2.8日間)、ガリウム-68 (68分間)、テクネチウム-99m (6時間)およびインジウム-111(3.2日間)などの、1時間から3.5日間に及ぶ半減期を有する放射性金属が、抗体との結合に利用可能であり、これらのうち、ガリウム-67、テクネチウム-99mおよびインジウム-111はガンマカメライメージングに好ましく、ガリウム-68は陽電子放出断層撮影に好ましい。

【0144】

そのような放射性金属を用いて抗体を標識する有用な方法は、例えば、Khawら(Science 209:295 [1980])によりIn-111およびTc-99mについて、ならびにScheinbergら(Science215

10

20

30

40

50

:1511[1982])により記載されているように、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)などの二官能性キレート剤によるものである。その他のキレート剤が用いられてもよいが、1-(p-カルボキシメトキシベンジル)EDTAおよびDTPAのカルボキシカルボニックアンハイドライドが好都合である。というのは、その使用によって、抗体の免疫反応性に実質的に影響を与えずに結合が可能になるからである。

【0145】

DTPAをタンパク質にカップリングするための別の方法は、Hnatowichら(Int. J. Appl. Radiat. Isot.33:327[1982])によりIn-111を用いたアルブミンの標識化について記載されているように、DTPAの環状無水物の使用によるものであるが、これを抗体の標識化に適用することができる。DTPAによるキレート化を用いない、Tc-99mで抗体を標識化する適当な方法は、Crockfordら(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,323,546号)の予備スズ反応(pretinning)法である。

【0146】

Tc-99mで免疫グロブリンを標識化する方法は、Wongら(Int. J. Appl. Radiat. Isot., 29:251 [1978])により血漿タンパク質について記載されたものであって、最近、Wongら(J. Nucl. Med., 23:229 [1981])により抗体の標識化について適用が成功した方法である。

【0147】

特異的抗体に結合された放射性金属の場合、抗体の免疫特異性を破壊せずに、可能な限り高い比率の放射性標識を抗体分子に導入することが同じく望ましい。本発明の特異的幹細胞がんマーカーの存在下で放射性標識化を行うことによってさらなる改善を実現し、抗体上の抗原結合部位が保護されるのを確実にすることができる。

【0148】

さらなる態様において、インビボ・バイオフィットニックイメージング(Xenogen, Alameda, CA)がインビボイメージングに利用される。この実時間インビボイメージングでは、ルシフェラーゼを利用する。ルシフェラーゼ遺伝子は、(例えば、本発明のがんマーカーとの融合タンパク質として)細胞、微生物および動物に組み入れられる。活性な場合、この遺伝子は、光を発する反応をもたらす。CCDカメラおよびソフトウェアを用いて画像を取得し、それを解析する。

【0149】

治療剤

本発明は種々の治療剤を提供する。いくつかの態様において、薬剤は少なくとも一種のRSP0タンパク質に結合する。代替的な態様において、薬剤は二種またはそれ以上のヒトRSP0タンパク質に結合する。ある種の代替的な態様において、薬剤は少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に結合する。代替的な態様において、薬剤は二種またはそれ以上のヒトLGRタンパク質に結合する。いくつかの態様において、薬剤は、少なくとも一種のRSP0タンパク質(例えば、RSP01、RSP02、RSP03および/またはRSP04)の少なくとも一種のLGRタンパク質(例えば、LGR4、LGR5および/またはLGR6)への結合を(部分的または全体的に)乱す。ある種の態様において、薬剤はLGR5シグナル伝達などの、RSP0によって活性化されたLGRシグナル伝達を乱す。ある種の態様において、薬剤は β -カテニンシグナル伝達を乱す。

【0150】

ある種の態様において、治療剤は生体分子である。ある種の態様において、治療剤または生体分子は、少なくとも一種のRSP0タンパク質または少なくとも一種のLGRタンパク質に結合する抗体などの、抗体である。したがって、治療剤または生体分子は、LGR5に特異的に結合する抗体でありうる。ある種の代替的な態様において、治療剤または生体分子は、LGR4またはLGR6に特異的に結合する抗体である。ある種の態様において、治療剤または生体分子は、RSP01、RSP02、RSP03および/またはRSP04に特異的に結合する抗体である。

【0151】

ある種の態様において、治療剤または生体分子は、可溶性LGR受容体(例えば、LGR5受容体)である。例えば、いくつかの態様において、治療剤は、LGR5受容体の断片および抗体のFc部分を含む融合タンパク質である。

【0152】

ある種の代替的な態様において、治療剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA分子またはリボザイムである。

【0153】

いくつかの態様において、本発明はがん(例えば、乳がん)の治療法を提供する。いくつかの態様において、治療法はがんマーカーを標的にする。

【0154】

本発明は、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する抗体を提供する。ある種の態様において、抗体は、LGR4、LGR5およびLGR6からなる群より選択される少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する。ある種の態様において、抗体はLGR5に特異的に結合する。ある種の態様において、抗体は、LGR4、LGR5およびLGR6からなる群より選択される二種またはそれ以上のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する。ある種の態様において、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する抗体は、少なくとも一種のRSP0タンパク質(例えば、RSP01、RSP02、RSP03および/またはRSP04)の少なくとも一種のヒトLGRタンパク質(例えば、LGR5)への結合も乱す。ある種の態様において、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する抗体は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す能力、および/または β -カテニンシグナル伝達を乱す能力によって特徴付けられる。ある種の態様において、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する抗体は、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖などの、腫瘍増殖を阻害する能力によって特徴付けられる。例えば、いくつかの態様において、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質に特異的に結合する抗体は、LGRへのRSP0の結合を乱しまたは阻害し、腫瘍増殖を阻害する。ある種の代替的な態様において、少なくとも一種のLGRタンパク質に特異的に結合する抗体は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱し、腫瘍増殖を阻害もする。ある種の代替的な態様において、少なくとも一種のLGRタンパク質に特異的に結合する抗体は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化および/または β -カテニンシグナル伝達を乱し、腫瘍増殖を阻害もする。(ある種の態様において、抗体がもたらす腫瘍増殖の阻害は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化の結果でありうるが、必ずしもそうである必要はない。ある種の態様において、抗体がもたらす腫瘍増殖の阻害は、RSP0タンパク質のLGRタンパク質への結合の阻害の結果でありうるが、必ずしもそうである必要はない。)

【0155】

本発明は、RSP01、RSP02、RSP03およびRSP04からなる群より選択される少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体を提供する。ある種の態様において、抗体は、RSP01、RSP02、RSP03およびRSP04からなる群より選択される二種またはそれ以上のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する。ある種の態様において、抗体は、RSP01に特異的に結合する。ある種の態様において、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体は、少なくとも一種のヒトLGRタンパク質(例えばLGR5)への、少なくとも一種のRSP0タンパク質(例えば、RSP01、RSP02、RSP03および/またはRSP04)の結合を乱すこともできる。ある種の態様において、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す能力、および/または β -カテニンシグナル伝達を乱す能力によって特徴付けられる。ある種の態様において、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体は、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖などの、腫瘍増殖を阻害する能力によって特徴付けられる。例えば、いくつかの態様において、少なくとも一種のヒトRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体は、LGRへのRSP0の結合を乱しまたは阻害し、腫瘍増殖を阻害する。ある種の代替的な態様において、少なくとも一種のRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱し、腫瘍増殖を阻害しもする。ある種の態様において、少なくとも一種のRSP0タンパク質に特異的に結合する抗体は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化および/または β -カテニンシグナル伝達を乱し、腫瘍増殖を阻害する。

【0156】

ある種の態様において、RSP0タンパク質のLGRタンパク質への結合を乱す抗LGR抗体もし

くは抗RSP0抗体(または他の薬剤)は、インビトロまたはインビボアッセイにおいてRSP0タンパク質のLGRタンパク質への結合の少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%を乱す。

【0157】

同様に、ある種の態様において、(a) RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化および/または(b) β -カテニンシグナル伝達を乱す抗LGR抗体もしくは抗RSP0抗体(または他の薬剤)は、インビトロまたはインビボアッセイにおいてシグナル伝達の少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%または少なくとも約90%を乱す。

【0158】

本発明は、ある種の態様において、ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質に特異的に結合し、かつ充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する単離抗体を提供する。ある種の態様において、ヒトRSP0はRSP01である。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。

【0159】

ある種の態様において、本発明は、ヒトRSP0タンパク質に特異的に結合し、かつRSP0によるLGR5シグナル伝達の活性化を乱す単離抗体を提供する。ある種の態様において、ヒトRSP0はRSP01である。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。

【0160】

ある種の態様において、本発明は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、かつ充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する単離抗体を提供する。ある種の態様において、細胞外ドメインはヒトLGR5のアミノ酸番号22-564(SEQID NO:1)を含む。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。

【0161】

ある種の態様において、本発明は、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合し、かつRSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す単離抗体を提供する。ある種の態様において、細胞外ドメインはヒトLGR5のアミノ酸番号22-564(SEQID NO:1)を含む。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。

【0162】

本発明は、モノクローナル抗LGR5抗体88M1をさらに提供する。88M1モノクローナル抗体はブダペスト条約にしたがって、2008年7月31日付でアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC),10801University Blvd, Manassas, Virginia, 20110, USAに、ATCC寄託番号PTA-9342の下、寄託されたハイブリドーマ細胞株により産生される。ヒトLGR5に特異的に結合し、かつ(a)88M1の重鎖可変領域に対して少なくとも約95%の配列同一性(例えば、少なくとも約98%もしくは約100%の配列同一性)を有する重鎖可変領域を含む;(b)88M1の軽鎖可変領域に対して少なくとも約95%の配列同一性(例えば、少なくとも約98%もしくは約100%の配列同一性)を有する軽鎖可変領域を含む;(c)88M1の重鎖CDRを含む;(d) 88M1の軽鎖CDRを含む;(e) 88M1に結合できるエピトープに結合する;および/または(f) 競合的結合アッセイにおいて88M1と競合する抗体も提供される。抗体を産生する細胞株(ATCC寄託番号PTA-9342を有するハイブリドーマ細胞株を含むが、これに限定されない)、および抗体を含む組成物がさらに提供される。モノクローナル抗体の軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド、ならびにポリヌクレオチドを含むベクターおよび細胞も提供される。

【0163】

同一のまたは立体的に重なるエピトープを認識することにより二種の抗体が同じエピトープに結合するかどうかを判定するために、競合アッセイを用いることができる。競合的結合を判定するのに当技術分野において公知の(例えば、本明細書の他の箇所に記載され

10

20

30

40

50

ている免疫アッセイなどの)任意の方法を用いることができる。

【0164】

ある種の態様において、本発明は、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害するヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む可溶性受容体を提供する。ある種の態様において、細胞外ドメインはヒトLGR5のアミノ酸番号22-564(SEQID NO:1)を含む。ある種の態様において、ヒトLGR5の細胞外ドメインは非LGRタンパク質配列にインフレーションで連結される。ある種の態様において、非LGRタンパク質はヒトFcである。

【0165】

ある種の態様において、本発明は、RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱すヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインを含む可溶性受容体を提供する。ある種の態様において、細胞外ドメインはヒトLGR5のアミノ酸番号22-564(SEQID NO:1)を含む。ある種の態様において、ヒトLGR5の細胞外ドメインは非LGRタンパク質配列にインフレーションで連結される。ある種の態様において、非LGRタンパク質はヒトFcである。

【0166】

特定のRSP0またはLGRタンパク質に特異的に結合する能力を有する候補治療剤をスクリーニングするためのインビトロおよびインビボアッセイは、当技術分野において周知である。抗体による結合を評価するのに使用できる免疫アッセイには、例えば、ウエスタンブロット、放射免疫アッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、およびプロテインA免疫アッセイなどの技術を用いた競合的および非競合的アッセイ系が含まれる。標的RSP0またはLGRタンパク質との特異的結合を判定するためのFACS解析の使用は、具体例として、以下の実施例3に概略が述べられている。

【0167】

さらに、抗体とLGRまたはRSP0タンパク質との結合親和性、および抗体とLGRまたはRSP0との相互作用の解離速度(off-rate)を、競合的結合アッセイによって判定することもできる。競合的結合アッセイの一例は、漸増量の非標識LGRまたはRSP0タンパク質の存在下での関心対象の抗体との標識LGRまたはRSP0タンパク質のインキュベーション、および標識LGRまたはRSP0タンパク質に結合した抗体の検出を含む放射免疫アッセイである。次にScatchardプロット解析によってデータから、LGRまたはRSP0タンパク質に対する抗体の親和性および結合の解離速度を判定することができる。放射免疫アッセイを用いて第二の抗体(例えば、88M1)との競合を判定することもできる。例えば、LGRまたはRSP0タンパク質を、標識化合物に結合した関心対象の抗体と共に、漸増量の非標識二次抗体の存在下でインキュベートする。あるいは、抗体とLGRまたはRSP0タンパク質との結合親和性、ならびに抗体-LGR間のまたは抗体-RSP0間の相互作用の結合速度(on-rate)および解離速度を、BIAcoreなどの表面プラズモン共鳴によって判定することもできる。ある種の態様において、抗LGR抗体は、LGR発現細胞の膜に標的化され、そこに蓄積しうる。

【0168】

候補治療剤(抗体ではないものを含む)とLGRまたはRSP0タンパク質などのタンパク質との結合または他の相互作用を評価するための、当技術分野において公知のさらなるアッセイは、「薬物スクリーニング」と題した項において後述されている。

【0169】

(抗LGR抗体または抗RSP0抗体などの候補治療剤が、RSP0タンパク質のLGRタンパク質への結合を遮断できるかどうかを判定するのに適したアッセイは、同様に当技術分野において周知である。そのような競合的結合アッセイの例は、本明細書の他の箇所に記載されている。RSP01のLGR5への結合を少なくとも部分的に遮断するLGR5に対する抗体の能力を判定するためのFACSに基づく競合的結合アッセイの使用の一例が、具体例として、以下の実施例3に提供されている。

【0170】

さらに、特定の候補治療剤が、RSP0によるLGRシグナル伝達(例えば、LGR5シグナル伝達

)の活性化を乱すことができるおよび/または β -カテニンシグナル伝達を乱すことができるかどうかを判定するためのアッセイも、当技術分野において公知である。例えば、 β -カテニン応答性プロモーターに機能的に連結されたレポーター遺伝子の使用を採用したアッセイを用いて、抗RSP0抗体または抗LGR抗体の存在下での β -カテニンシグナル伝達のレベルを測定することができる。例えば、具体例として以下の実施例2に記載されているルシフェラーゼアッセイを参照されたい。

【0171】

抗腫瘍および/または抗がん幹細胞の効力に関して、RSP0またはLGRタンパク質を標的にする候補治療剤をスクリーニングするためのインビトロおよびインビボアッセイは、当業者には明らかであろう。当技術分野において公知の例示的なアッセイは、「薬物スクリー

10

【0172】

抗体(抗体断片を含む)

上記のように、ある種の態様において、治療剤はヒトLGRタンパク質またはヒトRSP0タンパク質に対する抗体などの抗体である。さらに、本発明は、診断目的またはスクリーニング目的のためなど、他の目的のために有用な抗体も提供する。ある種の態様において、本明細書に記載する抗体(治療用抗体を含むが、これに限定されない)は、単離されている。ある種の態様において、本明細書に記載する抗体は、実質的に純粋である。

20

【0173】

いくつかの態様において、抗体(治療で用いるか他の目的で用いるかを問わず)は、モノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体である。本発明は、二重特異性抗体をさらに提供する。ある種の態様において、抗体はFab断片などの、抗体断片である。

【0174】

ある種の態様において、本発明は、がん幹細胞マーカー(例えば、LGR5)に対する単離抗体を提供する。抗体または抗体断片は、所望の結腸がん幹細胞マーカーを特異的に認識する任意のモノクローナルまたはポリクローナル抗体でありうる。いくつかの態様において、本発明は、本明細書に記載する結腸がん幹細胞マーカーポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片を提供する。いくつかの態様において、モノクローナル抗体またはその断片は、本明細書に記載する結腸がん幹細胞マーカーポリペプチドの細胞外ドメインに特異的に結合するキメラ抗体またはヒト化抗体である。他の態様において、モノクローナル抗体またはその断片は、本明細書に記載する結腸がん幹細胞マーカーポリペプチドの細胞外ドメインに特異的に結合するヒト抗体である。

30

【0175】

がん幹細胞マーカーに対する抗体は、本明細書に記載する実験方法、診断方法および治療方法に用途がある。ある種の態様において、本発明の抗体は、例えば、患者の組織生検、胸水または血液試料などの生物学的試料における結腸がん幹細胞マーカータンパク質の発現を検出するために用いられる。組織生検から切片を作製し、例えば、免疫蛍光法または免疫組織化学法を用いてタンパク質を検出することができる。あるいは、試料から個別の細胞を単離し、FACS解析によって固定化細胞または生細胞でのタンパク質の発現を検出する。さらに、抗体をタンパク質アレイ上に用いて、例えば、腫瘍細胞上での、細胞溶解液中での、または他のタンパク質試料中での結腸がん幹細胞マーカーの発現を検出することもできる。他の態様において、本発明の抗体を用いてインビトロの細胞に基づくアッセイまたはインビボ動物モデルのいずれかで、抗体と腫瘍細胞とを接触させることにより、腫瘍細胞の増殖を阻害する。他の態様において、該抗体を用いて結腸がん幹細胞マーカーに対する治療上有効量の抗体を投与することにより、ヒト患者におけるがんを処置する。

40

50

【0176】

ポリクローナル抗体は、任意の公知の方法によって調製することができる。ポリクローナル抗体は、任意でキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミンなどに結合されてもよい関連抗原(精製ペプチド断片、全長組み換えタンパク質、融合タンパク質など)を滅菌生理食塩水に希釈し、アジュバント(例えば完全または不完全フロイントアジュバント)と組み合わせて安定な乳濁液を形成させたものを複数回、皮下注射または腹腔内注射することで動物(例えばウサギ、ラット、マウス、ロバなど)を免疫することにより作製することができる。次いで、そのように免疫された動物の血液、腹水などから、ポリクローナル抗体を回収する。採取した血液を凝固し、血清をデカントし、遠心分離によって清澄化し、抗体力価についてアッセイする。ポリクローナル抗体はアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などを含め、当技術分野において標準的な方法にしたがい、血清または腹水から精製することができる。

10

【0177】

モノクローナル抗体はKohler and Milstein (1975) Nature 256:495によって記載されているものなどの、ハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法を用いて、マウス、ハムスターまたは他の適切な宿主細胞を上記のように免疫して、免疫抗原に特異的に結合する抗体の、リンパ球による産生を誘発する。あるいは、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。免疫の後、リンパ球を単離し、例えば、ポリエチレングリコールを用いて適当な骨髓腫細胞株と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成させ、これを次に未融合リンパ球および骨髓腫細胞から選択分離することができる。次いで、免疫沈降、免疫プロットイングにより、または放射免疫アッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などのインビトロ結合アッセイにより判定されるように、選択抗原に対して特異的に作製されたモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、標準的な方法を用いたインビトロ培養(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)でまたは動物での腹水腫瘍としてインビボで増やすことができる。次いで、ポリクローナル抗体の場合に上述したように、培地または腹水からモノクローナル抗体を精製することができる。

20

【0178】

あるいは、モノクローナル抗体を、米国特許第4,816,567号に記載されているように組み換えDNA法によって作出することもできる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、例えば成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から、例えば抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRによって単離し、その配列を従来の手順によって決定する。次いで、重鎖および軽鎖をコードする単離ポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターにクローニングし、これを、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌(E.coli)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトした場合に、宿主細胞によってモノクローナル抗体が産生される。また、所望の種の組み換えモノクローナル抗体またはその断片を、記載(McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628; および Markset al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597)のように、ファージディスプレイライブラリーから単離することもできる。

30

40

【0179】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを、組み換えDNA技術を用いていくつかの異なる方法でさらに修飾して、代替の抗体を作出することができる。一つの態様において、例えば、マウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインを、(1)例えば、ヒト抗体のその領域に置き換えてキメラ抗体を作出してもよく、または(2)非免疫グロブリンポリペプチドに置き換えて融合抗体を作出してもよい。他の態様において、定常領域を切断または除去して、モノクローナル抗体の所望の断片を作出する。さらに、可変領域の部位特異的または高密度突然変異誘発を用いて、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化することもできる。

50

【0180】

本発明のいくつかの態様において、結腸がん幹細胞マーカーに対するモノクローナル抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体は、可変領域内に非ヒト(例えばマウス)抗体由来の最小配列を含む抗体である。そのような抗体は、ヒト被験体に投与される場合に抗原性およびHAMA(ヒト抗マウス抗体)反応を低減するように治療的に用いられる。実際、ヒト化抗体は、典型的には非ヒト配列が最小限から全くなしのヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒトによって産生される抗体、またはヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。

【0181】

ヒト化抗体は、当技術分野において公知のさまざまな技術を用いて産生することができる。抗体は、ヒト抗体のCDRを、所望の特異性、親和性、および能力を有する(例えばマウス、ラット、ウサギ、ハムスターなどの)非ヒト抗体のCDRと置き換えることによってヒト化することができる(Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536)。ヒト化抗体をFvフレームワーク領域中の、および/または置換された非ヒト残基内のさらなる残基の置換によりさらに修飾して、抗体の特異性、親和性および/または能力を洗練し最適化してもよい。

【0182】

ヒト抗体は、当技術分野において公知のさまざまな技術を用いて直接調製することができる。インビトロで免疫された不死化ヒトBリンパ球、または標的抗原に対して作製された抗体を産生する免疫済の個体から単離された不死化ヒトBリンパ球を作出することができる(例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147 (1):86-95; および米国特許第5,750,373号を参照のこと)。また、ヒト抗体は、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから選択することもできる(Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314; Sheets et al., 1998, PNAS, 95:6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381; Mark et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581)。ヒト化抗体は、免疫によって、内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体の全レパートリーを産生できる、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含んだトランスジェニックマウスで作出することもできる。この手法は米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号に記載されている。

【0183】

本発明は、結腸がん幹細胞マーカーを特異的に認識する二重特異性抗体も包含する。二重特異性抗体は、少なくとも二つの異なるエピトープを特異的に認識し結合しうる抗体である。異なるエピトープは、同じ分子(例えば同じ結腸がん幹細胞マーカーポリペプチド)内に存在してもよく、または異なる分子上に存在してもよく、それによって両方、例えば抗体が、結腸がん幹細胞マーカー、ならびに、例えば、(1)T細胞受容体(例えばCD3)またはFc受容体(例えばCD64、CD32もしくはCD16)などの白血球上のエフェクター分子、あるいは(2)以下で詳細に記載されている細胞毒性剤を、特異的に認識および結合できる。二重特異性抗体は、無傷の抗体または抗体断片でありうる。二重特異性抗体を作出するための技術は、当技術分野において一般的である(Millstein et al., 1983, Nature 305:537-539; Brennan et al., 1985, Science 229:81; Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol. 121:120; Trautnecker et al., 1991, EMBOJ. 10:3655-3659; Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med. 175:217-225; Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553; Gruber et al., 1994, J. Immunol. 152:5368; および米国特許第5,731,168号)。

【0184】

本発明のある種の態様において、例えば、腫瘍浸潤を増大させるために、無傷の抗体ではなく、抗体断片を用いることが望ましいこともある。抗体断片の産生のためのさまざまな技術が知られている。伝統的には、これらの断片は無傷の抗体のタンパク質分解的消化によって得られる(例えばMorimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical

10

20

30

40

50

al Methods 24:107-117およびBrennanetal., 1985, Science, 229:81)。しかし、現在では、これらの断片は、典型的には、上記のように組み換え宿主細胞によって直接産生されている。すなわちFab、FvおよびscFv抗体断片は全て、大腸菌または他の宿主細胞において発現され、それらから分泌され、かくしてこれらの断片の大量生産を可能にすることができる。あるいは、そのような抗体断片を上記の抗体ファージライブラリーから単離することもできる。抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されているように線状の抗体であってもよく、単一特異性または二重特異性であってもよい。抗体断片の産生のための他の技術は明らかであろう。

【0185】

とりわけ抗体断片の場合、その血清中半減期を増大させるために抗体を修飾することがさらに望ましいことがある。これは、例えば、抗体断片中の適切な領域の突然変異によって抗体断片にサルベージ受容体結合エピトープを組み入れることにより、またはペプチドタグにエピトープを組み入れ、これを抗体断片にいずれかの末端でまたは中央で(例えば、DNAまたはペプチド合成により)融合させることにより実現することができる。

【0186】

本発明は、本明細書に記載する、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体、またはその抗体断片に実質的に相同である変異体および等価体をさらに包含する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、すなわち類似のアミノ酸による一つまたは複数のアミノ酸の置換を含むことができる。例えば、保存的置換は、例えば、ある酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸との置換、ある塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸との置換、またはある中性アミノ酸の別の中性アミノ酸による置換など、同じ一般的クラス内の別のアミノ酸とのアミノ酸の置換をいう。保存的アミノ酸置換によって意図されるものは、当技術分野において周知である。

【0187】

本発明はまた、細胞毒性剤に結合された抗体を含む免疫複合体にも関する。細胞毒性剤には化学療法剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物または動物由来の酵素活性毒素、またはその断片)、放射性同位体(すなわち、放射性複合体)などが含まれる。そのような免疫複合体の作出において有用な化学療法剤には、例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤が含まれる。使用できる酵素活性毒素およびその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、 α -サルシン、シナアブラギリ(*Aleuritesfordii*)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(*Phytolaccaamericana*)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ツルレイシ(*momordicacharantia*)阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ(*sapaonariaofficinalis*)阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、ならびにトリコテセンが含まれる。 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y および ^{186}Re を含めて、種々の放射性核種が、放射性結合された抗体の産生に利用可能である。抗体および細胞毒性剤の複合体は、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジピミド酸ジメチルHCLなど)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)、アルデヒド(グルタルアルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサレンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネートなど)、およびビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)のような種々の二官能性タンパク質結合剤を用いて生成される。抗体と一つまたは複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、トリコテセン、およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の誘導体との複合体を用いることもできる。

【0188】

いくつかの態様において、本発明の抗体は、エフェクター機能、例えば、抗原依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害(CDC)を増強するように修飾さ

れているヒトFc領域を含む。これは、抗体のFc領域に一つまたは複数のアミノ酸置換を導入することによって実現することができる。例えば、システイン残基をFc領域に導入し、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成させて、補体媒介性細胞死滅および抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を向上させることができる(Caronetal., 1992, J. Exp Med. 176:1191-1195; Shopes, 1992, Immunol. 148:2918-2922)。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体の抗体を、Wolffetal., 1993, Cancer Research 53:2560-2565に記載されているようにヘテロ二官能性架橋剤を用いて調製することもできる。あるいは、二つの部分からなるFc領域を有する抗体を設計することもできる(Stevensonetal., 1989, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)。

【0189】

10

いくつかの態様において、本発明は、本発明の幹細胞がんマーカーを発現する腫瘍を標的とする抗体を提供する。任意の適当な抗体(例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体または合成抗体)を、本明細書において開示される治療方法で利用することができる。いくつかの態様において、がん治療に用いられる抗体は、ヒト化抗体である。抗体をヒト化するための方法は当技術分野において周知である(例えば、米国特許第6,180,370号、同第5,585,089号、同第6,054,297号、および同第5,565,332号を参照されたく、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる)。

【0190】

いくつかの態様において、治療用抗体は、本発明の幹細胞がんマーカーに対して作製された抗体を含み、ここでこの抗体は細胞毒性剤に結合されている。そのような態様において、正常細胞を標的とせず、したがって従来の化学療法有害な副作用の多くを低減する腫瘍特異的な治療剤が作製される。ある種の適用では、治療剤は、抗体への付着に有用な薬剤、特に内皮細胞の増殖または細胞分裂を止めるまたは抑える能力を有する細胞毒性剤またはその他の抗細胞剤として働く薬理学的薬剤であると想定される。本発明は、抗体に結合され、活性な形態で送達されうる任意の薬理学的薬剤の使用を企図する。例示的な抗細胞剤としては、化学療法剤、放射性同位体、および細胞毒素が挙げられる。本発明の治療用抗体には、放射性同位体(例えばヨウ素-131、ヨウ素-123、テクネチウム-99m、インジウム-111、レニウム-188、レニウム-186、ガリウム-67、銅-67、イットリウム-90、ヨウ素-125またはアスタチン-211)、ステロイドなどのホルモン、シトシンなどの代謝拮抗物質(例えば、アラビノシド、フルオロウラシル、メトトレキサートまたはアミノプテリン; アントラサイクリン; マイトマイシンC)、ビンカアルカロイド(例えば、デメコルシン; エトポシド; ミトラマイシン)、およびクロラムブシルまたはメルファランなどの抗腫瘍アルキル化剤を含むがこれらに限定されない、種々の細胞毒性部分が含まれうる。他の態様では、凝固剤、サイトカイン、増殖因子、細菌内毒素または細菌内毒素のリピッドA部分などの薬剤が含まれうる。例えば、いくつかの態様において、治療剤には、ほんの数例を挙げれば、植物、真菌、または細菌由来の毒素、例えばA鎖毒素、リボソーム不活性化タンパク質、 α -サルシン、アスペルギリン、レストリクトシン、リボヌクレアーゼ、ジフテリア毒素または緑膿菌(pseudomonas)外毒素が含まれよう。いくつかの態様において、脱グリコシル化リシンA鎖が利用される。

20

30

【0191】

40

いずれにしても、必要に応じて公知の結合技術を用いて標的化される腫瘍細胞の部位で、薬剤の標的化、内部移行、放出または血液成分への提示を可能にする様式で、これらのような薬剤が、所望であれば、抗体に成功裏に結合されることが提唱されている(例えば、Ghoseetal., Methods Enzymol., 93:280 [1983]を参照のこと)。

【0192】

例えば、いくつかの態様において、本発明は、本発明の幹細胞がんマーカーを標的とする免疫毒素を提供する。免疫毒素は、特異的標的化剤、典型的には腫瘍に対する抗体または断片と、毒素部分などの細胞毒性剤との複合体である。標的化剤は、標的となる抗原を保有する細胞に毒素を向け、それによりその細胞を選択的に死滅させる。いくつかの態様において、治療用抗体は高いインビボ安定性を与える架橋剤を利用する(Thorpeetal., Ca

50

ncer Res., 48:6396 [1988])。

【0193】

他の態様、特に充実性腫瘍の処置を伴う態様において、血管内皮細胞の増殖または細胞分裂を抑制することにより、腫瘍の脈管構造に対して、細胞傷害性作用または他の様式で抗細胞作用を有するように抗体がデザインされる。この攻撃は、腫瘍細胞、特に脈管構造から遠位の腫瘍細胞から酸素および栄養分を欠乏させて、最終的に細胞死および腫瘍壊死を誘導して、腫瘍に限局性の血管虚脱を誘導することを意図する。

【0194】

いくつかの態様において、抗体に基づく治療薬は、下記のように薬学的組成物として処方される。いくつかの態様において、本発明の抗体組成物の投与は、がんの測定可能な減少(例えば、腫瘍の減少または消失)をもたらす。

【0195】

本発明は、一つまたは複数の抗体を含むキットおよび製造品をさらに提供する。ある種の態様において、キットは少なくとも二つの抗体を含む。ある種の態様において、キットは、ヒトRSP0タンパク質またはヒトLGRタンパク質に特異的に結合する少なくとも二つの抗体を含む。

【0196】

薬物スクリーニング

いくつかの態様において、本発明は、薬物スクリーニングアッセイ(例えば、抗がん薬をスクリーニングするための)を提供する。ある種の態様において、本発明のスクリーニング法では、本発明の方法を用いて同定された幹細胞がんマーカーを利用する。例えば、いくつかの態様において、本発明は、幹細胞がんマーカー遺伝子の発現を変化させる(例えば、増加または減少させる)化合物をスクリーニングする方法を提供する。いくつかの態様において、候補化合物は、がんマーカーに対して作製されたアンチセンス剤またはsiRNA剤(例えば、オリゴヌクレオチド)である。他の態様において、候補化合物は、本発明の幹細胞がんマーカーに特異的に結合する抗体である。ある種の態様において、小分子化合物のライブラリーが、本明細書に記載する方法を用いてスクリーニングされる。

【0197】

あるスクリーニング方法では、化合物と幹細胞がんマーカーを発現している細胞とを接触させ、次いで発現に及ぼす候補化合物の作用をアッセイすることにより、候補化合物が幹細胞がんマーカーの発現を変化させる能力について候補化合物を評価する。いくつかの態様において、がんマーカー遺伝子の発現に及ぼす候補化合物の作用は、細胞により発現されるがんマーカーmRNAのレベルを検出することによってアッセイされる。mRNAの発現は、任意の適当な方法により検出することができる。他の態様において、がんマーカー遺伝子の発現に及ぼす候補化合物の作用は、がんマーカーによりコードされるポリペプチドのレベルを測定することによってアッセイされる。発現されるポリペプチドのレベルは、本明細書において開示されるものを含むがこれに限定されない、任意の適当な方法を用いて測定することができる。いくつかの態様において、細胞生物学における他の変化(例えば、アポトーシス)が検出される。

【0198】

具体的には、本発明は、本発明のがんマーカーに結合する、または本発明のがんマーカーに関連するシグナル伝達もしくは機能を変化させる、例えば、幹細胞がんマーカーの発現もしくはがんマーカーの活性に阻害作用(もしくは刺激作用)を及ぼす、または、例えば、がんマーカー基質の発現もしくは活性に刺激作用もしくは阻害作用を及ぼす調節因子、すなわち、候補化合物または被験化合物または薬剤(例えば、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、ペプトイド、小分子または他の薬物)を同定するためのスクリーニング方法を提供する。このように同定された化合物を用いて、治療プロトコルのなかで標的遺伝子産物(例えば、幹細胞がんマーカー遺伝子)の活性を直接的もしくは間接的に調節することができ、標的遺伝子産物の生物学的機能を詳しく述べることができ、または正常な標的遺伝子の相互作用を乱す化合物を同定することができる。がんマーカーの活性または発現

を阻害する化合物は、増殖性疾患、例えば、がん、特に転移がんの処置において、または腫瘍幹細胞を排除もしくは制御してがんのリスクを予防もしくは低下させることにおいて有用である。

【0199】

一つの態様において、本発明は、がんマーカータンパク質もしくはポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分の基質である候補化合物または被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。別の態様において、本発明は、がんマーカータンパク質もしくはポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分に結合する、またはその活性を調節する候補化合物または被験化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。

【0200】

本発明の被験化合物は、生物学的ライブラリー；ペプチドライブラリー(ペプチドの官能基を有するが新規な非ペプチド主鎖を有し、酵素分解に抵抗性であるにもかかわらず生体活性を維持する分子ライブラリー；例えば、Zuckennannetal., J. Med. Chem. 37:2678-85 [1994]を参照のこと)；空間的にアドレス可能な並列固相または溶液相ライブラリー；デコンボリューションを要する合成ライブラリー法；「1ビーズ-1化合物」ライブラリー法；およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法を含め、当技術分野において公知のコンビナトリアルライブラリー法における多数の手法のうちのいずれかを用いて得ることができる。生物学的ライブラリーおよびペプチドライブラリーの手法は、ペプチドライブラリーでの使用に好ましく、その他の四つの手法は、ペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは小分子ライブラリーの化合物に適用可能である(Lam (1997)Anticancer Drug Des. 12:145)。

【0201】

分子ライブラリーの合成のための方法の例は、当技術分野において、例えば、DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A.90:6909 [1993]; Erb et al., Proc. Nad. Acad.Sci. USA 91:11422 [1994];Zuckermannet al., J. Med. Chem. 37:2678 [1994]; Cho et al., Science 261:1303[1993];Carrell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33.2059 [1994]; Carell etal.,Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061 [1994]; およびGallop et al., J. Med.Chem.37:1233 [1994]において見出すことができる。

【0202】

化合物のライブラリーは、溶液中(例えば、Houghten, Biotechniques 13:412-421 [1992])で、あるいはビーズ上(Lam,Nature354:82-84 [1991])、チップ上(Fodor, Nature 364:555-556 [1993])、細菌もしくは胞子上(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,223,409号)、プラスミド上(Culletal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:18651869 [1992])、またはファージ上(Scott andSmith,Science 249:386-390 [1990]; Devlin Science 249:404-406 [1990]; Cwirla etal.,Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382 [1990]; Felici, J. Mol. Biol.222:301[1991])に提示することができる。

【0203】

一つの態様において、アッセイは、細胞に基づくアッセイであり、幹細胞がんマーカータンパク質またはその生物学的に活性な部分を発現する細胞を被験化合物と接触させ、がんマーカーの活性を調節する被験化合物の能力を判定する。幹細胞がんマーカーの活性を調節する被験化合物の能力の判定は、例えば、酵素活性の変化をモニタリングすることによって実現することができる。細胞は、例えば、哺乳動物由来のものでありうる。

【0204】

化合物、例えば、幹細胞がんマーカーの基質へのがんマーカーの結合を調節する被験化合物の能力を評価することもできる。例えば、これは、化合物、例えば基質を、放射性同位体または酵素標識とカップリングさせ、その結果、複合体中の標識化合物、例えば基質を検出することによって、化合物、例えば基質のがんマーカーへの結合を判定できるようにすることで実現可能である。

【0205】

あるいは、幹細胞がんマーカーを放射性同位体または酵素標識とカップリングさせて、

複合体中のがんマーカーの基質へのがんマーカーの結合を調節する被験化合物の能力をモニタリングする。例えば、化合物(例えば、基質)を ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C または ^3H で直接的または間接的に標識することができ、放射線照射の直接的な計測によってまたはシンチレーション計測によって放射性同位体を検出することができる。あるいは、化合物を、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたはルシフェラーゼで酵素的に標識し、適切な基質の生成物への変換の判定によって酵素標識を検出することもできる。

【0206】

相互作用体のいずれかの標識化の有無で、化合物(例えば、幹細胞がんマーカーの基質)が幹細胞がんマーカーと相互作用する能力を評価することができる。例えば、マイクロフィジオメータを用いて、化合物またはがんマーカーのどちらかの標識化なしで、化合物とがんマーカーとの相互作用を検出することができる(McConnelletal. Science 257:1906-1912 [1992])。本明細書で用いる場合、「マイクロフィジオメータ」(例えば、サイトセンサ(Cytosensor))とは、細胞がその環境を酸性化する速度を、光アドレス可能電位差測定センサ(LAPS)を用いて測定する分析機器である。この酸性化速度の変化を、化合物およびがんマーカー間の相互作用の指標として用いることができる。

【0207】

別の態様において、がんマーカータンパク質またはその生物学的に活性な部分を被験化合物と接触させ、幹細胞がんマーカータンパク質またはその生物学的に活性な部分に結合する被験化合物の能力が評価される、無細胞アッセイが提供される。本発明のアッセイにおいて用いられるがんマーカータンパク質の生物学的に活性な部分には、基質または他のタンパク質との相互作用に関与する断片、例えば高い表面確率スコアを有する断片が含まれる。

【0208】

無細胞アッセイは、標的遺伝子タンパク質および被験化合物の反応混合物を、この二つの構成要素を相互作用および結合させることで、除去および/または検出できる複合体を形成させるのに十分な条件および時間で、調製することを伴う。

【0209】

二つの分子間の相互作用は、例えば、蛍光エネルギー移動(FRET)(例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号、Stavrianopoulosら、米国特許第4,968,103号を参照されたく、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる)を用いて検出することもできる。第一ドナー分子が放射した蛍光エネルギーが第二「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、その標識が吸収エネルギーによって蛍光を発せられるような、フルオロフォア標識が選択される。

【0210】

あるいは「ドナー」タンパク質分子は、トリプトファン残基の自然蛍光エネルギーを単に利用することもできる。異なる波長の光を発生し、その結果、「アクセプター」分子標識を「ドナー」のそれと区別できるような、標識が選択される。標識間のエネルギー移動の効率は、分子を隔てる距離に関係することから、分子間の空間関係の評価することができる。分子間で結合が起こる状況では、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光放射は最大のはずである。FRETの結合事象は、当技術分野において周知の標準的な蛍光検出手段によって(例えば、蛍光計を用いて)好都合に測定することができる。

【0211】

別の態様において、標的分子に結合する幹細胞がんマーカータンパク質の能力の判定は、実時間の生体分子相互作用分析(BiomolecularInteractionAnalysis; BIA)を用いて実現することができる(例えば、Sjolander and Urbaniczky, Anal.Chem.63:2338-2345 [1991]およびSzabo et al. Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705[1995]を参照のこと)。「表面プラズモン共鳴」または「BIA」では、反応体のいずれも標識化せずに、実時間で生体特異的な相互作用が検出される(例えば、BIAcore)。結合表面での質量の変化(結合事象を示す)は、表面近くの光の屈折率の改変(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)を招き、生体分子間の実時間反応の指標として使用できる検出可能なシグナルを生じる。

【0212】

一つの態様において、標的遺伝子産物または被験物質を固相上に固定する。固相上に固定された標的遺伝子産物/被験化合物の複合体を、反応の終了時に検出することができる。標的遺伝子産物を固体表面上に固定することができ、被験化合物(固定されていない)を、本明細書において論じられる検出可能な標識で直接的または間接的に標識することができる。

【0213】

幹細胞がんマーカー、抗がんマーカー抗体またはその標的分子を固定化して、タンパク質の一方または両方の非複合体化型からの複合体化型の分離を容易にすること、およびアッセイの自動化に合わせることが望ましいこともある。幹細胞がんマーカータンパク質への被験化合物の結合、または候補化合物の存在下および非存在下でのがんマーカータンパク質と標的分子との相互作用は、反応体を含有するのに適した任意の容器の中で実現することができる。そのような容器の例としては、マイクロタイタープレート、試験管および微量遠心管が挙げられる。一つの態様において、タンパク質の一方または両方をマトリックスに結合させるドメインを付加する融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ・がんマーカー融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させることができ、これを被験化合物と、または被験化合物および非吸着標的タンパク質もしくはがんマーカータンパク質のいずれかと混合し、この混合物を、複合体の形成をもたらす条件下で(例えば、塩およびpHに関して生理的条件で)インキュベートする。インキュベーションの後、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルを洗浄して、未結合の任意の成分を除去し、ビーズの場合にはマトリックスに固定化し、例えば、上記のように直接的または間接的に複合体を判定する。

【0214】

あるいは、複合体をマトリックスから解離させ、がんマーカーの結合または活性のレベルを標準的な技術を用いて判定することもできる。がんマーカータンパク質または標的分子のいずれかをマトリックス上に固定化するための他の技術には、ビオチンおよびスト렙トアビジンの結合の使用が含まれる。ビオチン化されたがんマーカータンパク質または標的分子は、当技術分野において公知の技術(例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals, Rockford, IL)を用いてビオチン-NHS (N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から調製し、スト렙トアビジン被覆96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定化することができる。

【0215】

アッセイを行うために、固定された成分を含む被覆表面に非固定化成分を加える。反応が完了した後に、形成されたいかなる複合体も固体表面に固定化されたままになる条件下で、未反応の成分を除去する(例えば、洗浄により)。固体表面に固定された複合体の検出はいくつかの方法で実現することができる。予め固定化されていない成分が予め標識されている場合、表面に固定化された標識の検出は、複合体が形成されたことを示す。予め固定化されていない成分が予め標識されていない場合、間接的な標識を用いて、表面に固定された複合体を検出することができる；例えば、固定化された成分に特異的な標識抗体を用いて検出することができる(その抗体は、直接的に標識されていてもよく、または例えば標識抗IgG抗体で間接的に標識されてもよい)。

【0216】

このアッセイは、幹細胞がんマーカータンパク質または標的分子と反応性であるが、幹細胞がんマーカータンパク質のその標的分子への結合を妨害しない抗体を利用して行われる。そのような抗体をプレートのウェルに誘導体化し、未結合の標的またはがんマーカータンパク質を、抗体の結合によってウェルに捕捉することができる。そのような複合体を検出するための方法には、GST固定化複合体の場合に上述したものに加えて、がんマーカータンパク質または標的分子と反応性の抗体を用いた複合体の免疫検出、およびがんマ

カータンパク質または標的分子と関連する酵素活性を検出することに依る酵素結合アッセイが含まれる。

【0217】

あるいは、無細胞アッセイは液相中で行うこともできる。そのようなアッセイでは、反応産物は、分画遠心分離(例えば、Rivas and Minton, Trends Biochem Sci 18:284-7 [1993]を参照のこと); クロマトグラフィー(ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー); 電気泳動(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New York.を参照のこと); および免疫沈降(例えば、Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology 1999, J. Wiley: New Yorkを参照のこと)を含むが、これらに限定されない、いくつかの標準的な技術のうちのいずれかにより、未反応の成分から分離される。そのような樹脂およびクロマトグラフィー技術は公知である(例えば、Heegaard J. Mol. Recognit 11:141-8 [1998]; Hage and Tweed J. Chromatogr. Biomed. Sci. Appl 699:499-525 [1997]を参照のこと)。さらに、溶液から複合体をそれ以上精製しないで結合を検出するため、本明細書に記載するように、蛍光エネルギー移動を好都合に利用することもできる。

10

【0218】

アッセイには、幹細胞がんマーカータンパク質またはその生物学的に活性な部分と、がんマーカーに結合する公知の化合物とを接触させてアッセイ混合物を形成させる段階、アッセイ混合物と被験化合物とを接触させる段階、およびがんマーカータンパク質と相互作用する被験化合物の能力を判定する段階を含めることができ、ここで、がんマーカータンパク質と相互作用する被験化合物の能力を判定する段階には、がんマーカーもしくはその生物学的に活性な部分に選択的に結合する、または標的分子の活性を調節する被験化合物の能力を、公知の化合物と比べて判定する段階が含まれる。

20

【0219】

幹細胞がんマーカーが、インビボで、タンパク質などの一つまたは複数の細胞高分子または細胞外高分子と相互作用できる程度に、そのような相互作用の阻害剤は有用である。阻害剤を同定するために、均一性アッセイを用いることができる。

【0220】

例えば、標的遺伝子産物またはその結合パートナーのいずれかを標識するが、標識により生成されるシグナルは複合体の形成によって消光されるように、標的遺伝子産物と相互作用性細胞または細胞外結合パートナー産物との、予め形成された複合体を調製する(例えば、免疫アッセイにこの手法を利用している米国特許第4,109,496号を参照されたく、これは参照により本明細書に組み入れられる)。予め形成された複合体由来の種の一つと競合して置き換わる被験物質を加えることで、バックグラウンドを超えるシグナルの生成が起こるであろう。このようにして、標的遺伝子産物と結合パートナーとの相互作用を乱す被験物質を同定することができる。あるいは、がんマーカータンパク質を2ハイブリッドアッセイまたは3ハイブリッドアッセイ(例えば、米国特許第5,283,317号; Zervos et al., Cell 72:223-232 [1993]; Madura et al., J. Biol. Chem. 268:12046-12054 [1993]; Bartel et al., Biotechniques 14:920-924 [1993]; Iwabuchi et al., Oncogene 8:1693-1696 [1993]; およびBrentのWO 94/10300を参照されたく、これらの各々が参照により本明細書に組み入れられる)における「ベイトタンパク質」として用い、がんマーカーに結合しまたはそれと相互作用し(「がんマーカー-結合タンパク質」または「がんマーカー-bp」)、かつがんマーカーの活性に関与する他のタンパク質を同定することもできる。そのようながんマーカー-bpは、例えば、がんマーカー媒介性シグナル伝達経路の下流の要素として、がんマーカータンパク質または標的によるシグナルの活性化因子または阻害因子でありうる。

30

40

【0221】

がんマーカー発現の調節因子を同定することもできる。例えば、細胞または無細胞混合物を候補化合物と接触させ、がんマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現を、候補化合物の非存在下での幹細胞がんマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現レベルに比べて評価す

50

る。がんマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下におけるよりも存在下において高い場合、候補化合物はがんマーカーmRNAまたはタンパク質の発現の刺激因子と同定される。あるいは、がんマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現が、候補化合物の非存在下におけるよりも存在下において少ない(すなわち、統計的に有意に少ない)場合、候補化合物はがんマーカーmRNAまたはタンパク質の発現の阻害因子と同定される。がんマーカーのmRNAまたはタンパク質の発現レベルは、がんマーカーのmRNAまたはタンパク質を検出するために本明細書に記載する方法により判定することができる。

【0222】

調節剤は、細胞に基づくアッセイまたは無細胞アッセイを用いて同定することができ、その薬剤が、がんマーカータンパク質の活性を調節する能力は、例えば、疾患の動物モデル(例えば、前立腺がんもしくは転移性前立腺がんを有する動物)；あるいは動物(例えば、ヒト)由来の前立腺がんの異種移植片、または前立腺がんの(例えば、リンパ節、骨もしくは肝臓への)転移に起因するがん由来の細胞、もしくは前立腺がん細胞株由来の細胞を内部に有する動物などの、動物においてインビボで確認することができる。

【0223】

本発明はさらに、上記のスクリーニングアッセイ(例えば、がん治療に関する説明の下部を参照のこと)により同定された新規の薬剤に関する。したがって、本明細書に記載するように同定された薬剤(例えば、がんマーカー調節剤、アンチセンスがんマーカー核酸分子、siRNA分子、がんマーカー特異的抗体、またはがんマーカー結合パートナー)を適切な動物モデル(本明細書に記載するものなどの)でさらに用いて、そのような薬剤を用いた処置の有効性、毒性、副作用、または作用機序を判定することは本発明の範囲内である。さらに、上記のスクリーニングアッセイによって同定された新規の薬剤を、例えば、本明細書に記載する処置のために(例えば、がんを有するヒト患者を処置するために)用いることもできる。

【0224】

ある種の態様において、本発明は、抗体を含むが、これに限定されない候補薬物を(a)ヒトRSP0タンパク質もしくはヒトLGRタンパク質に特異的に結合する、(b)ヒトRSP0タンパク質とヒトLGRタンパク質との間の結合を乱す、および/または(c)RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱すその能力についてスクリーニングするための方法を提供する。

【0225】

薬学的組成物および方法

本発明は、薬学的組成物(例えば、本発明の幹細胞がんマーカーを標的とする小分子、アンチセンス、抗体またはsiRNAを含む)をさらに提供する。したがって、LGRまたはRSP0タンパク質を標的とする抗体などの、本明細書に記載する治療剤の一つまたは複数を含む薬学的組成物が提供される。ある種の態様において、本明細書に記載する一つまたは複数の治療剤を含む薬学的組成物は、薬学的に許容される担体をさらに含む。

【0226】

本発明の薬学的組成物は、局所処置または全身処置が望まれるかどうかに応じて、および処置される領域に応じていくつかの方法で投与することができる。投与は局所投与(経眼送達、ならびに腔送達および結腸送達を含む粘膜への送達を含め)、肺投与(例えば、粉末もしくはエアロゾルの吸入もしくは吸入による、例えば噴霧器による；気管内投与、鼻腔内投与、上皮投与および経皮投与)、経口投与または非経口投与であってよい。非経口投与は、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内もしくは筋肉内への注射もしくは注入；または頭蓋内、例えば、髄腔内または脳室内投与を含む。

【0227】

局所投与用の薬学的組成物および処方物は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、液滴、坐剤、スプレー、液体および粉末を含むことができる。従来の薬学的担体、水性、粉末または油性基剤、粘稠化剤などが、必要または望ましいこともある。

【0228】

経口投与用の組成物および処方物には、粉末または顆粒、水もしくは非水性媒体の懸濁

10

20

30

40

50

液または溶液、カプセル、サシェ(sachet)または錠剤が含まれる。粘稠化剤、着香料、希釈剤、乳化剤、分散補助剤、または結合剤が、望ましいこともある。

【0229】

非経口、髄腔内または脳室内投与用の組成物および処方物は、緩衝液、希釈剤、ならびに以下に限定されないが、浸透促進剤、担体化合物および他の薬学的に許容される担体または賦形剤などの他の適当な添加剤も含有しうる滅菌水溶液を含むことができる。

【0230】

本発明の薬学的組成物は、溶液、乳濁液、およびリポソーム含有処方物を含むが、これらに限定されることはない。これらの組成物は、予め形成された液体、自己乳化性固体および自己乳化性半固体を含むが、これらに限定されない、さまざまな成分から作製することができる。

10

【0231】

単位剤形で好都合に提示できる本発明の薬学的処方物は、製薬業界において周知の従来技術によって調製することができる。そのような技術には、活性成分を薬学的担体または賦形剤と会合させる段階が含まれる。一般に、処方物は、活性成分を液体担体もしくは微粉化固体担体またはその両方と、均一かつ密に会合させ、次に必要ならば、その生成物を成形することによって調製される。

【0232】

本発明の組成物は、以下に限定されないが、錠剤、カプセル、液体シロップ、軟質ゲル、坐剤、および浣腸剤などの多数の可能な剤形のいずれかに処方することができる。本発明の組成物は、水性媒体、非水性媒体、または混合媒体の懸濁液として処方することもできる。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールおよび/またはデキストランを含め、懸濁液の粘性を増大する物質をさらに含有することもできる。懸濁液は安定化剤を含有することもできる。

20

【0233】

本発明の一つの態様において、薬学的組成物は泡剤として処方および使用することができる。薬学的泡剤は、以下に限定されないが、乳濁液、マイクロエマルジョン、クリーム、ゼリーおよびリポソームなどの処方物を含む。これらの処方物は、基本的には性質が類似しているが、構成成分および最終製品の一貫性が多様である。

【0234】

細胞レベルでオリゴヌクレオチドの取り込みを高める薬剤を、本発明の薬学的組成物および他の組成物に加えることもできる。例えば、リポフェクチンなどの陽イオン性脂質(米国特許第5,705,188号)、陽イオン性グリセロール誘導体、およびポリリジン(W097/30731)などのポリカチオン性分子も、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを高める。

30

【0235】

本発明の組成物は、薬学的組成物に従来見られる他の補助成分をさらに含有することもできる。したがって、例えば、この組成物は、例えば鎮痛薬、収斂薬、局所麻酔薬もしくは抗炎症剤など、さらなる適合性の薬学的に活性な物質を含有してもよく、または色素、着香料、保存料、抗酸化剤、乳白剤、粘稠化剤および安定化剤などの、本発明の組成物のさまざまな剤形を物理的に処方するうえで有用なさらなる物質を含有してもよい。しかしながら、そのような物質は、添加時に、本発明の組成物の成分の生物活性を過度に妨害すべきではない。処方物は滅菌され、所望であれば、処方物の核酸と有害に相互作用しない助剤、例えば、滑沢剤、保存料、安定化剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与えるための塩、緩衝液、着色料、着香料および/または芳香性物質などと混合されてもよい。

40

【0236】

本発明は、(a) 本明細書に記載する一つまたは複数の治療剤および(b) 第二の抗がん剤を含む薬学的組成物を提供する。ある種の態様において、第二の抗がん剤は化学療法剤である。本発明のある種の態様は、(a) 幹細胞がんマーカーの活性を調節する一つまたは複数の化合物(例えば抗体、小分子、siRNA、アンチセンスなど)および(b) 一つまたは複数の他の化学療法剤を含有する薬学的組成物を提供する。

50

【0237】

そのような化学療法剤の例としては、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラムブシル、メルファラン、シクロホスファミド、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン(CA)、5-フルオロウラシル(5-FU)、フロクスウリジン(5-FUdR)、メトトレキサート(MTX)、コルヒチン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール(DES)などの抗がん薬が挙げられるが、これらに限定されることはない。ある種の態様において、化学療法剤はイリノテカンまたはパクリタキセルである。非ステロイド系抗炎症薬および副腎皮質ステロイド薬を含むがこれらに限定されない抗炎症薬、ならびにリビビリン(ribivirin)、ビダラビン、アシクロビルおよびガンシクロビルを含むがこれらに限定されない抗ウイルス薬を本発明の組成物において組み合わせることもできる。他の化学療法剤も本発明の範囲内である。

10

【0238】

組み合わせられた二つまたはそれ以上の化合物を一緒にまたは連続的に使用してもよい。

【0239】

投薬は処置される病状の重症度および反応性に依存し、処置の過程は数日から数ヶ月まで、または治癒がもたらされるか、もしくは病状の軽減(例えば、腫瘍サイズの減少)が実現されるまで続く。最適な投薬スケジュールは、患者体内における薬物の蓄積の測定から計算することができる。投与にあたる医師は、最適な投薬量、投薬方法および繰り返し速度を容易に判定することができる。最適な投薬量は、個別のオリゴヌクレオチドの相対効力に応じて変動することがあり、インビトロでおよびインビボ動物モデルで有効であると分かったEC₅₀に基づき、または本明細書に記載する例に基づき一般に推定することができる。一般に、投薬量は、体重1kgあたり0.01 μgから100 gであり、1日、1週間、1ヶ月または1年に1回または複数回与えることができる。処置にあたる医師は、体液または組織において測定された薬物の滞留時間および濃度に基づいて、投薬の繰り返し速度を推定することができる。処置の成功後には、病状の再発を予防するため、被験体に維持療法を受けさせることが望ましいこともあり、その場合には、オリゴヌクレオチドが体重1kgあたり0.01 μgから100 gに及ぶ維持用量で、1日1回または複数回から20年に1回まで投与される。

20

【0240】

本発明は、本明細書に記載する一つまたは複数の治療剤を被験体(例えば、ヒト)に投与する段階を含む、がんを処置する方法を提供する。ある種の態様において、がんはがん幹細胞を含む。ある種の態様において、処置されるがんは乳がんまたは結腸がんである。

30

【0241】

いくつかの態様において、本明細書に記載する方法により処置される被験体は充実性腫瘍を有する。いくつかの態様において、本明細書に記載する方法により処置される被験体は、充実性腫瘍が切除されている。ある種の態様において、腫瘍は充実性腫瘍幹細胞を含む。ある種の態様において、腫瘍は、LGR5を(同じ組織型の正常細胞に比べて)過剰発現する腫瘍である。ある種の態様において、腫瘍は正常組織に比べてWntタンパク質を有意には過剰発現せず、腫瘍はそれゆえ通常のWnt発現を示す。いくつかの代替的な態様において、腫瘍は少なくとも一種のWntタンパク質を過剰発現する。

40

【0242】

ある種の態様において、腫瘍を有する被験体は治療剤の投与の前に、腫瘍がLGR5を過剰発現しているか、またはLGR5を過剰発現しているがん幹細胞を含むかどうかを確認するためにスクリーニングされる。

【0243】

本発明は、(a) ヒトR-スポンジン(RSP0)タンパク質およびヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)の結合を乱す; ならびに/または(b)RSP0によるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤の治療的有効量をヒトに投与する段階を含む、ヒトにおけるがんを処置するまたは腫瘍の増殖を阻害する方法を提供する。

【0244】

50

本発明は、(a)ヒトR-スポンジン(RSPO)タンパク質およびヒトロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体(LGR)の結合を乱す；ならびに/または(b)RSPOによるLGRシグナル伝達の活性化を乱す薬剤と腫瘍細胞を接触させる段階を含む、腫瘍細胞におけるβ-カテニンシグナル伝達を阻害することによりがんを処置するまたは腫瘍増殖を阻害する方法をさらに提供する。ある種の態様において、この方法はインビボでの方法である。代替的な態様において、この方法はインビトロでの方法である。

【0245】

ある種の態様において、本発明は、がん(例えば、がん幹細胞を含むがん)を処置する方法であって、ヒトR-スポンジン(RSPO)タンパク質に特異的に結合する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。ある種の態様において、ヒトRSPOタンパク質はRSPO1である。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。ある種の態様において、本発明は、腫瘍増殖を阻害する方法であって、ヒトR-スポンジン(RSPO)タンパク質に特異的に結合する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。ある種の態様において、ヒトRSPOタンパク質はRSPO1である。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。ある種の態様において、腫瘍は、充実性腫瘍幹細胞を含む腫瘍である。ある種の態様において、抗体は、ヒトRSPOタンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱す。ある種の代替的な態様において、抗体は、RSPOによるLGRシグナル伝達の活性化を乱す、および/またはβ-カテニンシグナル伝達を乱す。

【0246】

ある種の態様において、本発明は、がん幹細胞を含むがんを処置する方法であって、ヒトLGRタンパク質の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。ある種の態様において、細胞外ドメインはヒトLGR5のアミノ酸番号22-564(SEQID NO:1)を含む。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。

【0247】

ある種の態様において、本発明は、腫瘍増殖を阻害する方法であって、ヒトLGRタンパク質に特異的に結合する抗体の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。ある種の態様において、ヒトLGRタンパク質はLGR5である。ある種の態様において、抗体はモノクローナル抗体である。ある種の態様において、抗体はヒト抗体である。ある種の態様において、腫瘍は、充実性腫瘍幹細胞を含む腫瘍である。ある種の態様において、抗体は、ヒトRSPOタンパク質のヒトLGRタンパク質への結合を乱す。ある種の代替的な態様において、抗体は、RSPOによるLGRシグナル伝達の活性化を乱す、および/またはβ-カテニンシグナル伝達を乱す。

【0248】

ある種の態様において、本発明は、がん幹細胞を含むがんを処置する方法であって、ヒトLGR5の細胞外ドメインを含む可溶性受容体の治療的有効量を投与する段階を含む方法を提供する。ある種の態様において、細胞外ドメインはヒトLGR5のアミノ酸番号22-564(SEQ ID NO:1)を含む。ある種の態様において、ヒトLGR5の細胞外ドメインは非LGRタンパク質配列にインフレイムで連結される。ある種の態様において、非LGRタンパク質はヒトFcである。

【0249】

本発明は、抗LGR抗体および抗RSPO抗体を含むが、これらに限定されない、本明細書に記載する一つまたは複数の治療剤を被験体に投与する段階を含む、被験体におけるがん幹細胞の増殖を阻害する、および/またはがん幹細胞の数もしくは割合を低減する方法をさらに提供する。

【0250】

ある種の態様において、治療剤の被験体への投与を含む方法は、第二の抗がん剤の被験体への投与をさらに含む。治療剤および第二の抗がん剤は、同じ時点で(同時に)または異なる時点で(例えば、連続的に)投与することができる。ある種の態様において、二つの薬

剤は同じ組成物の一部として被験体に投与される。ある種の態様において、治療剤は一つの組成物で被験体に投与され、その一方、第二の抗がん剤はもう一つの組成物で被験体に投与される。

【0251】

ある種の態様において、被験体は哺乳動物である。ある種の態様において、治療剤が投与される被験体は、ヒトである。

【0252】

本発明は、本明細書に記載する治療剤も、第二の抗がん剤もともに含むキットおよび製造品をさらに提供する。ある種の態様において、第二の抗がん剤は化学療法剤である。

【0253】

がんマーカー遺伝子を発現するトランスジェニック動物

本発明は、本発明の外因性がんマーカー遺伝子またはその変異体および変種(例えば、切断もしくは単一ヌクレオチド多型)あるいはそのノックアウトを含むトランスジェニック動物の作出を企図する。いくつかの態様において、トランスジェニック動物は、野生型動物と比べて改変された表現型(例えば、マーカーの存在の増加または減少)を示す。そのような表現型の存在または非存在を分析するための方法は、本明細書において開示されるものを含むが、それに限定されることはない。いくつかの態様において、トランスジェニック動物は、腫瘍の増殖またはがんの証拠の増加または減少をさらに示す。

【0254】

本発明のトランスジェニック動物は、薬物(例えば、がんの治療法)の選別に用途がある。いくつかの態様において、被験化合物(例えば、がんを処置するのに有用と思われる薬物)および対照化合物(例えば、プラセボ)をトランスジェニック動物および対照動物に投与し、その効果を評価する。

【0255】

トランスジェニック動物は、種々の方法によって作出することができる。いくつかの態様において、さまざまな発生段階の胚細胞を用いて、トランスジェニック動物の作出のために導入遺伝子を導入する。胚細胞の発生段階に応じて異なる方法を用いる。接合子はマイクロインジェクションに最良の標的である。マウスでは、雄性前核は、DNA溶液1~2ピコリットル(pl)の繰り返し注射が可能な直径約20マイクロメートルのサイズに達する。遺伝子移入の標的としての接合子の使用には、ほとんどの場合で注射されたDNAが最初の卵割前に宿主ゲノムに組み込まれるという主な利点がある(Brinster et al., 1985, PNAS 82: 4438-4442)。結果として、トランスジェニック非ヒト動物の全細胞が、組み込まれた導入遺伝子を有するものである。生殖細胞の50%が導入遺伝子を内部に有するものであることから、これは、一般に創始体(founder)の子孫に導入遺伝子が効率的に伝達されることもまた反映している。米国特許第4,873,191号は、接合子のマイクロインジェクションのための方法について記載しており、この特許の開示はその全体が本明細書に組み入れられる。

【0256】

他の態様において、非ヒト動物に導入遺伝子を導入するためにレトロウイルス感染を用いる。いくつかの態様において、レトロウイルスベクターを卵母細胞の卵胞腔に注射することによって卵母細胞をトランスフェクトするために、レトロウイルスベクターが利用される(参照により本明細書に組み入れられる米国特許第6,080,912号)。他の態様において、発生中の非ヒト胚を胚盤胞期までインビトロで培養することができる。この間に、割球はレトロウイルス感染の標的となりうる(Janenich, 1976, PNAS 73:1260)。割球の効率的な感染は、透明帯を除去するための酵素処理によって得られる(Hogan et al., in Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. [1986])。導入遺伝子を導入するために用いられるウイルスベクター系は、典型的には、導入遺伝子を保有する複製欠損レトロウイルスである(Jahner et al., 1985, PNAS 82:6927)。トランスフェクションは、ウイルス産生細胞の単層上で割球を培養することによって容易かつ効率的に得られる(Stewart et al., 1987, EMBO J., 6:383)。

【0257】

あるいは、感染は後期に行うこともできる。ウイルスまたはウイルス産生細胞を割腔に注射することができる(Jahner et al., 1982, Nature 298:623)。組み込みがトランスジェニック動物を形成する細胞のサブセットにのみ起こることから、創始体の大部分が導入遺伝子についてモザイクとなる。さらに、創始体は、ゲノムの異なる位置でレトロウイルスによる導入遺伝子の挿入をさまざまに有することができ、これは子孫では一般に隔離される。加えて、妊娠中期胚の子宮内レトロウイルス感染により、効率は低いが生殖細胞系に導入遺伝子を導入することもまた可能である(Jahner et al., 前記 [1982])。レトロウイルスまたはレトロウイルスベクターを用いて、当技術分野で公知のトランスジェニック動物を創出するさらなる手段は、レトロウイルス粒子またはレトロウイルスを産生するマイトマイシンC処理細胞を受精卵の囲卵腔または初期胚にマイクロインジェクションすることに伴う(PCT国際出願WO90/08832[1990]、およびHaskell and Bowen, 1995, Mol. Reprod. Dev., 40:386)。

【0258】

他の態様において、導入遺伝子は、胚性幹細胞に導入され、トランスフェクトされた幹細胞を利用して胚を形成させる。ES細胞は、移植前胚をインビトロにおいて適切な条件の下で培養することによって得られる(Evans et al., 1981, Nature 292:154; Bradley et al., 1984, Nature 309:255; Gossler et al., 1986, PNAS 83:9065; およびRobertson et al., 1986, Nature 322:445)。導入遺伝子は、リン酸カルシウム共沈、プロトプラストまたはスフェロプラスト融合、リポフェクションおよびDEAE-デキストラン媒介性トランスフェクションを含めた当技術分野で公知の種々の方法によるDNAトランスフェクションにより、ES細胞に効率的に導入することができる。導入遺伝子は、レトロウイルスを介した形質導入またはマイクロインジェクションによりES細胞に導入することもできる。そのようなトランスフェクトされたES細胞は、その後胚盤胞期の胚の割腔に導入された後に胚に共存することができ、結果として生じたキメラ動物の生殖細胞系に貢献することができる(総説についてはJaenisch, Science, 1988, 240:1468を参照のこと)。トランスフェクトされたES細胞を割腔に導入する前に、トランスフェクトされたES細胞をさまざまな選択プロトコルに供して、その導入遺伝子があるような選択のための手段を提供すると仮定した上で、導入遺伝子を組み込んだES細胞を濃縮することができる。あるいは、ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、導入遺伝子を組み込んだES細胞についてスクリーニングすることもできる。この技術は、トランスフェクトされたES細胞を割腔に移入する前に、適切な選択条件の下で成長させる必要性をなくす。

【0259】

他の態様において、遺伝子の機能をノックアウトするか、または欠失変異体(例えば、切断変異体)を作製するために、相同組み換えを利用する。相同組み換えのための方法は、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,614,396号に記載されている。

【0260】

実験

以下の例は、本発明のある種の態様および局面を実証およびさらに例示するために提供されるものであり、その範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0261】

実施例1

LGR5は非腫瘍形成性の腫瘍細胞に比べてがん幹細胞において過剰発現される

最近では、悪性ヒト乳房腫瘍が、免疫不全マウスに腫瘍を形成する能力が強化されたがん幹細胞の小さな別個の集団を、内部に有することが実証されている。ESA+、CD44+、CD24-/低、Lin-細胞集団は、未分化腫瘍細胞と比べて腫瘍形成性の乳房腫瘍細胞が50倍濃縮されていることが見出された(Al-Hajj et al., 2003, PNAS 100:3983-8)。結腸がんにおいて、ESA+ CD44+がん幹細胞の類似の集団が同定されている(米国特許出願公開第11/591,019号)。非腫瘍形成性の腫瘍細胞と比較においてFACS選別された腫瘍形成性のがん幹細胞の

マイクロアレイ分析により、非腫瘍形成性の腫瘍細胞に比べがん幹細胞において上方制御されているいくつかのがん幹細胞マーカーが明らかにされた(米国特許出願公開第10/864,207号および同第11/050,282号)。

【0262】

これらのマイクロアレイデータは、非腫瘍形成性の腫瘍細胞と比べ結腸がん幹細胞において、LGR5が過剰発現されることも明らかにした(図1)。FACSを用いて細胞表面マーカーに基づき、腫瘍形成性(TG)結腸がん幹細胞を大多数の腫瘍細胞から単離した。具体的には、細胞を計数し、2%熱不活化仔ウシ血清(HICS)および25mMHEPESを含有するHBSSで2回洗浄し、100 μ lあたり細胞 10^6 個で再懸濁した。腫瘍細胞を、磁気ビーズに結合されたラット抗マウスCD3、CD4、CD8、Ter119、Mac1およびGr1抗体とともにインキュベートし、磁気カラムに流してマウス造血細胞を除去した。次いで腫瘍細胞を、Cy5.5-PEに結合されたヒツジ抗ラット抗体および生存度色素ヨウ化プロピジウムとともにインキュベートして、それぞれ、残存するマウス造血細胞および死細胞を検出および除去した。ブロッキング後、細胞をさらにマウスH-2K^d細胞、ヒトESA(MiltenyiBiotec; Auburn, CA)およびCD44 (Bioscience, San Diego, CA)に対する蛍光結合抗体とともにインキュベートして、マウス細胞を除去し、ESAおよびCD44を発現しているヒト腫瘍細胞の正の選択をした。フローサイトメトリーをFACSAria(BectonDickinson, Franklin Lakes, NJ)にて行い、側方散乱および前方散乱プロファイルを用いて単一細胞を選択した。Cy5.5-PE+およびヨウ化プロピジウム陽性細胞を最初に排除し、ESA+44+細胞の分画を非ESA+44+腫瘍細胞の分画から切り離して単離した。

【0263】

非腫瘍形成性の腫瘍細胞に対して結腸がん幹細胞のマーカーを同定するために、マイクロアレイ分析を利用した。FACS選別された腫瘍形成性のがん幹細胞および非腫瘍形成性の充実性腫瘍細胞からの総RNAを、製造元のプロトコルにしたがいRNasy(Qiagen, Valencia, CA)を用いて単離した。マイクロアレイ分析用のプローブを調製し、Affymetrixのプロトコル(Affymetrix, Santa Clara, CA)にしたがってAffymetrix HG-U133遺伝子チップにハイブリダイズさせた。アルゴンイオンレーザ共焦点顕微鏡を用いてアレイをスキャンし、アレイ上での各プローブセットの強度を、Affymetrixの手順にしたがい、AffymetrixMicroarraySuite 4.0ソフトウェアを用いて評価した。3種の異なる結腸がん(C4、C6およびC9)のマイクロアレイ分析から、非腫瘍形成性の充実性腫瘍細胞と比べ、腫瘍形成性の充実性腫瘍幹細胞において、LGR5の過剰発現が明らかになった(図1)。

【0264】

多数のヒト患者由来の腫瘍および対応する正常組織から単離されたmRNAを用いたマイクロアレイ分析(GeneLogic BioExpressDatasuite)から、上皮由来のヒト腫瘍におけるLGR5およびLGR6の発現の増大がさらに明らかになった。広範囲の上皮腫瘍由来の個々の患者試料におけるLGR5の発現を、正常臓器の上皮における発現と比較した。チップHG-U133_Plus_2, fragmentID(ChipID)244395(51)上のLGR5は、大部分の腫瘍において、しかしとりわけ結腸、肝臓、卵巣、および肺の腫瘍において、発現の増大を示した(図2)。同様に、チップHG-U133_Plus_2, fragmentID(ChipID)258288(51)上のLGR6は、大部分の上皮腫瘍において発現の変化を示した(図3)。

【0265】

実施例2

RSP01はLGR5による β -カテニンシグナル伝達を活性化する

本実施例は、LGR5を介したRSP01による β -カテニンシグナル伝達の活性化について記載する。

【0266】

ある種の態様において、8 $\times$ TCFルシフェラーゼレポーターアッセイにより、RSP01が β -カテニン応答性プロモーターの発現を活性化することが実証された。RSP01-Fc構築体を、標準的な組み換えDNA技術を用いて作出した。具体的には、完全長のヒトRSP01をヒトFcにインフレームで連結し、組み換えRSP01-Fcタンパク質を、バキュロウイルスを用い昆虫細

胞で発現させた。次いで、馴化した昆虫培地からプロテインAクロマトグラフィーを用いて組み換えRSP01-Fcを精製した。8×TCFルシフェラーゼレポーターで安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞を計12時間、だんだんと濃度を高くしたRSP01-Fcに曝露した。レポーター細胞は漸増濃度のRSP01に応じて高いルシフェラーゼ活性を示した(図4)。

【0267】

RSP01による8×TCF β -カテニン応答性プロモーターの活性化に及ぼす可溶性LGR5の影響を評価した(図5)。可溶性LGR5-Fc構築体を、標準的な組み換えDNA技術を用いて作製した。具体的には、ヒトLGR5のアミノ酸番号1~564をヒトFcにインフレームで連結し、組み換えLGR5-Fcを、バキュロウイルスを用い昆虫細胞で発現させた。LGR5シグナル配列の切断により、LGR5のアミノ酸番号22~564を含む成熟LGR5-Fc融合タンパク質が生ずる。8×TCFルシフェラーゼレポーター構築体で安定的にトランスフェクトされたHEK293細胞を96ウェルプレート中で培養し、対照培地、2.5 μ g RSP01-Fc、または漸増濃度の可溶性LGR5-Fcとの組み合わせたRSP01-Fcのいずれかに、24時間曝露した。可溶性LGR5は、 β -カテニン応答性プロモーターを介したルシフェラーゼ活性の、RSP01による活性化を阻害した。

【0268】

可溶性LGR5はまた、RSP01およびWnt3Bによる β -カテニンシグナル伝達の相乗的活性化を特異的に阻害する。8×TCFルシフェラーゼレポーター構築体で安定的にトランスフェクトしたHEK293細胞を96ウェルプレート中で培養し、対照培地(LCM、L細胞馴化培地)、LCM中2.5 μ g RSP01-Fc、Wnt3A (Wnt 3Aを含有するL細胞馴化培地)、または漸増濃度の可溶性LGR5-Fc(図6A)もしくは可溶性FZD10-Fc(図6B)とともにRSP01-FcおよびWnt3Aの組み合わせのいずれかに、24時間曝露した。RSP01およびWnt3Aは、 β -カテニンプロモーター由来のルシフェラーゼ活性を活性化する際に相乗的に作用し、可溶性LGR5はこの活性化を阻害した(図6A)。対照的に、可溶性FZD10は影響を及ぼさなかった(図6B)。

【0269】

RSP01が β -カテニンシグナル伝達を活性化する機序を判定するため、FACS解析を用いてRSP01とLGR5との間の結合を評価した。ある種の態様において、可溶性LGR5と細胞表面RSP01との間の結合について判定した。標準的な組み換えDNA技術を用いてCD4の膜貫通ドメインに完全長のヒトRSP01を連結することにより、細胞表面RSP01タンパク質を生成した(RSP01-CD4TM)。HEK293細胞を、RSP01-CD4TMおよびGFPで一過的にトランスフェクトした。48時間後、細胞を、2%FCSを含有する氷冷PBSに懸濁し、次にLGR5-Fc、LRP6-ECD-Fc(Fcドメインに融合されたヒトLRP6の細胞外ドメインを含む)、LRP6E1-2-Fc(Fcドメインに融合されたヒトLRP6のアミノ酸番号1-629を含む)、またはFZD1~10を含む、各種のFZD-Fcの構築体の存在下、氷上でインキュベートした。RSP01トランスフェクト細胞は、LGR5と相互作用したが、いずれのFZD構築体とも相互作用しなかった(図7A)。RSP01とWNT共受容体LRP6との間では、弱い相互作用しか検出されなかった。

【0270】

ある種の態様において、可溶性RSP01と細胞表面LGR5との間の結合について判定した。標準的な組み換えDNA技術を用いて、N末端FLAGタグおよびCD4の膜貫通ドメインに、LGR5のアミノ酸番号22-564を連結することにより、細胞表面LGR5変種タンパク質を生成した(FLAG-LGR5-CD4TM)。HEK293細胞を、FLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPで一過的にトランスフェクトした。48時間後、細胞を、2%FCSおよびヘパリンを含有する氷冷PBSに懸濁し、次にRSP01-Fc、FZD8-Fc、または陽性対照としてFLAG抗体の存在下、氷上でインキュベートした。可溶性RSP01は、LGR5トランスフェクト細胞と相互作用するが、可溶性FZD8は相互作用しなかった(図7B)。

【0271】

他のRSP0ファミリーの成員もLGR5に結合できるかどうかを判定するために、さらなる試験を行って、各RSP0ファミリーの成員とLGR5との相互作用を調べた。HEK293細胞を、FLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPで一過的にトランスフェクトした。48時間後、細胞を、2%FCS、ヘパリンを含有する氷冷PBSに懸濁し、次に図(図7C)のように、RSP01-Fc、RSP02-Fc、RSP03-Fc、RSP04-Fc、FZD8-Fc、または陽性対照としてFLAG抗体の存在下、氷上でインキュベ

トした。各RSP0ファミリーの成員はLGR5トランスフェクト細胞と相互作用した。

【0272】

実施例3

抗RSP01抗体または抗LGR5抗体の作出

実施例2ではRSP01およびLGR5による β -カテニン活性化の別経路を特定する。RSP0タンパク質とLGRタンパク質との間の相互作用の遮断は、それゆえ、腫瘍形成能と関連する β -カテニンシグナル伝達の過剰な活性化を乱すことができた。ある種の態様において、RSP0タンパク質に対する抗体は、LGRシグナル伝達を乱すことによりがん治療薬として作用する。ある種の態様において、RSP01に対する抗体はRSP01とLGR5との間の相互作用を乱す。ある種の態様において、LGRタンパク質に対する抗体は、LGRシグナル伝達を乱すことによりがん治療薬として作用する。ある種の態様において、LGR5に対する抗体はRSP01とLGR5との間の相互作用を乱す。

【0273】

本実施例は、RSP01およびLGR5に対する抗体の作出について記載する。類似の技術を用いて、RSP02、RSP03、RSP04、LGR4、およびLGR6に対する抗体を作出する。

【0274】

抗原産生

ある種の態様において、ヒトRSP01の組み換え完全長もしくは部分的タンパク質断片またはヒトLGR5の細胞外ドメインを、抗体産生用の抗原として作出する。標準的な組み換えDNA技術を用いて、RSP01またはLGR5をコードするポリヌクレオチドを単離する。次いでこれらのポリヌクレオチドを、例えば、ヒトFc、ヒスチジン-タグ、FLAG-タグ、または他の適当なタンパク質タグを含むタンパク質タグの配列にインフレームで連結し、昆虫細胞におけるバキュロウイルス媒介性の発現のために移入プラスミドベクターにクローニングする。次に標準的なトランスフェクション、感染、および細胞培養プロトコルを用いて、対応するRSP01およびLGR5ポリペプチドを発現する組み換え昆虫細胞を作製する(O'Reilley et al., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994))。アフィニティークロマトグラフィーを用いて、昆虫細胞溶解物から抗原タンパク質を精製する。精製した抗原タンパク質を、PBS(pH=7)に対して透析し、およそ1mg/mlに濃縮し、免疫に備えて滅菌ろ過する。

【0275】

免疫

標準的な技術を用いて、マウス(n=3)を、精製RSP01またはLGR5抗原タンパク質(Antibody Solutions; MountainView, CA)で免疫する。初回免疫からおおよそ70日後に、個々のマウス由来の血液を、ELISAおよびFACS解析を用いて、抗原認識についてスクリーニングする。最も高い抗体力価を有する動物二匹を、最終の抗原追加免疫のために選別し、追加免疫の後、ハイブリドーマの産生のために脾臓細胞を単離する。ハイブリドーマ細胞を、96ウェルプレート中に1ウェルあたり細胞1個でプレーティングし、各ウェル由来の上清を、抗原タンパク質に対するELISAおよびFACS解析によってスクリーニングする。高い抗体力価を有するいくつかのハイブリドーマを選別し、静置フラスコ培養でスケールアップする。プロテインAまたはプロテインGアガロースクロマトグラフィーを用いて、ハイブリドーマ上清から抗体を精製し、RSP01またはLGR5を発現する細胞のFACS選別によって抗体を試験する。

【0276】

FACS解析

天然のRSP01または天然の細胞表面LGR5のタンパク質を認識する、ハイブリドーマクローンによって産生されるモノクローナル抗体を選別するために、FACS解析を用いる。一例を挙げれば、FACSによる細胞のスクリーニングを容易にするため、アイソタイプ対照のマウスIgG1 κ 抗体、抗RSP01および抗LGR5のモノクローナル抗体を、Invitrogen社のキット番号A-20186を用いてAlexaFluor(商標)647 (AF647)に結合する。細胞結合型のRSP01またはLGR5構築体およびGFPをコードする発現ベクターで、HEK 293細胞を一過的にコトランス

フェクトする。トランスフェクションから24～48時間後に、細胞を浮遊状態で回収し、抗RSP01抗体または抗LGR5抗体とともに氷上でインキュベートし、対照IgG1抗体と比べてバックグラウンドの抗体結合を検出する。細胞を洗浄し、その後、FACSにより選別して、それぞれ、表面に発現されたRSP01またはLGR5への抗体の結合を特定する。

【0277】

一つの実験を挙げれば、天然の細胞表面LGR5タンパク質を認識する、ハイブリドーマクローンによって産生されるモノクローナル抗体をFACS解析によって選択した。細胞結合型のLGR5構築体(FLAG-LGR5-CD4TM)およびGFPをコードする発現ベクターで、HEK293細胞を一過的にコトランスフェクトした。トランスフェクションから24～48時間後に、細胞を浮遊状態で回収し、陰性対照として無関係の抗体(IgG1対照)とともに、もしくはLGR5発現の陽性対照として抗FLAG抗体とともに、またはLGR5に対するmAb(88M1、88M5)とともに、氷上でインキュベートし、その後、PE結合蛍光抗mAb二次試薬とのインキュベーションを行った。細胞を洗浄し、その後、FACSにより選別して、それぞれ、表面に発現されたLGR5への抗体の結合を特定した。このように、LGR5に対する抗体を特定した(図8)。モノクローナル抗体88M1および88M5は、特異的なLGR5結合を示すことが分かった。さらに、FACS解析を用いて、RSP0タンパク質とLGRタンパク質(例えば、LGR5)との間の相互作用を乱す抗体を選択することもできる。例えば、RSP0またはLGR5に対する抗体の存在下または非存在下で、フローサイトメトリーにより、RSP0またはLGR5への結合を測定することができる。

【0278】

図(図9)のように、モノクローナル抗体88M1は、RSP0のLGR5への結合を阻害する抗LGR5抗体と特定された。FLAG-LGR5-CD4TMおよびGFPで、HEK293細胞を一過的にトランスフェクトした。融合タンパク質RSP01-Fcのトランスフェクト細胞への結合を、PE結合抗ヒトFcとのインキュベーションにより検出した。RSP01-Fcの結合に及ぼす抗LGR5抗体88M1の影響を、図のように88M1とのトランスフェクト細胞のインキュベーションおよびフローサイトメトリーでの解析により評価した。実験から、88M1がトランスフェクト細胞上のLGR5へのRSP01-Fcの結合を低減したことが明らかである。

【0279】

キメラ抗体

RSP01またはLGR5のどちらかを特異的に認識するモノクローナル抗体を特定した後に、げっ歯類の抗体を治療剤として用いる際のヒト抗マウス抗体(HAMA)免疫反応を克服するために、これらの抗体を改変する。選択したモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をハイブリドーマ細胞からRT-PCRによって単離し、哺乳類発現ベクターにおいて、それぞれ、ヒトIgG1重鎖およびκ軽鎖定常領域にインフレームで連結する。あるいは、同じプラスミド上にヒトIgG1重鎖およびκ軽鎖定常領域の遺伝子を含む、TCAE5.3などの、ヒトIgG発現ベクターを用いる(Prestonet al., 1998, Infection & Immunity66:4137-42)。キメラ重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを次いで、キメラ抗体の産生のためにチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞にコトランスフェクトする。ELISAおよびFACSにより、キメラ抗体の免疫反応性および親和性を、親のマウス抗体と比較する。

【0280】

ヒト化抗体

キメラ抗体治療薬は依然として、抗原性を示すことが多く、ヒト抗キメラ抗体(HACA)免疫反応を生ずるので、RSP01またはLGR5に対するキメラ抗体は、さらなるヒト化が必要になりうる。ヒト化抗体を作出するため、上記のキメラ抗体重鎖および軽鎖可変ドメインの、三つの短い超可変配列または相補性決定領域(CDR)を、組み換えDNA技術を用いて、それぞれ、ヒト重鎖および軽鎖配列の可変ドメインフレームワークの中に設計し、次いで、CHO細胞における発現のために哺乳類発現ベクターにクローニングする。ELISAおよびFACSにより、ヒト化抗体の免疫反応性および親和性を、親のキメラ抗体と比較する。さらに、可変領域の部位特異的突然変異誘発または高密度突然変異誘発を用いて、ヒト化抗体の特異性、親和性などを最適化することもできる。

【0281】

ヒト抗体

代替的な態様において、RSP01またはLGR5の細胞外ドメインを特異的に認識するヒト抗体を、ファージディスプレイ技術を用いて単離する。ヒト抗体可変ドメインを含む合成抗体ライブラリー(MorphoSys,Munich,Germany)を、上記の抗原の特異的かつ高親和性の認識についてスクリーニングする。抗体の最適化のために隣接するユニークな制限部位を介して、ライブラリー中のCDRカセットを特異的に交換する。次いで、最適化されたヒト可変領域を、CHO細胞におけるヒト抗体の発現のためにヒトIgG1重鎖およびκ軽鎖を含むIg発現ベクターにクローニングする。

【0282】

実施例4

RSP01およびLGR5の標的化による腫瘍増殖のインビボ抑制

本実施例ではインビボでの腫瘍細胞の増殖に作用するための、RSP01およびLGR5を標的とする生体分子の使用について記載する。ある種の態様において、RSP01に対する抗体を用いてインビボでの腫瘍細胞の増殖を阻害する。ある種の態様において、LGR5に対する抗体を用いてインビボでの腫瘍細胞の増殖を阻害する。ある種の態様において、可溶性LGR5受容体を用いてインビボでの腫瘍細胞の増殖を阻害する。RSP02、RSP03、RSP04、LGR4およびLGR6を標的とする生体分子で、同様の技術を用いる。

【0283】

実験動物に注射するため、マウス体内で異種移植片として継代された患者試料由来の腫瘍細胞を調製する。腫瘍組織を無菌条件下で取り出し、滅菌ブレードを用いて小片に切断し、完全に切り刻み、酵素消化および機械的破壊によって単細胞懸濁液を得る。得られた腫瘍片を、培地中で超高純度のコラゲナーゼIII(1mLあたり200~250単位のコラゲナーゼ)と混合し、10 mLピペットにより15~20分毎に上下にピペッティングしながら、37°Cで3~4時間インキュベートする。消化された細胞を、45 μlのナイロンメッシュによってろ過し、RPMI/20%FBSで洗浄し、HBSSで2回洗浄する。次に、解離された腫瘍細胞を、6~8週齢のNOD/SCIDマウスに注射して、腫瘍増殖を誘発する。ある種の態様において、エストロゲンペレットの移植とともに乳房腫瘍細胞を、100 μl中50,000個の細胞として右乳房脂肪体に注射する(n=10)。ある種の態様において、結腸腫瘍細胞を100 μl中50,000個の細胞として右側腹部に注射する(n=10)。

【0284】

代替的な態様において、実験動物への注入の前に、解離された腫瘍細胞をまず初めに、細胞表面マーカーに基づいて腫瘍形成性細胞と非腫瘍形成性細胞に選別する。具体的には、上記のように解離された腫瘍細胞を、2%熱不活化仔ウシ血清(HICS)を含有するHBSSで2回洗浄し、100 μlあたり細胞10⁶個で再懸濁する。抗体を加え、細胞を20分間氷上でインキュベートし、続いてHBSS/2%HICSで2回洗浄する。抗体には、抗ESA(Biomed, Foster City, CA)、抗CD44、抗CD24、ならびに細胞系列マーカーの抗CD2、抗CD3、抗CD10、抗CD16、抗CD18、抗CD31、抗CD64、および抗CD140b(Linと総称する; PharMingen, San Jose, CA)が含まれる。抗体を蛍光色素に直接結合させて、これらのマーカーを発現する細胞の正または負の選択をする。H2Kd+細胞に対して不利な選択をすることによってマウス細胞を除去し、生存度色素7AADを用いることによって死細胞を除去する。フローサイトメトリーを、FACSVantage(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)で行なう。側方散乱と前方散乱プロファイルを用いて細胞凝集塊を除去する。単離されたESA+、CD44+、CD24-/low、Lin-腫瘍形成性細胞を次いで、NOD/SCIDマウスに皮下注射して、腫瘍増殖を誘発する。

【0285】

ある種の態様において、処置を始める前に腫瘍を約75 mm²にまで増殖させる。ある種の態様において、細胞の注射から2日後に処置を始める。ある種の態様において、注射した各動物に、10mg/kgの抗RSP01抗体または対照抗体を、腹腔内(i.p.)投与する。ある種の態様において、注射した各動物に、10 mg/kgの抗LGR5抗体(例えば、88M1)または対照抗体を投与する。動物に抗体処置を週2回、計6~8週間行い、腫瘍サイズを週2回評価する。抗RSP01抗体または抗LGR5抗体のどちらかで処置された動物は、対照の注射動物と比べて顕著

に低減した腫瘍細胞増殖を示すものと期待される。ある種の態様において、注射した各動物に10mg/kgの可溶性LGR5タンパク質(例えばLGR5-Fc)を投与する。動物にLGR5-Fcタンパク質処置を週2回、計6〜8週間行い、腫瘍サイズを週2回評価する。可溶性LGR5タンパク質で処置された動物は、対照の注射動物と比べて顕著に低減した腫瘍細胞増殖を示すものと期待される。

【0286】

実施例5

LGR5シグナル伝達の妨害によるヒトがんの処置

本実施例では、機能的なLGR5シグナル伝達を乱す生体分子を用いて、ヒト患者においてがんを処置するための方法について記載する。ある種の態様において、RSP01に対する抗体を用いて、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する。ある種の態様において、LGR5に対する抗体を用いて、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する。ある種の態様において、可溶性LGR5受容体を用いて、充実性腫瘍幹細胞を含む充実性腫瘍の増殖を阻害する。RSP02、RSP03、RSP04、LGR4およびLGR6を標的とする生体分子で、同様の技術を用いる。

【0287】

ある種の態様において、がん幹細胞マーカー発現の存在をまず初めに、腫瘍生検から判定する。がんと診断された患者由来の生検から、無菌条件の下で腫瘍細胞を取り出す。ある種の態様において、組織生検を液体窒素中で新鮮凍結し、O.C.T.に包埋し、クライオスタットにて10 μ mの切片として切断しスライドガラスに載せる。ある種の態様では、組織生検をホルマリン固定し、パラフィン包埋し、ミクロトームにて10 μ mの切片に切断しスライドガラスに載せる。切片をLGR5などのがん幹細胞マーカーに対する抗体とともにインキュベートして、タンパク質の発現を検出する。ある種の態様において、FACSによりがん幹細胞の存在について判定する。組織生検試料を、滅菌ブレイドを用いて小片に切断し、完全に切り刻み、細胞を酵素消化および機械的破壊に供して単細胞懸濁液を得る。次いで、解離された腫瘍細胞を、抗ESA抗体および抗CD44抗体とともにインキュベートし、フローサイトメトリーにより腫瘍幹細胞の存在について判定する。

【0288】

腫瘍ががん幹細胞マーカーを発現していると診断されたがん患者を、機能的なLGR5シグナル伝達を乱す分子で処置する。ある種の態様において、分子は抗RSP01抗体を含む。ある種の態様において、分子は抗LGR5抗体を含む。上記のように作出されたヒト化またはヒトモロクロナル抗RSP01抗体または抗LGR5抗体を精製し、注射のためにPBS中の適当な薬学的担体で処方する。ある種の態様において、分子は可溶性LGR5タンパク質を含む。週1回、少なくとも10週間、しかしある場合には、週1回、少なくとも約14週間、患者を処置する。各投与は薬学的に有効な用量、約2〜約100mg/ml、ある場合には、約5〜約40mg/mlとすべきである。処置は、標準的な放射線療法レジメン、またはオキサリプラチン、フルオロウラシル、ロイコボリンもしくはストレプトゾシンなどの、一つもしくは複数の化学療法剤を用いる化学療法レジメンの前に、それと同時に、またはその後に施すことができる。患者をモニタリングして、そのような処置が、例えば、腫瘍の退縮、新しい腫瘍の発生率の減少、腫瘍抗原発現の低下、がん幹細胞数の減少、または疾患予後を評価する他の手段に基づいて、抗腫瘍応答をもたらしたかどうかを判定する。

【0289】

配列

LGR5 ECDアミノ酸番号22-564 (SEQ ID NO:1)。

GSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSELPSNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFL
EELRLAGNALTYIPKGAFGLYSLKVLMLQNNQLRHVPTEALQNLRLSLQSLRLDANHISYVPPSCFSGLHS
LRHLWLDDNALTEIPVQAFRSLSALQAMTLALNKIHHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKCFDGLH
SLETLDLNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLITIHFYDNPIQFVGRSAFQHLPL
ELRTLTLNGASQITEFPDLTGANLESITLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLSYNLLEDLPSFSVCQKL
QKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLSLRSLNLAWNKIAIIHPNAFSTLPSLIKLDLSSNLLSSFPITGLHGLTH
LKLGTGNHALQSLISSENFPELKVIEMPYAYQCCAFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQD
ERDLEDFLLDFEEDLKALHSVQCSPSPGPFKPCHEHLLDGWLIRIGV

10

【0290】

ヒトRSP01 DNA配列 (SEQ ID NO:2)。

ATGCGGCTTGGGCTGTGTGTGGTGGCCCTGGTTCTGAGCTGGACGCACCTCACCATCAGC
AGCCGGGGGATCAAGGGGAAAAGGCAGAGGCGGATCAGTGCCGAGGGGAGCCAGGCCTGT
GCCAAAGGCTGTGAGCTCTGCTCTGAAGTCAACGGCTGCCTCAAGTGCTCACCCAAGCTG
TTCATCCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCAGGTGGGCGTCTGCTTGCCGTCCTGCCCA
CCTGGATACTTCGACGCCCCGCAACCCCGACATGAACAAGTGCATCAAAATGCAAGATCGAG
CACTGTGAGGCTGCTTCAGCCATAACTTCTGCACCAAGTGTAAGGAGGGCTTGTACCTG
CACAAGGGCCGCTGCTATCCAGCTTGTCCCAGGGGCTCCTCAGCTGCCAATGGCACCATG
GAGTGCAGTAGTCCTGCGCAATGTGAAATGAGCGAGTGGTCTCCGTGGGGGCCCTGCTCC
AAGAAGCAGCAGCTCTGTGGTTTCCGAGGGGCTCCGAGGAGCGGACACGCAGGGTGCTA
CATGCCCCTGTGGGGGACCATGCTGCCTGCTCTGACACCAAGGAGACCCGGAGGTGCACA
GTGAGGAGAGTGCCGTGTCTGAGGGGCAGAAGAGGAGGAAGGGAGGCCAGGGCCGGCGG
GAGAATGCCAACAGGAACCTGGCCAGGAAGGAGAGCAAGGAGGCGGGTGCTGGCTCTCGA
AGACGCAAGGGGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAAGGGACAGTGGGGCCACTCACATCTGCA
GGGCCTGCCTAG

20

【0291】

ヒトRSP01タンパク質配列 (SEQ ID NO:3)。

MRLGLCVVALVLSWTHLTISRGIKGKRQRRI SAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
FILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYL
HKGRCPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVL
HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSR
RRKGQQQQQQGTVGPLTSAGPA

30

【0292】

ヒトRSP02 DNA配列 (SEQ ID NO:4)。

40

ATGCAGTTTCGCCTTTTCTCCTTTGCCCTCATCATTTCTGAACTGCATGGATTACAGCCAC
TGCCAAGGCAACCGATGGAGACGCAGTAAGCGAGCTAGTTATGTATCAAATCCCATTTCG
AAGGGTTGTTTGTCTTGTTCAAAGGACAATGGGTGTAGCCGATGTCAACAGAAGTTGTTT
TTCTTCCTTCGAAGAGAAGGGATGCGCCAGTATGGAGAGTGCCTGCATTCTGCCCCATCC
GGGTACTATGGACACCGAGCCCCAGATATGAACAGATGTGCAAGATGCAGAATAGAAAAC
TGTGATTCTTGCTTTAGCAAAGACTTTTGTACCAAGTGCAAAGTAGGCTTTTATTTGCAT
AGAGGCCGTTGCTTTGATGAATGTCCAGATGGTTTTGCACCATTAGAAGAAACCATGGAA
TGTGTGGAAGGATGTGAAGTTGGTCATTGGAGCGAATGGGGAAC TTGTAGCAGAAATAAT
CGCACATGTGGATTTAAATGGGGTCTGGAAACCAGAACACGGCAAATTGTTAAAAAGCCA
GTGAAAGACACAATAACCGTGTCCAACCATTGCTGAATCCAGGAGATGCAAGATGACAATG
AGGCATTGTCCAGGAGGGAAGAGAACACCAAAGGCGAAGGAGAAGAGGAACAAGAAAAAG
AAAAGGAAGCTGATAGAAAGGGCCCAGGAGCAACACAGCGTCTTCCTAGCTACAGACAGA
GCTAACCAATAA

10

【 0 2 9 3 】

ヒト RSP02 タンパク質配列 (SEQ ID NO:5)。

MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLF
FFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLH
RGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCCKWGLETRTRQIVKKP
VKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDR
ANQ

20

【 0 2 9 4 】

ヒト RSP03 DNA配列 (SEQ ID NO:6)。

ATGCACTTGCGACTGATTTCTTGCTTTTTATCATTTTGAAC TTTATGGAATACATCGGC
AGCCAAAACGCCTCCCGGGGAAGGCGCCAGCGAAGAATGCATCCTAACGTTAGTCAAGGC
TGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGATTACAATGGATGTTTGT CATGTAAGCCCAGA
CTATTTTTTGTCTCTGGAAAGAATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTCTTCATGT
CCAAGTGGATATTATGGAAC TCGATATCCAGATATAAATAAGTGTACAAAATGCAAAGCT
GACTGTGATACCTGTTTCAACAAAAATTTCTGCACAAAATGTAAAAGTGGATTTTACTTA
CACCTTGGAAGTGCCTTGACAATTGCCCAGAAGGGTTGGAAGCCAACAACCATACTATG
GAGTGTGTCAGTATTGTGCACTGTGAGGTCAGTGAATGGAATCCTTGAGTCCATGCACG
AAGAAGGGAAAAACATGTGGCTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCCGAGAAATAATA
CAGCATCCTTCAGCAAAGGGTAACCTGTGTCCCCCAACAAATGAGACAAGAAAGTGTACA
GTGCAAAGGAAGAAGTGTGAGAAGGGAGAACGAGGAAAAAAAGGAAGGGAGAGGAAAAGA
AAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTGACAGCAAAAGTCTGGAATCC
AGCAAAGAAATCCCAGAGCAACGAGAAAACAAACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAA
GATAAACAGAAATCGGTATCAGTCAGCACTGTACACTAG

30

40

【 0 2 9 5 】

ヒト RSP03 タンパク質配列 (SEQ ID NO:7)。

MHLRLISWLFIIILNFMEYIGSQNASRGRQRMRHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPR
LFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYL
HLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTTETRVREII
QHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKCQKGERGKKGRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLES
SKEIPEQRENKQQQKKRKVDKQKSVSVSTVH
【 0 2 9 6 】

ヒト RSP04 DNA配列 (SEQ ID NO:8)。

ATGCGGGCGCCACTCTGCCTGCTCCTGCTCGCCACGCCGTGGACATGCTCGCCCTG
AACCGAAGGAAGAAGCAAGTGGGCACTGGCCTGGGGGGCAACTGCACAGGCTGTATCATC
TGCTCAGAGGAGAACGGCTGTTCCACCTGCCAGCAGAGGCTCTTCCTGTTTCATCCGCCGG
GAAGGCATCCGCCAGTACGGCAAGTGCCTGCACGACTGTCCCCCTGGGTACTTCGGCATC
CGCGGCCAGGAGGTCAACAGGTGCAAAAAATGTGGGGCCACTTGTGAGAGCTGCTTCAGC
CAGGACTTCTGCATCCGGTGCAAGAGGCAGTTTTACTTGTACAAGGGGAAGTGTCTGCCC
ACCTGCCCCGCCGGGCACCTTTGGCCCCACCAGAACACACGGGAGTGCCAGGGGGAGTGTGAA
CTGGGTCCCTGGGGCGGCTGGAGCCCCCTGCACACACAATGGAAAGACCTGCGGCTCGGCT
TGGGGCCTGGAGAGCCGGGTACGAGAGGCTGGCCGGGCTGGGCATGAGGAGGCAGCCACC
TGCCAGGTGCTTTCTGAGTCAAGGAAATGTCCCATCCAGAGGCCCTGCCCAGGAGAGAGG
AGCCCCGGCCAGAAGAAGGGCAGGAAGGACCGGCGCCACGCAAGGACAGGAAGCTGGAC
CGCAGGCTGGACGTGAGGCCGCGCCAGCCCGGCCTGCAGCCCTGA
【 0 2 9 7 】

ヒト RSP04 タンパク質配列 (SEQ ID NO:9)。

MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGCTCQQRLFLFIRR
EGIRQYGKCLHDCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSQDFCIRCKRQFYLYKGKCLP
TCPPGTLAHQNTRECQGECELGPWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAAT
CQVLSESRKCPPIQRPCPGERSPGQKKGRKDRRPRKDRKLDRLDVRPRQPGLQP
【 0 2 9 8 】

ヒト LGR4 タンパク質配列 (NM_018490; SEQ ID NO:10)。

10

20

30

MPGPLGLLCFLALGLLGSAGPSGAAPPLCAAPCSCDGD RRVDCS
GKGLTAVPEGLSAFTQALDISMNNITQLPEDAFKNFPFLEELQLAGNDLSFIHPKALS
GLKELKVLTLQNNQLKTVPSEAIRGLSALQSLRLDANHITSVPEDSFEGLVQLRHLWL
DDNSLTEVPVHPLSNLPTLQALTALANKISSIPDFAFTNLSSLVVLHLHNNKIRSLSQ
HCFDGLDNLETLDLNNYNNLGEFPQAIKALPSLKELGFSNSISVIPDGAFDGNPLLRT
IHLYDNPLSFVGNFAHNLSDLHSLVIRGASMVQQFPNLTGTVHLESLLTGTGKISSI
PNNLCQEQKMLRTLDSLNNIRDLPSFNGCHALEEISLQRNQIYQIKEGTFQGLISLR
ILDLSRNLIIHEIHSRAFATLGPITNLDVSFNEELTSFPT EGLNGLNQLKLVGNFKLKEA
LAAKDFVNLRSLSVPYAYQCCAFWGCDSYANLNTEDNSLQDHSVAQEKGTAANVTS
TLENEHSQIIHCTPSTGAFKPC EYLLGSWMIRLTVWFIFLVALFFNLLVILTTFAS
CTSLPSSKLFIGLISVSNLFMGIYTGILTF L DAVSWGRFAEFGIWWETGSGCKVAGFL
AVFSSESAIFLLMLATVERSLSAKDIMKNGKSNHLKQFRVAALLAFLGATVAGCFPLF
HRGEYSASPLCLPFPPTGETPSLGFTVTLVLLNSLAFLLMAVIYTKLYCNLEKEDLSEN
SQSSMIKHVAWLIFTNCIFFCPVAFFSFAPLITAISISPEIMKSVTLIFFPLPACLN
VLYVFFNPKFKEDWKLKRRVTKKSGSVSVSIS SQGGCLEQDFYYDCGMYSHLQGNLT
VDCCESFLLTKPVSKHLIKSHSCPALAVASCQRPEGYWSDCGTQSAHSDYADEEDS
FVSDSSDQVQACGRACFYQSRGFPLVRYAYNLPRVKD

10

20

【0299】

ヒトLGR6タンパク質配列(BC047905; SEQ ID NO:11)。

MGRPRLTLVCQVSIISARDLSMNNLTELPGLFHHLRFLEELR
LSGNHLSHIPGQAFSGLYSLKILMLQNNQLGGIPAEALWELPSLQSLRLDANLISLVP
ERSFEGLSLRLHLWLDDNALTEIPVRALNNLPALQAMTLALNRISHIPDYAFQNLTS
VVLHLHNNRIQHLGTHSFEGHLNLETLDLNNYKLQEFVVAIRTLGRQLQELGFHNNNIK
AIPKAFMGNPLLQTIHFYDNPIQFVGRSAFYLPKLHTLSLNGAMDIQEF PDLKGT
SLEILTLTRAGIRLLPSGMCQQLPRLRVLELSHNQIEELPSLHRCQKLEEIGLQHNRI
WEIGADTFSQLSSLQALDLSWNAIRSIHPEAFSTLHSLVKLDLTDNQLTTLPLAGLGG
LMHLKLKGNLALSQAFSKDSFPKLRILEVPYAYQCCPYGMCASF F KASGQWEAEDLHL
DDEESSKRPLGLLARQAENHYDQDLDELQLEMEDSKPHPSVQCSPTPGPFKPC EYLFE
SWGIRLAVWAIVLLSVLCNGLVLLTVFAGGPVPLPPVKFVVGA IAGANTLTGISCGLL
ASVDALTFGQFSEYGARWETGLGCRATGFLAVLGSEASVLLLTAAVQCSVSVSCVRA
YGKSPSLG SVRAGVLGCLALAGLAAALPLASVGEYGASPLCLPYAPPEGQPAALGFTV
ALVMMNSFCFLV VAGAYIKLYCDLPRGDFAVWDCAMVRHVAVLI FADGLLYCPVAF
SFASMLGLFPVTPEAVKSVLLVVLPLPACLNPLLYLLFNPHFRDDLRLRLRPRAGDSGP
LAYAAAGELEKSSCDSTQALVAFSDVDLILEASEAGRPPGLETYGFPSVTLIS CQQPG
APRLEGSHCVEPEGNHFGNPQPSMDGELLRLRAEGSTPAGGGLSGGGGFQPSGLAFASH
V

30

40

【0300】

ヒトLGR5 DNA配列(SEQ ID NO:12)。

ATGGACACCTCCCGGCTCGGTGTGCTCCTGTCCTTGCCTGTGCTGCTGCAGCTGGCGACC
GGGGGCAGCTCTCCAGGTCTGGTGTGTTGCTGAGGGGCTGCCCCACACACTGTCATTGC
GAGCCCGACGGCAGGATGTTGCTCAGGGTGGACTGCTCCGACCTGGGGCTCTCGGAGCTG
CCTTCCAACCTCAGCGTCTTCACCTCCTACCTAGACCTCAGTATGAACAACATCAGTCAG
CTGCTCCCGAATCCCCTGCCAGTCTCCGCTTCTTGGAGGAGTTACGTCTTGCGGGAAAC
GCTCTGACATACATTCCCAAGGGAGCATTTACTGGCCTTTACAGTCTTAAAGTTCTTATG
CTGCAGAATAATCAGCTAAGACACGTACCCACAGAAGCTCTGCAGAATTTGCGAAGCCTT
CAATCCCTGCGTCTGGATGCTAACCACATCAGCTATGTGCCCCAAGCTGTTTTAGTGGC
CTGCATTCCCTGAGGCACCTGTGGCTGGATGACAATGCGTTAACAGAAATCCCCGTCCAG
GCTTTTAGAAGTTTATCGGCATTGCAAGCCATGACCTTGGCCCTGAACAAAATACACCAC
ATACCAGACTATGCCTTTGGAAACCTCTCCAGCTTGGTAGTTCTACATCTCCATAACAAT
AGAATCCACTCCCTGGGAAAGAAATGCTTTGATGGGCTCCACAGCCTAGAGACTTTAGAT
TTAAATTACAATAACCTTGATGAATTCCCCACTGCAATTAGGACACTCTCCAACCTTAA
GAACTAGGATTTTCATAGCAACAATATCAGGTCGATACCTGAGAAAGCATTGTAGGCAAC
CCTTCTCTTATTACAATACATTTCTATGACAATCCCATCCAATTTGTTGGGAGATCTGCT
TTTCAACATTTACCTGAACTAAGAACACTGACTCTGAATGGTGCCTCACAAATAACTGAA
TTTCCTGATTTAACTGGAACTGCAAACCTGGAGAGTCTGACTTTAACTGGAGCACAGATC
TCATCTCTTCTCAAACCGTCTGCAATCAGTTACCTAATCTCCAAGTGCTAGATCTGTCT
TACAACCTATTAGAAGATTTACCCAGTTTTTTCAGTCTGCCAAAAGCTTCAGAAAATTGAC
CTAAGACATAATGAAATCTACGAAATTAAAGTTGACACTTTCCAGCAGTTGCTTAGCCTC
CGATCGCTGAATTTGGCTTGGAACAAAATTGCTATTATTACCCCCAATGCATTTTCCACT
TTGCCATCCCTAATAAAGCTGGACCTATCGTCCAACCTCCTGTCGTCTTTTCCTATAACT
GGGTTACATGGTTTAACTCACTTAAATTAACAGGAAATCATGCCTTACAGAGCTTGATA
TCATCTGAAAACCTTTCCAGAACTCAAGGTTATAGAAATGCCTTATGCTTACCAGTGCTGT
GCATTTGGAGTGTGTGAGAATGCCTATAAGATTTCTAATCAATGGAATAAAGGTGACAAC

10

20

30

AGCAGTATGGACGACCTTCATAAGAAAGATGCTGGAATGTTTCAGGCTCAAGATGAACGT
GACCTTGAAGATTTCTGCTTGACTTTGAGGAAGACCTGAAAGCCCTTCATTCACTGCAG
TGTTACCTTCCCCAGGCCCTTCAAACCCTGTGAACACCTGCTTGATGGCTGGCTGATC
AGAATTGGAGTGTGGACCATAGCAGTTCTGGCACCTTACTTGTAATGCTTTGGTGACTTCA
ACAGTTTTTCAGATCCCCTCTGTACATTTCCCCCATTAAACTGTTAATTGGGGTCATCGCA
GCAGTGAACATGCTCACGGGAGTCTCCAGTGCCGTGCTGGCTGGTGTGGATGCGTTCCT
TTTGGCAGCTTGCACGACATGGTGCCTGGTGGGAGAATGGGGTTGGTTGCCATGTCATT
GGTTTTTTGTCCATTTTTTGCTTCTGCAATCATCTGTTTTCTGCTTACTCTGGCAGCCCTG
GAGCGTGGGTCTCTGTGAAATATTCTGCAAAATTTGAAACGAAAGCTCCATTTTCTAGC
CTGAAAGTAATCATTTTTGCTCTGTGCCCTGCTGGCCTTGACCATGGCCGAGTTCCCCTG
CTGGGTGGCAGCAAGTATGGCGCCTCCCCTCTCTGCCTGCCTTTGCCTTTTGGGGAGCCC
AGCACCATGGGCTACATGGTCTGCTCTCATCTTGCTCAATCCCTTTGCTTCCTCATGATG
ACCATTGCCCTACACCAAGCTCTACTGCAATTTGGACAAGGAGACCTGGAGAATATTTGG
GACTGCTCTATGGTAAACACATTGCCCTGTTGCTCTTCACCAACTGCATCCTAACTGC
CCTGTGGCTTTCTTGTCTTCTCCTCTTTAATAAACCTTACATTTATCAGTCTGAAGTA
ATTAAGTTTATCCTTCTGGTGGTAGTCCCACTTCTGCATGTCTCAATCCCCTTCTCTAC
ATCTTGTTCAATCCTCACTTTAAGGAGGATCTGGTGAGCCTGAGAAAGCAAACCTACGTC
TGGACAAGATCAAAACACCCAAGCTTGATGTCAATTAACCTCTGATGATGTCGAAAAACAG
TCCTGTGACTCAACTCAAGCCTTGGTAACCTTTACCAGCTCCAGCATCACTTATGACCTG
CCTCCCAGTTCCGTGCCATCACCAGCTTATCCAGTGACTGAGAGCTGCCATCTTTCCTCT
GTGGCATTGTGCCATGTCTCTAA

【 0 3 0 1 】

ヒトLGR5タンパク質配列 (SEQ ID NO:13)。

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSEL
PSNLSVFTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGAFTGLYSLKVL
LQNNQLRHVPTEALQNLRLSLRLDANHISYVPPSCFSGLSLRLHLWLDNALTEIPVQ
AFRSLSALQAMTLALNKIHHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKCFDGLHSLETLD
LNYNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLITIHFYDNPIQFVGRSA
FQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTGANLESLTLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLS
YNLLEDLPFSVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLSLRSLNLAWNKIAIIHPNAFST
LPSLIKLDLSSNLLSFPITGLHGLTHLKLGTGNHALQSLISSENFPELKVIEMPYAYQCC
AFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQDERDLEDFLDFEEDLKALHSVQ
CSPSPGPFKPEHLLDGWLIRIGVWTIAVLALTCNALVTSTVFRSPLYISPIKLLIGVIA
AVNMLTGVSSAVLAGVDAFTFGSFARHGAWWENGVGCHVIGFLSIFASESSVFLTLAAL
ERGFVKYSKAFETKAPFSSLKVIIILLCALLALTMAAVPLLGGSKYGASPLCLPLPFGE
STMGYMVALIILLNSLCFLMMTIAYTKLYCNLDKGDLENIWDCSMVKHIALLLFTNCILNC
PVAFLSFSSLINLTFISPEVIKIFILLVVVPLPACLNPLLYILFNPHEKEDLVSLRKQTYV
WTRSKHPSLMSINSDDVEKQSCDSTQALVTFTSSSITYDLPPSSVPSPAYPVTESCHLSS
VAFVPCL

【 0 3 0 2 】

LGR5-Fc DNA配列 (SEQ ID NO:14)。

ATGGACACCTCCCGGCTCGGTGTGCTCCTGTCCTTGCCTGTGCTGCTGCAGCTGGCGACC
GGGGGCAGCTCTCCAGGTCTGGTGTGTTGCTGAGGGGCTGCCCCACACACTGTCATTGC
GAGCCCGACGGCAGGATGTTGCTCAGGGTGGACTGCTCCGACCTGGGGCTCTCGGAGCTG
CCTTCCAACCTCAGCGTCTTCACCTCCTACCTAGACCTCAGTATGAACAACATCAGTCAG
CTGCTCCCGAATCCCCTGCCAGTCTCCGCTTCTGGAGGAGTTACGTCTTGCGGGAAAC
GCTCTGACATACATTCCCAAGGGAGCATTCACTGGCCTTTACAGTCTTAAAGTTCTTATG
CTGCAGAATAATCAGCTAAGACACGTACCCACAGAAGCTCTGCAGAATTTGCGAAGCCTT
CAATCCCTGCGTCTGGATGCTAACACATCAGCTATGTGCCCCCAAGCTGTTTCAGTGGC
CTGCATTCCCTGAGGCACCTGTGGCTGGATGACAATGCGTTAACAGAAATCCCCGTCCAG
GCTTTTAGAAGTTTATCGGCATTGCAAGCCATGACCTTGGCCCTGAACAAAATACACCAC
ATACCAGACTATGCCTTTGGAAACCTCTCCAGCTTGGTAGTTCTACATCTCCATAACAAT
AGAATCCACTCCCTGGGAAAGAAATGCTTTGATGGGCTCCACAGCCTAGAGACTTTAGAT
TTAAATTACAATAACCTTGATGAATTTCCCACTGCAATTAGGACACTCTCCAACCTTAAA
GAACTAGGATTTCATAGCAACAATATCAGGTGATACCTGAGAAAGCATTGTAGGCAAC
CCTTCTCTTATTACAATACATTTCTATGACAATCCCATCCAATTTGTTGGGAGATCTGCT
TTTCAACATTTACCTGAACTAAGAACACTGACTCTGAATGGTGCCTCACAAATAACTGAA
TTTCTGATTTAACTGGAACGCAAACCTGGAGAGTCTGACTTTAACTGGAGCACAGATC
TCATCTCTTCTCAAACCGTCTGCAATCAGTTACCTAATCTCCAAGTGCTAGATCTGTCT
TACAACCTATTAGAAGATTTACCCAGTTTTTTCAGTCTGCCAAAAGCTTCAGAAAATTGAC
CTAAGACATAATGAAATCTACGAAATTAAAGTTGACACTTTCCAGCAGTTGCTTAGCCTC
CGATCGCTGAATTTGGCTTGGAACAAAATTGCTATTATTACCCCAATGCATTTTCCACT
TTGCCATCCCTAATAAAGCTGGACCTATCGTCCAACCTCCTGTCGTCTTTTCTATAACT
GGGTTACATGGTTTAACTCACTTAAAATTAACAGGAAATCATGCCTTACAGAGCTTGATA
TCATCTGAAAACCTTTCCAGAACTCAAGGTTATAGAAATGCCTTATGCTTACCAGTGCTGT
GCATTTGGAGTGTGTGAGAATGCCTATAAGATTTCTAATCAATGGAATAAAGGTGACAAC
AGCAGTATGGACGACCTTCATAAGAAAGATGCTGGAATGTTTCAGGCTCAAGATGAACGT
GACCTTGAAGATTTCTGCTTGACTTTGAGGAAGACCTGAAAGCCCTTCATTCAGTGCAG
TGTTACCTTCCCCAGGCCCTTCAAACCCTGTGAACACCTGCTTGATGGCTGGCTGATC
AGAATTGGAGTGGGGCGCGCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA
CTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATC
TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC

10

20

30

40

AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAG
AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACC
ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

【 0 3 0 3 】

LGR5-Fcタンパク質配列 (SEQ ID NO:15)。

MDTSRLGVLLSLPVLLQLATGGSSPRSGVLLRGCPHCHCEPDGRMLLRVDCSDLGLSEL
PSNLSVFSTSYLDLSMNNISQLLPNPLPSLRFLEELRLAGNALTYIPKGAFGLYSLKVL
LQNNQLRHVPTEALQNLRLSLRLDANHISYVPPSCFSGLSLRLHLWDDNALTEIPVQ
AFRSLSALQAMTLALNKIHHIPDYAFGNLSSLVVLHLHNNRIHSLGKKCFDGLHSLETLD
LNYNNLDEFPTAIRTLNLKELGFHSNNIRSIPEKAFVGNPSLITIHFYDNPIQFVGRSA
FQHLPELRTLTLNGASQITEFPDLTGANLESLLTGAQISSLPQTVCNQLPNLQVLDLS
YNLLEDLPFSFVCQKLQKIDLRHNEIYEIKVDTFQQLSLRSLNLAWNKIAIIHPNAFST
LPSLIKLDLSSNLLSSFPITGLHGLTHLKLGTGNHALQSLISSENFPELKVIEMPYAYQCC
AFGVCENAYKISNQWNKGDNSSMDDLHKKDAGMFQAQDERDLEDFLDFFEDLKALHSVQ
CSPSPGPFKPEHLLDGWLIRIGVGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI
SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

20

30

【 0 3 0 4 】

RSP01-Fc DNA配列 (SEQ ID NO:16)。

ATGCGGCTTGGGCTGTGTGTGGTGGCCCTGGTTCTGAGCTGGACGCACCTCACCATCAGC
AGCCGGGGGATCAAGGGGAAAAGGCAGAGGCGGATCAGTGCCGAGGGGAGCCAGGCCTGT
GCCAAAGGCTGTGAGCTCTGCTCTGAAGTCAACGGCTGCCTCAAGTGCTCACCCAAGCTG
TTCATCCTGCTGGAGAGGAACGACATCCGCCAGGTGGGCGTCTGCTTGCCGTCCTGCCCCA
CCTGGATACTTCGACGCCCCGCAACCCCGACATGAACAAGTGCATCAAATGCAAGATCGAG
CACTGTGAGGCCTGCTTCAGCCATAACTTCTGCACCAAGTGTAAGGAGGGCTTGTACCTG
CACAAGGGCCGCTGCTATCCAGCTTGTCCCGAGGGCTCCTCAGCTGCCAATGGCACCATG
GAGTGCAGTAGTCCTGCGCAATGTGAAATGAGCGAGTGGTCTCCGTGGGGGCCCTGCTCC
AAGAAGCAGCAGCTCTGTGGTTTCCGGAGGGGCTCCGAGGAGCGGACACGCAGGGTGCTA
CATGCCCTGTGGGGGACCATGCTGCCTGCTCTGACACCAAGGAGACCCGGAGGTGCACA
GTGAGGAGAGTGCCGTGTCTTGAGGGGCAGAAGAGGAGGAAGGGAGGCCAGGGCCGGCGG
GAGAATGCCAACAGGAACCTGGCCAGGAAGGAGAGCAAGGAGGCGGGTGCTGGCTCTCGA
AGACGCAAGGGGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAAGGGACAGTGGGGCCACTCACATCTGCA
GGGCCTGCCGGGCGCGCCGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTTGACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

20

30

40

【 0 3 0 5 】

RSP01-Fcタンパク質配列 (SEQ ID NO:17)。

MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
FILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYL
HKGRCPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVL
HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSR
RRKGQQQQQQGTVGPLTSAGPAGRADKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

【 0 3 0 6 】

RSP02-Fc DNA配列 (SEQ ID NO:18)。

ATGCAGTTTCGCCTTTTCTCCTTTGCCCTCATCATTTCTGAACTGCATGGATTACAGCCAC
TGCCAAGGCAACCGATGGAGACGCAGTAAGCGAGCTAGTTATGTATCAAATCCCATTTCG
AAGGGTTGTTTGTCTTGTTCAAAGGACAATGGGTGTAGCCGATGTCAACAGAAGTTGTTT
TTCTTCCTTCGAAGAGAAGGGATGCGCCAGTATGGAGAGTGCCTGCATTCTGCCCCATCC
GGGTACTATGGACACCGAGCCCCAGATATGAACAGATGTGCAAGATGCAGAATAGAAAAC
TGTGATTCTTGCTTTAGCAAAGACTTTTGTACCAAGTGCAAAGTAGGCTTTTATTTGCAT
AGAGGCCGTTGCTTTGATGAATGTCCAGATGGTTTTGCACCATTAGAAGAAACCATGGAA
TGTGTGGAAGGATGTGAAGTTGGTCATTGGAGCGAATGGGGAACCTGTAGCAGAAATAAT
CGCACATGTGGATTTAAATGGGGTCTGGAACACAGAACACGGCAAATTGTTAAAAAGCCA
GTGAAAGACACAATACTGTGTCCAACCATTGCTGAATCCAGGAGATGCAAGATGACAATG
AGGCATTGTCCAGGAGGGAAGAGAACACCAAAGGCGAAGGAGAAGAGGAACAAGAAAAAG
AAAAGGAAGCTGATAGAAAGGGCCCAGGAGCAACACAGCGTCTTCCTAGCTACAGACAGA
GCTAACCAAGGGCGCGCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTC
CTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCC
CGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG
TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG
AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGGAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC
CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG
AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC
CACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

10

20

30

【 0 3 0 7 】

RSP02-Fcタンパク質配列 (SEQ ID NO:19)。

MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLF
FFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLH
RGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGCEVGHWSEWGTC SRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKP
VKDTILCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLATDR
ANQGRADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

【 0 3 0 8 】

RSP03-Fc DNA配列 (SEQ ID NO:20)。

ATGCACTTGCGACTGATTTCTTGGCTTTTTATCATTTTGAACTTTATGGAATACATCGGC
AGCCAAAACGCCTCCCGGGGAAGGCGCCAGCGAAGAATGCATCCTAACGTTAGTCAAGGC
TGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGATTACAATGGATGTTTGTCTATGTAAGCCCAGA
CTATTTTTTGTCTCTGGAAAGAATTGGCATGAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTCTTCATGT
CCAAGTGGATATTATGGAACCTCGATATCCAGATATAAATAAGTGTACAAAATGCAAAGCT
GACTGTGATACCTGTTTCAACAAAAATTTCTGCACAAAATGTAAAAGTGGATTTTACTTA
CACCTTGGAAAGTGCCTTGACAATTGCCCAGAAGGGTTGGAAGCCAACAACCATACTATG
GAGTGTGTCTAGTATTGTGCACTGTGAGGTGAGTGAATGGAATCCTTGGAGTCCATGCACG
AAGAAGGGAAAAACATGTGGCTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCCGAGAAATAATA
CAGCATCCTTCAGCAAAGGGTAACCTGTGTCCCCAACAAATGAGACAAGAAAGTGTACA
GTGCAAAGGAAGAAGTGTGAGAAGGGAGAACGAGGAAAAAAGGAAGGGAGAGGAAAAGA
AAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTGACAGCAAAAAGTCTGGAATCC
AGCAAAGAAATCCCAGAGCAACGAGAAAAACAAACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAGTCCAA
GATAAACAGAAATCGGTATCAGTCAGCACTGTACACGGGCGCGCCGACAAAACCTCACACA
TGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCA
AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCTCAGCGTC
CTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAC
AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA
CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG
CAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG
GGTAAATGA

【 0 3 0 9 】

RSP03-Fcタンパク質配列 (SEQ ID NO:21)。

MHLRLISWLFIIILNFMHEYIGSQNASRGRQRMRHPNVSQGCQGGCATCSYNGCLSCKPR
LFFALERIGMKQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYI
HLGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREII
QHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKCQKGERGKKGRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLES
SKEIPEQRENKQQQKKRKVQDKQKSVSVSTVHGRADKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP
KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【 0 3 1 0 】

RSP04-Fc DNA配列 (SEQ ID NO:22)。

10

20

30

40

ATGCGGGCGCCACTCTGCCTGCTCCTGCTCGTCGCCCCACGCCGTGGACATGCTCGCCCTG
AACCGAAGGAAGAAGCAAGTGGGCACTGGCCTGGGGGGCAACTGCACAGGCTGTATCATC
TGCTCAGAGGAGAACGGCTGTTCCACCTGCCAGCAGAGGCTCTTCCTGTTTCATCCGCCGG
GAAGGCATCCGCCAGTACGGCAAGTGCCTGCACGACTGTCCCCCTGGGTACTTCGGGCATC
CGCGGCCAGGAGGTCAACAGGTGCAAAAAATGTGGGGCCACTTGTGAGAGCTGCTTCAGC
CAGGACTTCTGCATCCGGTGCAAGAGGCAGTTTTACTTGTACAAGGGGAAGTGTCTGCCC
ACCTGCCCCGCCGGGCACTTTGGCCCACCAGAACACACGGGAGTGCCAGGGGGAGTGTGAA
CTGGGTCCCTGGGGCGGCTGGAGCCCCCTGCACACACAATGGAAAGACCTGCGGCTCGGCT
TGGGGCCTGGAGAGCCGGGTACGAGAGGCTGGCCGGGCTGGGCATGAGGAGGCAGCCACC
TGCCAGGTGCTTTCTGAGTCAAGGAAATGTCCCATCCAGAGGCCCTGCCAGGAGAGAGG
AGCCCCGGCCAGAAGAAGGGCAGGAAGGACCGGCGCCACGCAAGGACAGGAAGCTGGAC
CGCAGGCTGGACGTGAGGCCGCGCCAGCCCGGCTGCAGCCCGGGCGCGCCGACAAAACCT
CACACATGCCACCCTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAG
GTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC
AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC
TTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC
TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG
TCTCCGGGTAAATGA

10

20

30

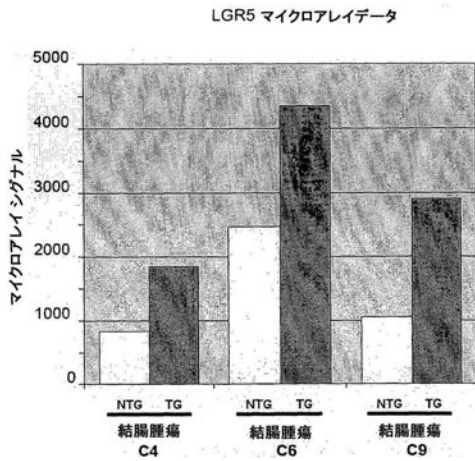
【 0 3 1 1 】

RSP04-Fc DNA配列 (SEQ ID NO:23)

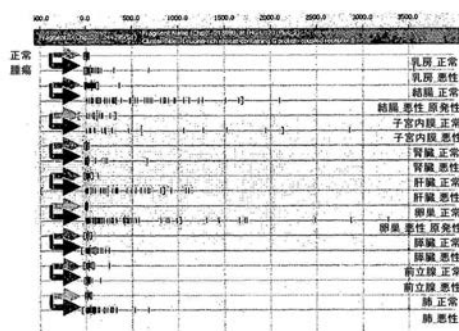
MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGCSCTCQQRFLFLFIRR
EGIRQYGKCLHDCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSQDFCIRCKRQFYLYKGKCLP
TCPPGTLAHQNTRECQGECELGPWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAAT
CQVLSESRKCPIQRPCPGERSPGQKKGRKDRRPRKDRKLDRLDVRPRQPGLQPGRADKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

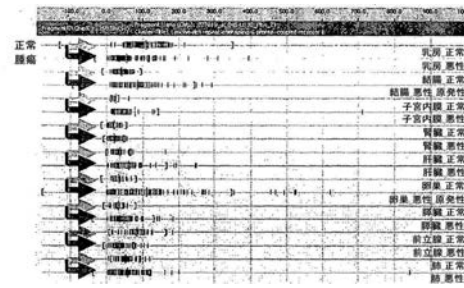
【図 1】



【図 2】



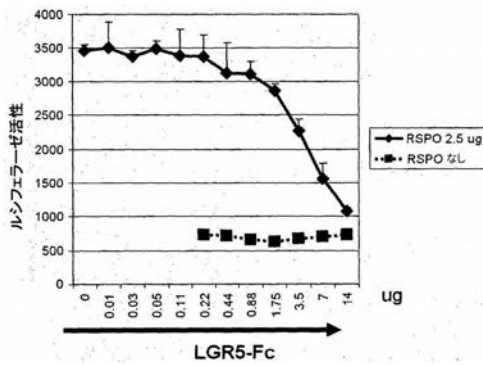
【図 3】



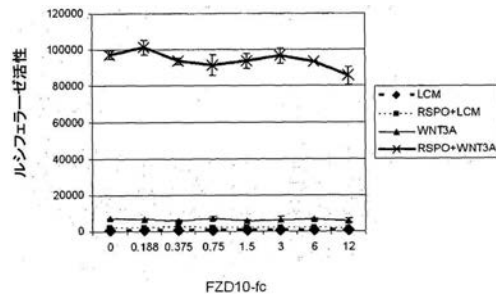
【図 4】



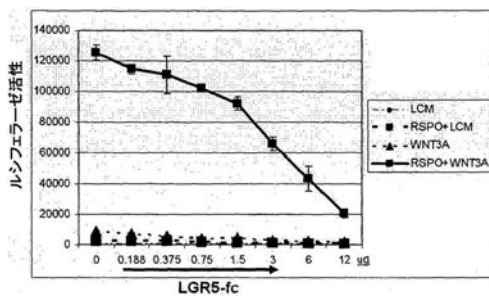
【図 5】



【図 6 B】

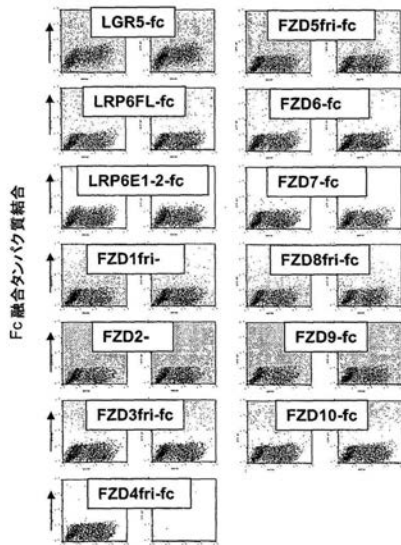


【図 6 A】



【図 7 A】

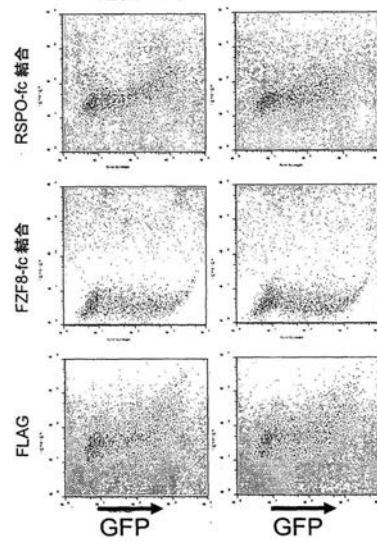
一過性の RSPO1-CD4TM+ GFP



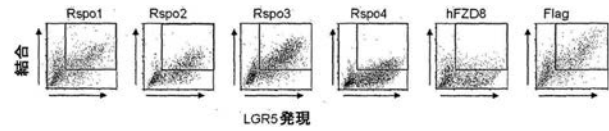
【図 7 B】

FLAG-LGR5-CD4TM

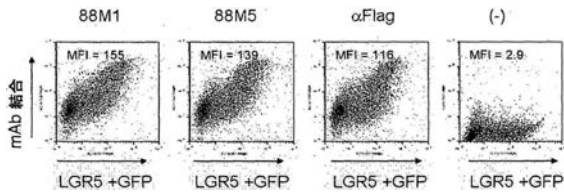
一過性のトランスフェクション + GFP



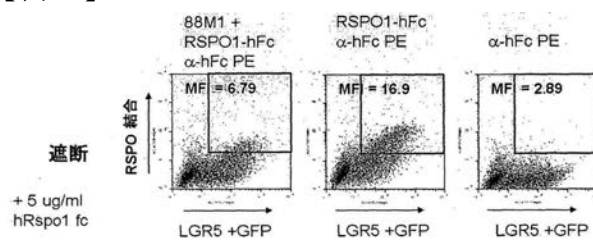
【図 7 C】



【図 8】



【図 9】



【配列表】

2016187356000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/02	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	C	4 H 0 4 5	
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10			
C 1 2 N	5/09	(2010.01)	C 1 2 N	5/09			
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02			
C 1 2 N	5/20	(2006.01)	C 1 2 N	5/20			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00			
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	45/00			
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1		
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08			

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 オースティン ガーニー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンフランシスコ ダイヤモンド ストリート 4 9 6

F ターム(参考) 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS07 QX01
 4B064 AG27 CA19 CA20 CC24 CE06 CE12 DA05 DA14
 4B065 AA90X AA91X AA92Y AA94Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 BD14
 BD17 BD18 CA25 CA44 CA46
 4C084 AA19 MA02 NA14 ZB261 ZC021
 4C085 AA14 AA16 BB01 EE01 EE03
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 CA41 DA50 DA76 EA28
 EA51 FA72 FA74 GA10 GA26

【外国語明細書】
2016187356000001.pdf

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2016187356A5	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2016148170	申请日	2016-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	昂考梅德药品有限公司		
申请(专利权)人(译)	オンコメッドファーマシューティカルズインコーポレイテッド		
[标]发明人	オースティンガーニー		
发明人	オースティン ガーニー		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/531 G01N33/543 C07K16/30 C07K16/46 C12N15/02 C07K14/705 C12N5/10 C12N5/09 C12Q1/02 C12N5/20 A61P35/00 A61K39/395 A61K45/00 A61P43/00 C12P21/08		
CPC分类号	A61K2039/505 C07K14/723 C07K16/28 C07K2317/76 C07K2319/30 A61K39/3955 A61K39/39558 A61K45/06 C07K16/18 C07K16/30 C07K2317/14 C07K2317/21 C07K2317/24		
FI分类号	C12N15/00.A G01N33/531.A G01N33/543.551.N C07K16/30.ZNA C07K16/46 C12N15/00.C C07K14/705 C12N5/10 C12N5/09 C12Q1/02 C12N5/20 A61P35/00 A61K39/395.N A61K45/00 A61P43/00.111 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QX01 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE06 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA92Y 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BD14 4B065/BD17 4B065/BD18 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC021 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA10 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	60/947611 2007-07-02 US		
其他公开文献	JP2016187356A		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种更好的诊断测定和治疗癌症患者。本发明涉及在肿瘤学领域的组合物和方法。本发明提供了破坏通过LGR蛋白功能信令，在某些实施方案中抑制LGR蛋白质之间的相互作用，如R-脊椎蛋白 (RSPO) 蛋白和LGR5的生物分子，这种分子Hisage经过。在某些实施方案中，所述生物分子是抗体。例如，在某些实施方案中，生物分子可以是特异性结合特异性结合至少一种人RSPO蛋白或至少一个人类LGR蛋白的抗体的胞外域的抗体。