

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-516371

(P2015-516371A)

(43) 公表日 **平成27年6月11日(2015.6.11)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	Z N A 2 G 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 5 0
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 B 0 6 4
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00	G 4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 111 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-560523 (P2014-560523)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月7日 (2013.3.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月27日 (2014.10.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2013/050209
 (87) 国際公開番号 W02013/132495
 (87) 国際公開日 平成25年9月12日 (2013.9.12)
 (31) 優先権主張番号 61/607,696
 (32) 優先日 平成24年3月7日 (2012.3.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/665,365
 (32) 優先日 平成24年6月28日 (2012.6.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 502379147
 イェダ リサーチ アンド デベロップメ
 ント カンパニー リミテッド
 イスラエル国 7 6 1 0 0 レホヴォト
 ビー. オー. ボックス 95 アット ザ
 ワインツマン インスティテュート オ
 ブ サイエンス
 (74) 代理人 100103816
 弁理士 風早 信昭
 (74) 代理人 100120927
 弁理士 浅野 典子
 (72) 発明者 ファス, デボラ
 イスラエル, 7 6 3 0 4 2 2 レホヴォ
 ト, モーリヴァー ストリート 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キエシンスルフヒドリルオキシダーゼ (Q S O X 1) を阻害するための組成物および該組成物の使用

(57) 【要約】

基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げる方法が開示される。この方法は、組織を、Q S O X 1 の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げることを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げる方法であって、組織を、Q S O X 1 の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げることを含む方法。

【請求項 2】

ラミニン含有基底膜を介する細胞遊走を阻害する方法であって、組織を、Q S O X 1 の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記ラミニン含有基底膜を介する前記細胞遊走を阻害することを含む方法。

【請求項 3】

前記細胞は腫瘍細胞である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記組織は腫瘍組織である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記組織は線維芽細胞を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記方法はインビボで行われる、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置の必要のある対象において処置する方法であって、Q S O X 1 の活性または発現を阻害する作用因の治療有効量を前記対象に投与し、それにより、前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を前記対象において処置することを含む方法。

【請求項 8】

ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置の必要のある対象において処置するために特定される医薬を製造するための、Q S O X 1 の活性または発現を阻害する作用因の治療有効量の使用。

【請求項 9】

前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は腫瘍である、請求項 7 に記載の方法、または請求項 8 に記載の使用。

【請求項 10】

前記腫瘍は転移性固形腫瘍である、請求項 9 に記載の方法または使用。

【請求項 11】

前記腫瘍は腺ガンである、請求項 9 に記載の方法または使用。

【請求項 12】

前記腫瘍は、前立腺ガン、肺ガン、乳ガン、子宮頸ガン、尿管管ガン、膣ガン、結腸ガン、食道ガン、膵臓ガン、咽頭ガン、胃ガンおよび骨髄性白血病からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法または使用。

【請求項 13】

前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は線維症に関連する、請求項 7 に記載の方法、または請求項 8 に記載の使用。

【請求項 14】

前記ラミニンはアルファ 4 鎖を含む、請求項 1 , 2 もしくは 7 に記載の方法、または請求項 8 に記載の使用。

【請求項 15】

前記ラミニンはラミニン - 4 1 1 またはラミニン - 4 2 1 である、請求項 1 , 2 もしくは 7 に記載の方法、または請求項 8 に記載の使用。

【請求項 16】

前記作用因はポリペプチド作用因である、請求項 7 に記載の方法、または請求項 8 に記載の使用。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチド作用因は、抗体、抗体フラグメントまたはペプチドからなる群から選択される、請求項 16 に記載の方法または使用。

【請求項 18】

前記ポリペプチド作用因は前記 QSOX1 のアミノ酸座標 34 ~ 266 に対して向けられる、請求項 16 に記載の方法または使用。

【請求項 19】

前記抗体は MA b 492 . 1 であり、配列番号 29 ~ 34 である相補性決定領域 (CDR) を含む、請求項 17 に記載の方法または使用。

【請求項 20】

前記抗体フラグメントは scFV 492 . 1 であり、配列番号 29 ~ 34 である相補性決定領域 (CDR) を含む、請求項 17 に記載の方法または使用。 10

【請求項 21】

前記作用因はポリヌクレオチド作用因である、請求項 7 に記載の方法、または請求項 8 に記載の使用。

【請求項 22】

前記ポリヌクレオチド作用因は、アンチセンス、siRNA、マイクロRNA、リボザイムおよび DNA ザイムからなる群から選択される、請求項 21 に記載の方法または使用。

【請求項 23】

QSOX1 と特異的に結合し、かつ、細胞遊走を支援する基底膜組立てを媒介することにおける QSOX1 活性を阻害する、抗原認識ドメインを含む単離された抗体。 20

【請求項 24】

前記活性が、細胞外マトリックスの免疫蛍光 (IF) 染色アッセイ、または、可溶性ラミニンについて検出するウエスタンブロットアッセイのうち少なくとも 1 つによってアッセイされる、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 25】

前記抗体は抗体フラグメントである、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 26】

前記抗体は、Fab フラグメント、Fv フラグメント、単鎖抗体および単ドメイン抗体からなる群から選択される、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 27】

前記 QSOX1 はヒト QSOX1 である、請求項 23 に記載の単離された抗体。 30

【請求項 28】

前記 QSOX1 はマウス QSOX1 である、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 29】

前記抗体はモノクローナル抗体である、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 30】

前記モノクローナル抗体は MA b 492 . 1 であり、かつ CDR 配列番号 29 ~ 34 を含む、請求項 29 に記載の単離された抗体。

【請求項 31】

前記抗体は一本鎖抗体である、請求項 23 に記載の単離された抗体。 40

【請求項 32】

前記一本鎖抗体は scFV 492 . 1 であり、CDR 配列番号 29 ~ 34 を含む、請求項 31 に記載の単離された抗体。

【請求項 33】

前記抗体または抗体フラグメントはヒト化される、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 34】

前記抗体はキメラ抗体である、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 35】

前記抗体は固体支持体に固定化される、請求項 23 に記載の単離された抗体。 50

【請求項 36】

前記抗体は検出可能成分に結合される、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 37】

配列番号 7 および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 38】

配列番号 27 および配列番号 28 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 23 に記載の単離された抗体。

【請求項 39】

有効成分として請求項 23 ~ 27 , 29 ~ 34 または 37 ~ 38 に記載の単離された抗体を含み、かつ、医薬的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物。

10

【請求項 40】

ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を妨げるか処置する必要のある対象において前記疾患または状態を妨げるか、または処置するための方法であって、前記対象に請求項 39 に記載の医薬組成物の治療有効量を投与することを含む方法。

【請求項 41】

ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を妨げるか処置する必要のある対象において前記疾患または状態を妨げるか、または処置するために特定される医薬を製造するための、請求項 23 ~ 27 , 29 ~ 34 または 37 ~ 38 のいずれかに記載の単離された抗体の使用。

20

【請求項 42】

前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態が腫瘍である、請求項 40 に記載の方法または請求項 41 に記載の使用。

【請求項 43】

請求項 23 ~ 27 , 29 ~ 34 または 37 ~ 38 のいずれかに記載の単離された抗体を包装材料に詰められた状態で含み、かつ、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態の処置において使用するために前記包装材料の内部または表面において印刷で特定される製品。

【請求項 44】

請求項 23 ~ 34 または 37 ~ 38 のいずれかに記載の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 45】

配列番号 29 ~ 34 に示される相補性決定領域 (CDR) を有する CDR 含有ポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 46】

ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を対象において診断する方法であって、
(a) 前記対象の生物学的サンプルを、請求項 35 または 36 に記載の単離されたポリペプチドと QSOX1 タンパク質との間における免疫複合体形成のために好適な条件のもとで請求項 35 または 36 に記載の単離されたポリペプチドと接触させること；および
(b) 前記免疫複合体の形成を検出し、ただし、所定の閾値を超える前記免疫複合体の存在により、前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態が示され、それにより、前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を前記対象において診断することを含む方法。

40

【請求項 47】

請求項 23 ~ 38 のいずれかに記載の抗体を含む生物学的サンプルにおいて QSOX1 のレベルを検出するためのキット。

【請求項 48】

QSOX1 阻害剤を特定する方法であって、組織を試験作用因の存在下または非存在下で培養することを含み、前記試験作用因との前記培養の後での機能的基底膜における減少により、前記試験作用因が前記 QSOX1 阻害剤であることが示される方法。

【請求項 49】

50

機能的基底膜における前記減少は、前記基底膜でのラミニン集合における低下を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

ラミニン集合における前記低下は、前記組織での可溶性ラミニンにおける増大を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 51】

前記組織は組織培養物を含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 52】

前記方法はインピボで実施される、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 53】

QSOX1 の活性レベルまたは発現レベルにおける低下をさらに含む、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 54】

QSOX1 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、長さが 500 アミノ酸未満である単離されたポリペプチド。

【請求項 55】

配列番号 6 に示される QSOX1 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 56】

QSOX1 と特異的に結合し、かつ、細胞遊走を支援する基底膜組立てを媒介することにおける QSOX1 活性を阻害する、抗原認識ドメインを含む抗体を製造する方法であって、

- (a) マウスを組換え QSOX1 ポリペプチドにより免疫化する工程；
- (b) ハイブリドーマを工程 (a) の前記マウスの脾臓細胞から作製する工程であって、前記脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合することを含む工程；および
- (c) 陽性のハイブリドーマを選択し、それにより、前記 QSOX1 と特異的に結合する前記抗原認識ドメインを含む前記抗体を製造する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、QSOX1 阻害剤に関連し、より具体的には、限定されないが、ラミニン関連疾患を処置するための QSOX1 阻害剤の使用に関連する。

【背景技術】

【0002】

キエシンスルフィドヒドロキシダーゼ 1 (QSOX1) は、基質タンパク質におけるチオール基の対から分子状酸素への電子の移動を媒介するために結合型フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 補因子を使用する酵素であり、過酸化水素が副生成物として生成される。QSOX1 は、ジスルフィド形成のこの基本的な触媒活性を、小胞体 (ER) における初期段階のタンパク質折り畳みにおいて機能するいくつかの他の酵素と、また、ミトコンドリアの膜間腔におけるタンパク質の折り畳みおよび保持を媒介する酵素と共用する。しかしながら、QSOX1 は、分泌経路において ER の下流側のオルガネラに主に局在化すること、および、細胞からの調節された分泌を受けることが知られている唯一のジスルフィド触媒である。QSOX1 は、電子を基質チオールからその FAD 補因子に渡すために一連のジチオール/ジスルフィド交換工程を受ける多ドメイン酵素である。この酵素の 2 つの主要なレドックス活性ドメイン (その第 1 のドメインがタンパク質チオール含有基質と相互作用し、その第 2 のドメインが分子状酸素の還元を触媒する) は、それらの相対的な配向を反応サイクルの期間中に変化させなければならない。特に、アミノ末端のチオレドキン折り畳み (Trx) ドメインにおけるレドックス活性なジシステインモチーフ (図 1A ~ 図 1B) は、基質タンパク質からの電子を受け入れるために十分に溶媒にさ

10

20

30

40

50

らされなければならない。Trxドメインはその後、電子をさらに移動させるためにジスルフィド生成のERV折り畳み(Erv)ドメインのレドックス活性なジステインモチーフに対して自身を埋没させなければならない(図1A~図1B)。哺乳動物およびトリパノソーマ寄生虫から得られるQSOXの一組の結晶構造により、QSOX酵素によって示される立体配座変化の本質が例示され、また、そのような再配置を可能にする柔軟なリンカーが特定された。

【0003】

QSOX1は、乳汁分泌および哺乳動物の精嚢分泌におけるジスルフィド結合形成の触媒として最初に発見された[Janolino V.G.およびSwaisgood H.E.(1975)、J.Biol.Chem.、250、2532~2538]。QSOX1の転写物が後で、コンフルエンスに達し、休止状態に入ったときの培養された肺線維芽細胞におけるその誘導により特定された[Coppock D.L.他(1993)、Cell Growth Differ.、4、483~493]。QSOX1の発現が生体において胚発達の期間中に認められており[Portes K.F.他(2008)、J.Mol.Histol.、39、217~225]、同様にまた、成体の多くの器官および細胞タイプにおいて認められている。QSOX1のレベルが、大きい分泌能力を有する器官(例えば、肺、卵巣および子宮内膜など)において特に高く[Musard J.F.他(2001)、Biochem.Biophys.Res.Comm.、287、83~91]、また、胃、気管支、唾液腺、食道、ランゲルハンス島、膀胱、ならびに、男性生殖器系および女性生殖器系の両方の表面近い上皮層において特に高い[Tury A.他(2006)、Cell Tissue Res.、323、91~103]。QSOX1はまた、発達途中の脳において、空間的および時間的に複雑な発現パターンを示す[Amiot C.他(2004)、Brain Res.Mol.Brain Res.、125、13~21]。休止している線維芽細胞によって産生されるQSOX1が分泌されることが示された[Coppock D.他(2000)、Biochem.Biophys.Res.Comm.、269、604~610]。また、様々な体液におけるスルフィドリルオキシダーゼ活性により、他の細胞タイプからのQSOX1分泌が同様に示唆される[Janolino V.G.およびSwaisgood、上掲]

10

20

30

【0004】

細胞外または後期分泌のジスルフィド触媒の目的は依然として、大きな未解決の疑問のままであり、また、QSOX1の生来的な基質が今後、特定されなければならない。

【0005】

近年、幾人かの研究者がQSOX1とガンを関連づけている。Antwi他[Antwi K.他(2009)、J.Proteome Res.、8、4722~4731]の教示によれば、増大したQSOX1タンパク質レベルがヒト患者における膵臓管腺ガン(DAP)および関連した微小転移において認められた。さらに、DAP患者の血清ペプチドームの質量分析研究では、見かけ上はタンパク質分解的な、QSOX1に由来するペプチドの高いレベルが明らかにされた[Antwi他(2009)、上掲]。Katchman他は、QSOX1が、マトリックスメタロプロテイナーゼによって媒介される膵臓腫瘍細胞の浸入を促進させることを教示する[Katchman他(2011)、Mol.Cancer Res.、9(12)、1621~31]。そのうえ、前立腺ガンについてのマウスモデルでは、Nkx3.1腫瘍抑制因子の機能の喪失がQSOX1の増大した産生をもたらした[Ouyang X.他(2005)、Cancer Res.、65、6773~6779]。QSOX1が、前立腺肥大および上皮間新形成において、すなわち、前立腺腫瘍形成における初期事象において特に高く発現した[Song H.他(2009)、Oncogene、28、3307~3319]。

40

【0006】

さらなる背景技術には、PCT出願公開番号WO2010/077921および同WO2010/071787が含まれる。

50

【発明の概要】

【0007】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げる方法であって、組織を、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げることを含む方法が提供される。

【0008】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ラミニン含有基底膜を介する細胞遊走を阻害する方法であって、組織を、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記ラミニン含有基底膜を介する前記細胞遊走を阻害することを

10

【0009】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置の必要のある対象において処置する方法であって、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因の治療有効量を前記対象に投与し、それにより、前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を前記対象において処置することを含む方法が提供される。

【0010】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置の必要のある対象において処置するために特定される医薬を製造するための、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因の治療有効量の使用が提供される。

20

【0011】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、QSOX1と特異的に結合し、かつ、細胞遊走を支援する基底膜組立てを媒介することにおけるQSOX1活性を阻害する、抗原認識ドメインを含む単離された抗体が提供される。

【0012】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、有効成分として本発明の単離された抗体を含み、かつ、医薬的に許容され得るキャリアを含む医薬組成物が提供される。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、本発明の抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

30

【0014】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、配列番号29～34に示される相補性決定領域(CDR)を有するポリペプチドを含有するCDRをコードする核酸配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0015】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を対象において診断する方法であって、(a)前記対象の生物学的サンプルを、本発明の単離されたポリペプチドとQSOX1タンパク質との間における免疫複合体形成のために好適な条件のもとで本発明の単離されたポリペプチドと接触させること；および(b)前記免疫複合体の形成を検出し、ただし、所定の閾値を超える前記免疫複合体の存在により、前記ラミニン関連疾患が示され、それにより、前記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を前記対象において診断することを含む方法が提供される。

40

【0016】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、本発明の抗体を含む生物学的サンプルにおいてQSOX1のレベルを検出するためのキットが提供される。

【0017】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、QSOX1阻害剤を特定する方法であって、組織を試験作用因の存在下または非存在下で培養することを含み、前記試験作用因との前記培養の後での機能的基底膜における減少により、前記試験作用因が前記Q S

50

O X 1 阻害剤であることが示される方法が提供される。

【0018】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、Q S O X 1 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、長さが500アミノ酸未満である単離されたポリペプチドが提供される。

【0019】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、配列番号6に示されるQ S O X 1 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、長さが500アミノ酸未満である単離されたポリペプチドが提供される。

【0020】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置の必要のある対象において妨げるか処置する方法であって、治療有効量の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法が提供される。

【0021】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を妨げるか処置する必要がある対象において上記疾患または状態を妨げるか、または処置するために特定される医薬を製造するための、上記単離された抗体の使用が提供される。

【0022】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、上記単離された抗体を包装材料に詰めた状態で含み、かつ、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態の処置において使用するために前記包装材料の内部または表面において印刷で特定される製品が提供される。

【0023】

本発明のいくつかの実施形態の1つの局面によれば、Q S O X 1 と特異的に結合し、かつ、細胞遊走を支援する基底膜組立てを媒介することにおけるQ S O X 1 活性を阻害する、抗原認識ドメインを含む抗体を製造する方法であって、(a)マウスを組換えQ S O X 1 ポリペプチドにより免疫化する工程；(b)ハイブリドーマを工程(a)のマウスの脾臓細胞から作製する工程であって、前記脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合することを含む工程；および(c)陽性のハイブリドーマを選択し、それにより、前記Q S O X 1 と特異的に結合する前記抗原認識ドメインを含む前記抗体を製造する工程を含む方法が提供される。

【0024】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記細胞は腫瘍細胞である。

【0025】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記組織は腫瘍組織である。

【0026】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記組織は線維芽細胞を含む。

【0027】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はインビボで行われる。

【0028】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は腫瘍である。

【0029】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記腫瘍は転移性固形腫瘍である。

【0030】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記腫瘍は腺ガンである。

【0031】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記腫瘍は、前立腺ガン、肺ガン、乳ガン、子宮頸ガン、尿管ガン、膀胱ガン、結腸ガン、食道ガン、膵臓ガン、咽頭ガン、胃ガンおよび骨髄性白血病からなる群から選択される。

【0032】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は線維症に関連する。

【0033】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ラミニンはアルファ4鎖を含む。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ラミニンはラミニン-411またはラミニン-421である。

【0035】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記作用因はポリペプチド作用因である。

【0036】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ポリペプチド作用因は、抗体、抗体フラグメントまたはペプチドからなる群から選択される。

【0037】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ポリペプチド作用因は上記QSOX1のアミノ酸座標34~266に対して向けられる。

【0038】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体はMAb492.1であり、配列番号29~34である相補性決定領域(CDR)を含む。

【0039】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体フラグメントはscFV492.1であり、配列番号29~34である相補性決定領域(CDR)を含む。

【0040】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記作用因はポリヌクレオチド作用因である。

【0041】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ポリヌクレオチド作用因は、アンチセンス、siRNA、マイクロRNA、リボザイムおよびDNAザイムからなる群から選択される。

【0042】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記活性が、細胞外マトリックスの免疫蛍光(IF)染色アッセイ、または、可溶性ラミニンについて検出するウエスタンブロットアッセイのうち少なくとも1つによってアッセイされる。

【0043】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体は抗体フラグメントである。

【0044】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体は、Fabフラグメント、Fvフラグメント、単鎖抗体および単ドメイン抗体からなる群から選択される。

【0045】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体はモノクローナル抗体である。

【0046】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記モノクローナル抗体はMAb492.1であり、配列番号29~34である相補性決定領域(CDR)を含む。

【0047】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体は一本鎖抗体である。

【0048】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記一本鎖抗体はscFV492.1であり、配列番号29~34である相補性決定領域(CDR)を含む。

【0049】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体または抗体フラグメントはヒト化される。

【0050】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体はキメラ抗体である。

【0051】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体は固体支持体に固定化される。

【0052】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記抗体は検出可能成分に結合される。

【0053】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記単離された抗体は、配列番号7および配列番号8に示されるアミノ酸配列を含む。

【0054】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記単離された抗体は、配列番号27および配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

【0055】

本発明のいくつかの実施形態によれば、機能的基底膜における上記減少は、上記基底膜でのラミニン集合における低下を含む。

【0056】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ラミニン集合における上記低下は、上記組織での可溶性ラミニンにおける増大を含む。

【0057】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記組織は組織培養物を含む。

【0058】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はインビボで行われる。

【0059】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記方法はさらに、QSOX1の活性レベルまたは発現レベルにおける低下を含む。

【0060】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記QSOX1はヒトQSOX1である。

【0061】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記QSOX1はマウスQSOX1である。

【0062】

本発明のいくつかの実施形態によれば、上記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は腫瘍である。

【0063】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的用語および/または科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および材料と類似または同等である方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができるが、例示的な方法および/または材料が下記に記載される。矛盾する場合には、定義を含めて、本特許明細書が優先する。加えて、材料、方法および実施例は例示にすぎず、限定であることは意図されない。

【図面の簡単な説明】

【0064】

本明細書では本発明のいくつかの実施形態を単に例示し添付の図面を参照して説明する。特に詳細に図面を参照して、示されている詳細が例示として本発明の実施形態を例示考察することだけを目的としていることを強調するものである。この点について、図面について行う説明によって、本発明の実施形態を実施する方法は当業者には明らかになるであろう。

【0065】

【図1A - 1B】図1A ~ 図1Bは、HsQSOX1のドメイン構成および反応サイクルを示す概略的例示である。図1Aは、HsQSOX1の4つのドメインを例示する概略図である。アミノ末端フラグメント、すなわち、HsQSOX1_{Trx}が、2つのTrx折り畳みドメインから構成される。カルボキシ末端フラグメント、すなわち、HsQSOX

10

20

30

40

50

1 E r v が、2つのE r v 折り畳みドメインから構成される。その活性部位システインおよび補因子結合能を失っている変性E r v 様スルフヒドリルオキシダーゼモジュールが“E r v”として示される。黄色の玉はC X X Cモチーフ（レドックス活性ジスルフィド）を表す。3つの融合した六角形は、E r vドメインが結合するフラビンアデニンジヌクレオチド（F A D）補因子を示す。図1 Bは、H s Q S O X 1による基質酸化および酸素還元反応の反応サイクルにおける工程を例示する。ドメインが、Aの場合と同じ名称および色により表され、ただし、灰色の線はT r x 2ドメインとE r vドメインとの間のリンカーを表す。融合した黄色の玉はジスルフィド結合を表す。分離した黄色の玉は、還元されたシステインを示す。

【0066】

【図1 C - 1 M】図1 C ~ 図1 Mは、Q S O X 1が、サブコンフルエントな線維芽細胞においてゴルジに局在化し、コンフルエントな線維芽細胞によって分泌されることを示す。図1 C ~ 図1 Jは、ゴルジ特異的抗体（p 1 1 5）またはER特異的抗体（G R A S P 6 5）のどちらかにより免疫染色されるサブコンフルエントなW I - 3 8線維芽細胞（赤色）と、Q S O X 1（緑色）とを例示する写真である。D A P I染色（青色）は核を示す。スケールバーは10 μmである。図1 Kは、コンフルエントW I - 3 8細胞抽出物のウエスタンブロット（上段）と、R T - P C R（下段）とを例示する写真であり、これらは、Q S O X 2ではなく、Q S O X 1の発現をこれらの細胞において明らかにする。図1 Lは、W I - 3 8培養上清のウエスタンブロット（上段）および細胞のR T - P C R（下段）をコンフルエンスの関数として例示する写真である。図1 Mは、5 m MのD T Tを添加したときの酸素消費によって測定される細胞培養上清のスルフヒドリルオキシダーゼ活性を例示する棒グラフである。

10

20

【0067】

【図2 A - 2 F】図2 A ~ 図2 Fは、活性なQ S O X 1が、密な線維芽細胞単層を培養において形成するために要求されることを示す。図2 A ~ 図2 Dは、対照s i R N A（s i C O N T R O L）またはQ S O X 1特異的s i R N A（s i Q S O X 1）によるトランスフェクションの4日後におけるW I - 3 8培養単層のD A P I染色を例示する写真である。図2 C ~ 図2 Dは、50 n Mの組換えQ S O X 1（r Q S O X 1）または不活性型変異体（r Q S O X 1 - A A）がs i R N Aトランスフェクション後24時間で補充された、s i Q S O X 1により処理される培養物を示す。スケールバーは10 μmである。図2 Eは、図2 A ~ 図2 Dに示されるような領域からの細胞数の定量化を例示する棒グラフである。図2 Fは、Q S O X 1のドメイン構成の略図および構造の概略的例示であり、レドックス活性なジスルフィドが、“C X X C”と表示される対になった黄色の玉として示される。フラビンアデニンジヌクレオチド（F A D）補因子が、融合した六角形（上段）またはオレンジ色の棒（下段）によって示される。ギザギザの垂直線は、Q S O X 1の可溶性型または膜結合型のどちらかを生じさせる選択的スプリング事象を表す。“T M”は膜貫通領域を表す。組換えQ S O X 1はすべてのQ S O X 1ドメインおよびレドックス活性部位にわたる。r Q S O X 1 - A A変異体はアミノ末端のレドックス活性なシステインを欠く。

30

【図2 G - 2 H】図2 G ~ 図2 Hは、活性なQ S O X 1が、密な線維芽細胞単層を培養において形成するために要求されることを示す。図2 G ~ 図2 Hは、Q S O X 1ノックダウンが組織培養プレートからの細胞剥離を引き起こすことを例示する棒グラフである。図2 Gは、s i R N Aトランスフェクション後1日目、2日目および4日目について報告されるような、対照プレートおよびQ S O X 1ノックダウンプレートでの細胞数を示す。図2 Hは、培養上清におけるトリパンブルー染色によって示されるような、剥離して浮遊しており、しかし、生存していることが見出される細胞の数を示す。

40

【0068】

【図3 A - 3 R】図3 A ~ 図3 Rは、Q S O X 1が基底膜へのラミニン取り込みのために要求されることを示す写真である。図3 A ~ 図3 Lは、Q S O X 1ノックダウンW I - 3 8培養物（s i Q S O X 1、図3 D ~ 図3 F）と比較して、対照（s i C O N T R O L、

50

図 3 A ~ 図 3 C) においてより実質的なラミニンマトリックスを明らかにする、P 1 ポリクローナル抗体を使用するラミニン免疫染色を例示する。s i Q S O X 1 培養物に、r Q S O X 1 - A A 変異体 (図 3 J ~ 図 3 L) ではなく、組換え Q S O X 1 (r Q S O X 1 、 図 3 G ~ 図 3 I) が s i R N A トランスフェクション後 2 4 時間で補充される場合、厚いラミニンマトリックスの回復がもたらされる。スケールバーは 1 0 μ m である。図 3 M ~ 図 3 R は、ラミニン鎖特異的抗体による対照ノックダウン細胞単層および s i Q S O X 1 処理された細胞単層の免疫染色を例示する。L A M A 2 および L A M A 4 は、ラミニンの 2 鎖および 4 鎖を認識する抗体による染色をそれぞれ示す。スケールバーは 1 0 μ m である。

【 0 0 6 9 】

【 図 4 A - 4 C 】 図 4 A ~ 図 4 C は、Q S O X 1 が基底膜へのラミニン取り込みのために要求されることを示す。図 4 A は、図 3 A ~ 図 3 L に示される領域などの領域から得られるラミニン強度の定量化を示す棒グラフである。図 4 B は、W I - 3 8 細胞培養上清サンプルにおけるラミニンのウエスタンブロット (上段パネル) および Q S O X 1 のウエスタンブロット (下段パネル) を例示する写真である。レーン 1 ~ レーン 2 は、対照 s i R N A により処理される細胞から得られる上清に対応する。レーン 3 ~ レーン 5 は、Q S O X 1 特異的 s i R N A により処理された細胞から得られる上清に対応する。図 4 C は、図 3 M ~ 図 3 R に示される領域などの領域から得られるラミニン鎖強度の定量化を示す棒グラフである。

【 0 0 7 0 】

【 図 5 A - 5 F 】 図 5 A ~ 図 5 F は、Q S O X 1 が基底膜へのラミニン取り込みのために要求されることを示す写真である。W I - 3 8 表面の S E M 像により、より低倍率で撮影された像で矢印によって示されている、明確なクラスター化物が明らかにされる。この物質は、4 鎖を含有するラミニンであると推定されるが、対照 s i R N A により処理された細胞にだけ現れ、s i Q S O X 1 により処理された細胞には現れなかった。

【 0 0 7 1 】

【 図 5 G 】 図 5 G は、図 6 A ~ 図 6 R のために使用される遊走アッセイの概略図である。線維芽細胞を、蛍光標識された腫瘍細胞が加えられる前に上部チャンバーにおいてコンフルエンスにまで成長させた。線維芽細胞 / E C M 層に突き抜け、多孔性膜を通過して遊走し、上部チャンバーの底部表面に到達した腫瘍細胞が計数された。

【 0 0 7 2 】

【 図 6 A - 6 Q 】 図 6 A ~ 図 6 Q は、線維芽細胞によって産生される Q S O X 1 が腫瘍上皮細胞の接着および遊走を促進させることを示す。図 6 A ~ 図 6 O は、示された処理に供される W I - 3 8 線維芽細胞の事前に形成された間質層を通過して遊走した蛍光標識されている H 4 6 0 ヒト肺ガン細胞を示す写真である。組換え酵素 (r Q S O X 1 、 図 6 G ~ 図 6 I 、 および、r Q S O X 1 - A A 、 図 6 J ~ 図 6 L) を、(図 2 A ~ 図 2 H 、 図 3 A ~ 図 3 R 、 図 4 A ~ 図 4 C および 図 5 A ~ 図 5 F の場合のように) 線維芽細胞の s i R N A トランスフェクションの 2 4 時間後に加えた。“抗 6 ” と表示される図 6 M ~ 図 6 O については、H 4 6 0 細胞が、対照トランスフェクションされた線維芽細胞への重層に先立ってインテリゲン活性を阻止する、6 インテグリンサブユニットに対する抗体により処理された。3 つの代表的な領域がそれぞれの処理について示される。図 6 P は、図 6 A ~ 図 6 O に示されるパネルなどのパネルから得られる遊走細胞数の定量化を示す棒グラフである。図 6 Q は、サンプルのそれぞれにおいて、力に供された後で接着したままである細胞の数を示す棒グラフである。

【 0 0 7 3 】

【 図 6 R - 6 S 】 図 6 R ~ 図 6 S は、膵臓線維芽細胞の事前に形成された間質層を通過して遊走した蛍光標識されている B x P C - 3 膵臓ガン細胞 (図 6 R) 、 および、力に供された後も肺線維芽細胞層に接着したままである H 4 6 0 肺ガン細胞 (図 6 S) の、対照 (s i C O N T R O L) 値のパーセントとして示される定量化を示す。

【 0 0 7 4 】

10

20

30

40

50

【図6T】図6Tは、対照線維芽細胞培養物が、QSOX1の非存在下でもたらされる対照線維芽細胞培養物よりも堅いことを示す原子間力顕微鏡法を示す。線維芽細胞培養物および関連ECMの機械的性質がQSOX1欠乏の結果として変化した。原子間力顕微鏡法を使用して、コンフルエントな対照WI-38線維芽細胞またはQSOX1欠乏WI-38線維芽細胞の堅さを測定した。ECMにおける変化に対する感度を最適化するために選ばれるチップサイズおよび圧入深さにより測定される場合、対照線維芽細胞培養物についての弾性率の分布はピークが4kPa~6kPaの間にあり、しかし、30kPaにまで達する値の幅広い範囲が認められた。弾性率のこの範囲は、培養された線維芽細胞の以前のAFM研究と一致している。QSOX1ノックダウン培養物についての分布はピークをより低い堅さ値(2kPa~4kPa)において示し、少数の散らばった測定結果が8kPa~50kPaの間にあった。対照細胞培養物についてではなく、QSOX1ノックダウン細胞培養物について得られる100kPaを超える弾性率をもたらす実質的な一組の圧入曲線はおそらくは、下に位置するペトリ皿支持体との直接の接触を表している。

10

【0075】

【図7A-7D】図7A~図7Dは、QSOX1が、腫瘍に関連する線維芽細胞においてアップレギュレーションされることを示す。図7Aは、H460肺ガン細胞から得られる馴化培地(C.M.)の非存在下または存在下で2日間培養されたWI-38細胞の上清におけるQSOX1のウエスタンブロットである。図7Bは、エクスピボ培養されたガン関連線維芽細胞(CAF)の細胞が、腫瘍成長部からより遠位の組織から採取される線維芽細胞と比較して、より大きいレベルのQSOX1を示すことを示す棒グラフである(NF=正常な線維芽細胞)。H460腫瘍細胞培養物から得られる馴化培地にさらされるとき、NFは、CAFによって産生されるような同程度のレベルのQSOX1を転写し、分泌するように誘導される。図7C~図7Dは、抗QSOX1により染色される乳管ガンの組織学的切片を例示する。矢印は、高レベルのQSOX1を発現する代表的な腫瘍関連線維芽細胞を示す。矢じりは、QSOX1について陰性である線維芽細胞の細胞を示す。

20

【0076】

【図8A-8K】図8A~図8Kは、QSOX1の阻害により、腫瘍上皮細胞遊走が阻止されることを示す。図8A~図8Fは、対照の非処理WI-38線維芽細胞、あるいは、培養培地においてQSOX1特異的モノクローナル抗体(抗QSOX1、図8C~図8D)または対照抗体(抗CD19、図8E~図8F)のいずれかの存在下で成長させたWI-38線維芽細胞の事前に形成された間質層を通して遊走した蛍光標識されているH460ヒト肺ガン細胞を例示する写真である。2つの代表的な領域がそれぞれの場合において示される。図8Gは、図8A~図8Fに示されるパネルなどのパネルから得られる遊走細胞数の定量化を例示する棒グラフである。図8H~図8Kは、QSOX1特異的モノクローナル抗体の非存在下または存在下で成長させたWI-38細胞から得られるBMにおけるラミニンのIF染色を例示する写真である。2つの代表的な領域が示される。

30

【0077】

【図9A-9J】図9A~図9Jは、コンフルエントな線維芽細胞から得られるQSOX1の特徴づけを示す。図9A~図9Fは、ゴルジ特異的抗体(p115)またはER特異的抗体(GRASP65)およびQSOX1抗体により免疫染色されるHUVEC細胞を示す写真である。DAPI染色(青色)は核を示す。サイズバーは10μmを表す。図9G~図9Jは、ゴルジマーカ-p115(赤色)およびQSOX1(緑色)により免疫染色されるコンフルエントなWI-38線維芽細胞を示す写真である。DAPI染色(青色)は核を示す。サイズバーは10μmを表す。

40

【図9K-9L】図9K~図9Lは、コンフルエントな線維芽細胞から得られるQSOX1の特徴づけを示す。図9Kは、示された濃度のrQSOX1を使用して作製されたような、モデル基質のジチオスレート(DTT)に対するQSOX1活性のための校正曲線を例示するグラフである。ゼロ点は、DTTを含有するが、酵素を全く含有しない溶液におけるバックグラウンドの酸素消費に対応する。灰色の線が、6個のデータ点に対する最も良い適合である。ピンク色の丸は、コンフルエントなWI-38線維芽細胞培養物が

50

ら得られる3つの上清サンプルについて観測されるDTT添加時の酸素消費速度を示す。図9Lは、ウエスタンブロットによって検出される様々な線維芽細胞からのQSOX1分泌を例示する写真である(1=WI-38、2=正常な肺線維芽細胞、3=ヒト包皮線維芽細胞(HFF))。注目すべきことに、QSOX1が、臍臓上皮BxPC細胞株(epi)または内皮HUVEC細胞(endo)のコンフルエントな培養物からは分泌されなかった。

【0078】

【図10A-10B】図10A~図10Bは、コンフルエントな線維芽細胞から得られるQSOX1の特徴づけを示す。分泌されたQSOX1を免疫沈殿させたときの、SDS-PAGEによって観測される2つのバンドの質量分析フィンガープリンティング。残基600の右側にある4残基(PELI)が、短い方のQSOX1スプライス変化体に特有である。下流側の147個のさらなる残基が、長い方のスプライス変化体に特有である。バンドをトリプシンまたはキモトリプシンのどちらかによりゲル内で消化した。赤色レタリングは、アミノ酸が少なくとも1つのペプチドにおいてLC-MS/MSによって観測されたことを示す。潜在的なN結合型糖鎖付加部位が灰色の背景で示される。右側パネルにおける残基601~747の左側にある垂直の黒色棒は、長い方のQSOX1スプライス変化体においてのみ見出される配列を示す。トリプシンサンプルおよびキモトリプシンサンプルの両方でのこの領域における赤色のアミノ酸の存在は、QSOX1の上側バンドが長い方のスプライス変化体に由来するにちがいないことを示している。

10

【図10C-10D】図10C~図10Dは、コンフルエントな線維芽細胞から得られるQSOX1の特徴づけを示す。分泌されたQSOX1を免疫沈殿させたときの、SDS-PAGEによって観測される2つのバンドの質量分析フィンガープリンティング。残基600の右側にある4残基(PELI)が、短い方のQSOX1スプライス変化体に特有である。下流側の147個のさらなる残基が、長い方のスプライス変化体に特有である。バンドをトリプシンまたはキモトリプシンのどちらかによりゲル内で消化した。赤色レタリングは、アミノ酸が少なくとも1つのペプチドにおいてLC-MS/MSによって観測されたことを示す。潜在的なN結合型糖鎖付加部位が灰色の背景で示される。右側パネルにおける残基601~747の左側にある垂直の黒色棒は、長い方のQSOX1スプライス変化体においてのみ見出される配列を示す。トリプシンサンプルおよびキモトリプシンサンプルの両方でのこの領域における赤色のアミノ酸の存在は、QSOX1の上側バンドが長い方のスプライス変化体に由来するにちがいないことを示している。

20

30

【0079】

【図11A-11E】図11A~図11EはQSOX1のノックダウンを示す。図11Aは、総RNAからのQSOX1転写物のPCR増強によって、また、ウエスタブロットによって示されるように、siRNAを使用するWI-38線維芽細胞におけるQSOX1のノックダウンの高い有効性を示す写真である。使用された負荷対照がブロットメンブレンのクーマシー染色であった。図11Bは、QSOX1ノックダウンがsiRNAトランスフェクション後の少なくとも4日間にわたって維持され、また、DTT添加時の酸素消費によってモニターされるように、バックグラウンドレベルのスルフヒドリルオキシダーゼ活性を細胞培養上清においてもたらしたことを例示する。これに対応して、QSOX1タンパク質はノックダウン後の培養上清において事実上検出不能であった。図11C~図11Eは、QSOX1ノックダウンが、老化関連 - ガラクトシダーゼ活性についてのX-gal染色によって明らかにされるように、細胞の老化を促進させないことを例示する写真である。対照の老化細胞が、大きい(32を超える)継代数からのWI-38細胞の3週齢培養物から得られた。

40

【0080】

【図12A-12Q】図12A~図12Qは、ECMに対するQSOX1ノックダウンの影響を示す。図12Aは、QSOX1ノックダウンがBMにおける増大した反応性チオール含有量をもたらすことを示す棒グラフである。WI-38線維芽細胞を、示されたsiRNAトランスフェクションに供し(DTTサンプルおよびNEMサンプルを対照トラン

50

スフェクション細胞から調製した)、さらに4日間成長させた。細胞を水酸化アンモニウムにより除き、ThioGloを加えて、遊離チオールを定量した。DTTサンプルおよびNEMサンプルを、100mMのDTTまたは100mMのNEMを対照プレートに加え、DTT/NEMを洗い流し、その後、ThioGloにより処理することによって作製した。図12B~図12Qは、BMに取り込まれる量におけるほんの小さな変化を伴うが、QSOX1ノックダウン細胞の細胞培養上清における増大した量のラミニン関連タンパク質を明らかにするウエスタンブロットおよび免疫蛍光である。

【0081】

【図13A-13F】図13A~図13Fは、ECMに対するQSOX1ノックダウンの影響を示す。図13A~図13Eは、既にトランスフェクション後の2日目において強度における著しい違いを示す、等しい数の細胞を含有する領域のラミニン染色を例示する。図13Fは、BMの総タンパク質含有量が、BMサンプルのクーマシー染色によって示されるように、siRNAおよび組換えQSOX1による様々な処理について感知できるほどには異なっていなかったことを示す写真である。

10

【図13G-13N】図13G~図13Nは、ECMに対するQSOX1ノックダウンの影響を示す。図13G~図13Lは、異なる安定性を有する2つの独立したラミニン網目構造がWI-38のBMにおいて共存することを示す写真である。標準的なIF染色手法は、ラミニンを含有する大きい斑点の出現を引き起こし、この場合、これらの斑点はsiQSOX1処理のサンプルでは消失し、しかし、rQSOX1の添加によって回復した。図13M~図13Nは、トランスフェクション後1日目に加えられる50nMのrQSOX1が、正常な細胞数およびラミニン組成をQSOX1ノックダウン細胞に戻すために十分であったことを示す棒グラフである。

20

【0082】

【図14】図14は、膵臓の線維芽細胞によって産生されるQSOX1が腫瘍上皮細胞遊走を促進させることを示す棒グラフである。示された処理に供される膵臓線維芽細胞の事前に形成された間質層を通り抜ける蛍光標識されているBxPC-3ヒト膵臓ガン細胞の遊走の定量化。

【0083】

【図15A-15B】図15A~図15Bは、MAb492.1についての阻害定数の決定を示す線グラフである。図15Aは、rdRnaseの酸化を伴う比色アッセイからの結果に基づく、50nMのHsQSOX1に対するMAb492.1の用量応答曲線を例示する。阻害活性が405nmにおける吸光度として表され、これは、DTNBと反応し、HsQSOX1によって酸化されなかった遊離チオールの量を表す。IC₅₀が非線形回帰分析によって決定され、IC₅₀は60nMの値をもたらした。図15Bは、(250nMから1nMにまで及ぶ)種々のMAb492.1濃度における酸素電極アッセイからの結果に基づく、25nMのHsQSOX1に対するMAb492.1の阻害曲線を例示する。阻害活性が、非阻害速度に対する阻害速度の比率として表される。阻害定数が非線形回帰分析によって決定され、阻害定数は1.0±0.3nMのKi値をもたらした。

30

【図15C】図15Cは、MAb492.1についての阻害定数の決定を示す線グラフである。図15Cは、10nMのHsQSOX1が、示された濃度のDTTの存在下で10分間、250nMのMAb492.1を伴って、または伴うことなくインキュベーションされ、トリクロロ酢酸(TCA)の添加によって反応停止されたことを例示する写真である。200μMにおけるDTTは、HsQSOX1の酸素消費アッセイにおける初速度を得るための還元性基質の十分に高い濃度をもたらす(DTTについてのHsQSOX1のK_Mがおよそ70μMである)、しかし、抗体の還元および解体を引き起こしていない。したがって、200μMにおけるDTTを、図15Bに記載される実験(下記参照)において使用した。

40

【図15D】図15Dは、MAb492.1についての阻害定数の決定を示す線グラフである。図15Dは、酸素消費アッセイに基づく、MAb492.1による阻害の基質依存性を示す棒グラフである。100nMのHsQSOX1の初期速度を50nMのMAb4

50

92.1の非存在下および存在下において2つのDTT濃度、すなわち、35 μ M (0.5 KM) および200 μ M (3 KM) について測定した。MAb 492.1の非存在下での初期速度 (v_0) に対するMAb 492.1の存在下での初期速度 (v_i) の間における3回の測定の平均比率がそれぞれの濃度について示される。これらの異なる濃度における類似する比率は、この阻害が基質依存的でないことを示している。

【0084】

【図16A - 16D】図16A ~ 図16Dは、MAb 492.1がHsQSOX1のアミノ末端フラグメントのHsQSOX1_{Trx}と結合することを示す線グラフである。図16Aは、ELISA結合アッセイに基づく、完全長HsQSOX1およびその2つのフラグメントに対するMAb 492.1の結合曲線を例示する。低い標的タンパク質濃度において達成される630 nmでの大きい吸光度は、堅固な結合を示している。図16B ~ 図16Dは、分析的サイズ排除クロマトグラフィーから得られる、完全長HsQSOX1およびその2つのフラグメントの遊走プロフィールを例示する。灰色の線はMAb 492.1の単独での遊走プロフィールを表す。点線はHsQSOX1またはそのフラグメントの1つの単独での遊走プロフィールを表す。黒色の線は、MAb 492.1とHsQSOX1またはそのフラグメントとの混合物の遊走プロフィールを表す。

10

【0085】

【図17】図17は、rdRNaaseの酸化を伴う比色アッセイからの結果に基づく、50 nMのHsQSOX1に対するscFv 492.1の用量応答曲線を描く線グラフである。阻害活性が405 nmにおける吸光度として表され、これは、DTNBと反応した遊離チオールを表す。IC₅₀が非線形回帰分析によって決定され、IC₅₀は250 nMの値をもたらし、これは、MAb 492.1について得られるIC₅₀値よりも5倍大きかった。

20

【0086】

【図18】図18は、rdRNaaseの酸化を伴う比色アッセイからの結果に基づく、50 nMのHsQSOX1に対するMAb 492.1から導かれるFabの用量応答曲線を描く線グラフである。阻害活性が405 nmにおける吸光度として表され、これは、DTNBと反応した遊離チオールを表す。IC₅₀が非線形回帰分析によって決定され、IC₅₀は100 nMの値をもたらし、これは、全長のMAb 492.1について得られるIC₅₀値よりも2倍大きかった。

30

【0087】

【図19A】図19Aは、下記を示す概略的例示である：図19Aは、HsQSOX1_{Trx} (Trx1 (桃色)、Trx2 (灰色)、黄色の球でのCXXCモチーフ)とFab 492.1 (重鎖 (青色)、軽鎖 (緑色))との間における複合体の構造を例示する。結合部位の拡大図が表面提示により示される。

【図19B - 19C】図19B ~ 図19Cは、下記を示す概略的例示である：図19Bは、異なる角度での眺めから得られる、Fab 492.1 - HsQSOX1_{Trx} 複合体およびCDRの表面提示を例示する。Aでのような、Trx1、重鎖および軽鎖の着色。CDRの表示がCDRそのものの色でなされる。左側において、Trx1は、CDRのL1、L3およびH2との接触を有することが示される。y軸の周りでの180°の回転により、CDRのL2、H1およびH3と接触しているTrx1が示される (中央)。右側において、6つすべてのCDRの表面の上面図。図19Cは、Fab 492.1 (左) およびTrx1 (右) のオープンブック描写を例示する。Trx1が、Fab 492.1に対して垂直軸の周りに180°回転させられる。Aでのような、Trx1、CXXCモチーフ、重鎖および軽鎖の着色。Trx1との相互作用に関与する軽鎖からの残基が白色である。Trx1との相互作用に関与するCDRのH3からの残基が暗赤紫色である。Trx1との相互作用に関与するCDRのH2およびH1からの残基が紫色である。Trx1からの対応する相互作用残基が、Fab 492.1からの残基と同じ色である。

40

【0088】

【図20A - 20B】図20A ~ 図20Bは、Fab 492.1 - HsQSOX1_{Trx}

50

の境界残基で、Trx1からの境界残基、軽鎖からの境界残基(図20A)および重鎖からの境界残基(図20B)を示す概略的例示である。Trx1が白色の表面に示され、特異的な相互作用残基が、黒色の書体により表示されて棒で示される。軽鎖(緑色)および重鎖(青色)が実物大に示され、特異的な相互作用残基が棒で示される。CDRには表示がなされる。水素結合が黒色の点線により示され、それらの距離が示されている。カチオン- および塩架橋も同様に示される。

【0089】

【図21A-21O】図21A~図21Oは、対照の非処理WI-38線維芽細胞、あるいは、培養培地においてMAb492.1または対照抗体(抗-アクチン)の存在下で成長させたWI-38線維芽細胞の事前に形成された間質層を通して遊走した蛍光標識されているH460ヒト肺ガン細胞を例示する写真である。3つの代表的な領域がそれぞれの場合において示される。

10

【0090】

【図22】図22は、MAb492.1による腫瘍細胞遊走の阻害を示す棒グラフである。WI-38線維芽細胞を多孔質膜の上で4日間成長させ、WI-38線維芽細胞に、ECMを種々の濃度のMAb492.1の存在下または非存在下で産生させた。続いて、蛍光標識されたH460肺ガン細胞を線維芽細胞の上に重層した。24時間後の各サンプルにおいて線維芽細胞層を突き抜けた標識されているH460細胞の数が示される。注目すべきことに、この図は、図21O~図20Aに示されるパネルの定量化である。

20

【0091】

【図23】図23は、MDA-MB-231乳ガン細胞から放射される生物発光の画像である。この図は、腫瘍細胞および線維芽細胞を乳房脂肪パッドに同時接種した1週間後における局在化した腫瘍を示す3匹のマウスを示す。

【0092】

【図24】図24は、MAb492.1の非存在下および存在下における様々な哺乳動物QSOX1酵素の活性を示す棒グラフである。活性速度を、酸素消費アッセイを使用して評価した。それぞれのQSOX1酵素についての測定を種々のMAb492.1濃度の存在下で行い、初期傾斜(速度)を計算した。酸素消費速度が、MAb492.1の非存在下(灰色)、250nMのMAb492.1の存在下(黒色)および1μMのMAb492.1の存在下(白色)においてそれぞれのQSOX1酵素について示される。留意すべきことに、HsQSOX1が、試験されたMAb492.1濃度においてMAb492.1によって阻害された唯一の酵素である。

30

【0093】

【図25】図25は、活性部位のCGHCモチーフと、MAb492.1の軽鎖およびCDRのH3と接触する残基とを含めて、MAb492.1と結合するTrx1ドメインの部分を示す、他の哺乳動物QSOX1酵素に対するHsQSOX1の配列アラインメントである。MAb492.1との相互作用に關与する残基が太字である。対応するHsQSOX1(配列番号3)残基と異なるMmQSOX1(配列番号43)由来の残基、RnQSOX1(配列番号42)由来の残基およびCpQSOX1(配列番号41)由来の残基が赤く着色される。

40

【0094】

【図26】図26は、HsQSOX1_{Trx}-Fab492.1複合体の構造とMmQSOX1_{Trx}の構造との間における重ね合わせである。HsQSOX1_{Trx}が青色であり、同じ非対称ユニットに由来するMmQSOX1_{Trx}の2つの鎖が緑色およびマゼンタ色である。レドックス活性部位のシステインが2つの黄色の玉として表示される。右側は、CDRのL3に由来するTyr92と、MmQSOX1に由来するAsn117との間における予想された衝突の拡大図である。左側は、CDRのH3に由来するTyr100と、MmQSOX1に由来する残基138~141のループとの間における予想された衝突の拡大図である。HsQSOX1およびMmQSOX1の残基の番号付けは比較し易いように、MmQSOX1に従っている。

50

【0095】

【図27】図27は、M A b 4 9 2 . 1 の存在下における種々の M m Q S O X 1 変異体についての百分率活性を示す棒グラフである。測定が3回行われ、平均化された。野生型 M m Q S O X 1 酵素は、M A b 4 9 2 . 1 による阻害に対して抵抗性であり、これに対して、T L P G 変異体および A 1 1 9 P 変異体は、M A b 4 9 2 . 1 に対するいくらかの感受性を示した。両方の変異を有する M m Q S O X 1 は、H s Q S O X 1 と同じ程度に阻害される。

【発明を実施するための形態】

【0096】

本発明はそのいくつかの実施形態において、Q S O X 1 阻害剤に関連し、より具体的には、しかし、限定的ではなく、ラミニン関連疾患を処置するための Q S O X 1 阻害剤の使用に関連する。

10

【0097】

本発明の原理および操作は、図面および付随する説明を参照してより良く理解されることができる。

【0098】

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その適用において、下記の説明に示される細部、または、実施例によって例示される細部に必ずしも限定されないことを理解しなければならない。本発明は他の実施形態が可能であり、あるいは、様々な方法で実施、または、実行される。また、本明細書中において用いられる表現法および用語法は説明のためであって、限定として見なされるべきでないことを理解しなければならない。

20

【0099】

キエシンスルフヒドリルオキシダーゼ1 (Q S O X 1) は、基質タンパク質におけるチオール基の対から分子状酸素への電子の移動を媒介するために結合型フラビンアデニンジヌクレオチド (F A D) 補因子を使用する酵素であり、過酸化水素が副生成物として生成される。Q S O X 1 は分泌経路において E R の下流側のオルガネラに主に局在化しており、細胞からの調節された分泌を受ける。

【0100】

基底膜 (B M) は、体腔または血管と、下側に位置する間質線維芽細胞との境界における細胞外マトリックス (E C M) の層である。B M は、ラミニン、コラーゲン I V 、ヘパリン硫酸プロテオグリカン、エンタクチンおよび多くの他の寄与する巨大分子から構成される。B M は、細胞接着およびシグナル伝達のための複雑な媒体であり、その組成および性質は、関連する上皮細胞の挙動に大きな影響を与える。

30

【0101】

本発明を実施に移している間に、本発明者らは、基底膜 (B M) でのラミニンの集合における Q S O X 1 の基本的な役割、および、腫瘍細胞侵入との境界におけるその重要性を発見している。具体的には、本発明者らは、Q S O X 1 が、細胞および特にガン細胞が基底膜を遊走することを結果的には可能にする適正なラミニン機能性 (例えば、集合ならびに細胞接着および細胞遊走の支援) のために要求されることを例証している。Q S O X 1 がラミニン集合のプロセスの主要な調節因子として見出されたことは、Q S O X 1 を、転移プロセスおよび細胞遊走における非常に重要な標的として示唆している。

40

【0102】

さらに本発明を実施に移している間に、本発明者らは、Q S O X 1 に対する阻害抗体を初めて製造することができ、また、ラミニン集合および腫瘍細胞遊走におけるその役割を実証した。したがって、これらの抗体は、基底膜を調節するために使用されるかもしれず、また、腫瘍細胞遊走を阻害するための治療剤として使用されるかもしれない。

【0103】

本明細書中下記および下記の実施例の節において示されるように、本発明者らは、Q S O X 1 が B M の組立てに直接に関与することを発見している (下記の実施例の節の実施例

50

1を参照のこと)。QSOX1によって最も著しく影響されるBM成分がラミニンであり(図12B~図12Qを参照のこと)、QSOX1の存在に対して最も影響を受けやすいラミニンイソ型が、4鎖を含有するイソ型である(本明細書中下記の表2を参照のこと)。本発明者らは、QSOX1の欠乏が、コンフルエントな線維芽細胞培養物の上清における可溶性ラミニンイソ型の出現を引き起こすことを認めた(図12B~図12Q、図3A~図3Lおよび図4Aを参照のこと)。本発明者らはさらに、QSOX1の非存在下で産生されるBMは、攻撃的な腫瘍上皮細胞の接着および遊走を支援することができないことを認めた(図8A~図8Kを参照のこと)。

【0104】

そのうえ、本発明者らは、ヒトQSOX1(HsQSOX1)と結合し、これを阻害するモノクローナル抗体を作製し、また、この抗体の組換え単鎖可変ドメイン型を構築し、QSOX1における抗体結合部位を特徴づけた(下記の実施例の節の実施例2を参照のこと)。本発明者らは、mAb492.1による処置が30mg/kgの用量において、処置を何ら受けていないマウスと比較して、乳ガン細胞のリンパ節内への浸潤を著しく減少させることをインビボマウスモデルにおいて例証している(本明細書中下記の表6および表7を参照のこと)。

10

【0105】

本発明者らはさらに、HsQSOX1が他の哺乳動物QSOX1オルソログと同等であることを示している。HsQSOX1のTrx1ドメイン配列と他のQSOX1酵素の対応する領域とのアライメントにより、CGHCのレドックス活性モチーフの近傍における配列が同一であることが示された(図25を参照のこと)。しかしながら、抗体の軽鎖およびCDRのH3配列が結合するHsQSOX1の領域(HsQSOX1₁₀₆₋₁₅₂)には、他のQSOX1酵素と比較して、少しの違いがあることが明らかにされた(図25を参照のこと)。特に、Pro116(これは、mAb492.1の疎水性のCDRL3の側鎖の間における溝に十分にはまる)が、他の哺乳動物QSOX1酵素ではアラニンにより置換される。配列の違いを示すもう1つの領域が、HsQSOX1に由来するV₁₃₅-V₁₃₈であり、これはMmQSOX1におけるThr₁₃₈-Gly₁₄₁に対応する。これらの発見により、マウスQSOX1と結合することができる抗体を作製するための枠組みが提供される。

20

【0106】

まとめると、本発明の教示は、ラミニン関連の疾患または状態(例えば、転移性腫瘍など)を処置することにおけるQSOX1阻害分子に対する治療的価値を述べている。

30

【0107】

したがって、本発明の1つの局面によれば、基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げる方法であって、組織を、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記基底膜におけるラミニン集合を阻害するか、または妨げることを含む方法が提供される。

【0108】

本発明の別の局面によれば、ラミニン含有基底膜を介する細胞遊走を阻害する方法であって、組織を、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因と接触させ、それにより、前記ラミニン含有基底膜を介する前記細胞遊走を阻害することを含む方法が提供される。

40

【0109】

本明細書中で使用される場合、用語「ラミニン」はヒトのラミニンタンパク質を示す。典型的には、ラミニンは、鎖、鎖および鎖(これらは、5つ、4つおよび3つの遺伝的変体でそれぞれ見出される)を含有する三量体タンパク質である。したがって、ラミニンの用語は、本明細書中で使用される場合、異なる鎖組合せのいずれかを含めて、ヒトラミニンのどのようなタイプをも包含する。これらの異なる鎖および三量体分子は、多種多様な機能をインビボで明らかに反映するそれらの組織分布に関して異なる。本発明の例示的なラミニンには、LAMA1、LAMA2、LAMA3、LAMA4、LAMA5、LAMB1、LAMB2、LAMB3、LAMB4、LAMC1、LAMC2およびL

50

A M C 3 が含まれるが、これらに限定されない。

【0110】

本発明の実施形態によれば、上記ラミニンはアルファ4鎖を含む。

【0111】

本発明の特定の実施形態によれば、上記ラミニンはラミニン-411またはラミニン-421である。

【0112】

本明細書中で使用される場合、用語「ラミニン集合」は、基底膜緻密層（すなわち、基底膜の層の1つ）へのラミニンタンパク質の取り込みを示す。典型的には、ラミニンが様々な細胞（例えば、線維芽細胞、上皮細胞、腫瘍細胞）から分泌され、これらの細胞が、独立した網状組織を形成し、また、エンタクチン、フィブロネクチンおよびパールカンを介してIV型コラーゲンの網状組織と会合する細胞会合細胞外マトリックスに取り込まれる。

10

【0113】

本明細書中で使用される場合、用語「基底膜」または用語「ラミニン含有基底膜」は、上皮および内皮の足場となり、それらを支え、かつ、基底膜緻密層を含む（すなわち、ラミニンを含む）薄い繊維層を示す。

【0114】

本明細書中で使用される場合、表現「ラミニン集合を阻害するか、または妨げる」は、基底膜におけるラミニン集合を低下させること、取り消すこと、弱めること、最小限に抑えること、抑制すること、または停止させることを示す。1つの実施形態によれば、ラミニン集合を阻害するか、または妨げることは、（本明細書中下記でさらに記載されるような）QSOX1阻害剤の非存在下におけるラミニン集合と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、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%、少なくとも約90%、または、少なくとも約100%である。したがって、本発明の1つの実施形態によれば、ラミニンが基底膜に全く取り込まれない。

20

【0115】

下記の実施例の節の実施例1において示されるように、基底膜に取り込まれないラミニンを（例えば、インビトロ培養された細胞の培養培地において）可溶性形態で見出すことができる。したがって、ラミニン集合における低下をモニターすることを、例えば、細胞外マトリックスの免疫蛍光（IF）染色によって、または、可溶性ラミニン（すなわち、基底膜に取り込まれなかったラミニン）のウエスタンブロッティングによってモニターすることができる。

30

【0116】

ラミニン集合を阻害するか、または妨げることはまた、過剰な結合組織が修復性プロセスまたは反応性プロセスで器官または組織において非構造化様式で産生される状況において、例えば、線維症などにおいて好都合であるかもしれないことが理解されるであろう。したがって、さらに本発明を実施に移している間において、QSOX1の阻害およびそれに続いて可溶性ラミニンの生成が線維症プロセスについては治療的であるかもしれない。

40

【0117】

ラミニンが、細胞の接着、シグナル伝達、遊走、表現型、分化および生存に影響を及ぼす、基底膜緻密層および基底膜の重要な生物学的に活性な部分であることが理解されるであろう。

【0118】

本明細書中で使用される場合、用語「細胞遊走」は、細胞が、ある場所から別の場所に移動する細胞プロセスを示す。本発明の例示的な細胞遊走は、転移を引き起こす腫瘍細胞遊走を含む。

【0119】

したがって、本発明の教示による細胞は、例えば、脳細胞、ニューロン、心臓細胞、筋

50

細胞、皮膚細胞、骨細胞、膵臓細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、腸細胞、脾臓細胞、呼吸器細胞、肺細胞、リンパ球または単球を含む場合がある。本発明の細胞は、健康な細胞を含む場合があり、または、別法として、変異した細胞（例えば、腫瘍細胞）を含む場合がある。

【0120】

本明細書中で使用される場合、表現「細胞遊走を阻害する」は、ラミニン含有基底膜を介する細胞（例えば、腫瘍細胞）の遊走を低下させること、取り消すこと、弱めること、最小限に抑えること、抑制すること、または停止させることを示す。1つの実施形態によれば、細胞遊走を阻害するか、または妨げることは、（本明細書中下記でさらに記載されるような）QSOX1阻害剤の非存在下におけるラミニン含有基底膜を介する細胞遊走と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、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%、少なくとも約90%、または、少なくとも約100%である。したがって、本発明の1つの実施形態によれば、細胞遊走が基底膜により完全に阻害される。

10

【0121】

本明細書中上記で述べられるように、本発明の方法は、組織を、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因（これはまた、本明細書中では「QSOX1阻害剤」として示される）と接触させることによって行われる。

【0122】

本明細書中で使用される場合、用語「QSOX1」は、QSCN6とも呼ばれるキエンスルフヒドリルオキシダーゼ1（例えば、ヒト型）に関連する。NCBIデータベースにおけるヒトQSOX1の長い変化体についてのタンパク質アクセション番号がNP_002817（配列番号1）であり、ヒトQSOX1の短い形態についてのアクセション番号がNP_001004128（配列番号2）である。本発明のQSOX1タンパク質の阻害剤は、基底膜における誤って集合したラミニン（すなわち、機能不全ラミニン）の上昇を媒介する。

20

【0123】

用語「組織」は、1つまたは複数の機能を行うように設計された細胞からなる生物の一部を示す。例には、脳組織、網膜、皮膚組織、肝臓組織、膵臓組織、骨、軟骨、結合組織、血液組織、筋組織、心臓組織、脳組織、脈管組織、腎臓組織、肺組織、生殖腺組織および造血組織が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0124】

本発明の実施形態によれば、上記組織は腫瘍組織である。

【0125】

本発明の別の実施形態によれば、上記組織は線維芽細胞を含む。

【0126】

QSOX1のダウンレギュレーションを、転写および/または翻訳を妨げる様々な分子〔例えば、RNAサイレンシング作用因（例えば、アンチセンス、siRNA、shRNA、マイクロRNA）、リボザイムおよびDNAザイム〕を使用してゲノムレベルおよび/または転写物レベルで行うことができ、あるいは、細胞遊走を許す適正な基底膜組立てを媒介することにおけるQSOX1の活性が、本明細書中上記で記載されるように阻害される限り、例えば、アンタゴニスト、当該ポリヌクレオチドを切断する酵素などを使用してタンパク質レベルで行うことができる。具体的には、基底膜組立ての阻害を、本明細書中に記載されるような可溶性ラミニンのレベルおよび局在化を定量することによってアッセイすることができる。

40

【0127】

1つの実施形態によれば、QSOX1活性をダウンレギュレーションすることができる作用因はポリペプチド作用因である。

【0128】

QSOX1活性をダウンレギュレーションすることがある例示的なポリペプチド作用因

50

は、Q S O X 1 と特異的に結合し、かつ、その活性を妨げることによってQ S O X 1 活性をダウンレギュレーションすることができる抗体、抗体フラグメント、ペプチド、ドミナントネガティブ分子または天然の阻害剤を含む。好ましくは、抗体はQ S O X 1 の少なくとも1つのエピトープと特異的に結合する。本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」は、抗体のパラトープが結合する抗原表面のどのような抗原決定基をも示す。

【0129】

エピトープ決定基は通常、様々な分子（例えば、アミノ酸または炭水化物側鎖など）がまとまった化学的に活性な表面上の一団からなり、また、通常、特定の電荷特徴と同様に、特定の三次元構造特徴を有する。

【0130】

その効率的な阻害のために標的とされることがあるQ S O X 1 の例示的な領域がアミノ末端のT r x ドメインである（下記の実施例の節における実施例2を参照のこと）。具体的には、Q S O X 1 のT r x 1 ドメインにおけるレドックス活性なジスルフィドが効率的な阻害のために標的とされる場合がある。

【0131】

本発明の別の実施形態によれば、上記ポリペプチド作用因はQ S O X 1 （配列番号3および4）のアミノ酸座標34～266に対して向けられる場合がある。

【0132】

下記の実施例の節において詳しく記載されるように（本明細書中下記の実施例2を参照のこと）、本発明者らは、Q S O X 1 を特異的に標的とし、これを阻害するモノクローナル抗体（m A b ）および単鎖抗体（s c A b ）を作製している。さらに、本発明者らは、抗体を誘発するために使用される組換えQ S O X 1 ポリペプチド（配列番号6）をコードするヒトQ S O X 1₃₃₋₅₄₆の核酸配列（配列番号5）を含むプラスミドを作製した。

【0133】

したがって、Q S O X 1 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、長さが500アミノ酸未満である単離されたポリペプチドが提供される。

【0134】

別の実施形態によれば、本発明のポリペプチドは、50個～500個の間のアミノ酸、100個～500個の間のアミノ酸、200個～500個の間のアミノ酸、300個～500個の間のアミノ酸、400個～500個の間のアミノ酸、50個～100個の間のアミノ酸、100個～200個の間のアミノ酸、100個～300個の間のアミノ酸、100個～400個の間のアミノ酸、200個～300個の間のアミノ酸、または、200個～400個の間のアミノ酸を含む場合がある。好ましくは、ポリペプチドは、適正な基底膜組立てを媒介することにおけるQ S O X 1 機能を含む。適正な基底膜組立てという用語は、細胞遊走を支援するそのようなものとして定義される。

【0135】

本発明の特定の実施形態の1つの局面によれば、Q S O X 1 のアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドであって、長さが500アミノ酸未満である単離されたポリペプチドが提供される。

【0136】

本発明で使用される用語「抗体」は、無傷の分子、ならびにマクロファージに結合することができるF a b、F（a b'）₂ およびF vなどのその機能的なフラグメントを含む。これらの機能的な抗体フラグメントは次のように定義される：（1）F a b は、抗体分子の一価の抗原結合性フラグメントを含有するフラグメントであり、完全な抗体を酵素パピンで消化して、無傷の軽鎖と、一方の重鎖の一部とを生じさせることによって作製することができる；（2）F a b' は、完全な抗体をペプシンで処理し、その後、還元して、無傷の軽鎖と、重鎖の一部とを生じさせることによって得ることができる抗体分子のフラグメントである；2つのF a b' フラグメントが1つの抗体分子あたり得られる；（3）（F a b'）₂ は、その後の還元を行うことなく、完全な抗体を酵素ペプシンで処理す

10

20

30

40

50

ることによって得ることができる抗体のフラグメントである； $F(ab')_2$ は、2つのジスルフィド結合によって一緒にされた2つのFab'フラグメントのダイマーである；(4)Fvは、2つの鎖として発現された軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作されたフラグメントとして定義される；(5)単鎖抗体(「SCA」)は、遺伝子的に融合された単鎖分子として好適なポリペプチドリンカーによって連結されて、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子操作された分子である。

【0137】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、同様にまた、それらのフラグメントを製造する様々な方法がこの技術分野では広く知られている(例えば、HarlowおよびLane、Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク、1988)を参照のこと。これは参照によって本明細書中に組み込まれる)。免疫化のために使用されるQSOX1ペプチドは、50個~100個の間のアミノ酸、50個~150個の間のアミノ酸、50個~200個の間のアミノ酸、50個~232個の間のアミノ酸、100個~200個の間のアミノ酸、または、150個~232個の間のアミノ酸を含む場合がある。

10

【0138】

本発明のいくつかの実施形態に従う抗体フラグメントは、抗体のタンパク質分解的加水分解によって、あるいは、当該フラグメントをコードするDNAのE.coli細胞または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養または他のタンパク質発現系)における発現によって調製することができる。抗体フラグメントを、完全な抗体の従来的方法によるペプシン消化またはパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体フラグメントを、 $F(ab')_2$ として示される5Sフラグメントを提供するためのペプシンによる抗体の酵素的切断によって製造することができる。このフラグメントはさらに、3.5SのFab'一価フラグメントを製造するために、チオール還元剤、および、所望により、ジスルフィド連結の切断から生じるスルフヒドリル基のための遮断基を使用して切断することができる。別法として、ペプシンを使用する酵素的切断により、2つの一価Fab'フラグメントおよびFcフラグメントが直接もたらされる。これらの方法が、例えば、Goldenberg、米国特許第4036945号および同第4331647号、ならびに、それらに含まれる参考文献によって記載されている(そのような特許は本明細書により、それらの全体が参照によって組み込まれる)。Porter, R. R. [Biochem. J., 73: 119~126 (1959)]もまた参照のこと。抗体を切断する他の方法、例えば、一価の軽-重鎖フラグメントを形成するための重鎖の分離、フラグメントのさらなる切断、あるいは、他の酵素的技術、化学的技術または遺伝学的技術などもまた、フラグメントが、無傷の当該抗体によって認識される抗原に結合する限り、使用される場合がある。

20

30

【0139】

FvフラグメントはVH鎖およびVL鎖の会合を含む。この会合は、Inbar他[Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 69: 2659~62 (1972)]に記載されるように非共有結合性である場合がある。別法として、可変鎖を分子間ジスルフィド結合によって連結することができ、または、化学試薬によって、例えば、グルタルアルデヒドなどによって架橋することができる。好ましくは、Fvフラグメントは、ペプチドリンカーによってつながれるVH鎖およびVL鎖を含む。これらの単鎖型抗原結合性タンパク質(sFv)が、オリゴヌクレオチドによってつながれる、VHドメインおよびVLドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。この構造遺伝子は発現ベクターに挿入され、続いて、この発現ベクターが宿主細胞(例えば、E.coliなど)に導入される。組換え宿主細胞により、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチド(例えば、本明細書中下記の実施例2において教示されるような[Gly₄Ser]₃など)を伴う単一ポリペプチド鎖が合成される。sFvを製造するための方法が、例えば、下記によって記載されている: WhitlowおよびFilp

40

50

ula、Methods、2：97～105（1991）；Bird他、Science、242：423～426（1988）；Pack他、Bio/Technology、11：1271～77（1993）；ならびに米国特許第4946778号（これは本明細書により、その全体が参照によって組み込まれる）。

【0140】

抗体フラグメントの別の形態が、単一相補性決定領域（CDR）をコードするペプチドである。CDRペプチド（「最小認識ユニット」）を、目的とする抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。そのような遺伝子が、例えば、可変領域を抗体産生細胞のRNAから合成するためにポリメラーゼ連鎖反応を使用することによって調製される。例えば、LarrickおよびFry [Methods、2：106～10（1991）]を参照のこと。

【0141】

非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化された形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含有する、免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそのフラグメント（例えば、抗体のFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または他の抗原結合性部分配列など）のキメラ分子である。ヒト化抗体には、レシピエントの相補性決定領域（CDR）に由来する残基が、所望される特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）（例えば、マウス、ラットまたはウサギなど）のCDRに由来する残基によって置き換えられたヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）が含まれる。場合により、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体においても、あるいは、移入されたCDR配列またはフレームワーク配列においても見出されない残基を含む場合がある。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含むであろう。この場合、CDR領域のすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、かつ、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリンのコンセンサス配列のFR領域である。ヒト化抗体は最適にはまた、免疫グロブリンの定常領域（Fc）の少なくとも一部を、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域（Fc）の少なくとも一部を含むであろう [Jones他、Nature、321：522～525（1986）；Riechmann他、Nature、332：323～329（1988）；およびPresta、Curr. Op. Struct. Biol.、2：593～596（1992）]。

【0142】

非ヒト抗体をヒト化するための方法がこの技術分野では広く知られている。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から当該ヒト化抗体に導入されている1つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は移入残基と呼ばれることが多く、この場合、移入残基は典型的には移入可変ドメインから選ばれる。ヒト化は本質的には、齧歯類のCDRまたはCDR配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに使用することによって、Winterおよび共同研究者らの方法に従って行うことができる [Jones他、Nature、321：522～525（1986）；Riechmann他、Nature、332：323～327（1988）；Verhoeyen他、Science、239：1534～1536（1988）]。したがって、そのようなヒト化抗体はキメラ抗体であり（米国特許第4816567号）、ここで実質的に無傷のヒト可変ドメイン未満の部分が非ヒト種由来の対応する配列によって置換されている。実際には、ヒト化抗体は典型的には、いくつかのCDR残基および可能な場合にはいくつかのFR残基が、齧歯類抗体における類似部位に由来する残基によって置換されているヒト抗体である。

【0143】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリー [HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、227：381（1991）；Marks他、J. Mol. Biol.、222：581（1991）]を含めて、この技術分野で知られている様々な技術を使用して製造することができる。Cole他およびBoerner他

10

20

30

40

50

の技術もまた、ヒトモノクローナル抗体を調製するために利用可能である [Cole 他、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*、Alan R. Liss、p. 77 (1985)、および、Boerner 他、*J. Immunol.*、147(1): 86~95 (1991)]。同様に、ヒト抗体は、ヒトの免疫グロブリン遺伝子座を、内因性の免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されているトランスジェニック動物(例えば、マウス)に導入することによって作製することができる。抗原投与したとき、ヒト抗体の産生が認められ、これは、遺伝子再構成、組立および抗体レパートリーを含めてすべての点でヒトにおいて見られる抗体産生によく似ている。この取り組みが、例えば、米国特許第5545807号、同第5545806号、同第5569825号、同第5625126号、同第5633425号、同第5661016号において、また、下記の科学刊行物において記載されている: Marks 他、*Bio/Technology*、10: 779~783 (1992); Lonberg 他、*Nature*、368: 856~859 (1994); Morrison、*Nature*、368、812~13 (1994); Fishwild 他、*Nature Biotechnology*、14、845~51 (1996); Neuberger、*Nature Biotechnology*、14: 826 (1996); ならびに、Lonberg および Huszar、*Intern. Rev. Immunol.*、13、65~93 (1995)。

10

20

30

40

50

【0144】

1つの実施形態によれば、抗体が、本質的には本明細書中下記で記載されるように製造される。具体的には、マウスが最初に、組換えヒトQSOX1および完全フロイントアジュバント(例えば、Difco Laboratories から得られる)の乳濁液により免疫化される。例えば、マウスが3週間の間隔で4回免疫化される場合がある。次に、選択されたマウスからの脾臓細胞が、ポリエチレングリコールを使用して骨髓腫細胞(例えば、NSO 骨髓腫細胞)と融合される。その後、ハイブリドーマ細胞が選択培地(例えば、HAT 培地)によって選択され、これらの細胞の上清が、ヒトQSOX1に対する特異的結合およびその阻害についてスクリーニングされる。その後、大規模での抗体が、例えば、miniPERM バイオリアクター(Sarstedt)を血清非含有培地(DCCM)において使用して製造される場合がある。

【0145】

したがって、本発明の教示によれば、QSOX1と結合し、かつ、細胞遊走を支援する基底膜組立てを媒介することにおけるQSOX1活性を阻害する、抗原認識ドメインを含む単離された抗体が提供される。

【0146】

本発明の実施形態によれば、上記活性が、細胞外マトリックスの免疫蛍光(IF)染色アッセイ、または、可溶性ラミニン(すなわち、以下の実施例の部分でさらに記載されるように、基底膜中に組み入れられないもの)に対するウエスタンブロットアッセイのうちの少なくとも1つによってアッセイされる。

【0147】

本発明の特定の実施形態によれば、本発明の抗体はモノクローナル抗体である。本発明の教示によって使用されてもよい例示的なモノクローナル抗体はMAb 492.1であり、配列番号29~34である相補性決定領域(CDR)を含む。したがって、CDR1~3(それぞれ配列番号29~31)は抗体の軽鎖に位置され、CDR1~3(それぞれ配列番号32~34)は抗体の重鎖に位置される。

【0148】

別の実施形態によれば、本発明の抗体は一本鎖抗体である。本発明の教示によって使用されてもよい例示的な一本鎖抗体はscFV 492.1であり、配列番号29~34である相補性決定領域(CDR)を含む。

【0149】

別の実施形態によれば、本発明の単離された抗体は、配列番号7および配列番号8に示

されるアミノ酸配列を含む。

【0150】

別の実施形態によれば、本発明の単離された抗体は、配列番号27および配列番号28に示されるアミノ酸配列を含む。

【0151】

1つの実施形態によれば、本発明の抗体はマウスQSOX1酵素と結合する場合がある。

【0152】

したがって、下記の実施例の節においてさらに詳しく記載されるように、ヒトQSOX1およびマウスQSOX1は同等であり、少なくとも70%（例えば、79%）の配列同一性を含む。ヒトQSOX1およびマウスQSOX1の配列アラインメントにより、例えば、ヒトQSOX1のPro116がマウスQSOX1ではアラニンにより置換されていることが明らかにされた（図25を参照のこと）。配列の違いを示すもう1つの領域が、ヒトQSOX1に由来するVal₁₃₅-Val₁₃₈であり、これはマウスQSOX1におけるThr₁₃₈-Gly₁₄₁に対応する（図25を参照のこと）。これらの発見により、マウスQSOX1と結合することができる抗体を作製するための枠組みが提供された。

10

【0153】

一つの実施形態によれば、本発明の抗体はモノクローナル抗マウスQSOX1抗体である。

20

【0154】

別の実施形態によれば、本発明の抗体は一本鎖抗マウスQSOX1抗体である。

【0155】

マウスQSOX1を標的とする抗体を作製するために使用されるMAb492.1における可能な変異が本明細書中下記の表8に記載される。

【0156】

QSOX1をダウンレギュレーションすることができる別の作用因が、QSOX1に結合し、かつ/または、QSOX1を切断する分子である。そのような分子としては、QSOX1アンタゴニスト、QSOX1のドミナントネガティブ分子（例えば、エフェクターと競合するペプチドの一部またはその変異体）、QSOX1の天然の阻害剤、または、QSOX1阻害ペプチドが可能である。

30

【0157】

QSOX1の少なくとも触媒作用部分または結合性部分の非機能的アナログもまた、QSOX1をダウンレギュレーションする作用因として使用され得ることが理解されるであろう。

【0158】

QSOX1をダウンレギュレーションするために本発明のいくつかの実施形態と一緒に使用され得る別の作用因が、QSOX1の活性化および基質結合を妨げる分子である。

【0159】

述べられるように、QSOX1の発現をダウンレギュレーションすることができる別の作用因が、標的化された様式で発現を沈黙させるために好適である核酸作用因である。そのような作用因の例が下記で示される。

40

【0160】

例えば、QSOX1のダウンレギュレーションをRNAサイレンシングによって達成することができる。本明細書中で使用される場合、表現「RNAサイレンシング」は、対応するタンパク質コード遺伝子の発現の阻害または「サイレンシング」をもたらすRNA分子によって媒介される一群の調節機構[例えば、RNA干渉(RNAi)、転写型遺伝子サイレンシング(TGS)、転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)、クエリング(queiling)、相互抑制および翻訳抑制]を示す。RNAサイレンシングが、植物、動物およびカビを含めて、多くのタイプの生物において認められている。

50

【0161】

本明細書中で使用される場合、用語「RNAサイレンシング作用因」は、標的遺伝子の発現の特異的な阻害または「サイレンシング」を行うことができるRNAを示す。特定の実施形態において、RNAサイレンシング作用因はmRNA分子の完全なプロセシング（例えば、完全な翻訳および/または発現）を転写後のサイレンシング機構により妨げることができる。RNAサイレンシング作用因には、非コードRNA分子、例えば、対形成した鎖を含むRNA二重鎖、同様にまた、そのような小さい非コードRNAを生じさせ得る前駆体RNAが含まれる。例示的なRNAサイレンシング作用因には、dsRNA（例えば、siRNAなど）、miRNAおよびshRNAが含まれる。1つの実施形態において、RNAサイレンシング作用因はRNA干渉を誘導することができる。別の実施形態において、RNAサイレンシング作用因は翻訳抑制を媒介することができる。

10

【0162】

本発明の1つの実施形態によれば、RNAサイレンシング作用因は標的RNA（例えば、QSOX1）に対して特異的であり、標的遺伝子に対する99%以下の全体的相同性（例えば、標的遺伝子に対する98%未満、97%未満、96%未満、95%未満、94%未満、93%未満、92%未満、91%未満、90%未満、89%未満、88%未満、87%未満、86%未満、85%未満、84%未満、83%未満、82%未満、81%未満の全体的相同性）を示す遺伝子またはプライス変化体の交差阻害または交差サイレンシングをもたらさない。

【0163】

RNA干渉は、短い干渉性RNA（siRNA）によって媒介される動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プロセスを示す。植物における対応するプロセスが転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと一般に呼ばれ、これはまた、カビではクエリングと呼ばれる。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために使用される進化的に保存された細胞防御機構であると考えられており、多種多様な植物および動物によってそれらの間で一般に共有される。外来遺伝子発現からのそのような保護が、相同的な一本鎖RNAまたはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答を介して、ウイルス感染に由来するか、または、宿主ゲノムへのトランスポゾンエレメントのランダムな組み込みに由来する二本鎖RNA（dsRNA）の生成に応答して進化してきたかもしれない。

20

30

【0164】

細胞における長いdsRNAの存在により、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼIII酵素の活性が刺激される。ダイサーは、短い干渉性RNA（siRNA）として知られているdsRNAの短片へのdsRNAのプロセシングに関与する。ダイサー活性に由来する短い干渉性RNAは、長さが典型的には約21ヌクレオチド～約23ヌクレオチドであり、約19塩基対の二重鎖を含む。RNAi応答はまた、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介するエンドヌクレアーゼ複合体（これはRNA誘導サイレンシング複合体（RISC）と一般に呼ばれる）を特徴とする。標的RNAの切断が、siRNA二重鎖のアンチセンス鎖に相補的な領域の中央において生じる。

40

【0165】

したがって、本発明のいくつかの実施形態では、mRNAからのタンパク質発現をダウンレギュレーションするためのdsRNAの使用が意図される。

【0166】

1つの実施形態によれば、dsRNAは30bp超である。長いdsRNA（すなわち、30bp超のdsRNA）の使用は、二本鎖RNAのこれらのより長い領域がインターフェロン応答およびPKR応答の誘導を生じさせるであろうという考えのために非常に限定されている。しかしながら、長いdsRNAの使用は下記の点で数多くの利点をもたらすことができる：細胞は、数多くのsiRNAを試験する必要性を軽減する最適なサイレンシング配列を選択することができる；長いdsRNAは、サイレンシングライブラリー

50

が、*siRNA*のために必要であろうと思われるよりも少ない複雑性を有することを可能にするであろう；および、おそらくは最も重要であるが、長い*dsRNA*は、治療剤として使用されたときにはウイルスの回避変異を防止することができるかもしれない。

【0167】

様々な研究により、長い*dsRNA*が、ストレス応答を誘導することなく、また、著しい標的外影響を引き起こすことなく、遺伝子発現を沈黙させるために使用され得ることが明らかにされる。例えば、Strat他、*Nucleic Acids Research*、2006、第34巻、No.13、3803~3810；Bhargava A他、*Brain Res. Protoc.*、2004、13:115~125；Diallo M.他、*Oligonucleotides*、2003、13:381~392；Pa
ddison P. J.他、*Proc. Natl Acad. Sci. USA.*、2002、99:1443~1448；Tran N.他、*FEBS Lett.*、2004、573:127~134を参照のこと。

10

【0168】

特に、本発明はそのいくつかの実施形態によれば、インターフェロン経路が活性化されない細胞（例えば、胚性細胞および卵母細胞）における遺伝子サイレンシングのための長い*dsRNA*（30塩基を超える転写物）の導入を意図する。例えば、Billy他、*PNAS*、2001、第98巻、14428頁~14433頁；およびDiallo他、*Oligonucleotides*、2003年10月1日、13(5):381~392、doi:10.1089/154545703322617069を参照のこと。

20

【0169】

本発明はそのいくつかの実施形態によれば、遺伝子発現をダウンレギュレーションするための、インターフェロン経路およびPKR経路を誘導しないように特に設計された長い*dsRNA*の導入もまた意図する。例えば、ShinagawaおよびIshii [*Genes & Dev.*、17(11):1340~1345、2003]は、長い二本鎖RNAをRNAポリメラーゼII (Pol II) プロモーターから発現するために、pDECAPと名づけられるベクターを開発している。pDECAPからの転写物は、細胞質への*ds-RNA*輸出を促進させる5'キャップ構造および3'ポリ(A)テールの両方を欠くので、pDECAPからの長い*ds-RNA*はインターフェロン応答を誘導しない。

30

【0170】

インターフェロン経路およびPKR経路を哺乳動物系において避ける別の方法が、小さい阻害性RNA (*siRNA*) を、トランスフェクションまたは内因性発現のどちらかを介して導入することによるものである。

【0171】

用語「*siRNA*」は、RNA干渉 (RNAi) 経路を誘導する小さい阻害性RNA二重鎖（一般には18塩基対~30塩基対の間）を示す。典型的には、*siRNA*は、中央の19bpの二重鎖領域および両末端における対称的な2塩基の3'突出部を有する21量体として化学合成されているが、25塩基~30塩基の長さの化学合成されたRNA二重鎖が、同じ場所において21量体と比較して、効力の100倍もの増大を有し得ることが近年には記載されている。RNAiを誘発することにおいてより長いRNAを使用して得られる観測された増大した効力が、ダイサーに生成物（21量体）の代わりに基質（27量体）を提供すること、また、このことにより、*siRNA*二重鎖がRISCに進入する速度または効率が改善されることから生じるように理論化される。

40

【0172】

3'突出の位置が*siRNA*の効力に影響すること、および、3'突出をアンチセンス鎖に有する非対称的な二重鎖が、3'突出をセンス鎖に有するものよりも一般に強力であることが見出されている (Rose他、2005)。このことは、アンチセンス転写物を標的とするときには逆の効力パターンが認められるので、非対称的な鎖がRISCに入ることに起因すると考えられ得る。

50

【0173】

二本鎖の干渉性RNA（例えば、siRNA）の鎖が、ヘアピン構造またはステム・ループ構造（例えば、shRNA）を形成するためにつながれる場合がある。したがって、述べられたように、本発明のいくつかの実施形態のRNAサイレンシング作用因はまた、短いヘアピンRNA（shRNA）である場合がある。

【0174】

用語「shRNA」は、本明細書中で使用される場合、相補的配列の第1の領域および第2の領域を含む、ステム・ループ構造を有するRNA作用因を示し、ただし、この場合、これらの領域の相補性の程度および配向が、塩基対形成がこれらの領域の間で生じるのに十分であり、第1の領域および第2の領域がループ領域によってつなぐられ、ループが、ループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチドアナログ）の間での塩基対形成の欠如から生じる。ループにおけるヌクレオチドの数は、3～23の間の数（3および23を含む）、または、5～15の間の数（5および15を含む）、または、7～13の間の数（7および13を含む）、または、4～9の間の数（4および9を含む）、または、9～11の間の数（9および11を含む）である。ループにおけるヌクレオチドのいくつかは、ループにおける他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に参与することができる。ループを形成させるために使用することができるオリゴヌクレオチド配列の例には、5'-UUC AAGAGA-3'（Brummelkamp, T.R.他（2002）、Science、296：550）および5'-UUUGUGUAG-3'（Castanotto, D.他（2002）、RNA、8：1454）が含まれる。生じた一本鎖オリゴヌクレオチドは、RNAi装置と相互作用することができる二本鎖領域を含むステム・ループ構造またはヘアピン構造を形成することが当業者によって認識されるであろう。

10

20

【0175】

本発明のいくつかの実施形態との使用のために好適であるRNAサイレンシング作用因の合成を下記のように行うことができる。最初に、QSOX1のmRNA配列がAAジヌクレオチド配列についてAUG開始コドンから下流に走査される。それぞれのAAおよびその3'側の隣接する19ヌクレオチドの存在が、可能性のあるsiRNA標的部として記録される。好ましくは、siRNA標的部がオープンリーディングフレームから選択される。これは、非翻訳領域（UTR）には調節タンパク質結合部位がより多いからである。UTR結合タンパク質および/または翻訳開始複合体がsiRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨げる場合がある[Tuschl, ChemBiochem、2：239～245]。だが、非翻訳領域に向けられるsiRNAもまた、5'UTRに向けられるsiRNAがGAPDHの細胞mRNAにおける約90%の低下を媒介し、かつ、タンパク質レベルを完全になくしたGAPDHについて明らかにされるように（www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html）、効果的である場合があることが理解されるであろう。

30

【0176】

次に、可能性のある標的部が、いずれかの配列アライメントソフトウェアを使用して、例えば、NCBIサーバー（www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）から入手可能なBLASTソフトウェアなどを使用して適切なゲノムデータベース（例えば、ヒト、マウス、ラットなど）に対して比較される。他のコード配列に対する有意な相同性を示す推定される標的部が取り出される。

40

【0177】

条件を満たす標的配列が、siRNA合成のためのテンプレートとして選択される。好ましい配列が、低いG/C含有量を含む配列である。これらは、G/C含有量が55%よりも大きい配列と比較して、遺伝子サイレンシングを媒介することにおいてより効果的であることが判明しているからである。いくつかの標的部が好ましくは、評価のために標的遺伝子の長さに沿って選択される。選択されたsiRNAのより良い評価のために、陰性対照が好ましくは、併せて使用される。陰性対照siRNAは好ましくは、siRNAと同じヌクレオチド組成を含み、しかし、ゲノムに対する有意な相同性を有していない。

50

したがって、他のいずれの遺伝子に対しても有意な相同性を何ら示さないならば、*siRNA*のスクランブル型ヌクレオチド配列が好ましくは使用される。

【0178】

例えば、*QSOX1*の好適な*siRNA*には、*Dharmacon*（米国）から商業的に購入される*siRNA*を挙げることができる。

【0179】

本発明のいくつかの実施形態の*RNA*サイレンシング作用因は、*RNA*のみを含有するそのような分子に限定される必要はなく、しかし、化学的に改変されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含することが理解されるであろう。

【0180】

*RNA*サイレンシング作用因を使用して標的化されることになる*mRNA*には、その発現が、望まれていない表現型形質と相関関係にある*mRNA*が含まれるが、これらに限定されない。標的化されることがある例示的な*mRNA*が、短縮型タンパク質をコードする*mRNA*、すなわち、欠失を含む*mRNA*である。したがって、本発明のいくつかの実施形態の*RNA*サイレンシング作用因は、欠失の両側での架橋領域に対して標的化される場合がある。そのような*RNA*サイレンシング作用因が細胞に導入されるならば、非変異タンパク質には影響を与えないままにしながら、変異タンパク質のダウンレギュレーションが引き起こされるであろう。

【0181】

別の実施形態によれば、*RNA*サイレンシング作用因は*miRNA*である場合がある。

【0182】

用語「マイクロ*RNA*」、「*miRNA*」および「*miR*」は同義的であり、遺伝子発現を調節する、長さが約19~28ヌクレオチドである非コードの一本鎖*RNA*分子の集まりを示す。様々な*miRNA*が広範囲の生物（ウイルス、*fw Darwin*、ヒト）において見出され、発達、恒常性および疾患原因においてある役割を果たすことが示されている。

【0183】

*miRNA*および*miRNA*^{*}のどのような対であれ、*miRNA*および*miRNA*^{*}の対の5'末端および3'末端には変動性が存在するかもしれないことには留意すべきである。この変動性は、切断部位に関する*Drosophila*および*Dicer*の酵素プロセッシングにおける変動性に起因する場合がある。*miRNA*および*miRNA*^{*}の5'末端および3'末端における変動性はまた、プリ-*miRNA*およびプレ-*miRNA*のステム構造におけるミスマッチに起因する場合がある。ステム鎖のミスマッチにより、異なるヘアピン構造の集団がもたらされる場合がある。ステム構造における変動性はまた、*Drosophila*および*Dicer*による切断の生成物における変動性をもたらす場合がある。

【0184】

*QSOX1*をダウンレギュレーションすることができる別の作用因が、*QSOX1*の*mRNA*転写物または*DNA*配列を特異的に切断することができる*DNA*ザイム分子である。*DNA*ザイムは、一本鎖標的配列および二本鎖標的配列の両方を切断することができる一本鎖のポリヌクレオチドである（*Breaker, R. R. & Joyce, G., Chemistry and Biology, 1995, 2: 655; Santoro, S. W. & Joyce, G. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, 943: 4262*）。*DNA*ザイムのための一般的なモデル（“10-23”モデル）が提案されている。“10-23”*DNA*ザイムは15個のデオキシリボヌクレオチドの触媒作用ドメインを有しており、この触媒作用ドメインには、それぞれが7個~9個のデオキシリボヌクレオチドである2つの基質認識ドメインが隣接している。このタイプの*DNA*ザイムはその基質*RNA*をプリン：ピリミジン接合部において有効に切断することができる（*Santoro, S. W. & Joyce, G. F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; DNAザイムの総説については、Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther, 4: 119~21 (2002)]を参照のこと*）。

10

20

30

40

50

【0185】

一本鎖標的切断部位および二本鎖標的切断部位を認識する合成される操作されたDNAザイムの構築および増幅の様々な例が米国特許第6326174号(Joyce他)に開示されている。ヒトウロキナーゼ受容体に対して指向した類似する設計のDNAザイムは近年、ウロキナーゼ受容体の発現を阻害し、結腸ガン細胞転移をインビボにおいて首尾よく阻害することが認められた(Itohe他、20002、アブストラクト409、Ann Meeting Am Soc Gen Ther、www.asgt.org)。別の適用において、bcr-ablガン遺伝子に相補的なDNAザイムが、ガン遺伝子の発現を白血病細胞において阻害すること、また、再発率をCMLおよびALLの場合における自己骨髄移植において小さくすることにおいて成功した。

10

【0186】

QSOX1のダウンレギュレーションはまた、QSOX1をコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイゼーションすることができるアンチセンスポリヌクレオチドを使用することによって行うことができる。

【0187】

QSOX1を効率的にダウンレギュレーションするために使用することができるアンチセンス分子の設計は、アンチセンス取り組みにとって重要である2つの局面を考慮しながら行わなければならない。第1の局面が、適切な細胞の細胞質へのオリゴヌクレオチドの送達であり、一方、第2の局面が、指定されたmRNAと、その翻訳を阻害する様式で細胞内において特異的に結合するオリゴヌクレオチドの設計である。

20

【0188】

先行技術では、オリゴヌクレオチドを広範囲の様々な細胞タイプに効率的に送達するために使用することができる数多くの送達戦略が教示される[例えば、Luft、J Mol Med、76:75~6(1998); Kronenwett他、Blood、91:852~62(1998); Rajur他、Bioconj Chem、8:935~40(1997); Lavigne他、Biochem Biophys Res Commun、237:566~71(1997); および、Aoki他(1997)、Biochem Biophys Res Commun、231:540~5(1997)を参照のこと]。

【0189】

加えて、最大の予測された結合親和性をそれらの標的mRNAについて有するそのような配列を、標的mRNAおよびオリゴヌクレオチドの両方における構造変化のエネルギー論を説明する熱力学的サイクルに基づいて特定するためのアルゴリズムもまた利用可能である[例えば、Walton他、Biotechnol Bioeng、65:1~9(1999)参照]。

30

【0190】

そのようなアルゴリズムが、細胞におけるアンチセンス取り組みを実行するために首尾よく使用されている。例えば、Walton他によって開発されたアルゴリズムは、科学者がウサギベータ-グロビン(RBG)およびマウス腫瘍壊死因子-アルファ(TNFアルファ)の転写物のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを首尾よく設計することを可能にした。同じ研究グループはさらに近年、合理的に選択されたオリゴヌクレオチドの、細胞培養物における3つのモデル標的mRNA(ヒト乳酸デヒドロゲナーゼAおよびBならびにラットgp130)に対するアンチセンス活性が、動的PCR技術によって評価された場合、ホスホジエステルオリゴヌクレオチド化学およびホスホロチオアートオリゴヌクレオチド化学を用いた2つの細胞タイプにおける3つの異なる標的に対する試験を含めて、ほとんどすべての場合において有効であることが判明したことを報告している。

40

【0191】

加えて、特異的なオリゴヌクレオチドを設計し、その効率を、インビトロ系を使用して予測するためのいくつかの取り組みもまた発表された(Matveeva他、Nature Biotechnology、16:1374~1375(1998)]。

50

【0192】

QSOX1をダウンレギュレーションすることができる別の作用因が、QSOX1をコードするmRNA転写物を特異的に切断することができるリボザイム分子である。様々なリボザイムが、目的とするタンパク質をコードするmRNAの切断による遺伝子発現の配列特異的な阻害のためにますます使用されている[Welch他、Curr Opin Biotechnol、9:486~96(1998)]。リボザイムを、どのようなRNAであれ、特異的な標的RNAを切断するために設計することができることにより、リボザイムは基礎的研究および治療的応用の両方において有益なツールになっている。治療領域において、様々なリボザイムが、感染性疾患におけるウイルスRNA、ガンにおける支配的なガン遺伝子、および、遺伝的障害における特異的な体細胞変異を標的とするために利用されている[Welch他、Clin Diagn Virol、10:163~71(1998)]。最も注目すべきことに、HIV患者のためのいくつかのリボザイム遺伝子治療プロトコルが既に第1相試験にある。より近年には、リボザイムが、トランスジェニック動物研究、遺伝子標的検証および経路解明のために使用されている。いくつかのリボザイムが臨床試験の様々な段階にある。ANGIOZYMEが、ヒトの臨床試験において研究されるための最初の化学合成リボザイムであった。ANGIOZYMEは、VEGF-r(血管内皮増殖因子受容体)、すなわち、血管形成経路における重要な成分の形成を特異的に阻害する。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc.、同様にまた、他の企業が、抗血管形成治療剤の重要性を動物モデルにおいて明らかにしている。HEPTAZYME、すなわち、C型肝炎ウイルス(HCV)のRNAを選択的に破壊するために設計されたリボザイムが、C型肝炎ウイルスRNAを細胞培養アッセイで低下させることにおいて有効であることが見出された(Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - WEBホームページ)。

10

20

【0193】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供されるRNAサイレンシング作用因を細胞透過性ペプチドと機能的に関連させることができる。本明細書中で使用される場合、「細胞透過性ペプチド」は、細胞の原形質膜および/または核膜を越える膜透過性複合体の輸送に関連するエネルギー非依存的(すなわち、非エンドサイトーシス的)転位特性を与える短い(約12~30残基の)アミノ酸配列または機能的モチーフを含むペプチドである。本発明のいくつかの実施形態の膜透過性複合体において使用される細胞透過性ペプチドは好ましくは、少なくとも1つの非機能的なシステイン残基を含み、この場合、この非機能的システイン残基は遊離状態であるか、または、連結のために改変されている二本鎖リボ核酸とのジスルフィド連結を形成するために誘導体化されるかのどちらかである。そのような特性を与える代表的なアミノ酸モチーフが米国特許第6348185号に列挙されている(その内容は明示的に、参照によって本明細書中に組み込まれる)。本発明のいくつかの実施形態の細胞透過性ペプチドには好ましくは、ペネトラチン、トランスポータン、pIs1、TAT(48-60)、pVEC、MTSおよびMAPが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0194】

本発明の方法(例えば、細胞遊走を阻害する方法)は、インビトロ、インビボまたはエクスピボで行われる場合がある。

40

【0195】

細胞遊走を調節することができることを、新規な治療様式として使用することができる。

【0196】

したがって、本発明の別の実施形態によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置の必要のある対象において処置する方法であって、QSOX1の活性または発現を阻害する作用因の治療有効量を前記対象に投与することを含む方法が提供される。

【0197】

本明細書中で使用される場合、用語「ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態」は、

50

ラミニン機能が疾患の発症または進行に関連する疾患または状態を示す。

【0198】

用語「処置する」は、疾患、障害もしくは状態の発達を阻害すること、もしくは停止させること、および/または、疾患、障害もしくは状態の軽減、寛解もしくは退行を生じさせること、あるいは、疾患、障害もしくは医学的状态を、当該疾患、障害もしくは状態について危険性があるかもしれないが、当該疾患、障害もしくは状態を有すると未だ診断されていない対象において生じさせないことを示す。当業者は、様々な方法論およびアッセイが、疾患、障害もしくは状態の発達を評価するために使用され得ること、また、同様に、様々な方法論およびアッセイが、疾患、障害もしくは状態の軽減、寛解もしくは退行を評価するために使用されるかもしれないことを理解するであろう。

10

【0199】

本明細書中で使用される場合、用語「対象」は、動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを示し、この場合、ヒトには、壊死関連の障害または状態に罹患しているか、あるいは、壊死関連の障害または状態に対する素因を有する男女の若年者および高齢者の両方が含まれる。

【0200】

一つの実施形態によれば、上記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は腫瘍である。

【0201】

腫瘍の例には、ガン腫、芽細胞腫および肉腫が含まれるが、これらに限定されない。ガン性疾患の具体的な例には、下記のもの挙げられるが、これらに限定されない：骨髄増殖性疾患、例えば、固形腫瘍、良性髄膜腫、唾液腺混合腫瘍、結腸腺腫など；腺ガン、例えば、小細胞肺ガン、腎臓、子宮、前立腺、膀胱、卵巣、結腸、肉腫、脂肪肉腫、粘液様、滑膜肉腫、横紋筋肉腫（肺胞）、骨外性粘液様軟骨肉腫、ユーイング腫瘍；他のものには、精巣および卵巣の未分化胚細胞腫、網膜芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫、悪性黒色腫、中皮腫、乳房、皮膚、前立腺および卵巣が含まれる。

20

【0202】

一つの実施形態によれば、上記腫瘍は転移性固形腫瘍である。

【0203】

一つの実施形態によれば、上記腫瘍は腺ガンである。

30

【0204】

別の実施形態によれば、本発明の教示によって処置されてもよい腫瘍は、前立腺ガン、肺ガン、乳ガン、子宮頸ガン、尿管ガン、膣ガン、結腸ガン、食道ガン、膵臓ガン、咽頭ガン、胃ガンおよび骨髄性白血病からなる群から選択されるが、これらに限定されない。

【0205】

一つの実施形態によれば、上記ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は線維症に関連する。

【0206】

用語「線維症」は、器官または組織における過剰な結合組織の形成または存在を示す。線維症はまた、例えば、刺激（例えば、組織の傷害または炎症など）に対する修復応答または置換応答として生じる場合がある。

40

【0207】

線維症を伴う障害の例には、肝線維症、肺線維症、腎線維症、膵線維症、強皮症、結合組織疾患、癬痕化、皮膚線維症、心臓線維症、臓器移植、血管狭窄、再狭窄、動脈線維症、関節線維化、乳房線維症、筋線維症、後腹膜線維症、甲状腺線維症、リンパ節線維症、膀胱線維症、胸膜線維症およびCOPDが含まれるが、これらに限定されない。

【0208】

一つの実施形態によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態は、細菌疾患、ウイルス疾患または寄生虫疾患である。

50

【0209】

本発明の教示によって処置されることがある例示的な寄生虫疾患には、アフリカトリパノソーマ症が含まれる。

【0210】

本発明の教示によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を処置するために、対象には、本明細書中上記でさらに詳述されるように、QSOX1の活性または発現をダウンレギュレーションする作用因が投与される。

【0211】

本明細書中上記で記載されるダウンレギュレーション作用因のそれぞれを個体にそれぞれで投与することができ、または、生理学的に許容され得るキャリアもまた含む医薬組成物の一部として個体に投与することができる。医薬組成物の目的は、有効成分の生物への投与を容易にすることである。

10

【0212】

本明細書中で使用される「医薬組成物」は、本明細書中に記載される有効成分の1つまたは複数と、他の化学的成分（例えば、生理学的に好適な担体および賦形剤など）との調製物を示す。医薬組成物の目的は、生物に対する化合物の投与を容易にすることである。

【0213】

本明細書中において、用語「有効成分（活性成分）」は、生物学的効果を説明することができるQSOX1ダウンレギュレーション作用因を示す。

【0214】

本明細書中以降、表現「生理学的に許容され得る担体」および表現「医薬的に許容され得る担体」は、交換可能に使用され得るが、生物に対する著しい刺激を生じさせず、かつ、投与された化合物の生物学的な活性および性質を妨げない担体または希釈剤を示す。アジュバントはこれらの表現に包含される。

20

【0215】

本明細書中において、用語「賦形剤」は、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性な物質を示す。賦形剤の非限定的な例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコールが挙げられる。

【0216】

薬物の配合および投与のための技術が「Remington's Pharmaceutical Sciences」(Mack Publishing Co.、Easton、PA、最新版)に見出されることができ、これは参考として本明細書中に組み込まれる。

30

【0217】

好適な投与経路には、例えば、経口送達、直腸送達、経粘膜送達、特に経鼻送達、腸管送達、または非経口送達（これには、筋肉内注射、皮下注射および髄内注射、ならびに、クモ膜下注射、直接的な脳室内注射、例えば右または左の心室腔内、もしくは総冠動脈内への心臓内注射、静脈内注射、腹腔内注射、鼻内注射または眼内注射が含まれる）が含まれることができる。

40

【0218】

中枢神経系(CNS)への薬物送達のための従来への取り組みには、下記のことが含まれる：神経外科的戦略（例えば、脳内注射または脳室内注入）；BBBの内在性輸送経路の1つを利用するための試みにおける作用因の分子的操作（例えば、内皮細胞表面分子に対する親和性を有する輸送ペプチドを、自身ではBBBを越えることができない作用因との組合せで含むキメラ融合タンパク質の製造）；作用因の脂質溶解性を増大させるために設計される薬理学的戦略（例えば、水溶性作用因を脂質キャリアまたはコレステロールキャリアにコンジュゲート化すること）；および、BBBの一体性を（頸動脈内へのマンニトール溶液の注入または生物学的活性剤（例えば、アンジオテンシンペプチドなど）の使用から生じる）高浸透圧破壊によって一時的に破壊すること。

50

【0219】

あるいは、例えば、患者の組織領域に直接的に医薬組成物の注射をすることによって、全身的な方法よりも局所的に医薬組成物を投与することができる。

【0220】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物は、この分野で十分に知られているプロセスによって、例えば、従来混合、溶解、造粒、糖衣錠作製、研和、乳化、カプセル化、包括化または凍結乾燥のプロセスによって製造されることができる。

【0221】

したがって、本発明のいくつかの実施形態に従って使用される医薬組成物は、医薬品として使用されることができる調製物への有効成分の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容され得る担体を使用して従来の様式で配合されることができる。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

10

【0222】

注射の場合、医薬組成物の有効成分は、水溶液において、好ましくは生理学的に適合する緩衝液（例えば、ハンス溶液、リンゲル溶液、または生理学的な食塩緩衝液など）において配合されることができる。経粘膜投与の場合、浸透されるバリアーに対して適切な浸透剤が配合において使用される。そのような浸透剤はこの分野では一般に知られている。

【0223】

経口投与の場合、医薬組成物は、活性化合物をこの分野でよく知られている医薬的に許容され得る担体と組み合わせることによって容易に配合されることができる。そのような担体は、医薬組成物が、患者によって経口摂取される錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液剤、ゲル、シロップ、スラリー剤および懸濁物などとして配合されることを可能にする。経口使用される薬理的調製物は、固体の賦形剤を使用し、得られた混合物を場合により粉碎し、錠剤または糖衣錠コアを得るために、望ましい好適な補助剤を添加した後、顆粒の混合物を加工して作製されることができる。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖などの充填剤；セルロース調製物、例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなど；および/またはポリビニルピロリドン（PVP）などの生理学的に許容され得るポリマーである。もし望むなら、架橋されたポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはその塩（例えば、アルギン酸ナトリウムなど）などの崩壊剤が加えられることができる。

20

30

【0224】

糖衣錠コアには、好適なコーティングが施される。この目的のために、高濃度の糖溶液を使用することができ、この場合、糖溶液は、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液、および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有しうる。色素または顔料は、活性化合物の量を明らかにするために、または活性化合物の量の種々の組合せを特徴づけるために、錠剤または糖衣錠コーティングに加えられることができる。

40

【0225】

経口使用されうる医薬組成物としては、ゼラチンから作製されたプッシュ・フィット型カプセル、ならびに、ゼラチンおよび可塑剤（例えば、グリセロールまたはソルビトールなど）から作製された軟いシールされたカプセルが挙げられる。プッシュ・フィット型カプセルは、充填剤（例えば、ラクトースなど）、結合剤（例えば、デンプンなど）、滑剤（例えば、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなど）、および場合により安定化剤との混合で有効成分を含有することができる。軟カプセルでは、有効成分は、好適な液体（例えば、脂肪油、流動パラフィンまたは液状のポリエチレングリコールなど）に溶解または懸濁されることができる。さらに、安定化剤が加えられることができる。経口投与される配合物はすべて、選ばれた投与経路について好適な投薬形態でなければならない。

50

【0226】

口内投与の場合、組成物は、従来の方法で配合された錠剤またはトローチの形態を取ることができる。

【0227】

鼻吸入による投与の場合、本発明のいくつかの実施形態による使用のための有効成分は、好適な噴射剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素）の使用により加圧バックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提示物の形態で都合よく送達される。加圧されたエアロゾルの場合、投与量は、計量された量を送達するためのバルブを備えることによって決定されることができる。ディスペンサーにおいて使用される、例えば、ゼラチン製のカプセルおよびカートリッジは、化合物および好適な粉末基剤（例えば、ラクトースまたはデンプンなど）の粉末混合物を含有して配合されることができる。

10

【0228】

本明細書中に記載される医薬組成物は、例えば、ポラス注射または連続注入による非経口投与のために配合されることができる。注射用配合物は、場合により保存剤が添加された、例えば、アンプルまたは多回用量容器における単位投薬形態で提供されることができる。組成物は、油性ビヒクルまたは水性ビヒクルにおける懸濁物または溶液剤またはエマルションにすることができ、懸濁化剤、安定化剤および/または分散化剤などの配合剤を含有することができる。

20

【0229】

非経口投与される医薬組成物には、水溶性形態の活性調製物の水溶液が含まれる。さらに、有効成分の懸濁物は、適切な油性または水性の注射用懸濁物として調製されることができる。好適な親油性の溶媒またはビヒクルとしては、脂肪油（例えば、ゴマ油など）、または合成脂肪酸エステル（例えば、オレイン酸エチルなど）、トリグリセリドまたはリポソームが挙げられる。水性の注射用懸濁物は、懸濁物の粘度を増大させる物質、例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトールまたはデキストランなどを含有することができる。場合により、懸濁物はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために、有効成分の溶解性を増大させる好適な安定化剤または薬剤を含有することができる。

【0230】

あるいは、有効成分は、好適なビヒクル（例えば、無菌の、パイロジェン不含水溶液）を使用前に用いて構成される粉末形態であることができる。

30

【0231】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物はまた、例えば、カカオ脂または他のグリセリドなどの従来座薬基剤を使用して、座薬または停留浣腸剤などの直腸用組成物に配合されることができる。

【0232】

本発明のいくつかの実施形態に関連した使用のために好適な医薬組成物として、有効成分が、その意図された目的を達成するために有効な量で含有される組成物が含まれる。より具体的には、「治療有効量」は、障害（例えばラミニン関連疾患またはラミニン関連状態）の症状を予防、緩和あるいは改善するために効果的であるか、または、処置されている対象の生存を延ばすために効果的である、有効成分（QSOX1ダウンレギュレーション作用因）の量を意味する。

40

【0233】

治療有効量の決定は、特に本明細書に与えられた詳細な開示に照らして十分に当業者の能力の範囲内である。

【0234】

本発明の方法において使用されるいかなる調製物についても、投与量または治療有効量は、生体外および細胞培養アッセイから最初に推定されることができる。例えば、投与量は、所望の濃度または力価を達成するために動物モデルにおいて決定されることができ、そのような情報は、ヒトにおける有用な投与量をより正確に決定するために使用されるこ

50

とができる。

【0235】

ラミニン関連疾患のための動物モデルには、例えば、肝線維症のためのマウス動物モデル [例えば、Hirimitsu Hayashi および Takao Sakai 1、*Amer Journal Physiol - GI* (2011)、300(5):G729~G738による総説論文を参照のこと] および転移性乳がんのためのマウス動物モデル [Anna Fantozzi および Gerhard Christofori、*Breast Cancer Research* (2006)、8:212] が含まれる。

【0236】

本明細書中に記載される有効成分の毒性および治療効力は、生体外、細胞培養物、または実験動物における標準的な薬学的手法によって決定されることができる。これらの生体外、細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量範囲を定めるために使用されることができる。投与量は、用いられる投薬形態および利用される投与経路に依存して変化しうる。正確な配合、投与経路および投与量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択されることができる (例えば、Fingler、(1975)「*The Pharmacological Basis of Therapeutics*」, Ch. 1 p. 1を参照のこと)。

10

【0237】

投薬量および投薬間隔を、生物学的効果 (最小有効濃度 (MEC)) を誘発または抑制するために十分な量で活性成分を提供するために個々に調節することができる。MECはそれぞれの調製物について変化するが、インビトロデータから推定することができる。MECを達成するために必要な投薬量は個々の特性および投与経路に依存する。検出アッセイを使用して、血漿中濃度を求めることができる。

20

【0238】

処置される状態の重篤度および応答性に依存して、投薬は、単回または複数回投与で行われることができ、この場合、処置期間は、数日から数週間まで、または治療が達成されるまで、または疾患状態の軽減が達成されるまで続く。

【0239】

本発明のいくつかの実施形態の抗マウス QSOX 1 抗体は、処置のための抗体の治療有効量、毒性および効力を求めるために前臨床試験のために使用されることがあることが理解されるであろう。

30

【0240】

投与される組成物の量は、当然のことではあるが、処置されている対象、苦痛の重篤度、投与様式、処方医の判断などに依存するだろう。

【0241】

本発明のいくつかの実施形態の組成物は、所望されるならば、有効成分を含有する1つまたは複数の単位投薬形態物を含むパックまたはディスペンサーデバイス (例えば、FDA承認キットなど) で提供され得る。パックは、例えば、金属ホイルまたはプラスチックホイル (例えばプリスターパック) を含むことができる。パックまたはディスペンサーデバイスには、投与のための説明書が付随し得る。パックまたはディスペンサーデバイスはまた、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府当局によって定められた形式で、容器に関連した通知によって適応させることができ、この場合、そのような通知は、組成物の形態、あるいはヒトまたは動物への投与の当局による承認を反映する。そのような通知は、例えば、処方薬物について米国食品医薬品局によって承認されたラベル書きであり得るか、または、承認された製品添付文書であり得る。適合し得る医薬用担体に配合された本発明の医薬組成物もまた、上でさらに詳述されたように、示された状態を処置するために調製され、適切な容器に入れられ、かつ標識され得る。

40

【0242】

本発明の単離されたポリペプチド (例えば、抗体) は QSOX 1 と特異的に結合することができるので、また、QSOX 1 のレベルが、ラミニンに関連する医学的状态 (例えば

50

、腫瘍)において上昇するので、そのようなポリペプチドは、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態の診断において使用することができることが理解されるであろう。

【0243】

したがって、本発明の1つの局面によれば、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を対象において診断する方法であって、(a)前記対象の生物学的サンプルを、本発明の単離されたポリペプチドとQSOX1タンパク質との間における免疫複合体形成のために好適な条件のもとで本発明の単離されたポリペプチドと接触させること;および(b)前記免疫複合体の形成を検出し、ただし、所定の閾値(すなわち、健康な個人から得られる生物学的サンプルにおけるそのレベル)を超える前記免疫複合体の存在により、前記ラミニン関連疾患が示されることを含む方法が提供される。

10

【0244】

本明細書中で使用される場合、表現「診断する」は、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態を分類すること、疾患の重篤度を決定すること、疾患の進行をモニターすること、疾患の結果および/または回復の見通しを予測することを示す。

【0245】

本明細書中で使用される場合、「生物学的サンプル」は、対象から単離される組織または流体のサンプルを示し、これらには、細胞(例えば、線維芽細胞、ニューロン細胞、樹状細胞、上皮細胞など)、組織、器官、様々な腫瘍(例えば、腫瘍生検サンプル)、ならびに、流体、例えば、血液、血清、血漿、リンパ、胆汁液、尿、唾液、痰、滑液、精液、涙、脳脊髄液、気管支肺胞洗浄液、腹水、膿、馴化培地など、ならびに、同様に、インビボ細胞培養成分のサンプルが含まれるが、これらに限定されない。「対象の生物学的サンプル」はまた、場合により、当該対象から物理的に取り出されていないサンプルを含む場合がある。

20

【0246】

1つの実施形態によれば、本発明の方法は、腫瘍、例えば、転移性固形腫瘍(例えば、前立腺ガン、膵臓ガン、乳ガンなど)などの診断を可能にする。

【0247】

本発明に従うラミニン関連疾患の診断が、対象の生物学的サンプルを、本発明の単離されたポリペプチド(例えば、抗体)とQSOX1タンパク質との間における免疫複合体形成のために好適な条件のもとで本発明の単離されたポリペプチドと接触させることによつて行われる。

30

【0248】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫複合体」は、抗体(例えば、本発明の単離されたポリペプチド)とその特異的な抗原(QSOX1タンパク質)との間で形成される複合体を示す。

【0249】

本発明の免疫複合体は、使用される単離されたポリペプチドおよびQSOX1タンパク質に依存して変化する場合がある様々な温度、塩濃度およびpH値において形成させることができ、当業者は、それぞれの免疫複合体の形成のために好適な条件を調節することができる。

40

【0250】

本発明のこの局面の方法によれば、免疫複合体形成の検出により、ラミニン関連疾患またはラミニン関連状態の診断が示される。様々な方法を、本発明の免疫複合体を検出するために使用することができ、当業者は、どの方法が、それぞれの免疫複合体のために、および/または、診断のために使用される生物学的サンプルのタイプのために好適であるかを決定することができる。

【0251】

例えば、免疫複合体を、従来の免疫組織化学分析または免疫蛍光分析、FACS分析、ELISA分析、ウエスタンブロット分析およびRIA分析によって、または、分子量に基づく取り組みによって検出することができる。

50

【0252】

本発明のいくつかの実施形態の単離されたポリペプチド（例えば、抗体）は、免疫複合体の検出を可能にするために、検出可能な部分に結合させられる場合があることが理解されるであろう。

【0253】

様々なタイプの検出可能な部分またはレポーター部分が本発明の抗体にコンジュゲート化される場合がある。これらには、放射性同位体（例えば、 ^{125}I ヨウ素など）、リン光性化学物質、化学発光性化学物質、蛍光性化学物質（蛍光団）、酵素、蛍光性ポリペプチド、親和性タグ、および、陽電子放射断層撮影法（PET）または磁気共鳴画像法（MRI）によって検出可能である分子（造影剤）が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0254】

好適な蛍光団の例には、フィコエリトリン（PE）、イソチオシアン酸フルオレセイン（FITC）、Cy-クロム、ローダミン、緑色蛍光タンパク質（GFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）、テキサスレッドおよびPE-Cy5などが含まれるが、これらに限定されない。蛍光団選択、蛍光団を様々なタイプの分子に連結する方法に関するさらなる指針については、下記を参照のこと：Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 第5版、Molecular Probes, Inc. (1994); 米国特許第6037137号 (Oncoimmunin Inc.); Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press New York, ニューヨーク (1995); Kay M. 他, 1995, Biochemistry, 34:293; Stubbs 他, 1996, Biochemistry, 35:937; Gakamsky D. 他, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer", "Receptors: A Practical Approach", 第2版、Stanford C. および Horton R. (編)、Oxford University Press, 英国 (2001); 米国特許第6350466号 (Targesome, Inc.)。蛍光性の検出可能な部分にコンジュゲート化されたときの抗体を検出するために使用することができる蛍光検出法には、例えば、蛍光活性化フローサイトメトリー（FACS）、免疫蛍光共焦点顕微鏡法、蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション（FISH）および蛍光共鳴エネルギー転移（FRET）が含まれる。

20

30

【0255】

数多くのタイプの酵素が本発明の抗体に結合させられる場合があり [例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ベータ-ガラクトシダーゼおよびアルカリホスファターゼ（AP）]、また、酵素コンジュゲート化抗体の検出を、ELISA（例えば、溶液において）、酵素結合免疫組織化学的アッセイ（例えば、固定処理された組織において）、酵素結合化学発光アッセイ（例えば、電気泳動分離されたタンパク質混合物において）またはこの技術分野で知られている他の方法を使用して行うことができる [例えば、Khatkhatay MI. および Desai M., 1999, J Immunology, 20:151~83; Wisdom GB., 1994, Methods Mol Biol., 32:433~40; Ishikawa E. 他, 1983, J Immunology, 4:209~327; Oellerich M., 1980, J Clin Chem Clin Biochem., 18:197~208; Schuur AH. および van Weemen BK., 1980, J Immunology, 1:229~49を参照のこと]。

40

【0256】

親和性タグ（または結合対のメンバー）は、対応する抗体によって特定可能な抗原 [例えば、抗DIG抗体によって特定されるジゴキシゲニン（DIG）]、または、タグに対

50

する大きい親和性を有する分子〔例えば、ストレプトアビジンおよびビオチン〕が可能である。親和性タグと結合する抗体または分子は蛍光標識することができ、または、上記で記載されるような酵素にコンジュゲート化することができる。

【0257】

様々な方法がこの技術分野では広範囲に実施されており、ストレプトアビジン分子またはビオチン分子を本発明の抗体に結合するために用いられる場合がある。例えば、ビオチン分子が、下記の実施例の節において、また、Denkberg, G. 他、2000、Eur. J. Immunol.、30:3522~3532において記載されるようなビオチンタンパク質リガーゼ（例えば、BirA）の認識配列を介して本発明の抗体に結合させられる場合がある。別法として、ストレプトアビジン分子が、本質的には下記において記載されるように、抗体フラグメント（例えば、単鎖Fvなど）に結合させられる場合がある：Cloutier SM. 他、2000、Molecular Immunology、37:1067~1077；Dubel S. 他、1995、J Immunol Methods、178:201；Huston JS. 他、1991、Methods in Enzymology、203:46；Kipriyanov SM. 他、1995、Hum Antibodies Hybridomas、6:93；Kipriyanov SM. 他、1996、Protein Engineering、9:203；Pearce LA. 他、1997、Biochem Molec Biol Intl、42:1179~1188。

10

【0258】

ストレプトアビジンにコンジュゲート化される様々な機能的部分（例えば、蛍光団など）が、免疫蛍光フローサイトメトリー試薬の本質的にすべての主要な供給者から市販されている（例えば、PharmingenまたはBecton-Dickinson）。

20

【0259】

本発明のいくつかの実施形態によれば、様々なビオチンコンジュゲート化抗体が、多価組成物（例えば、当該抗体の二量体形態または四量体形態）を形成させるためにストレプトアビジン分子に結合させられる。

【0260】

表1は、本発明の抗体にコンジュゲート化することができる特定可能な部分の限定されない例を提供する。

30

【0261】

表1

特定可能部分	アミノ酸配列 (GenBankアクセション番号)	核酸配列 (GenBankアクセション番号)
緑色蛍光タンパク質	AAL33912	AF435427
アルカリホスホターゼ	AAK73766	AY042185
ペルオキシダーゼ	CAA00083	A00740
ヒスチジンタグ	GenBankアクセション番号 AAK09208の アミノ酸264~269	GenBankアクセション番号 AF329457の ヌクレオチド790~807
Mycタグ	GenBankアクセション番号 AAK09208の アミノ酸273~283	GenBankアクセション番号 AF329457の ヌクレオチド817~849
ビオチンリガーゼタグ	LHHILDAQKMVWNHR	
オレンジ色蛍光タンパク質	AAL33917	AF435432
ベーターガラクトシダーゼ	ACH42114	EU626139
ストレプトアビジン	AAM49066	AF283893

40

【0262】

さらに、免疫複合体を単離するために、単離されたペプチド（例えば、抗体）が固体支

50

持体に固定化される場合がある。本明細書中で使用される場合、表現「固体支持体」は、目的とする試薬（例えば、本発明のこの局面の単離されたポリペプチド）が付着することができる非水性マトリックスを示す。固体支持体の例には、一部または全体がガラス（例えば、細孔制御ガラス）、多糖（例えば、アガロース）、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリビニルアルコールおよびシリコンから形成される固体支持体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、状況に依存して、固体支持体はアッセイプレートのウェルを含むことができる；他の状況では、固体支持体は精製カラム（例えば、アフィニティークロマトグラフィーカラム）である。この用語にはまた、分離している粒子の不連続な固相、例えば、米国特許第 4 2 7 5 1 4 9 号に記載のものが含まれる。

【0263】

免疫複合体形成を検出するための本明細書中上記で記載される作用因は、好ましくは適切な使用説明書、ならびに、ラミニン関連疾患の診断および/または評価を行うことにおける使用のための FDA 承認を示す表示と一緒に診断キット/製品に含まれる場合がある。

【0264】

そのようなキットは、例えば、上記の診断剤の少なくとも 1 つ（例えば、抗体）を含む少なくとも 1 つの容器と、別の容器に詰められた画像化試薬（例えば、酵素、二次抗体、緩衝液、発色性基質、蛍光発生物質）とを含むことができる。キットはまた、キットの貯蔵寿命を改善するための適切な緩衝液および保存剤を含む場合がある。

【0265】

本発明の別の局面によれば、生物学的サンプルにおいて Q S O X 1 のレベルを検出するためのキットが提供される。

【0266】

下記の実施例の節において詳しく記載されるように（例えば、本明細書中下記の実施例 1 を参照のこと）、本発明者らは、Q S O X 1 の阻害/欠乏が基底膜におけるラミニン集合の欠陥を引き起こすことを示している。

【0267】

したがって、本発明の別の局面によれば、Q S O X 1 阻害剤を特定する方法であって、組織を試験作用因の存在下または非存在下で培養することを含み、前記試験作用因との前記培養の後での機能的基底膜における減少により、前記試験作用因が前記 Q S O X 1 阻害剤であることが示される方法が提供される。

【0268】

一つの実施形態によれば、機能的基底膜における上記減少は、上記基底膜でのラミニン集合における低下を含む。

【0269】

本明細書中で使用される場合、表現「機能的基底膜における減少」は、少なくとも約 10% の減少、少なくとも約 20% の減少、少なくとも約 30% の減少、少なくとも約 40% の減少、少なくとも約 50% の減少、少なくとも約 60% の減少、少なくとも約 70% の減少、少なくとも約 80% の減少、少なくとも約 90% の減少、または、少なくとも約 100% の減少を示す。したがって、好ましくは、ラミニンが基底膜に全く取り込まれない。

【0270】

別の実施形態によれば、ラミニン集合における上記低下は、上記組織での可溶性ラミニンにおける増大を含む。

【0271】

別の実施形態によれば、上記組織は組織培養物を含む。

【0272】

別の実施形態によれば、上記方法はインビボで行われる。

【0273】

別の実施形態によれば、上記方法はさらに、Q S O X 1 の活性レベルまたは発現レベル

10

20

30

40

50

における低下を含む。Q S O X 1の活性レベルまたは発現レベルにおける低下は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、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%、少なくとも約90%、または、少なくとも約100%である場合がある。

【0274】

本明細書中で使用される用語「約」は、±10%を示す。

【0275】

用語「含む/備える (comprises, comprising, includes, including)」、「有する (having)」、およびそれらの同根語は、「含むが、それらに限定されない (including but not limited to)」ことを意味する。

10

【0276】

用語「からなる (consisting of)」は、「含み、それらに限定される (including and limited to)」ことを意味する。

【0277】

表現「から本質的になる (consisting essentially of)」は、さらなる成分、工程および/または部分が、主張される組成物、方法または構造の基本的かつ新規な特徴を実質的に変化させない場合にだけ、組成物、方法または構造がさらなる成分、工程および/または部分を含み得ることを意味する。

【0278】

本明細書中で使用される場合、単数形態(「a」、「an」および「the」)は、文脈がそうでないことを明確に示さない限り、複数の参照物を包含する。例えば、用語「化合物 (a compound)」または用語「少なくとも1つの化合物」は、その混合物を含めて、複数の化合物を包含し得る。

20

【0279】

本開示を通して、本発明の様々な態様が範囲形式で提示され得る。範囲形式での記載は単に便宜上および簡潔化のためであり、本発明の範囲に対する柔軟性のない限定として解釈すべきでないことを理解しなければならない。従って、範囲の記載は、具体的に開示された可能なすべての部分範囲、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値を有すると見なさなければならない。例えば、1~6などの範囲の記載は、具体的に開示された部分範囲(例えば、1~3、1~4、1~5、2~4、2~6、3~6など)、ならびに、その範囲に含まれる個々の数値(例えば、1、2、3、4、5および6)を有すると見なさなければならない。このことは、範囲の広さにかかわらず、適用される。

30

【0280】

数値範囲が本明細書中で示される場合には常に、示された範囲に含まれる任意の言及された数字(分数または整数)を含むことが意味される。第1の示された数字および第2の示された数字「の範囲である/の間の範囲」という表現、および、第1の示された数字「から」第2の示された数「まで及ぶ/までの範囲」という表現は、交換可能に使用され、第1の示された数字と、第2の示された数字と、その間のすべての分数および整数とを含むことが意味される。

40

【0281】

本明細書中で使用される用語「方法 (method)」は、所与の課題を達成するための様式、手段、技術および手順を示し、これには、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者に知られているそのような様式、手段、技術および手順、または、知られている様式、手段、技術および手順から、化学、薬理学、生物学、生化学および医学の技術分野の実施者によって容易に開発されるそのような様式、手段、技術および手順が含まれるが、それらに限定されない。

【0282】

明確にするため別個の実施形態の文脈で説明されている本発明の特定の特徴が、単一の実施形態に組み合わせて提供されることもできることは分かるであろう。逆に、簡潔にす

50

るため単一の実施形態で説明されている本発明の各種の特徴は別個にまたは適切なサブコンビネーションで、あるいは本発明の他の記載される実施形態において好適なように提供することもできる。種々の実施形態の文脈において記載される特定の特徴は、その実施形態がそれらの要素なしに動作不能である場合を除いては、それらの実施形態の不可欠な特徴であると見なされるべきではない。

【0283】

本明細書中上記に描かれるような、および、下記の請求項の節において特許請求されるような本発明の様々な実施形態および態様のそれぞれは、実験的裏付けが下記の実施例において見出される。

【実施例】

【0284】

次に下記の実施例が参照されるが、下記の実施例は、上記の説明と一緒に、本発明を非限定様式で例示する。

【0285】

本願で使用される用語と、本発明で利用される実験方法には、分子生化学、微生物学および組み換えDNAの技法が広く含まれている。これらの技術は文献に詳細に説明されている。例えば以下の諸文献を参照されたい：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Sambrookら、(1989)；「Current Protocols in Molecular Biology」I~II I巻、Ausubel, R. M. 編(1994)；Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、John Wiley and Sons、米国メリーランド州バルチモア(1989)；Perbal「A Practical Guide to Molecular Cloning」、John Wiley & Sons、米国ニューヨーク(1988)；Watsonら、「Recombinant DNA」Scientific American Books、米国ニューヨーク；Birrenら編「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」1~4巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press、米国ニューヨーク(1998)；米国特許の第4666828号、同第4683202号、同第4801531号、同第5192659号および同第5272057号に記載される方法；「Cell Biology: A Laboratory Handbook」I~III巻、Cellis, J. E. 編(1994)；「Current Protocols in Immunology」I~III巻、Coligan, J. E. 編(1994)；Stitesら編「Basic and Clinical Immunology」(第8版)、Appleton & Lange、米国コネティカット州ノーウォーク(1994)；MishellとShiigi編「Selected Methods in Cellular Immunology」、W. H. Freeman and Co.、米国ニューヨーク(1980)；利用可能な免疫アッセイ法は、特許と科学文献に広範囲にわたって記載されており、例えば：米国特許の第3791932号、同第3839153号、同第3850752号、同第3850578号、同第3853987号、同第3867517号、同第3879262号、同第3901654号、同第3935074号、同第3984533号、同第3996345号、同第4034074号、同第4098876号、同第4879219号、同第5011771号および同第5281521号；「Oligonucleotide Synthesis」Gait, M. J. 編(1984)；「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編(1985)；「Transcription and Translation」Hames, B. D. および Higgins S. J. 編(1984)；「Animal Cell Culture」Freshney, R. I. 編(1986)；「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press(1986)；「A Practical Guide to Molec

10

20

30

40

50

ular Cloning」Perbal, B. (1984) および「Methods in Enzymology」1~317巻、Academic Press; 「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」、Academic Press、米国カリフォルニア州サンディエゴ(1990); Marshakら、「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」CSHL Press (1996); これらの文献の全ては、あたかも本願に完全に記載されているように援用するものである。その他の一般的な文献は、本明細書を通じて提供される。それらの文献に記載の方法は当業技術界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。それらの文献に含まれるすべての情報は本願に援用するものである。

10

【0286】

実施例 1

ジスルフィド触媒 QSOX 1 は重要な基底膜成分の取り込みによって腫瘍細胞遊走を促進させる

材料および実験手順

細胞株および維持

WI-38 肺線維芽細胞 (Coriell) を、供給者によって推奨されるように、15% FBS、L-グルタミンおよび抗生物質が補充された最少必須培地 (MEM) において維持した。HFF 細胞および膀胱線維芽細胞を、10% FBS、L-グルタミンおよび抗生物質が補充された MEM において維持した。BxPC-3 上皮細胞および H460 上皮細胞を、10% FBS、L-グルタミンおよび抗生物質が補充された DMEM において維持した。

20

【0287】

siRNA トランスフェクション

QSOX 1 特異的 siRNA オリゴヌクレオチドおよびスクランブル型 siRNA オリゴヌクレオチドを製造者の説明書 (Dharmacon) に従って線維芽細胞にトランスフェクションした。簡単に記載すると、細胞をおよそ 75% のコンフルエンスで播種し、血清非含有 Opti-MEM 培地において 50 nM の siRNA および Dharmafect 1 トランスフェクション緩衝液と 6 時間インキュベーションした。インキュベーション後、トランスフェクション混合物を吸引し、10% FBS を含有する MEM を細胞に加えた。

30

【0288】

免疫蛍光

細胞を、所望されるコンフルエンスにまで 24 ウエルプレートにおいてガラスカバースリップ上で成長させた。細胞内染色のために、細胞を、RT で 30 分間、3.7% ホルムアルデヒドにより固定処理し、続いて、透過処理を 0.1% の Triton X-100 において 2 分間行い、その後、0.1% の Tween を含有するリン酸塩緩衝液生理的食塩水 (PBS) (PBST-T) において 3 回すすぎ洗浄した。その後、細胞を PBS-T における 5% BSA と 1 時間インキュベーションし、続いて、PBS での 5% BSA における一次抗体 (製造者によって別途指定される場合は除き、20 μg/ml) と RT で 1 時間、または、4 で一晩インキュベーションし、その後、PBS において洗浄し、PBST-T での 5% BSA における蛍光標識されている二次抗体と RT で 1 時間インキュベーションした。さらに 3 回洗浄した後、カバースリップを、細胞面を下側にしてガラススライド上の 5 μL 液滴の ProLong Gold 退色防止試薬 (Invitrogen) の上に置き、遮光して一晩乾燥させた。サンプルを DeltaVision 画像化システム (Applied Precision) で観察した。ECM タンパク質を標識するために、細胞およびその関連マトリックスを PBS-T における 5% BSA とインキュベーションし、一次抗体により標識した。その後、サンプルを 3.7% ホルムアルデヒドにより固定処理し、二次抗体により処理した。

40

50

【0289】

ECMの精製およびThioGlo染色

細胞培養物を24ウエル皿において成長させ、結果の節（本明細書中下記）および図の説明（本明細書中上記）に記載されるようにトランスフェクションした。細胞を20 mMのNH₄OHによる1分間の処理によつてはぎ取り、続いて、1 mM EDTA/PBS（pH 7.4）による6回の洗浄を行った。最後の洗浄の後で、陽性対照および陰性対照のECMサンプルを、37 で1時間、100 mMのDTT（1 mM EDTA/PBSにおいて）または100 mMのNEM（5%アセトニトリルにおける250 mMストック液から加えられる）によりそれぞれ処理した。その後、サンプルを、1 mM EDTA/PBSにより4回洗浄し、その後、6 μMのThioGlo試薬とRTで30分間（遮光して）インキュベーションした。反応を、2 μlの2 N HClを加えることによつて停止させ、放射を、ELISAプレートリーダーを使用して測定した（ex: 379 nm、em: 513 nm）。

10

【0290】

酸素消費アッセイ

クラーク型酸素電極（Hansatech Instruments Ltd.）を使用して、溶存酸素濃度における変化をスルフヒドリルオキシダーゼ活性の尺度としてモニターした。精製QSOX1を、50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH 7.5）、65 mM NaCl、1 mM EDTAにおいてアッセイした。反応を、ジチオスレイトール（DTT）を電極反応チャンバーにおいて5 mMの濃度に注入することによつて開始させた。細胞培養上清におけるスルフヒドリルオキシダーゼ活性を、5 mMのDTTを上清溶液に注入した後で同様にアッセイした。

20

【0291】

質量分析法による分析

ゲルフラグメントを50 mM重炭酸アンモニウムにおいて37 でプロテアゼにより処理した。ペプチド混合物を、80% CH₃CN、1% CF₃COOHを用いてゲルから抽出し、有機溶媒を真空遠心分離器において蒸発させた。得られたペプチド混合物を、質量分析法による分析に先立って80%ギ酸において再構成し、Milli-Q水により直ちに1:10に希釈した。タンデム質量分析法（LC-MS/MS）を、UltiMate 3000 Capillary/Nano LC System（LC Packings、Dionex）を使用して、社内で作製され、かつ、3 μmのReproSil-Pur C₁₈ AQ媒質（Ammerbuch-Entringen、ドイツ国）が充填された15 cmの逆相の噴霧用フューズドシリカ・キャピラリーカラム（内径、75 μm）を使用して行った。LCシステムを、陽イオンモードで運転され、かつ、ナノエレクトロスプレーイオン源を備えるLTQ Orbitrap（Thermo Fisher Scientific）と併せて使用した。ペプチドを5%アセトニトリルから65%アセトニトリルへの50分の勾配により分離した（緩衝液A: 5%アセトニトリル、0.1%ギ酸、0.005% TFA; 緩衝液B: 90%アセトニトリル、0.2%ギ酸、0.005% TFA）。サーベイMS走査を、60000の値に設定される分解能によりOrbitrapにおいて取得した。1走査あたり6個までの最も大きい強度のイオンをフラグメント化し、線形トラップにおいて分析した。ペプチドの分析のために、サーベイ走査をFTモードで記録し、続いて、6個の最も大きい強度のイオンのデータ依存的衝突誘起解離（CID）を線形イオントラップ（LTQ）において行った。生データファイルをSwissprotデータベースに対してMASCOT（Matrix Science、ロンドン、英国）により検索した。

30

40

【0292】

侵入アッセイ

線維芽細胞を、8.0 μmの細孔サイズの膜挿入物を有する24ウエルのBD BioCoatプレートの上部チャンバーに播種した。結果の節（本明細書中下記）および図の説明（本明細書中上記）に記載されるように細胞をトランスフェクションし、かつ、rQ

50

S O X 1を補充し、その後、細胞を4日間成長させて、コンフルエンスに到達させた。4日目に、 5×10^4 個の上皮細胞（製造者の説明書に従って細胞追跡色素C S F E（M o l e c u l a r P r o b e s）により事前に標識されたもの）を線維芽細胞の上に重層した。内側チャンバーを血清非含有M E Mで満たし、外側チャンバーを、10% F B Sを含有するM E Mで満たした。上皮細胞を、 37°C で24時間、膜を越えて遊走させた。非侵入細胞を膜の上部面から手でかき取り、捨て、下部面の侵入細胞を3.7%ホルムアルデヒドにおいて固定処理し、画像化し、定量化した。

【0293】

細胞接着アッセイ

線維芽細胞を24ウェルプレートにおいて成長させ、その後、結果の節および図の説明文に記載されるようにトランスフェクションし、かつ、r Q S O X 1を補充した。トランスフェクション後4日目に、線維芽細胞をP B Sにおける5% B S Aと1時間インキュベーションし、一組のサンプルに6抗体を補充した。P B S - Tによる洗浄の後、 10^5 個の上皮細胞（細胞追跡色素C S F Eにより事前に標識されたもの）を線維芽細胞の上に重層し、 37°C で1時間インキュベーションした。その後、プレートをプラスチックにより密封し、上下逆さにして $50 \times g$ で5分間遠心分離して、細胞を除いた。遠心分離後、プレートに付着したままであった細胞をトリプシン処理し、P B Sに再懸濁し、フローサイトメトリーによって計数した。

【0294】

老化染色

細胞を結果の節および図の説明文に記載されるようにトランスフェクションした。S A - G a l染色に先立って、細胞を、RTで15分間、0.5%グルタルアルデヒドにより固定処理し、続いて、P B S / M g C l ₂（p H 6.0）により3回洗浄した。その後、新鮮なX - g a l溶液を加え、細胞を遮光して 37°C で3時間インキュベーションした。その後、細胞をP B Sにより3回洗浄し、直ちに画像化した。

【0295】

走査型電子顕微鏡法

W I - 38細胞を、直径が13mmのガラスカバースリップの上で成長させた。細胞を、RTで1時間、0.1Mカコジル酸塩緩衝液（p H 7.2）、5mM C a C l ₂、1%スクロースにおける3%パラホルムアルデヒドおよび2%グルタルアルデヒドにより固定処理した。1%スクロースを含有する0.1Mカコジル酸塩緩衝液により3回（それぞれ5分）すすいだ後、細胞を、室温で1時間、0.1Mカコジル酸塩緩衝液（p H 7.2）、5mM C a C l ₂、1%スクロースにおける1%O s O ₄により処理した。その後、サンプルを0.1Mカコジル酸塩緩衝液により5回、水により5回洗浄し、1%タンニン酸と5分間インキュベーションし、再び、水により5回洗浄した。サンプルを1%酢酸ウラニルにおいて30分間インキュベーションし、再び、水により5回洗浄した。脱水するため、サンプルを、25%、50%、70%、96%および100%のエタノールにおいて順次、それぞれ5分間インキュベーションした。サンプルを、F E G - S E M L E O S u p r a 5 5電子顕微鏡を使用して画像化した。

【0296】

N F / C A F単離

N FおよびC A Fを、手術により切除された肺腫瘍から得た（C A F）か、または、同じ試料の健全な領域から得た（N F）。施設内審査委員会（I R B）によって要求されるように、署名入りの同意を患者から得た。組織を切り刻み、4型コラゲナーゼを含有するD M E Mにおいて絶えず振とうしながら 37°C で一晩インキュベーションした。その後、細胞をろ過し、20%のF B S、1mMのピルビン酸ナトリウム、2mMのL - グルタミン、非必須アミノ酸、抗生物質および60μMのβ -メルカプトエタノールを含有するD M E Mにおいて7~14日間にわたって置床し、その後、10%のF B Sを含有する培地に移した。線維芽細胞の同一性を、典型的な形態学、陽性のビメンチン染色および陰性のサイトケラチン染色によって確認した。細胞を小分けで凍結し、それぞれの実験の7日前

10

20

30

40

50

に解凍した。解凍後、線維芽細胞を70%のコンフルエンスにまで成長させ、その後、培地を対照培地またはH460馴化培地のどちらかにより置き換えた。細胞の採取およびRNA分析を48時間で行った。

【0297】

馴化培地

コンフルエントな肺上皮細胞(H460)および膵臓上皮細胞(BxPC-3)を培養プレートにおいて成長させた。馴化培地を5日後に集め、遠心分離して、破片を除いた。

【0298】

リアルタイム逆転写PCR分析

総RNAを、NuclioeSpinキット(Macherey Nagel、ドイツ国)を使用して抽出した。1マイクログラムのRNAを、モロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素およびランダムヘキサマープライマーを用いて逆転写した。定量的リアルタイムPCRを、ABI7300装置(Applied Biosystems)において、SYBR Green PCR Master Mixを使用して行った。プライマーを、Primer Expressソフトウェアを使用して設計し、発現レベルを同じサンプルにおけるGAPDHハウスキーピング遺伝子の発現レベルによって正規化した。

【0299】

組織学的免疫染色

乳ガン患者に由来するホルマリン固定組織を脱水し、パラフィンに包埋し、4μmで切片化した。スライドを60℃に1時間加熱し、キシレンにおけるワックス除去に供し、脱水した。内因性ペルオキシダーゼの阻害を3% H₂O₂/メタノールにおいて10分間行った。TBSにおいてすすいだ後、切片を、室温で1時間、QSOX1に対する精製抗体(1:50)とインキュベーションした。検出を、Super Picture POLY HRP Conjugate(Invitrogen)を用いて行った。簡単に記載すると、切片を、室温で30分間、POLY HRP Conjugateとインキュベーションした。抗体結合を基質色素原AECにより可視化した。切片をヘマトキシリンにより対比染色し、カバースリップに水性封入液(Glycer gel、Dako)と一緒に載せた。染色された切片を光学顕微鏡で調べ、分析した。

【0300】

マイクロアレイ分析

ラミニン転写物の定量化のために、WI-38細胞を、siCONTROL、siQSOX1、または、siQSOX1+rQSOX1のいずれかにより処理し、総RNAを、RNeasyミニキット(Qiagen)を使用して抽出した。RNAの質を、Bioanalyzer 2100プラットフォーム(Agilent)を使用して評価した。その後、サンプルを処理し、Affymetrix GeneChipシステムを製造者の説明書に従って使用してAffymetrix社のヒト2.0マイクロアレイに対してハイブリダイゼーションさせた。

【0301】

原子間力顕微鏡法

AFM測定を、コロイド状チップ(1μmの半径のホウケイ酸塩)および0.03N/mのカンチレバー(Novascan)を使用して、Nanoscope 4コントローラとともにBruker Bioscopeで行った。力-距離曲線を、サンプル上の走査を行うことなく、0.5Hzで行った。弾性率を、新しい曲線に対するヘルツモデル適合を使用して計算した。数十の力曲線を3つの対照サンプルおよび2つのQSOX1ノックダウンサンプルのそれぞれについて取得した。

【0302】

結果

活性なQSOX1が休止線維芽細胞から分泌される

培養された上皮細胞において一時的に発現されるQSOX1が、ゴルジ装置に局在化することが以前に示された[Chakravarti S.他(2007)、Bioch

10

20

30

40

50

em. J.、404、403~411]。ニューロンおよび神経内分泌腺における内因性 QSOX1 もまた、ゴルジ局在化することが以前に示唆された [Turry A. 他 (2004)、J. Endocrinol.、183、353~363]。本発明者らはポリクローナル抗体を惹起させ、内皮細胞および上皮細胞におけるゴルジへの内因性 QSOX1 の局在化を明らかにした (図 9A~図 9J)。サブコンフルエントな線維芽細胞において、QSOX1 がまた、ゴルジに見出された (図 1C~図 1J)。しかしながら、コンフルエンスに達したとき、線維芽細胞における細胞内染色パターンは変化し、分泌小胞への QSOX1 の移動に対応するようであった (図 9A~図 9J)。

【0303】

QSOX1 のレベルが、WI-38 線維芽細胞がコンフルエントになり、休止状態に入るにつれて、WI-38 線維芽細胞の成長培地において増大することが以前に示された (Coppock 他、2000、上掲)。WI-38 細胞は、QSOX1 が多く存在するが、そのパラログである QSOX2 は多く存在しない組織である肺に由来した。本発明者らは、排他的な QSOX1 転写、および、コンフルエントな線維芽細胞の培養培地へのタンパク質分泌を確認した (図 1K)。分泌された QSOX1 のレベルが時間とともに増大し (図 1L)、これは、酸素消費アッセイによって測定されるように、スルフヒドリルオキシダーゼ活性における増大と相関していた (図 1M)。コンフルエントな細胞の培養培地における QSOX1 活性は $40 \mu\text{M} \sim 50 \mu\text{M}$ の野生型組換え QSOX1 (rQSOX1) と同程度であった (図 9K)。QSOX1 の分泌は、様々な起源に由来するコンフルエントな線維芽細胞の一般的な現象であることが示された。特に、膵臓および肺から得られるガン関連線維芽細胞 (CAF)、正常な肺線維芽細胞、ならびに、ヒト包皮線維芽細胞が、QSOX1 を成長培地に分泌した (図 9L)。対照的に、試験された上皮細胞および内皮細胞は、QSOX1 を細胞内に発現するが、コンフルエンスに達した数日後においてさえ、この酵素を分泌しなかった (データは示されず)。

【0304】

線維芽細胞成長培地に分泌された QSOX1 のウエスタンブロットは SDS-PAGE による二重のバンドをおよそ $80 \text{kD} \sim 90 \text{kD}$ において一貫して示した (図 1L)。QSOX1 転写物のこれら 2 つの知られているスプライス変化体は、計算された分子量が、オリゴ糖修飾を含めておよそ 76kD である可溶性タンパク質と、予測されたカルボキシ末端の膜貫通部分を含有するおよそ 92kD のタンパク質とをコードする。ウエスタンブロットによって認められるこれら 2 つの QSOX1 種の源を求めるために、本発明者らは QSOX1 を培養上清から免疫沈殿させ、これら 2 つのバンドを液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) に供した (図 10A~図 10D)。下側バンドから回収されるペプチドは、両方のスプライス変化体に共通である領域にのみ由来した。しかしながら、上側バンドから回収されるいくつかのペプチドは、長い方のスプライス変化体に特有な領域に由来した。長い方のスプライス変化体の細胞質テール領域または膜貫通領域にわたるペプチドは一つも観測されなかった。これらの観測結果についての 1 つの可能な説明が、長い方のスプライス変化体はその膜貫通領域を伴って生合成され、可溶性の外部ドメインが、分泌経路において、または、細胞表面において翻訳後切断のときに取り除かれるということであった。

【0305】

細胞外 QSOX1 が線維芽細胞接着に要求される

QSOX1 を、小さい干渉性 RNA (siRNA) を使用して線維芽細胞から欠乏させた。QSOX1 特異的 siRNA によるトランスフェクションは QSOX1 の mRNA および分泌された酵素を検出可能レベル未満に低下させ、バックグラウンド速度への細胞外スルフヒドリルオキシダーゼ活性における対応する低下を引き起こした (図 11A)。QSOX1 の siRNA によりトランスフェクションされた線維芽細胞の免疫蛍光染色は、非常に少ない細胞 (およそ 5%) が細胞内タンパク質の検出可能レベルを保持することを示した。QSOX1 の欠乏がトランスフェクション後の少なくとも 4 日間にわたって維持された (図 11B)。

10

20

30

40

50

【0306】

線維芽細胞からのQSOX1欠乏の最も明白な影響が細胞数における低下であった(図2A~図2E)。トランスフェクション後4日において、QSOX1欠乏細胞のカウント数が対照細胞のおよそ50%であった。50nMのrQSOX1をトランスフェクション後24時間でQSOX1欠乏細胞の培養培地に加えることにより、細胞数の完全な回復もたらされた。対照的に、50nMの触媒不活性なrQSOX1(rQSOX1-AA)(アミノ末端のレドックス活性なシステイン(C70およびC73)がアラニンによって置換されたもの)(図2F)の添加は、影響が何らなかった。過酸化水素、すなわち、QSOX1媒介によるジスルフィド形成の副生成物が、正常な細胞増殖のために要求されるという可能性が、カタラーゼ(過酸化水素を酸素および水に不均化する酵素)による対照細胞の処理によって除外された。すなわち、検出可能な影響が認められなかった(データは示されず)。これらのデータにより、触媒活性な細胞外QSOX1の重要性、および、培養における線維芽細胞増殖のためのジスルフィド結合の形成が立証される。

10

【0307】

いくつかの状況が線維芽細胞におけるQSOX1欠乏後の低下した細胞数を引き起こし得るかもしれない。特に、細胞外QSOX1活性は細胞増殖を促進させる場合があり、あるいは、QSOX1の不足が、アポトーシス、休止または老化を誘導する場合がある。アネキシンV染色は、アポトーシスがQSOX1ノックダウン細胞においてわずかであることを示した(データは示されず)。QSOX1ノックダウンは、老化関連の α -ガラクトシダーゼ活性についてのX-gal染色によれば、細胞が老化することを引き起こさなかった(図11C~図11E)。さらに、siRNA処理後4日目におけるヨウ化プロピジウムによる染色は、QSOX1欠乏が細胞周期からの離脱を引き起こさないことを示唆した(データは示されず)。本発明者らは、細胞数における有意な違いがトランスフェクション後48時間までのQSOX1欠乏培養物と対照培養物との間に無いことに注目した。しかしながら、3日目から始まって、細胞数が分かれ始め、剥離細胞がQSOX1欠乏サンプルの培養培地に現れ始めた(図2G~図2H)。rQSOX1をトランスフェクション後1日目に線維芽細胞培養物に加えることにより、上記で記されるように、細胞数の回復もたらされることに加えて、それ以降での細胞剥離が妨げられた。QSOX1の欠乏は、「有糸分裂シェークオフ」技術において利用される有糸分裂細胞の低下した接着を悪化させる場合があり、その結果、単層からの細胞の喪失を、意図的な攪拌がない場合でさえもたらし得る。

20

30

【0308】

QSOX1欠乏が基底膜におけるラミニン集合欠陥を引き起こす

本発明者らは次に、細胞剥離を細胞外QSOX1の非存在下でもたらず分子的欠陥を特定しようとした。細胞外マトリックス(ECM)タンパク質が接着受容体のための主要な標的である。様々なECM成分についての転写物がQSOX1のmRNAと一緒にコンフルエントな線維芽細胞において増大することが以前に指摘された(Coppock他、1993、上掲)。本発明者らは、QSOX1がコラーゲンまたは他のECM成分におけるジスルフィド結合の形成のために要求されるならば、QSOX1の欠乏はECMにおける過剰な対形成していないシステインを生じさせることがあると推論した。実際、QSOX1欠乏の線維芽細胞から単離される細胞外マトリックスは、チオール特異的蛍光団のThioG101による標識化によって示されるように、反応性チオールのレベルを増大させた(図12A)。チオールレベルは大部分が、rQSOX1-AAの添加によってではなく、rQSOX1をsiRNAトランスフェクション後の培養培地に加えることによって回復した。これらのデータは、QSOX1が細胞外マトリックスのタンパク質の内部におけるジスルフィド形成を触媒するというを初めて示すものとなっている。

40

【0309】

WI-38線維芽細胞によって産生されるECM成分は、基底膜(BM)、すなわち、上皮および内皮の下側に位置する薄い線維層を構成する成分である。本発明者らは本明細書中下記では、培養されたWI-38細胞によって産生されるECMをBMとして示して

50

おり、だが、このマトリックスは、身体表面および腔に対してその生理学的状況から取り出される。BMの主要な構成要素には、コラーゲンIVおよびラミニン（これらは重合して、線維網目構造を形成する）、ならびに、パールカン、エンタクチンおよびアグリン（これらは、コラーゲンIVおよびラミニンの足場を架橋する）が含まれる。これらのBM構成要素のどれかがQSOX1の細胞外活性によって影響を受けるかを明らかにするために、免疫蛍光（IF）染色およびウエスタンブロットングを使用して、QSOX1特異的siRNAトランスフェクションの4日後の線維芽細胞に由来する細胞および培養培地をそれぞれ分析した。この様式で、本発明者らは、BMの形態学および組成における変化、同様にまた、BMに取り込むことができないことに起因する様々なタンパク質の可溶性型のレベルにおける変化をモニターした。有意な変化が、QSOX1欠乏のとき、ウエスタンブロットまたはIFによってコラーゲンIVからは何ら検出されなかった（図12B～図12Q）。しかしながら、ラミニン取り込みにおける大きな欠陥がQSOX1の非存在下で認められた。QSOX1欠乏後4日で、可溶性ラミニンを培養培地においてウエスタンブロットによって検出することができ、細胞外ラミニンIF染色における74%の低下が、対照細胞と比較して測定された（図3A～図3Lおよび図4A）。QSOX1欠乏後でのラミニンにおける変化が、rQSOX1-AAの添加によってではなく、siRNAトランスフェクション後の培養培地へのrQSOX1の外因的な添加によって完全に消失された。このことは、スルフヒドリルオキシダーゼ活性がBMへのラミニン取り込みに要求されることを示している。ラミニンの総量における低下が、QSOX1ノックダウンのときの総細胞数における低下を考慮して予想され得るかもしれないが、本発明者らは、低下したラミニンレベルを、等しい数の細胞が画像化されたときでさえ見出した（図13A）。加えて、細胞剥離がトランスフェクション後3日目から始まり、これに対して、マトリックスにおける低下したラミニンが、既に48時間で検出することができ（図13A）、また、細胞外タンパク質の総含有量が全般的に見て、対照細胞とQSOX1欠乏細胞との間で等しかった（図13F）。最後に、そして、最も重要なことであるが、可溶性ラミニンが、QSOX1の非存在下でのみ、培養培地において検出された（図4B）。このことは、量におけるわずかな変化というよりは、むしろ、組立てにおける欠陥を示している。

10

20

30

40

50

【0310】

基底膜内へのラミニンの集合における細胞外QSOX1の役割をさらに細かく分析するために、本発明者らは、QSOX1欠乏細胞へのrQSOX1添加の濃度および時間依存性を評価した（図13M）。本発明者らは、トランスフェクション後24時間で加えられる50nMのrQSOX1により、siRNAによるQSOX1欠乏によって引き起こされる細胞外欠陥（例えば、低下した細胞接着およびBMへの不十分なラミニン取り込みなど）が修復されることを見出した。より高いrQSOX1濃度（すなわち、125nM）では、細胞数またはラミニン集合を、対照細胞のレベルまたは50nMのrQSOX1で処理されたQSOX1ノックダウン細胞のレベルを超えて増大させなかった。このことは、QSOX1活性が50nM超では制限的ではなかったことを示している。対照的に、25nMのrQSOX1は、QSOX1欠乏の影響を完全に取り消すためには不十分であった。50nMのrQSOX1が、トランスフェクション後24時間でなく、トランスフェクション後72時間で加えられたとき、QSOX1欠乏の影響は取り消されなかった（示されず）。外因的な酵素添加のこの時間依存性は、QSOX1およびラミニンの分泌が時間的に相関するにちがいないこと、または、ラミニンのBM取り込みのための好機が失われていることを示唆する。

【0311】

ラミニン集合の攪乱はまた、ラミニン結合タンパク質に影響を及ぼすであろうことが予想される。基底膜は、パールカン、エンタクチン、アグリン、ネトリンおよびフィブロネクチンを含めて様々なラミニン相互作用タンパク質に富む。これらのタンパク質はコラーゲンIVの網状組織とも相互作用し、また、細胞表面受容体とも相互作用する。本発明者らは、可溶性のパールカン、エンタクチン、アグリンおよびフィブロネクチンを、対照細

胞の培地の場合よりも大きな度合いで Q S O X 1 欠乏線維芽細胞の培養培地において認められた (図 1 2 C ~ 図 1 2 E) 。しかしながら、これらのタンパク質のそれぞれにおける最大でも小さい変化が、Q S O X 1 欠乏細胞の B M において I F によって検出された (図 1 2 G ~ 図 1 2 I 、 図 1 2 K ~ 図 1 2 M) 。これらのデータは、Q S O X 1 の非存在下でのラミニン網状組織における欠陥、および、ラミニン相互作用タンパク質に対する、結果として生じる影響と一致しており、しかし、コラーゲン I V または細胞表面タンパク質との相互作用が、それらの B M 取り込みを大きな程度に保つために十分であることを示唆する。

【 0 3 1 2 】

Q S O X 1 が特定のラミニンイソ型に影響を及ぼす

ラミニンが、 および として知られている 3 つの鎖からなる十字形状のヘテロ三量体として細胞から分泌される。5 つの サブユニットイソ型、4 つの イソ型および 3 つの イソ型がヒトでは知られており、16 通りの異なる鎖組合せが種々の組織および発達段階において発現され、今日までに発見されている。最新の命名法によれば、これらのラミニンタイプはそれらの鎖組成によって指定され、例えば、ラミニン - 1 1 1 は、 1 鎖、 1 鎖および 1 鎖を含有する。上記のラミニンにおける変化を検出するために使用される抗体が、ラミニン三量体の高度に保存された抗原決定基であるフラグメント P 1 に対してポリクローナルであった。したがって、P 1 抗体は多数のラミニンイソ型を認識する。それにもかかわらず、P 1 についての I F 染色では、コンフルエントな W I - 3 8 細胞によって産生される B M における多数の異なるラミニンマトリックスの共存が暗示された。本発明者らは、繊細なラミニンマトリックスが対照サンプルおよび Q S O X 1 ノックダウンサンプルの両方において認められることに注目した。しかしながら、標準的な I F 染色手順のもとでは大きい無定形のパッチとして現れたが (図 1 3 G ~ 図 1 3 H 、 図 1 3 K ~ 図 1 3 L) 、さらなるラミニン集団が対照細胞においてのみ見出された。同じ固定処理および染色プロトコルのもとでのこれら 2 つのラミニン集団の異なる出現は、2 つの質的に異なるタイプのラミニンが存在し、これらの一方のみが Q S O X 1 の存在に対して敏感であることを示していた。染色プロトコルのその後の精緻化 (上記の「材料および方法の節」を参照のこと) により、Q S O X 1 依存的なラミニン網状組織の網目様外観が、図 3 A ~ 図 3 L における画像などの画像をもたらすように保たれた。

【 0 3 1 3 】

W I - 3 8 線維芽細胞において発現されるラミニンイソ型に関する情報が対照細胞および Q S O X 1 欠乏細胞の R N A マイクロアレイ分析から得られた。本発明者らは、ラミニン - 4 1 1 、ラミニン - 4 2 1 、ラミニン - 2 2 1 およびラミニン - 2 1 1 が潜在的にはこれらの細胞において最も豊富に発現されること、また、 1 鎖および 2 鎖についての転写物におけるわずかな増大を除いては、Q S O X 1 欠乏はラミニン鎖の m R N A レベルを有意に変化させないことを見出した (表 2 (下記)) 。特異的抗体による I F 染色では、Q S O X 1 欠乏のときの B M でのラミニンの 4 鎖における大きな低下が明らかにされ、これに対して、 2 鎖は変化していなかった (図 3 M ~ 図 3 R および 図 4 C) 。したがって、ラミニン - 2 2 1 またはラミニン - 2 1 1 ではなく、ラミニン - 4 1 1 またはラミニン - 4 2 1 の取り込みが、細胞外 Q S O X 1 によって影響されるまさにその事象である。さらに、ラミニン - 4 1 1 またはラミニン - 4 2 1 は、上記で記載されるように、標準的な I F 染色手順を使用して認められる大きいラミニンパッチに対応する可能性が高い。 2 鎖ラミニンに富む B M の領域は同様に、 4 鎖ラミニンに富む傾向があり、しかし、 4 含有マトリックスは、 2 含有ラミニンに乏しい領域の中に広がっていた (図 3 M ~ 図 3 R) 。

【 0 3 1 4 】

表2:ラミニンイソ型の発現レベル

遺伝子	siQ対siC	siQ+r対siC	siQ+r対siQ	siCにおけるレベル
LAMA1	1.6	1.5	-1.1	6.7
LAMA2	1.5	2.5	1.7	7.8
LAMA3	ND	ND	ND	ND
LAMA4	-1.0	-1.2	-1.2	10.3
LAMA5	ND	ND	ND	ND
LAMB1	1.1	-1.0	-1.1	10.8
LAMB2	-1.3	-1.3	-1.1	8.1
LAMB3	ND	ND	ND	ND
LAMB4	ND	ND	ND	ND
LAMC1	1.1	1.0	-1.0	10.7
LAMC2	ND	ND	ND	ND
LAMC3	ND	ND	ND	ND

10

r Q S O X 1 による補充を伴って、または伴うことなく、対照 s i R N A または Q S O X 1 特異的 s i R N A により処理される W I - 3 8 線維芽細胞における m R N A 転写物レベルを、マイクロアレイ分析を使用して求めた。様々なサンプル対の間における倍数変化、および、対照 W I - 3 8 細胞における正規化されたレベル（選択された一組の参照 m R N A に対して正規化されたレベル）が示された。

20

【0315】

Q S O X 1 依存性ラミニンマトリックスの超微細構造に対する洞察が、走査型電子顕微鏡法（S E M）を使用して得られた。S E M により、クラスター化したフィリグリー様物質が、対照 W I - 3 8 細胞の細胞外環境に多く存在することが明らかにされた（図 5 A ~ 図 5 F）。この外観を有する物質が、Q S O X 1 ノックダウン細胞との関連では検出されなかった。まとめると、S E M および I F を使用して行われた観測により、Q S O X 1 が、特有の超微細構造を呈示する特定のラミニンイソ型のみ適切な B M 組立てのために要求されることが示唆された。さらに、染色プロトコルに対する感受性により、Q S O X 1 依存的ラミニン網目は自然界では、Q S O X 1 活性と無関係に B M に堆積するそのようなラミニン網状組織よりも強くは細胞表面または他の B M 成分に付着しないことが示唆される。

30

【0316】

Q S O X が腫瘍上皮細胞遊走に要求される

様々なラミニンイソ型が腫瘍上皮細胞遊走を転移時において促進させ、支援する。Q S O X 1 およびラミニン 4 鎖（これは L A M A 4 遺伝子によってコードされる）の両方についての転写物が、正常な乳房線維芽細胞と比較して、浸襲性乳房ガン腫を取り囲む線維芽細胞において著しく増大することが以前に見出された [F i n a k G . 他 (2 0 0 8) 、 N a t u r e M e d . 、 1 4 、 5 1 8 ~ 5 2 7] 。 今回のデータは、4 含有ラミニンの集合における Q S O X 1 についての特異的な要求を明らかにしており、ガン関連間質における L A M A 4 / Q S O X 1 同時誘導の機構的結果を示唆する。Q S O X 1 の細胞外活性が腫瘍細胞と周囲の間質との相互作用に影響を及ぼすかどうかを調べるために、本発明者らは器官型侵入アッセイを利用した。このアッセイでは、H 4 6 0 転移性肺上皮細胞（蛍光性の細胞質色素により事前に標識されたもの）が、W I - 3 8 肺線維芽細胞およびその関連 B M の事前に形成された層を通して遊走する能力がモニターされた（図 5 G）。上皮細胞遊走が、Q S O X 1 が線維芽細胞層形成期間中に欠乏させられたときにはおよそ 6 0 % 弱まった（図 6 A ~ 図 6 O）。Q S O X 1 欠乏線維芽細胞に外因性 r Q S O X 1 が補充されたとき、腫瘍細胞遊走が回復した。しかしながら、r Q S O X 1 - A A の添加は遊走を支援しなかった。類似する結果が、臍臓の線維芽細胞および上皮細胞を使用して

40

50

得られた。このことは、QSOX1欠乏時の遊走阻害の一般性を示している(図14)。類似する結果が、対にされた臍臓の線維芽細胞および上皮細胞について得られた(図6R~図6S)。このことは、遊走促進(pro-migratory)ECMの構築におけるQSOX1触媒活性の一般性を示している。QSOX1欠乏線維芽細胞単層は対照よりも弾力的であり(図6T)、このことは、より大きい浸透性を示唆したにもかかわらず、それらは遊走を支援することができないことは、インテグリン媒介接着、すなわち、腫瘍転移のための必要条件におけるラミニンの知られている役割と一致している。

【0317】

QSOX1が腫瘍上皮細胞に直接に作用して、それらの遊走を促進させるという可能性を除外するために、遊走アッセイを線維芽細胞層の非存在下で行った。Matrigel被覆の多孔質膜を通るH460の遊走を培養培地におけるrQSOX1の存在下または非存在下で定量化した。rQSOX1の添加は検出可能な影響を何ら有しておらず、このことから、QSOX1は腫瘍細胞遊走を直接に促進させていないことが明らかにされた。加えて、QSOX1を欠く線維芽細胞層における腫瘍細胞の不良な遊走が上皮細胞の低下した生存性に起因するという可能性を除外するために、H460細胞をガラスカバースリップ上のWI-38線維芽細胞に重層した。細胞生存性トレーサーの取り込みにおける差が、対照対QSOX1欠乏線維芽細胞におけるH460細胞の間で何ら検出されなかった(データは示されず)。まとめると、これらのデータは、QSOX1の細胞外活性が実際に、線維芽細胞により分泌されるBMを通る腫瘍上皮細胞の遊走を、間質層に対するその影響を介して促進させるという結論を裏付けている。

10

20

【0318】

上皮細胞が遊走期間中のBMへの確固たる接着のためにQSOX1を要求する

線維芽細胞接着における欠陥が、上記で記載されるようなQSOX1欠損の単一培養物における攪乱されたラミニン集合と相関した。QSOX1欠乏線維芽細胞層を通して遊走する上皮細胞の損なわれた能力もまた、接着欠陥に起因するかどうかを調べるために、本発明者らは、遠心分離を使用して上皮細胞接着を評価した。上皮細胞を、事前に形成された線維芽細胞層の上に置き、接着力を、制御された力を加えることによって比較した。5分間にわたる50gの加速度に供されたとき、H460上皮細胞が対照細胞から(4.5%の剥離)よりも容易にQSOX1欠乏WI-38線維芽細胞から剥離した(44.9%の剥離)。rQSOX1をQSOX1欠乏線維芽細胞の成長培地に加えた場合、その後でその上に重層された上皮細胞の接着が回復し、これに対して、rQSOX1-AAを加えた場合、上皮細胞の接着は回復しなかった。本発明者らは、QSOX1の細胞外触媒活性が、腫瘍細胞が有効に接着する間質層の形成を促進させ、腫瘍細胞遊走の促進がその結果として生じると結論する。

30

【0319】

様々なラミニンが、鎖および鎖のヘテロ二量体であって、細胞-細胞および細胞-マトリックスの接着の基本的な媒介因子として働く、細胞表面の様々なインテグリンによって認識される。インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ が上皮細胞表面におけるラミニンのための主要な受容体であり、だが、 $\alpha 6 \beta 4$ および $\alpha 3 \beta 1$ もまた、ラミニンと結合することが以前に示された。QSOX1ノックダウンが実際に細胞接着および細胞遊走をラミニン欠損のために低下させるならば、本発明者らは、ラミニン受容体の直接の阻止が同程度の影響を有すると予想するであろう。 $\alpha 6$ 阻止抗体により1時間にわたって前処理された転移性上皮細胞は、QSOX1ノックダウン時に観測されるのと同様な程度に、線維芽細胞およびそれらの関連BMの層を通る低下した遊走を示した(図6P)。線維芽細胞分泌マトリックスに対する、抗 $\alpha 6$ 処理された上皮細胞の低下した接着もまた、遠心分離細胞接着アッセイにおいて明らかにされた(図6Q)。これらのデータは、QSOX1ノックダウン時に観測される接着および遊走の欠陥の根底にある少なくなったラミニン-インテグリン相互作用と一致している。

40

【0320】

腫瘍上皮細胞と線維芽細胞との間でのクロストークがQSOX1分泌を誘導し、遊走を促

50

進させる

インビボでは、器官および血管を取り囲むBMに埋め込まれる線維芽細胞は、様々なシグナルを、分泌された因子を介して上皮および内皮と交換する。今回のデータは、QSOX1の分泌が、細胞接着、基底膜組立および細胞遊走（これらのすべてが腫瘍細胞の増殖および転移を支援し得る）を促進させることを示す。上皮細胞は、QSOX1を分泌することが知られていないので、本発明者らは次に、腫瘍細胞が隣接の線維芽細胞を動員して、QSOX1の発現および分泌を誘導するかどうかを調べた。この目的のために、サブコンフルエントなWI-38細胞（これは典型的には、より低いレベルのQSOX1を発現し、QSOX1を検出可能なほどに分泌しない）を、H460肺ガン細胞株に由来する馴化培地とともに2日間培養した。馴化培地への暴露により、線維芽細胞からのQSOX1の分泌が高まった（図7A）。この発見は、臍臓起源の線維芽細胞および上皮腫瘍細胞を用いて再現された（図7A）。加えて、腫瘍細胞馴化培地との線維芽細胞のインキュベーションは、その結果としてのマトリックス横断の上皮細胞遊走を通常の培地とのインキュベーションよりも大きく促進させた（データは示されず）。

10

【0321】

ガン患者由来の線維芽細胞のエクスピボ分析

上記の研究において、本発明者らは、細胞外QSOX1の役割を解明するために、QSOX1の発現を培養細胞においてノックダウンさせ、その後、培養培地に組換え酵素を与えた。これらの攪乱を介して、本発明者らは、QSOX1がBMにおけるラミニン集合に寄与し、また、細胞接着および細胞遊走に寄与することを発見した。腫瘍の進行および転移発達におけるQSOX1の役割をさらに探るために、本発明者らは、エクスピボ実験系、すなわち、肺ガン患者から得られる初代線維芽細胞に向かった。外植された線維芽細胞をガン関連組織（CAF、ガン関連線維芽細胞）から、または、隣接する健康な組織（NF、正常な線維芽細胞）から精製し、上記の「材料および実験手順」節に記載されるように維持した。1名の患者から得られる細胞のRNAマイクロアレイ分析では、CAFサンプルにおけるQSOX1転写がNFサンプルの場合よりも大きく、両方の細胞タイプが、増大するQSOX1転写レベルによって腫瘍由来の馴化培地とのインキュベーションにตอบสนองすることが示された（データは示されず）。さらに3名の患者についてのリアルタイムPCR分析では、CAFが一貫して、NFよりも大きいレベルのQSOX1を発現することが示された（図7B）。これらのエクスピボ線維芽細胞のウエスタンブロット分析では、QSOX1の分泌が転写と相関することが示された；CAFはNFよりも多くのQSOX1を分泌し、NFは、腫瘍の馴化培地とのインキュベーションの後での高まった分泌を示した。

20

30

【0322】

乳ガン患者から取り出された腫瘍切片の免疫組織化学的染色により、エクスピボ線維芽細胞から得られる結論が確認された。最も顕著なQSOX1染色が腫瘍の上皮細胞において明白であったが、腫瘍に隣接する線維芽細胞は、成長部からより離れた線維芽細胞よりも強いQSOX1染色を示した（図7C～図7D）。

【0323】

細胞外QSOX1の阻害によるBM組立および腫瘍細胞遊走の制御

今回の発見は、QSOX1の阻害が、BM組成を制御し、それにより、腫瘍の微小環境を制御するための強力な戦略となるかもしれないことを示唆する。したがって、本発明者らは、QSOX1に対する様々な阻害性モノクローナル抗体を開発した（本明細書中下記の実施例2を参照のこと）。これらの抗体が、細胞がコンフルエンスに近づくにつれてWI-38線維芽細胞の成長培地に与えられたとき、より少ない細胞数が、非処理の細胞または対照抗体により処理された細胞と比較して、4日後の培養単層において認められた（図8A～図8K）。さらに、ラミニン4鎖の劇的に減少した染色が、（下記の実施例2において記載されるように）QSOX1モノクローナル抗体の存在下で成長させた細胞によって産生されるBMにおいて認められた。最後に、上記で記載されるような、QSOX1のsiRNAにより処理された細胞に対して行われるタイプの器官型侵入アッセイでは

40

50

、線維芽細胞層を通る腫瘍上皮細胞遊走における大きな低下が、線維芽細胞層が Q S O X 1 阻害剤の存在下で生成されたときに示された。まとめると、これらの結果は、Q S O X 1 酵素を発現し、分泌する細胞によって産生される Q S O X 1 の阻害を使用して、B M の組成および機能性を調節することができることを示す。

【 0 3 2 4 】

実施例 2

ジスルフィド触媒 Q S O X 1 を標的とする阻害性抗体は、ジチオール/ジスルフィド中継における最初の工程を阻止することによって細胞外マトリックス形成を攪乱する

材料および実験手順

プラスミド構築

抗体産生を誘発するために使用される組換え H s Q S O X 1 は以前に記載された [A l o n 他 (2 0 1 2) 、 N a t u r e 、 4 8 8 、 4 1 4 ~ 4 1 8] 。 E . c o l i i におけるタンパク質産生のためにコドン最適化された s c F v および H s Q S O X 1 の合成遺伝子 (G e n e s c r i p t) を p E T - 1 5 b ベクター (N o v a g e n) の N d e I 部位と B a m H I 部位との間にクローン化した。アミノ末端およびカルボキシ末端の H s Q S O X 1 フラグメントの構築は以前に記載された [A l o n 他 (2 0 1 2) 、 N a t u r e 、 4 8 8 、 4 1 4 ~ 4 1 8 、 および、 A l o n 他 (2 0 1 0) 、 F E B S L e t t 、 5 8 4 、 1 5 2 1 ~ 1 5 2 5] 。

【 0 3 2 5 】

H s Q S O X 1 ₃₃₋₅₄₆

ヒト腎臓 mRNA に由来する H s Q S O X 1 イソ型 b の c D N A クローン (I D 4 4 4 7 6 6 6) をベクター p C M V ・ S P O R T 6 において I n v i t r o g e n から得た。所望される構築物を、シグナル配列を取り除き、かつ、N d e I 制限部位を取り込む N ' 端側フォワードプライマー (配列番号 3 9) と、B a m H I 部位が続く停止コドンを取り込む C ' 端側リバースプライマー (配列番号 4 0) とを用いる P C R によって増幅した。

【 0 3 2 6 】

P C R 生成物および p E T 1 5 b 発現ベクターを N d e I および B a m H I により制限した。ベクターをさらに子ウシ腸アルカリホスファターゼ (C I P) により処理して、5 ' 側の隣接するリン酸を除き、かつ、ベクターの再連結を防止した。H i s ₆ タグおよび トロンピン切断部位を、タンパク質に直接つながれる H i s ₆ タグにより置き換えた。この改変を、N c o I および N d e I による制限、続いて C I P によって行った。N c o I および N d e I の制限部位と適合可能な付着末端部位をもたらす隣接ヌクレオチドを伴う H i s ₆ をコードするオリゴヌクレオチドを煮沸し、アニーリングさせた。これらのオリゴヌクレオチドは制限されるのではなく、むしろ、酵素による制限を模倣するために設計されたので、リン酸基をアニーリング後に酵素により付加し、その後、プライマーをベクターに連結した。

【 0 3 2 7 】

最終的な発現ベクターは、配列番号 6 に示される配列をコードした。

【 0 3 2 8 】

組換え H s Q S O X 1 の発現および精製

マウスに注入される H s Q S O X 1 を以前に記載されるように発現させ、精製した [A l o n 他 (2 0 1 2) 、 N a t u r e 、 4 8 8 、 4 1 4 ~ 4 1 8] 。他の目的のために使用される H s Q S O X 1 を同様に発現させ、精製し、そのアミノ末端の H i s ₆ タグのみを N i - N T A カラム (G E H e a l t h c a r e) での精製の後で切断した。溶出された酵素を、P D - 1 0 脱塩カラム (G E H e a l t h c a r e) を使用して、2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 4) 、 1 0 0 m M N a C l 、 2 0 m M イミダゾールに交換した。トロンピン (1 0 ユニット / m g タンパク質) を加え、切断反応のために室温で一晩インキュベーションした。P M S F を 1 m M に加えてトロンピンを阻害し、タンパク質を N i - N T A カラムに再び加えた。さらなる精製を、2 0 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 7 . 5) 、 2 0 0 m M N a C l 、 0 . 5 m M E D T A においてサイズ

10

20

30

40

50

排除クロマトグラフィーによって行った。

【0329】

アミノ末端およびカルボキシ末端のHsQSOX1フラグメントの発現および精製を以前の記載のように行った[Alon他(2012)、Nature、488、414~418、および、Alon他(2010)、FEBS Lett、584、1521~1525]。

【0330】

マウス抗HsQSOX1モノクローナル抗体の作製

ハイブリドーマを以前に記載されるようなKohler-Milstein法によって作製した[Kohler G.およびMilstein C.(1974)、Nature、256、495~497]。5匹のBALB/cマウス(12週齢)を、3週間間隔で4回、組換えHsQSOX1および完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories)の乳濁液により免疫化した。選択されたマウスからの脾臓細胞を、以前に記載されるようにポリエチレングリコールを使用してNSO骨髓腫細胞と融合した[Galfre G.他(1977)、Nature、266、550~552]。ハイブリドーマ細胞をHAT培地によって選択した。細胞の上清をHsQSOX1の結合および阻害についてスクリーニングした(下記を参照のこと)。MAb492.1を、miniPERMバイオリアクター(Sarstedt)を血清非含有培地(DCCM)において用いて大規模で産生させた。

【0331】

モノクローナル抗体の精製

血清を20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7)に対して10000のMWカットオフメンブラン(Thermo)により透析し、プロテインGカラム(GE Healthcare)に負荷した。抗体を100mMグリシン緩衝液(pH3)によりカラムから溶出し、10%の1M Tris緩衝液(pH8)により直ちに中和した。

【0332】

ELISA結合アッセイ

96ウエルプレート(Nunc)を、100μLの5μg/mlの組換えHsQSOX1により、または、対照として、0.1% tweenを含有するリン酸塩緩衝液生理的食塩水(PBS-T)における5%BSAにより37℃で1時間にわたって被覆した。ウエルを、RTで1時間、PBS-Tにおける5%BSAにより遮断処理した。種々のマウス抗HsQSOX1クローンおよびマウス抗HsQSOX1サブクローンを、RTで1時間、ウエルに加えた。ウエルを300μLのPBS-Tにより3回洗浄した。5%BSAにおける、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲート化されたポリクローナルのヤギ抗マウス抗体を1:2500の希釈で加え、RTで30分間インキュベーションした。ウエルを300μLのPBS-Tにより3回洗浄した。吸光度を、100μLの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Millipore)を加えた後直ちにマイクロプレートリーダー(TECAN)で630nmにおいて読み取った。

【0333】

HsQSOX1阻害アッセイ

100μLの体積の反応を96ウエルプレート(Nunc)で行った。還元および変性されたRNaseA(Sigma)をモデル基質として使用し、下記のように調製した。10mgのRNaseを、20mMリン酸塩緩衝液(pH6.5)、6M GuHClおよび100mM DTTの1mlに溶解し、37℃で1時間インキュベーションした。タンパク質をDDWにより平衡化されるPD-10カラム(GE Healthcare)で脱塩し、そのチオール含有量を412nmにおいてDTNB吸光度によって求めた。50nMの組換えHsQSOX1および様々な濃度のモノクローナル抗体クローンをRTで30分間インキュベーションした。反応を200μMのRNaseチオールの添加によって開始させ、1mMのDTNBにより25分後に停止させた。吸光度をマイクロプレートリーダーで405nmにおいて測定した。

10

20

30

40

50

【0334】

可変領域の配列決定

総RNAを、RNeasyミニキット(Qiagen)を使用しておよそ 11×10^6 個の抗HsQSOX1ハイブリドーマ細胞から抽出した。500ngの総RNAを、ポリdTプライマーおよび20ユニットのモロニーマウス白血球ウイルス逆転写酵素を使用することによって第1鎖cDNAに逆転写した。軽鎖の可変領域を、以前に記載されるような縮重プライマーを使用して増幅し[Benhar I. およびReiter, Y. (2002)、Curr. Protoc. Immunol.、第10章、ユニット10.19B]、重鎖の可変領域を、以前に記載されるような、マウスscFvレパートリークローニングのための最適化プライマーを使用して増幅した[Zhou H. 他(1994)、Nuc. Acids Res.、22、888~889]。およそ300bpのPCR生成物を、HiYield Gel/PCR DNAフラグメント抽出キット(RBC Bioscience)を用いてゲル抽出し、pGEM-T easyベクター(Promega)にクローン化した。挿入物を、T7プライマーおよびSP6プライマーを使用して配列決定し、IMG Tデータベースによって分析した。配列をタンデム質量分析法(LC-MS/MS)によって確認した[Alon 他(2012)、Nature、488、414~418]。

10

【0335】

分析的サイズ排除クロマトグラフィー

100 μ Lの20 μ M HsQSOX1、そのフラグメントまたはMAb492.1を、20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)、200mM NaClおよび1mM EDTAにより平衡化されるスーパーデックス200カラム(GE HealthCare)に1ml/分の流速で負荷した。HsQSOX1またはそのフラグメントと、MAb492.1との複合体(200 μ L)を、RTでの30分間の共インキュベーションの後で注入した。

20

【0336】

scFvの発現、精製およびリフォールディング

scFv492.1を、100 μ g/mlのアンプシリンおよび30 μ g/mlのクロラムフェニコールが補充されるLB培地で成長させたBL21(DE3)plysSE.coli株において産生させた。形質転換された細胞を37 で成長させ、誘導を、細胞が595nmにおいて0.5の光学密度に達したとき、0.5mMの濃度へのIPTGの添加によって行った。誘導後、細胞を25 で一晩成長させた。細胞を4000rpmでの30分間の遠心分離によって採取した。細胞ペレットを、プロテアーゼ阻害剤が補充される20mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)、500mM NaClおよび20mMイミダゾールに懸濁した。細胞溶解物を40000xgで1時間遠心分離した。ペレットを、50mM Tris緩衝液(pH8)、100mM NaCl、1mM EDTAおよび0.5% triton X-100に溶解し、30秒間、3回、超音波処理し、再び10分間遠心分離した。上清を捨て、超音波処理および遠心分離の手順を3回繰り返した(ただし、最後は、triton X-100を用いなかった)。ペレットを、50mM Tris緩衝液(pH7.8)、6M GuHCl、10mM -メルカプトエタノールに4 で一晩溶解した。溶解されたscFvを変性条件(6M GuHCl)においてNi-NTAカラムで精製し、pH6.9とpH3.8との間でのpH勾配を使用して溶出した。リフォールディングを以前の記載のように行った[Kouhei, T. 他(1998)、J. Immunol. Methods、219、119~129]。

30

40

【0337】

阻害定数の決定

クラーク型酸素電極(Hansatech Instruments)を使用して、溶存酸素濃度における変化をHsQSOX1活性の尺度としてモニターした。25nMのHsQSOX1および様々な濃度(1~250nM)の精製MAb492.1を、50mMリン酸カリウム緩衝液(pH7.5)、65mM NaCl、1mM EDTAにおいて

50

アッセイした。反応を、ジチオスレイトール (DTT) を電極反応チャンバーにおいて 200 μ M の濃度に注入することによって開始させた。測定を種々の MA b 492 . 1 濃度について行い、初期傾きを計算した。DTT および MA b 492 . 1 の存在に起因する酸素濃度におけるバックグラウンド低下を 3 回測定し、平均化し、初期傾きから差し引いて、様々な MA b 492 . 1 濃度における H s Q S O X 1 活性の速度を得た。阻害剤の存在下および非存在下における H s Q S O X 1 の初速度の比率を阻害剤濃度の関数としてプロットした。得られた曲線を、強固に結合する阻害剤についての K_i を得るために、以前に記載されるような下記の式に対して適合させた [Morrison J . F . (1969)、Biophys . Biochem . Acta、185、269 ~ 286 ; Bieth J . G . (1995)、Methods in Enzymology、248、59 ~ 84] :

10

$$\frac{v_i}{v_0} = \frac{1}{2[E_0]} \left(([E_0] - [I_0] - K_i) + \sqrt{([I_0] + K_i - [E_0])^2 + 4K_i[E_0]} \right)$$

【0338】

式中、 v_0 は MA b 492 . 1 の非存在下における反応の速度であり、 v_i は種々の MA b 492 . 1 濃度の存在下における速度であり、 $[E_0]$ は総酵素濃度 (25 nM) であり、 $[I_0]$ は総 MA b 492 . 1 濃度であり、 K_i が、決定されることになる阻害定数である。

20

【0339】

s c F v 492 . 1 の阻害定数を、古典的競合阻害のための下記の式を使用して、r d R N a s e の酸化に基づく比色アッセイによって得られる $I C_{50}$ 値から計算した： $K_i = I C_{50} / (1 + [S]_0 / K_m)$ 。

【0340】

式中、 $[S]_0$ は初期基質濃度であり、 K_m は r d R N a s e についての H s Q S O X 1 のミカエリス定数であり、この場合には $320 \pm 35 \mu$ m である。

【0341】

MA b 492 . 1 F a b - H s Q S O X 1 T_r_x 複合体の精製および結晶化

PBS において 1 . 5 mg / ml に濃縮された精製 MA b 492 . 1 を、活性化パパインを 1 : 20 のパパイん : MA b 492 . 1 の比率で使用して 37 で消化した。パパイん (Sigma) を、PBS、20 mM EDTA に溶解し、20 mM シス테인により活性化した。消化を、ロイペプチンを阻害剤として使用して 4 時間後に停止させ、消化された抗体を PBS (pH 8) に対して透析した。MA b 492 . 1 の F a b フラグメント (F a b 492 . 1) をサイズ排除クロマトグラフィーによって精製し、続いて、プロテイン G 精製を行った。精製 F a b 492 . 1 を 2 倍過剰の H s Q S O X 1 T_r_x と 4 で 1 時間インキュベーションし、複合体を、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して 11 mg / ml の濃度で単離した。結晶を、19% (w / v) のポリエチレングリコール (PEG) (4 kD)、0 . 4 M 二塩基性リン酸アンモニウムを含有するウエル溶液の上方における 293 K での懸滴蒸気拡散によって成長させた。結晶を、20% (w / v) の PEG (4 kD)、25% のグリセロール、0 . 35 M 二塩基性リン酸アンモニウムを含有する溶液に移し、急速冷凍した。

30

40

【0342】

データ収集

回折データを、R a x i s I V + + イメージプレートシステムおよび O s m i c ミラーを備える R U - H 3 R 発生装置 (R i g a k u) で 100 K において収集した。データを、 $a = b = 209 . 311$ 、 $c = 55 . 265$ 、 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ 、 $\theta = 120^\circ$ の単位格子定数を有する空間群 $P6_1$ の結晶から 2 . 7 の分解能になるまで収集した。デー

50

タを、DENZOおよびSCALEPACKを使用して処理し、スケール化した。

【0343】

構造解

構造を、Phaserを使用する分子置換(MR)によって決定した。最初に、HsQS O X_{T r x}の構造を検索のために使用し、回転および並進の好適な解を見出した。その後、75%の配列同一性を有するFab構造の定常領域(PDBコード、3OKD)を検索モデルとして使用し、最終的には、同じFabモデルからのCDRループを有しない可変領域を検索した。精密化を、CNSを使用して行い、モデル再構築を、Cootを使用して行った。構造の検証を、MOLPROBITYを使用して行い(それに従えば、ラムチャンドラン異常値が全く存在しなかった)、構造モデルをその分解能範囲において上位95%で評価した。

10

【0344】

細胞侵入アッセイ

WT-38線維芽細胞(Coriel1)を、8.0μmの細孔サイズの膜挿入物を有する24ウエルのBD BioCoatプレートの上部チャンバーに播種し、種々のMAb492.1濃度または抗アクチン(対照抗体)の存在下でコンフルエンスに到達させるために4日間にわたって成長させた。4日目に、 5×10^4 個のH460ヒト肺ガン上皮細胞(製造者の説明書に従って細胞追跡色素CSFE(Molecular Probes)により事前に標識されたもの)を線維芽細胞の上に重層した。内側チャンバーを血清非含有の最少必須培地(MEM)で満たし、外側チャンバーを、10%のウシ胎児血清を含有するMEMで満たした。標識されたH460細胞を、37℃で24時間、膜を越えて遊走させた。非侵入細胞を膜の上部面から手でかき取り、捨て、下部面の侵入細胞を3.7%ホルムアルデヒドにおいて固定処理し、画像化し、定量化した。

20

【0345】

異種移植実験におけるインビボでのHsQS O X 1阻害

MDA-MB-231-RFP乳ガン腫瘍細胞を以前に記載されるように成長させた[Goldsheid, L.他(2010)、Breast Cancer Research、12:R29]。GFP-hTert-WI-38肺線維芽細胞を、15%FCS、L-グルタミン、ピルビン酸Naおよび抗生物質が補充されるMEM培地において成長させた。

30

【0346】

26匹のメスのCD-1ヌードマウス(6週齢)を6つの群に分け(本明細書中下記の表6を参照のこと)、施設内動物管理使用の指示に従って収容し、取り扱った。実験手順がWeizman科学研究所(レホヴォト、イスラエル国)の施設内動物管理使用委員会によって承認された。

【0347】

実験を開始するために、3つの群のマウスには、 10^7 個の採取された線維芽細胞および 10^6 個の採取された腫瘍細胞の、50μLのPBSに懸濁された混合物を左側下部の乳房脂肪パッドに注入した。2つの他の群には、腫瘍細胞のみを同様に注入した。注入後4日で、MAb492.1による処置を開始した。MAb492.1の様々な投薬量(本明細書中下記の表6を参照のこと)を200μLのPBSにおいて調製し、週に2回、静脈内(IV)に投与した。細胞注入の1週間後、マウスを、ルシフェリン生物発光を使用して、局在化した腫瘍の形成を確認するために、In Vivo Optical Imaging System(IVISR100/XFO-12、Xenogen Corp.、アラメダ、カリフォルニア、米国)で画像化した。画像化の前に、マウスには、1.5mgのD-ルシフェリンの腹腔内(IP)注射が施され、85:15のケタミン:キシラジンの50μLの混合物の注入によって麻酔が施された。細胞注入の5週間後、マウスを記載されるように麻酔し、膝窩リンパ節および腋窩リンパ節における転移を特定するために蛍光顕微鏡下で画像化した。動物を実験開始後5週間でペントバルビタールにより屠殺した。

40

50

【0348】

M A b 4 9 2 . 1 特異性アッセイ

哺乳動物 Q S O X 1 酵素の M m Q S O X 1 (野生型および3つの変異体)、C p Q S O X 1 および R n Q S O X 1 を、(上記で記載されるような) H s Q S O X 1 の場合のようにクローン化し、発現させ、精製した。50 nM におけるこれらの酵素の活性を、(上記で記載されるような) 酸素消費アッセイおよび基質としての 200 μM の D T T を使用して評価した。250 nM または 1 μM の M A b 4 9 2 . 1 の存在下における活性も同様に測定し、M A b 4 9 2 . 1 の非存在下における活性と比較した。

【0349】

M m Q S O X 1 _{T r x} の精製および結晶化

M m Q S O X 1 _{T r x} を H s Q S O X 1 の場合のようにクローン化し、発現させた。精製を、下記の点を除いて、H s Q S O X 1 の精製と同様に行った: N i - N T A クロマトグラフィーを、結合については 20 mM T r i s 緩衝液 (pH 8.5)、500 mM N a C l、20 mM イミダゾールにおいて行い、溶出については 250 mM イミダゾールにおいて行った。溶出された酵素をサイズ排除クロマトグラフィーカラムに直ちに負荷し、10 mM T r i s 緩衝液 (pH 8.5)、100 mM N a C l において精製した。結晶を、7% (w/v) P E G モノメチルエーテル (2 k D)、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.6)、5% D M S O を含有するウエル溶液の上方における 293 K での懸滴蒸気拡散によって成長させた。液滴におけるタンパク質濃度が 13 mg/ml であり、液滴には、0.4 mg のタンパク質あたり 1 ユニットの トロンピンが補充された。結晶を、15% (w/v) P E G モノメチルエーテル (2 k D)、25% グリセロール、0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.6) を含有する溶液に移し、急速冷凍した。

【0350】

M m Q S O X 1 _{T r x} のデータ収集および構造解

回折データを、R a x i s I V ++ イメージプレートシステムおよび O s m i c ミラーを備える R U - H 3 R 発生装置 (R i g a k u) において 100 K で収集した。データを、 $a = 42.48$ 、 $b = 116.38$ 、 $c = 50.02$ 、 $\beta = 90^\circ$ 、 $\gamma = 103.1^\circ$ の単位格子定数を有する空間群 $P 2_1$ の結晶から 2.05 Å の分解能になるまで収集した。データを、D E N Z O および S C A L E P A C K を使用して処理し、スケール化した。M m Q S O X 1 _{T r x} の構造を、H s Q S O X 1 _{T r x} の構造を検索モデルとして使用して M R によって決定した。精密化を、C N S を使用して行い、モデル再構築を、C o o t を使用して行った。構造の検証を、M O L P R O B I T Y を使用して行い (それに従えば、ラマチャンドラン異常値が全く存在しなかった)、構造モデルをその分解能範囲において上位 70% で評価した。

【0351】

結果

H s Q S O X 1 と結合し、これを阻害する抗体クローンの選択

細菌において産生される組換えヒト Q S O X 1 (以降、H s Q S O X 1 として示される) [A l o n 他 (2012)、N a t u r e、488、414~418] を、マウスにおける抗体産生を誘発させるために使用し、ハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマの上清を、標準的な E L I S A アッセイを使用して H s Q S O X 1 の結合についてスクリーニングした。スクリーニングされたおよそ 500 個のクローンのうち、上位 5 個の結合体をサブクローニングのために選んだ。これらのサブクローンのそれぞれを E L I S A によって結合について試験した。およそ 30 個のサブクローンを阻害アッセイのために選んだ。

【0352】

阻害を、インビトロ・スルフヒドリルオキシダーゼ活性アッセイを使用して試験した。抗体の減少を避けるために、穏和な還元性基質、すなわち、還元および変性させた R N a s e A (r d R N a s e) を最初に選んだ。r d R N a s e を高濃度の様々な精製抗体サブクローンの存在下における H s Q S O X 1 による酸化に供し、所定期間の後に残ってい

10

20

30

40

50

るチオール基を5, 5'-ジチオビス-(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)との反応によって定量した。高いDTNB反応性は反応終了時の溶液における高濃度のチオール基の存在を示した。このことは、HsQSOX1の阻害を示していると解釈された。1つの特定のクローンに由来する抗体サブクローンが、良好なHsQSOX1阻害をこのアッセイにおいて示した。IgG1イソ型であると分類される1つのサブクローン、すなわち、MAb492.1をさらなる研究のために選択した。

【0353】

阻害定数の決定

HsQSOX1の阻害をMAb492.1の様々な濃度で調べた。DTNBアッセイが250 nMのHsQSOX1とともに最初に用いられたとき、 240 ± 30 nMの IC_{50} が認められた。この値は、アッセイにおける酵素濃度に密接に対応するので、アッセイの条件のもとでのMAb492.1によるHsQSOX1のほぼ化学量論的な結合および有効な阻害を示唆した。HsQSOX1濃度が50 nMに下げられたとき、 60 ± 10 nMの IC_{50} が認められた(図15A)。再度ではあるが、この値は酵素濃度とほぼ等しく、このことは堅固な結合および有効な阻害をさらに裏づけている。より低い酵素濃度および抗体濃度を、溶存酸素がHsQSOX1によって過酸化水素に還元されるときの溶存酸素の低下速度をモニターする酸素消費アッセイを使用して詳しく調べた。このアッセイは、単に活性の程度だけでなく、初期速度の直接的な決定を可能にする。強い還元剤、すなわち、ジチオスレイトール(DTT)がこの実験における電子供与体として使用されたにもかかわらず、抗体の一体性を保つDTT濃度が選ばれた(図15C)。反応速度を、25 nMのHsQSOX1および様々な濃度のMAb492.1を使用する実験から計算した。結果を、強固に結合する阻害剤についてのモデルに対して適合させることにより、 1.0 ± 0.3 nMの見かけの阻害定数が得られた(図15B)。MAb492.1はアミノ末端のTrx1ドメイン(図1A)においてHsQSOX1と結合し、レドックス活性なジシステインモチーフの活性部位への基質の接近を妨げる。このことは、MAb492.1が競合的阻害剤であることを示している。競合的阻害剤の存在下における反応速度は典型的には、基質濃度とともに変化し、したがって、見かけの K_i は実際の K_i を必ずしも表していない。それにもかかわらず、MAb492.1による阻害は基質濃度に無関係であった(図15D)。このことは、MAb492.1-HsQSOX1複合体の解離が実験の時間枠に対して遅く、基質によって誘導されないことを暗示している。これらの条件のもとでは、見かけの阻害定数が実際の阻害定数になる。

【0354】

HsQSOX1における抗体結合部位の決定

トリQSOXの限定されたタンパク質分解が2つの安定なフラグメントをもたらすことが以前に認められた。類似する観察が哺乳動物のQSOX1酵素についてなされ、ヒトQSOX1の2つのフラグメント、すなわち、HsQSOX1_{Trx}およびHsQSOX1_{ErV}の構造(図1A~図1B)が、X線結晶学を使用して以前に決定されている[Alon A.他(2010)、FEBS Lett、584、1521~1525; Alon他(2012)、Nature、488、414~418]。MAb492.1のための結合部位がHsQSOX1_{Trx}またはHsQSOX1_{ErV}に存在するかどうかを明らかにするために、本発明者らはこれら2つのフラグメントのそれぞれを細菌において産生させ、2つの相補的な結合アッセイを行った。第1のアッセイにおいて、HsQSOX1_{Trx}またはHsQSOX1_{ErV}に対するMAb492.1の結合をELISAによって完全長HsQSOX1に対する結合と比較した。HsQSOX1_{Trx}(これはTrx1ドメインおよびTrx2ドメインを含有する)は、完全長HsQSOX1が結合したのと同じ程度にMAb492.1と結合した(図16A)。他方で、HsQSOX1_{ErV}は、試験されたどの濃度においても、MAb492.1と結合しなかった。第2の結合アッセイでは、サイズ排除クロマトグラフィーが使用された。HsQSOX1、HsQSOX1_{Trx}およびHsQSOX1_{ErV}の遊走プロファイルをMAb492.1の存在下および非存在下において測定した。HsQSOX1およびHsQSOX1_{Trx}の両方の

遊走プロフィールが M A b 4 9 2 . 1 とのインキュベーションの後では変化し、しかし、H s Q S O X 1_{E r v}の遊走は影響を受けず(図 1 6 B ~ 図 1 6 D)、このことから、M A b 4 9 2 . 1 が H s Q S O X 1 のアミノ末端部分に結合するという結論が確認された。

【 0 3 5 5 】

M A b 4 9 2 . 1 抗体クローンの配列決定および単鎖可変フラグメントの構築

M A b 4 9 2 . 1 の配列をハイブリドーマクローンからの逆転写および P C R によって決定した。軽鎖の可変領域が比較的小さい一組の縮重プライマーにより増幅された。対照的に、重鎖の可変領域は、同程度のプライマーミックスを使用して増幅することができず、このことは、以前に認められた、重鎖を増幅することが比較的困難であったことと一致していた。したがって、M A b 4 9 2 . 1 の重鎖を、マウス s c F v レパートリークローニングのための最適化プライマーを使用して増幅した。それぞれの増幅フラグメントを p G E M - T E a s y ベクターにクローン化し、配列決定した。これらの配列(下記の表 3 を参照のこと)を、以前に記載されるように [L e f r a n c M . P . 他 (2 0 0 4)、N u c . A c i d s R e s .、3 3、5 9 3 ~ 5 9 7]、I m M u n o G e n e T i c s (I M G T) データベースに付随するツールを使用して分析し、これらの配列は、生産的に再構成された配列であることが確認された。可変領域は、94%を超える同一性を、マウスにおいて産生される抗体の可変領域についてのデータベース登録物に対して示した。これらの配列はまた、精製 M A b 4 9 2 . 1 のタンデム質量分析法 (L C - M S / M S) によって確認された(下記の表 3 を参照のこと)。

【 0 3 5 6 】

10

20

表3: MAb492. 1の可変領域アミノ酸配列

配列				鎖
DVVMTQTHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKSGQSPKLLIHS AS YRYTGVPDRFTGSGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQQHYSIPLTFGAGTKL ELK (配列番号7)				軽鎖
QVQLKQSGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTGYGVNWVRQSPGKGLEWLGMI WGDGRTDYKSALKSRLSITKDNSKSKVFLKMNSLQTDITARYFCASDYYG SGSFAYWGQGLVTVSA (配列番号8)				重鎖
Mr(計算値)	Mr(実験値)	ペプチド	酵素	鎖
2037.9612	2037.9634	DVVMTQTHKFMSTSVGDR (配列番号9)	トリプシン	軽鎖
2742.3140	2742.3148	DVVMTQTHKFMSTSVGDRVST ICK (配列番号10)		
1686.8069	1686.8076	FMSTSVGDRVSITCK (配列番号11)		
1680.8107	1680.8110	ASQDVSTAVAWYQQK (配列番号12)		
1058.5873	1058.5880	LLIHSASYR (配列番号13)	キモトリプシン/ Asp-N	
1766.8332	1766.8344	DVVMTQTHKFMSTSVG (配列番号14)		
1841.8612	1841.8642	MSTSVGDRVSITCKASQ (配列番号15)		
1870.9901	1870.9938	QQKSGQSPKLLIHSASY (配列番号16)		
1075.4459	1075.4468	TGSGSGTDFTF (配列番号17)		
1203.6863	1203.6886	SIPLTFGAGTKL (配列番号18)	キモトリプシン/ Asp-N	
995.4713	995.4732	SLTGYGVNW (配列番号19)		
1711.8794	1711.8808	GVNWVRQSPGKGLEW (配列番号20)		
1179.6611	1179.6637	DYKSALKSRL (配列番号21)		
1837.0057	1837.0096	KSRLSITKDNSKSKVFL (配列番号22)		
1985.9782	1985.9824	QSPGKGLEWLGMIWGDGR (配列番号23)		トリプシン
1488.7184	1488.7206	GLEWLGMIWGDGR (配列番号24)		
1995.9513	1995.9510	GLEWLGMIWGDGRTDYK (配列番号25)		
1250.5561	1250.5576	MNSLQTDITAR (配列番号26)		

10

20

30

40

れるように得た。D T Tによる処理の後でのM A b 4 9 2 . 1はS D S - P A G Eにおいて2つのバンドを呈示し、上側バンドが重鎖に対応し、下側バンドが軽鎖に対応した。バンドをトリプシンまたはキモトリプシンおよびA s p Nによりゲル内で消化した。表は、トリプシンによる切断またはキモトリプシンおよびA s p Nによる切断の後、L C - M S / M Sによって少なくとも1回は検出される代表的なペプチドを呈示する。

【0357】

M A b 4 9 2 . 1から特定された可変領域を使用して、単鎖抗体フラグメント(s c F v)を構築した。このs c F vは、アミノ末端における重鎖可変ドメイン、カルボキシ末端における軽鎖可変ドメイン、および、それらをつなぐ[G l y₄S e r]₃のリンカーから構成された。このs c F vをコードする配列を、E . c o l iにおける発現のために最適化し、トロンピンにより切断可能なH i s₆タグをアミノ末端に有する発現ベクターにクローン化した。精製されたs c F v(これはs c F v 4 9 2 . 1として示される)を細菌における産生の後で封入体から得て、機能的な材料を得るためにリフォールディングした。リフォールディングされたs c F v 4 9 2 . 1をr d R N a s eの酸化に基づく比色アッセイにおいて試験し、このs c F v 4 9 2 . 1は、50 nMのH s Q S O X 1を250 ± 30 nMのI C₅₀により阻害することが示された(図17)。s c F v 4 9 2 . 1は競合阻害剤であるので、130 ± 20 nMの阻害定数をこのI C₅₀値から直接計算することができた。s c F v 4 9 2 . 1はおそらく、M A b 4 9 2 . 1と同じ部位においてH s Q S O X 1と結合し、これにより、基質の酸化を妨げ、しかし、5倍の過剰が、H s Q S O X 1を同じ実験条件のもとで阻害するために必要とされるので、強固な結合阻害剤であると見なすことができない。

10

20

【0358】

H s Q S O X 1における抗体結合部位の決定

M A b 4 9 2 . 1に由来するF a bフラグメントをH s Q S O X 1_{T r x}との共結晶化のために調製した。F a bをパイン消化によって精製M A b 4 9 2 . 1から生じさせた。F a bがH s Q S O X 1と結合し、これを阻害する能力を、r d R N a s eの酸化に基づく比色アッセイにより試験した。F a b 4 9 2 . 1は、50 nMのH s Q S O X 1を100 ± 20 nMのI C₅₀により阻害することが見出され(図18)、これは、完全長M A b 4 9 2 . 1について見出されるI C₅₀値の2倍であった。M A b 4 9 2 . 1のアビディティーはF a bフラグメントのアビディティーの2倍であった。このことは、F a b 4 9 2 . 1が、強固な結合挙動を維持することを示している。

30

【0359】

H s Q S O X 1_{T r x} - F a b 4 9 2 . 1複合体の構造を2 . 7の分解能になるまで決定した(下記の表4を参照のこと)。結晶構造により、F a b 4 9 2 . 1がアミノ末端ドメインのT r x 1(図19A)を認識することが明らかにされた。具体的には、F a b 4 9 2 . 1は活性部位と結合し、これにより、C X X Cモチーフと、このモチーフを取り囲む広い表面区域とを覆う。境界面積が、948 . 7²であると計算された。6つすべてのC D Rが結合に関与する(図19B)。重鎖が、3つすべてのC D Rを使用してC X X Cモチーフを覆うことを含めて相互作用のほとんどに関わっている(図20Bおよび下記の表5)。軽鎖はH s Q S O X 1_{T r x} - F a b 4 9 2 . 1境界の40%(407 . 6²)に関わっており、ベータシートをT r x 1ドメインのc末端ヘリックスとつながるループにおいて活性部位から離れている広い表面区域と結合する(図19C)。この領域は、活性部位を含有する、重鎖が結合する表面を伴う連続した表面をもたらす。軽鎖は疎水性相互作用および水素結合のネットワークによりT r x 1と結合し(図20Aおよび下記の表5)、これにより、活性部位に対する重鎖の配向をおそらく安定化させると思われる。F a b 4 9 2 . 1と複合体化しているH s Q S O X 1_{T r x}の構造は、複合体化していないH s Q S O X 1_{T r x}の構造からのずれをほとんど示さなかった。このことは、M A b 4 9 2 . 1はH s Q S O X 1_{T r x}の構造を乱すのではなく、単に活性部位への基質の接近を遮断することを示している。

40

【0360】

50

表4: データ収集および精密化統計量

データ収集	
空間群	P6 ₁
格子定数	
a, b, c (Å)	209.311, 209.311, 55.265
α, β, γ (°)	90, 90, 120
波長 (Å)	1.5418
分解能 (Å)	50-2.7 (2.75-2.70)
R _{sym} ^a	9.2 (36.3)
I/σ	14.35 (1.96)
完全性	97.3 (91.9)
冗長度	5.1 (3.8)
精密化	
分解能 (Å)	50-2.70
反射/試験の数	34719/2622
R _{work} / R _{free} ^b	20.0/23.5
原子数	
タンパク質	5155
リン酸	10
水	350
R. m. s偏差	
結合長さ (Å)	0.006
結合角度 (°)	1.4

10

20

括弧内の値は最高分解能最外殻についてである。

^a $R_{sym} = \frac{\sum_{hkl} |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} I_i(hkl)}$ 、式中、 $I_i(hkl)$ は実測による強度であり、 $\langle I(hkl) \rangle$ は i 個の実測値についての平均強度である。

^b $R_{work}, R_{free} = \frac{||F_{obs}| - |F_{calc}||}{|F_{obs}|}$ 、式中、 F_{obs} および F_{calc} はそれぞれ、実測による構造因子および計算による構造因子である。一組の反射 (6.8%) が精密化から除外され、また、 R_{free} を計算するために使用された。

【0361】

30

表5: Fab492. 1-HsQSOX1_{TRX}相互作用

Fab492.1		HsQSOX1 _{TRX}		
CDR	残基	残基	相互作用のタイプ	距離
L1	Ser30	Val135	水素結合	2.9 Å
L1	Ala32	Val135	疎水性	<5 Å
フレームワーク3 (軽鎖)	Tyr53	Pro137	疎水性	<5 Å
フレームワーク3 (軽鎖)	Tyr53	Arg149	カチオン-π	4.86 Å
L3	Tyr92	Arg122	カチオン-π	4 Å
L3	Tyr92	Arg122	水素結合	3.2 Å
L3	Tyr92	Ser132	水素結合	3.4 Å
L3	Tyr92	Gly133	水素結合	2.6 Å
L3	Tyr92	Val135	疎水性	<5 Å
L3	Ile94	Asn114	水素結合	2.6 Å, 3.5 Å
L3	Ile94	Pro116	疎水性	<5 Å
L3	Leu96	Pro116	疎水性	<5 Å
H1	Gly31	Gly71	水素結合	2.9 Å
H2	Trp52	Trp69	疎水性	<5 Å
H2	Trp52	Trp69	芳香族-芳香族	6.9 Å
H2	Trp52	Phe118	疎水性	<5 Å
H2	Trp52	Phe118	芳香族-芳香族	5 Å
フレームワーク3 (重鎖)	Asp58	Arg111	塩架橋	6.9 Å
H3	Asp98	His72	塩架橋	6.9 Å
H3	Tyr99	Ala139	疎水性	<5 Å
H3	Tyr100	His72	水素結合	3.4 Å
H3	Tyr100	Phe76	疎水性	<5 Å
H3	Tyr100	Phe76	芳香族-芳香族	6.1 Å
H3	Tyr100	Pro119	疎水性	<5 Å
H3	Tyr100	Val138	疎水性	<5 Å
H3	Tyr100	Ala139	疎水性	<5 Å
H3	Gly101	Thr120	水素結合	3.4 Å

10

20

30

40

50

【 0 3 6 2 】

間質を通過する腫瘍細胞遊走についての共培養アッセイにおける H s Q S O X 1 阻害

M A b 4 9 2 . 1 を、腫瘍細胞侵入を支援する E C M 層の線維芽細胞による産生を阻害するその能力について試験した。器官型侵入アッセイを、最初に W I - 3 8 線維芽細胞がコンフルエンスになり、E C M を種々の M A b 4 9 2 . 1 濃度の存在下において 4 日間に

わたって蓄積することを可能にすることによって行った。対照のために、アクチンについての抗体を加えた。その後、蛍光標識されているH460肺腫瘍細胞を線維芽細胞の上に置床した。24時間後、それぞれのサンプルにおいて線維芽細胞層および関連ECMを突き抜けた細胞を計数した(図21A~図21Oおよび図22)。250nMおよび500nMのMAb492.1により処理されるサンプルは、非処理のサンプルよりも少ない腫瘍細胞侵入を示し、このことから、MAb492.1は細胞培養において腫瘍細胞遊走を遮断することができることが明らかにされた。50nMのMAb492.1により処理されるサンプルは腫瘍細胞侵入において差を示さず、このことは、アッセイにおけるHsQSOX1濃度が、決定された阻害定数に基づいて約50nM以下であったことを示している。

10

【0363】

転移の防止または軽減のための異種移植実験におけるインビボでのHsQSOX1阻害
インビボでのHsQSOX1阻害がBM組成を調節することができ、かつ、腫瘍細胞遊走を防止することができること、遅らせることができること、または除くことができることを明らかにするために、腫瘍細胞および腫瘍関連線維芽細胞の両方を取り込む動物モデルが必要であった。MAb492.1は、HsQSOX1に対する大きい特異性を示し(データは示されず)、これにより、QSOX1が動物の線維芽細胞から分泌されるときにおけるQSOX1阻害をインビボで研究する選択肢がなくなった。この障害を克服するために、ある種からの生細胞を別の種に移植することを伴う異種移植アッセイをヌードマウス(胸腺の非存在または欠陥に起因する抑制された免疫系を有するマウス)に対して行った。種々の組成の細胞注入液および種々の処置(これらは本明細書中下記の表6にまとめられる)を、3匹~5匹のメスのヌードマウスをそれぞれが含む6つの群に施した。

20

【0364】

ヒト線維芽細胞と一緒にヒト乳ガン細胞の混合物を3つの群のマウスの乳房脂肪パッドに注入した。2つの群は、転移成長が、分泌されたHsQSOX1によって支援され、腫瘍そのものに局在化する細胞内HsQSOX1によって支援されないことを確認するために乳ガン細胞のみを受けた。最後の群には、健康な動物に対するMAb492.1の影響を調べるために、どのようなヒト細胞も移植されなかった。使用されたヒト不死化線維芽細胞がGFP-hTERT-WI-38線維芽細胞であった。赤色蛍光タンパク質(RFP)およびルシフェラーゼを含有するMAD-MB-231乳ガン細胞が腫瘍細胞として使用された。ルシフェラーゼ(これはルシフェリンに作用して、光を生じさせる)の発現により、腫瘍細胞遊走を実験の経過期間中において生物発光画像化によってモニターすることが可能になる。重要なことに、生物発光画像化は組織における大きいシグナル対ノイズ比を有しており、放射されたシグナルを生きている動物において非浸襲的に検出することができる。1週間後に乳房脂肪パッドに局在化する腫瘍の形成が、ルシフェリンの生物発光を使用して確認された(図23)。細胞接種後4日で、数群のマウス(本明細書中下記の表6を参照のこと)が、MAb492.1の処置を異なる投薬量で受け始めた。細胞注入後5週間で、腋窩リンパ節および膝窩リンパ節への転移進行をガン性細胞から放射される蛍光によって評価した(本明細書中下記の表6を参照のこと)。

30

【0365】

残存する動物は2つの大きな傾向を示した。第1に、MDA-MB-231ガン細胞をヒト線維芽細胞と一緒に受けた動物は、MDA-MB-231細胞のみを受ける動物が発達させたよりも多い転移を生じさせる、より大きい腫瘍を発達させた。この観測結果は、腫瘍関連線維芽細胞から分泌される間質成分がガンの進行のために必須であるという既に立証された考えを強固にした。観測された第2の影響が、線維芽細胞およびMDA-MB-231細胞の両方を受けた動物の中で、より大きいMAb492.1投薬量(すなわち、30mg/kg)により処置された動物は、処置を何ら受けなかったか、または、より低い投薬量を受けた動物と比較して、ガン性細胞によるリンパ節浸潤がより少なかった(本明細書中下記の表7を参照のこと)。MAb492.1の投薬量および投薬様式はさらに最適化される場合がある。

40

50

【 0 3 6 6 】

重要なことに、M A b 4 9 2 . 1 注射を受けたが、細胞を全く受けなかった3匹の動物は、異常な挙動を実験期間中に何ら示さず、また、炎症の徴候が剖検において何ら認められなかった。予想されたように、M A b 4 9 2 . 1 は観察可能な副作用を何ら有しなかった。

【 0 3 6 7 】

表6:異種移植実験

注入細胞のタイプ	処置	腫瘍のサイズおよび性質 (外部から見て)	転移場所(RFP画像化による)
ヒト乳ガン細胞 および 不死化ヒト 線維芽細胞	5mg/kgの MAb492. 1、 週に2回、IV	巨大、壊疽を伴う	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
		中位	4つすべてのリンパ節において
		巨大、壊疽を伴う	側副膝窩リンパ節において
		認められず	なし
		巨大、壊疽を伴う	腫瘍の同じ側で、 側副膝窩リンパ節 および腋窩リンパ節において
ヒト乳ガン細胞 および 不死化ヒト 線維芽細胞	30mg/kgの MAb492. 1、 週に2回、IV	中位	腫瘍に近い膝窩リンパ節において
		大きく赤い	腫瘍に近い膝窩リンパ節において
		大きく赤い	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
		中位	腫瘍に近い膝窩リンパ節において
ヒト乳ガン細胞 および 不死化ヒト 線維芽細胞	なし	巨大、壊疽を伴う	側副膝窩リンパ節において
		認められず	なし
		中位、尾の近く	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
		大きい	側副膝窩リンパ節において
ヒト乳ガン細胞	なし	小さい	なし
		巨大+壊疽	腫瘍に近い膝窩リンパ節において
		小さい	なし
		大きい	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
		認められず	なし
ヒト乳ガン細胞	30mg/kgの MAb492. 1、 週に2回、IV	大きい	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
		中位	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
		認められず	なし
		大きく赤い	腫瘍と同じ側で、 膝窩リンパ節および 腋窩リンパ節において
		大きい+壊疽 壊疽を伴う尾	細胞が全体に広がり、 局在化した腫瘍が形成されない
ヒト細胞非注入	30mg/kgの MAb492. 1、 週に2回、IV	なし	なし
		なし	なし
		なし	なし

10

20

30

40

表7:異種移植実験のまとめ

注入細胞のタイプ	処置	含まれる動物の数	% (転移を遠位リンパ節に有する動物)
ヒト乳ガン細胞および不死化ヒト線維芽細胞	5mg/kgのMAb492. 1、週に2回、IV	3	100%
ヒト乳ガン細胞および不死化ヒト線維芽細胞	30mg/kgのMAb492. 1、週に2回、IV	3	0%
ヒト乳ガン細胞および不死化ヒト線維芽細胞	なし	3	66%
ヒト乳ガン細胞	なし	3	0%
ヒト乳ガン細胞	30mg/kgのMAb492. 1、週に2回、IV	1	0%

10

20

【0369】

HsQSOX1に対するMAb492. 1の特異性

MAb492. 1の阻害活性を、その特異性を調べるために他の哺乳動物QSOX1酵素に対して試験した。組換えハツカネズミ(Mus musculus)QSOX1(MmQSOX1)は、組換えHsQSOX1に対する79%の配列同一性を有する。酸素消費アッセイは、MAb492. 1が、マイクロモル濃度でさえ、MmQSOX1に対する影響を何ら有しないことを示した(図24)。ドブネズミ(Rattus norvegicus)由来のQSOX1(RnQSOX1)およびモルモット(Cavisporellus)由来のQSOX1(CpQSOX1)はともに、HsQSOX1に対する79%の配列同一性を有しており、それらの活性もまた、MAb492. 1によって影響されなかった(図24)。HsQSOX1のTrx1ドメイン配列と他のQSOX1酵素の対応する領域とのアライメントにより、CGHCのレドックス活性モチーフの近傍における配列が同一であることが示される(図25を参照のこと)。しかしながら、抗体の軽鎖およびCDRのH3配列が結合するHsQSOX1の領域(HsQSOX1₁₀₆₋₁₅₂)では、他のQSOX1酵素と比較して、少しの違いが明らかにされる(図25)。特に、Pro116(これは、MAb492. 1の疎水性のCDRL3の側鎖の間における溝に十分にはまる)が、他の哺乳動物QSOX1酵素ではアラニンにより置換される。配列の違いを示すもう一つの領域が、HsQSOX1に由来するV₁₃₅-V₁₃₈であり、これはMmQSOX1におけるThr₁₃₈-Gly₁₄₁に対応する。

30

40

【0370】

アミノ酸配列におけるこれらの違いがどのようにQSOX1オルソログの構造に影響を及ぼすかを明らかにするために、MmQSOX1_{Trx}を結晶化し、その構造を解明した。2つのMmQSOX1_{Trx}分子が非対称ユニットに存在した。HsQSOX1_{Trx}-Fab492. 1複合体の構造をPro116の近傍においてMmQSOX1_{Trx}の構造(図26)と比較することにより、Pro116に取って代わるアラニン残基は、M

50

mQSOX1とFab492.1との間での仮想的な複合体における疎水性の溝を、Pro116が満たすのと同様には満たすことができないことが示される。加えて、アラニンによるプロリンの置換は、(HsQSOX1に由来するAsn114に対応する)MmQSOX1に由来するAsn117の近くでの骨格の位置およびAsn117の回転異性体に影響を及ぼす。したがって、衝突が、MmQSOX1のAsn117と、CDRのL3に由来するTyr92との間で予想される(図26、右)。加えて、MmQSOX1分子の一方に由来するThr₁₃₈-Gly₁₄₁のループが、HsQSOX1に由来する対応するV₁₃₅-V₁₃₈のループよりも、CDRのH3に由来するTyr100に近づく(図26、左)。

【0371】

HsQSOX1を別個の位置で模倣する3つのMmQSOX1変異体を上記の観察結果に基づいて構築した。MAb492.1による阻害を、MAb492.1-MmQSOX1複合体形成を妨げる残基を特定するためにこれらの変異体について試験した。第1の変異体(MmQSOX1 A119P)の活性は約40%の活性をMAb492.1の存在下で示した(図27)。第2の変異体、すなわち、MmQSOX1 TLPG(138-141)VFV(これは以降、TLPG変異体と名づけられる)は、約50%の活性をMAb492.1の存在下で示し、第3の変異体(これは、述べられた両方の変異を含む)は、HsQSOX1と同じ程度にMAb492.1によって阻害された。これらの結果から、ほんの少数の残基(変異させられた4個まで)により、MmQSOX1と比較して、HsQSOX1に対するMAb492.1の特異性が決定されることが確認される。

【0372】

これらの観察結果に基づいて、MmQSOX1および潜在的には他の哺乳動物QSOX1オルソログを阻害するMAb492.1変化体の作製が、抗体のCDRまたは周囲領域の少数の変異に基づいて可能である。MmQSOX1を阻害する抗体をもたらす得るMAb492.1における変異についての示唆(が下記の表8に列挙される)。これらの変異の組合せもまた用いられるかもしれない。

【0373】

表8:MmQSOX1を標的とする抗体を作製するための
MAb492.1における可能な変異

CDR	可能な変異
H3	Tyr100Asn
H3	Tyr100Asp
H3	Tyr100Gly
H3	Tyr100Ser
H3	Ala101Gly
L3	Tyr92Asn
L3	Tyr92Asp
L3	Ser93Gly
L3	Ser93Ala

【0374】

本発明はその特定の実施態様によって説明してきたが、多くの別法、変更および変形があることは当業者には明らかであることは明白である。従って、本発明は、本願の請求項

10

20

30

40

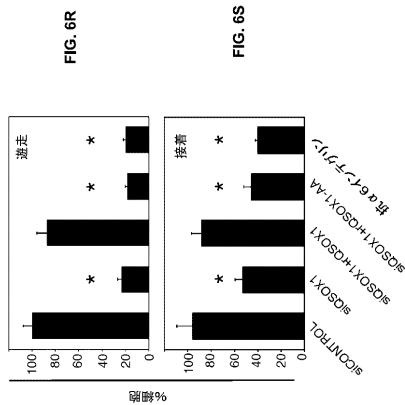
50

の精神と広い範囲の中に入るこのような別法、変更および変形すべてを包含するものである。

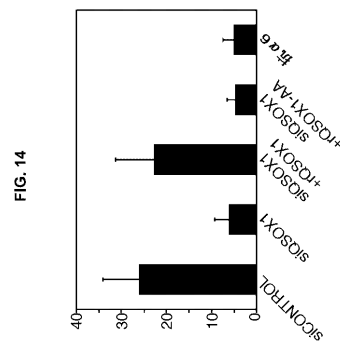
【 0 3 7 5 】

本明細書で挙げた刊行物、特許および特許出願はすべて、個々の刊行物、特許および特許出願が各々あたかも具体的にかつ個々に引用提示されているのと同程度に、全体を本明細書に援用するものである。さらに、本願で引用または確認したことは本発明の先行技術として利用できるという自白とみなすべきではない。節の見出しが使用されている程度まで、それらは必ずしも限定であると解釈されるべきではない。

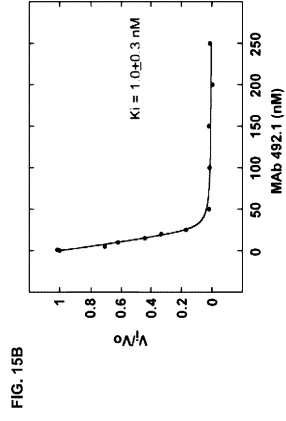
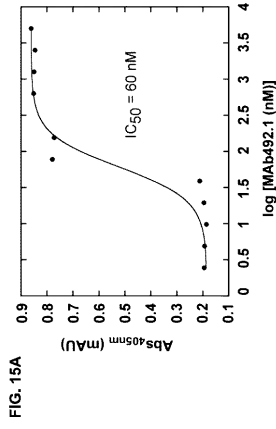
【 図 6 R - 6 S 】



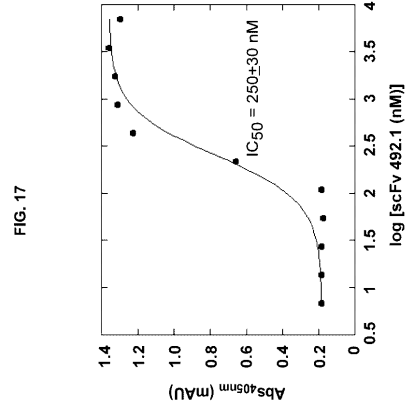
【 図 1 4 】



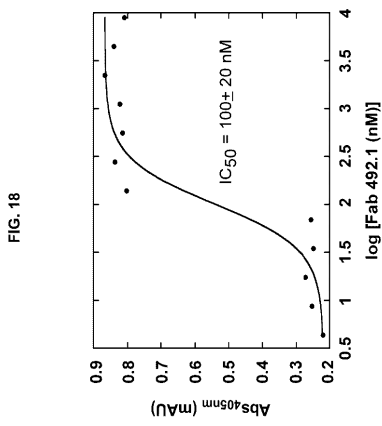
【 15 A - 15 B 】



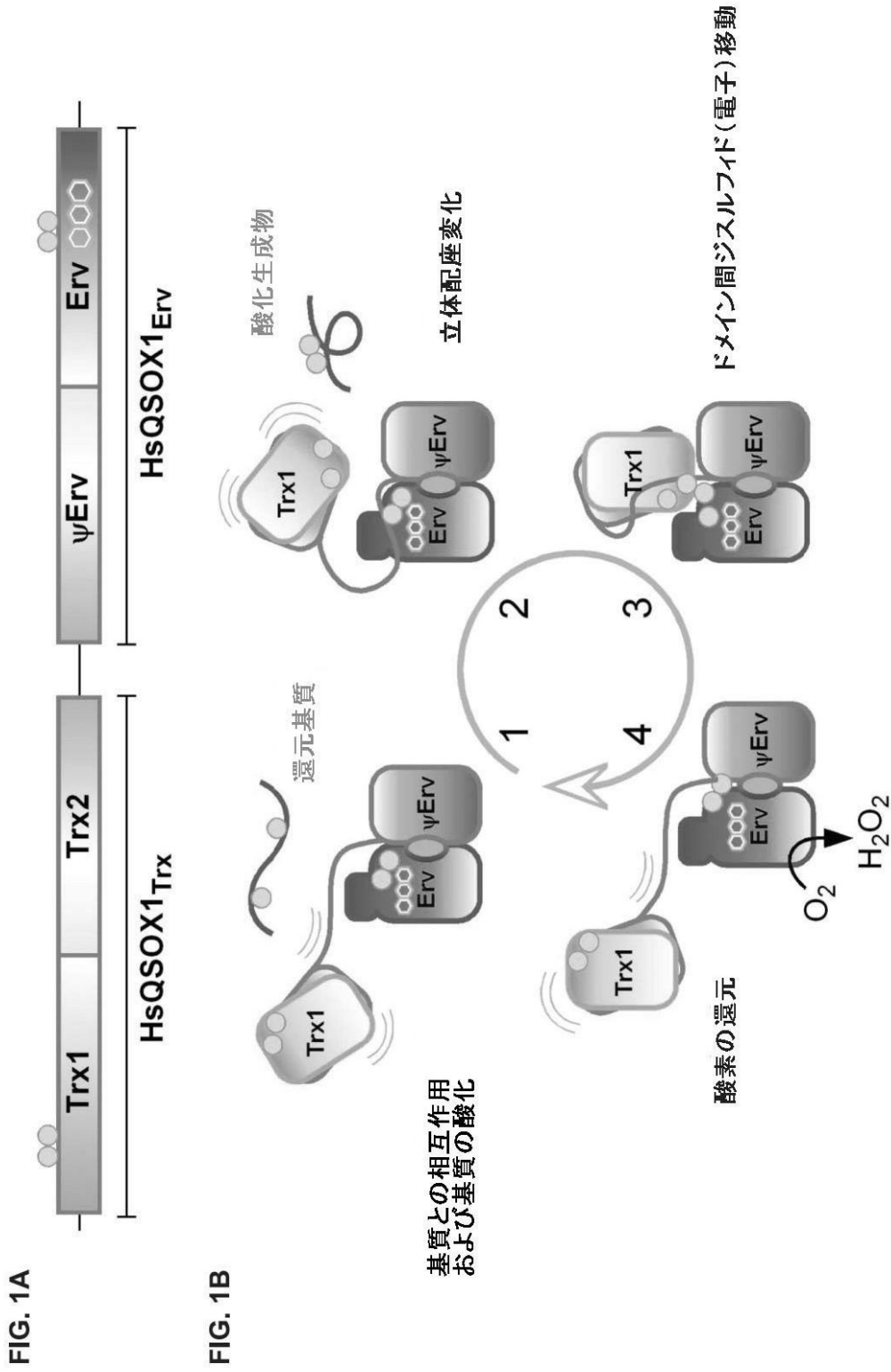
【 17 】



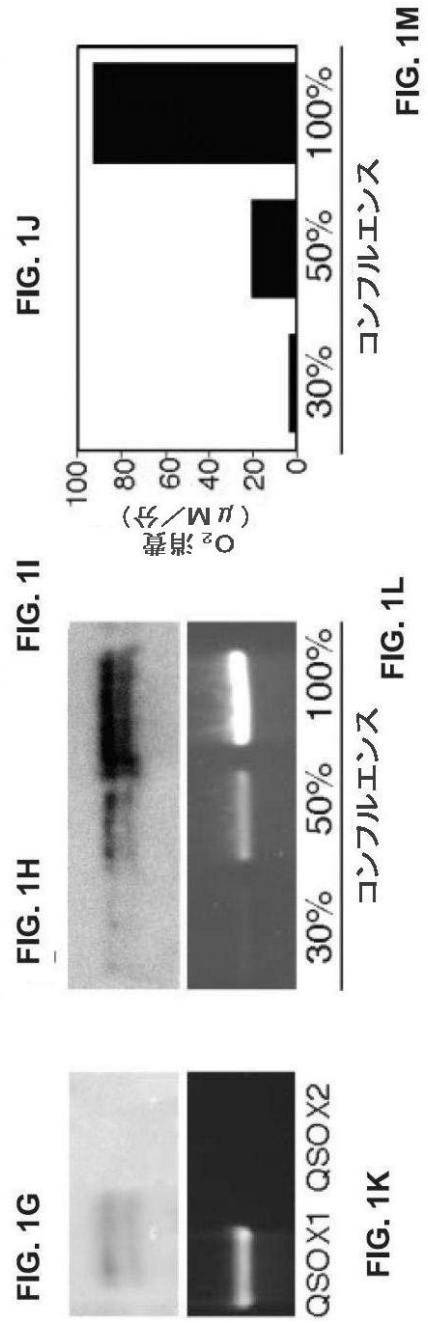
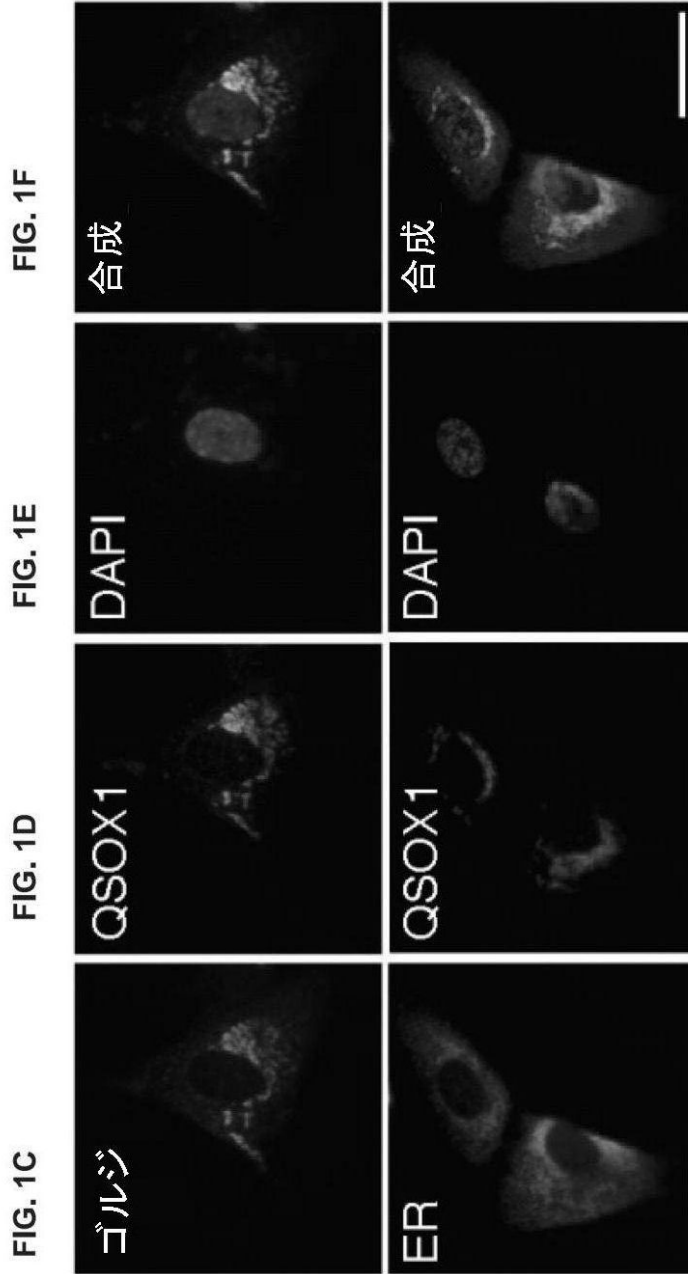
【 18 】



【 図 1 A - 1 B 】



【 図 1 C - 1 M 】



【 図 2 A - 2 F 】

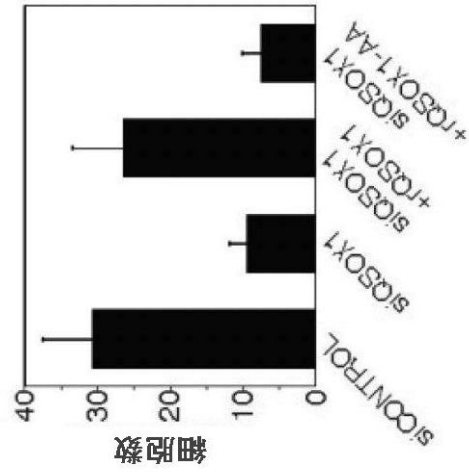
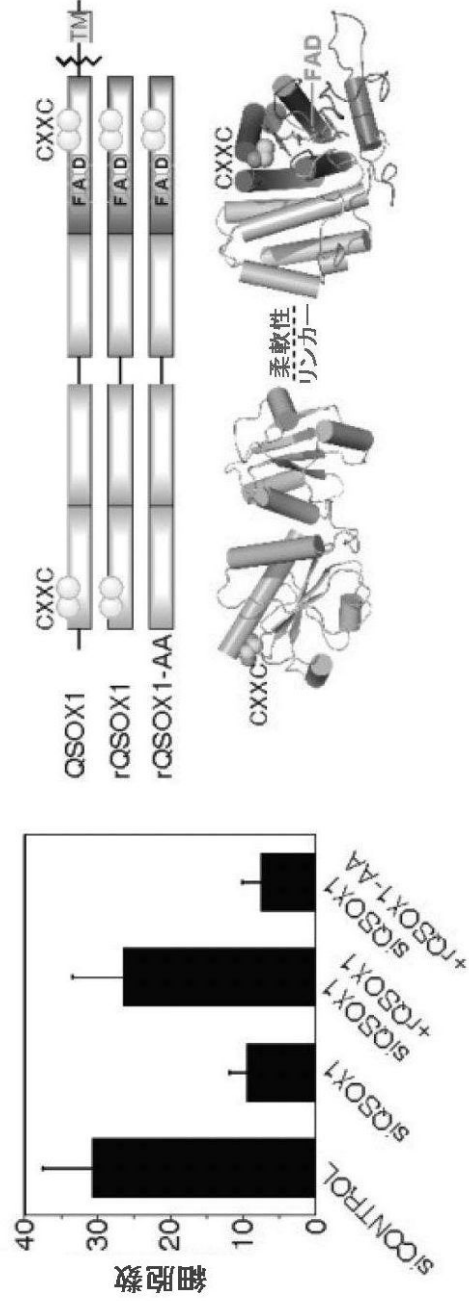
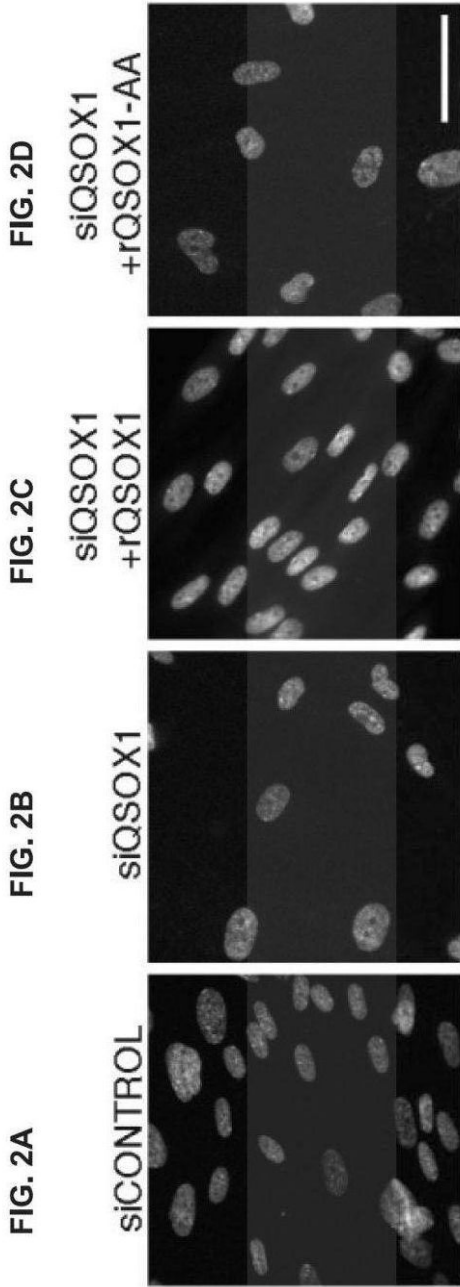


FIG. 2F

FIG. 2E

【 図 2 G - 2 H 】

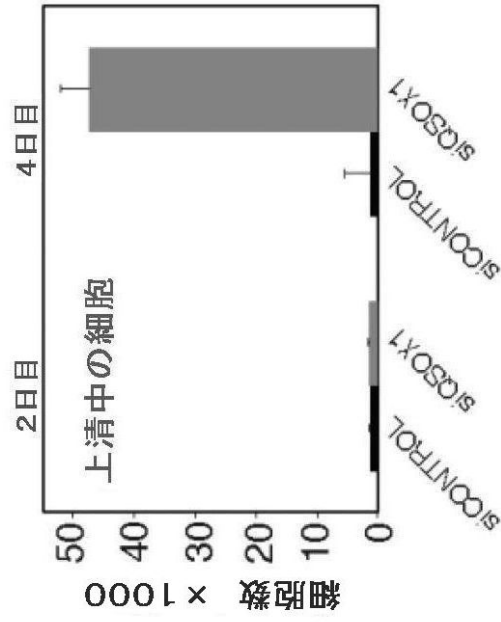


FIG. 2H

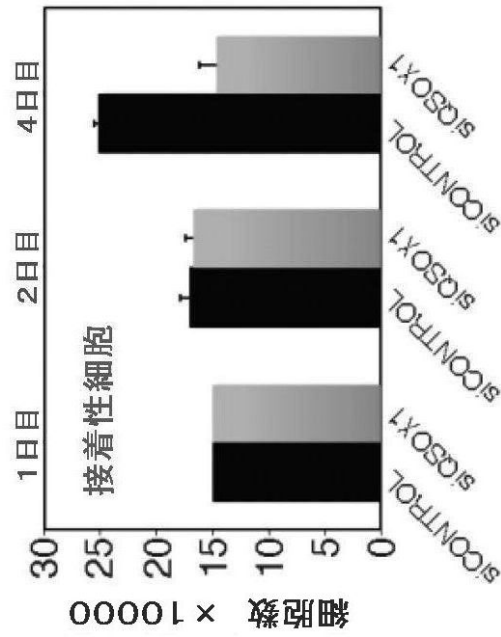
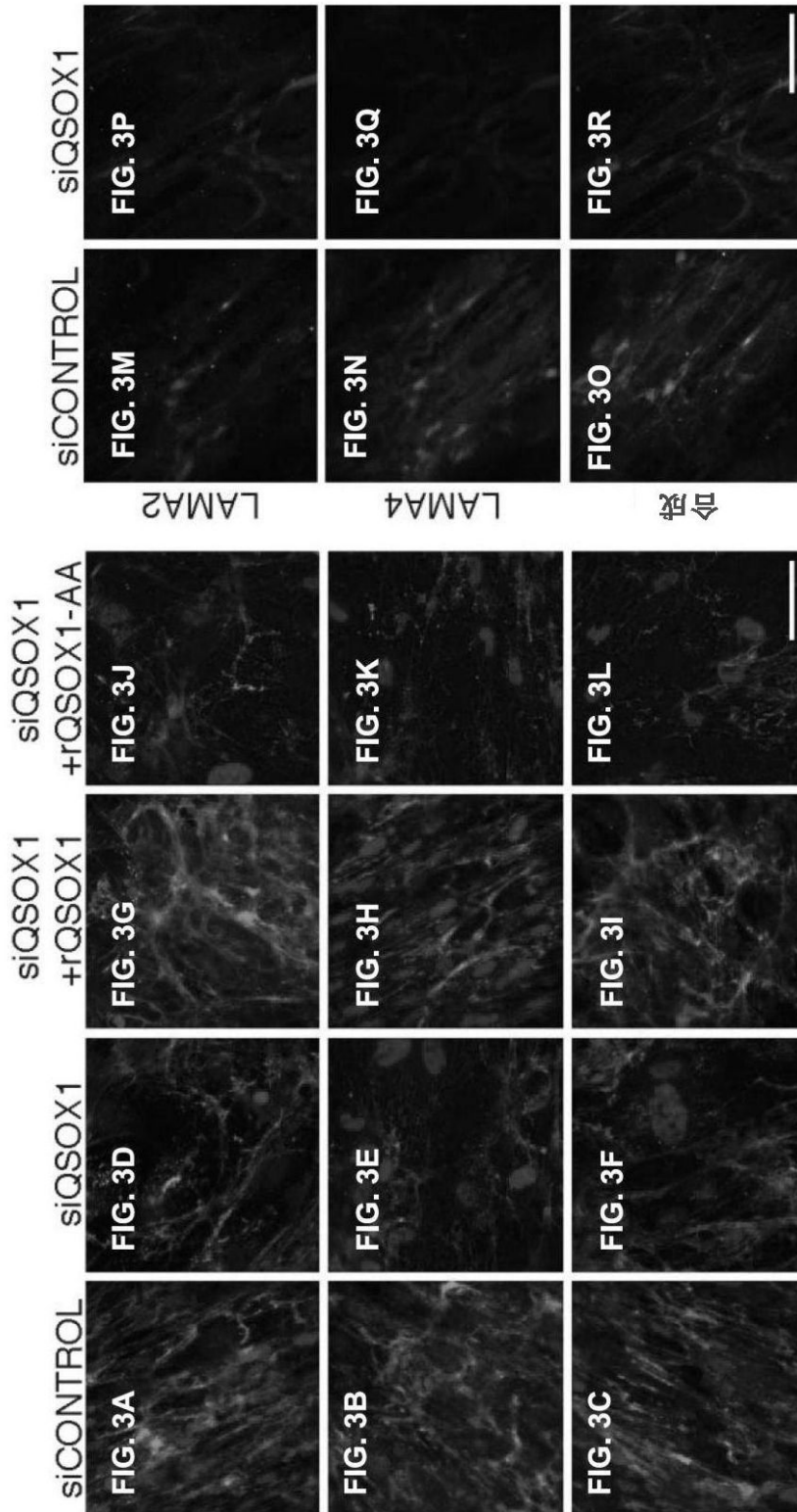


FIG. 2G

【 図 3 A - 3 R 】



【 図 4 A - 4 C 】

FIG. 4C

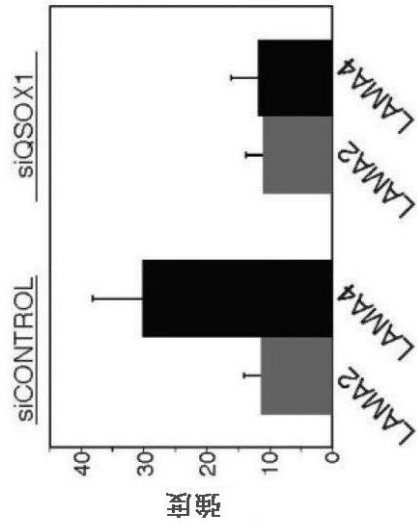


FIG. 4B

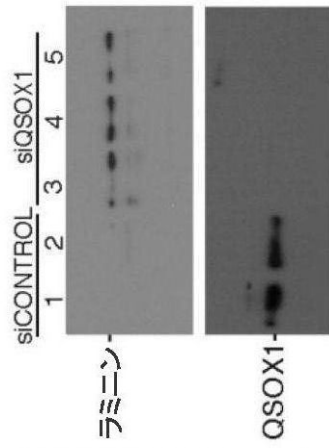
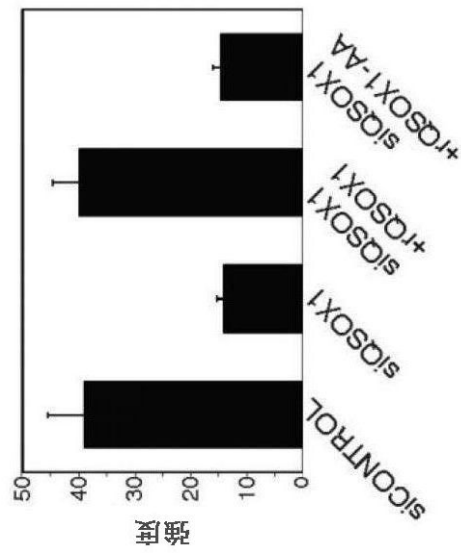


FIG. 4A



【 図 5 A - 5 F 】

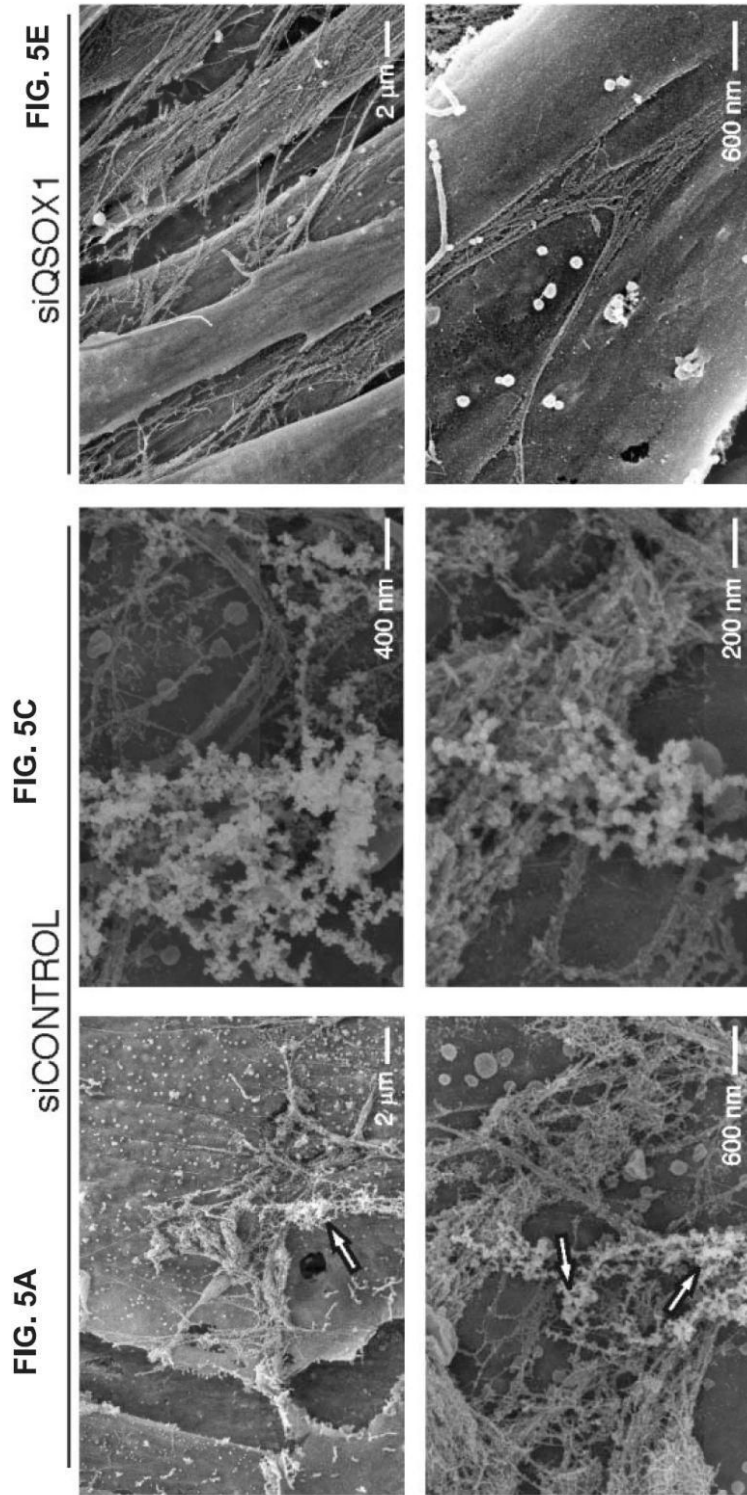


FIG. 5A

siCONTROL

FIG. 5C

siQSOX1

FIG. 5E

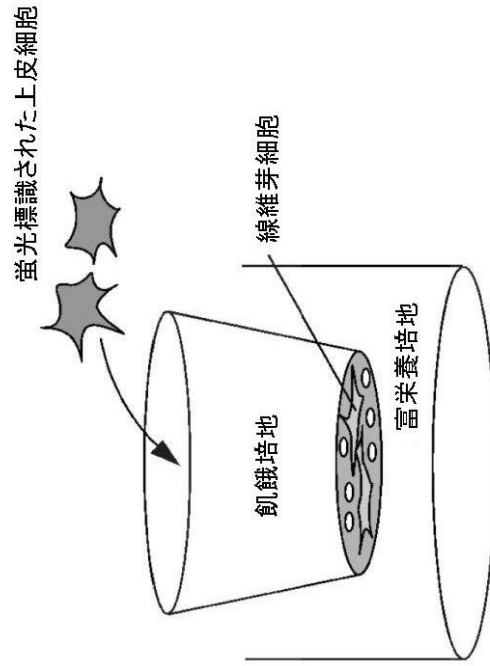
FIG. 5B

FIG. 5D

FIG. 5F

【 図 5 G 】

FIG. 5G



【 図 6 A - 6 Q 】

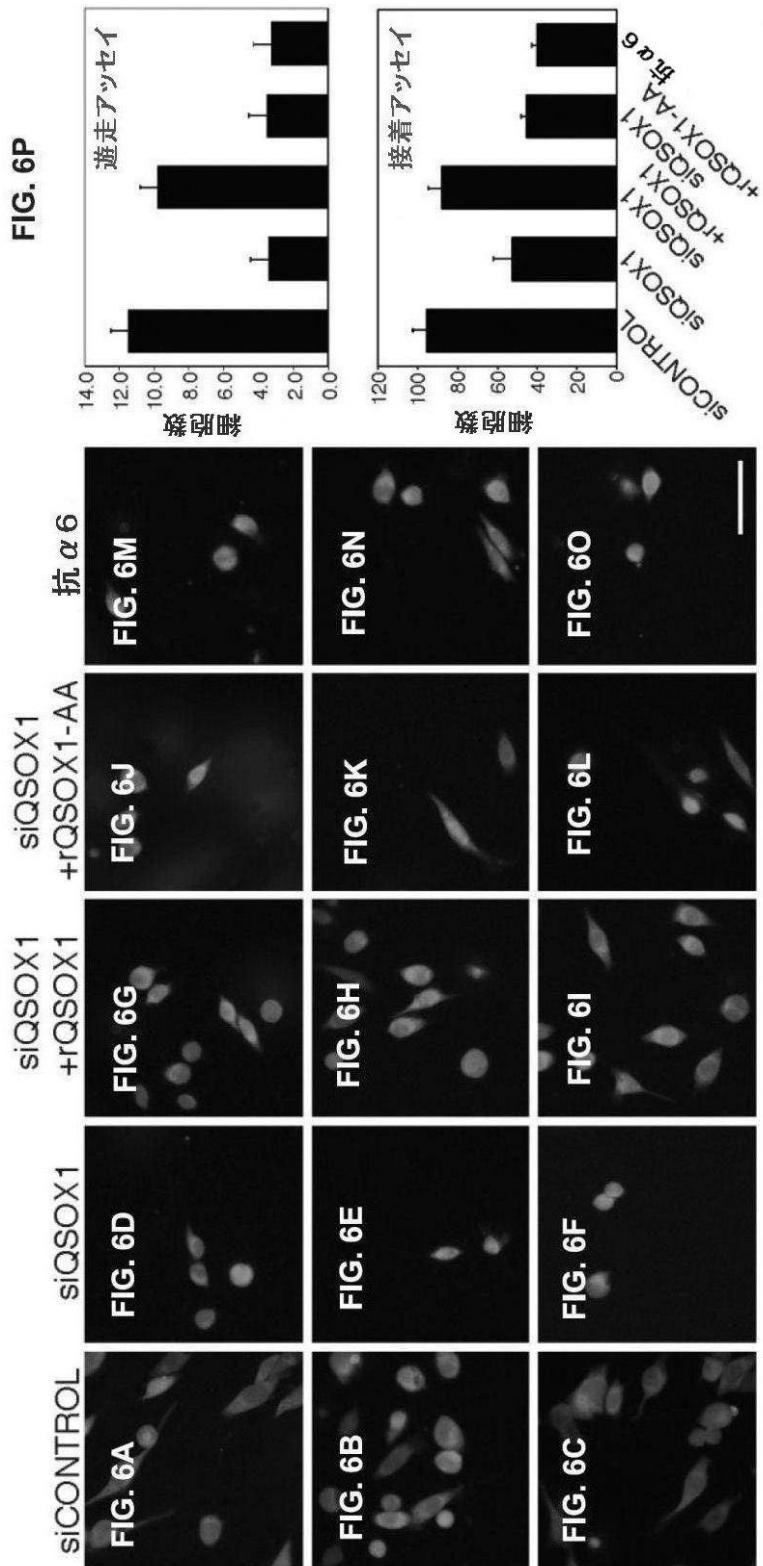
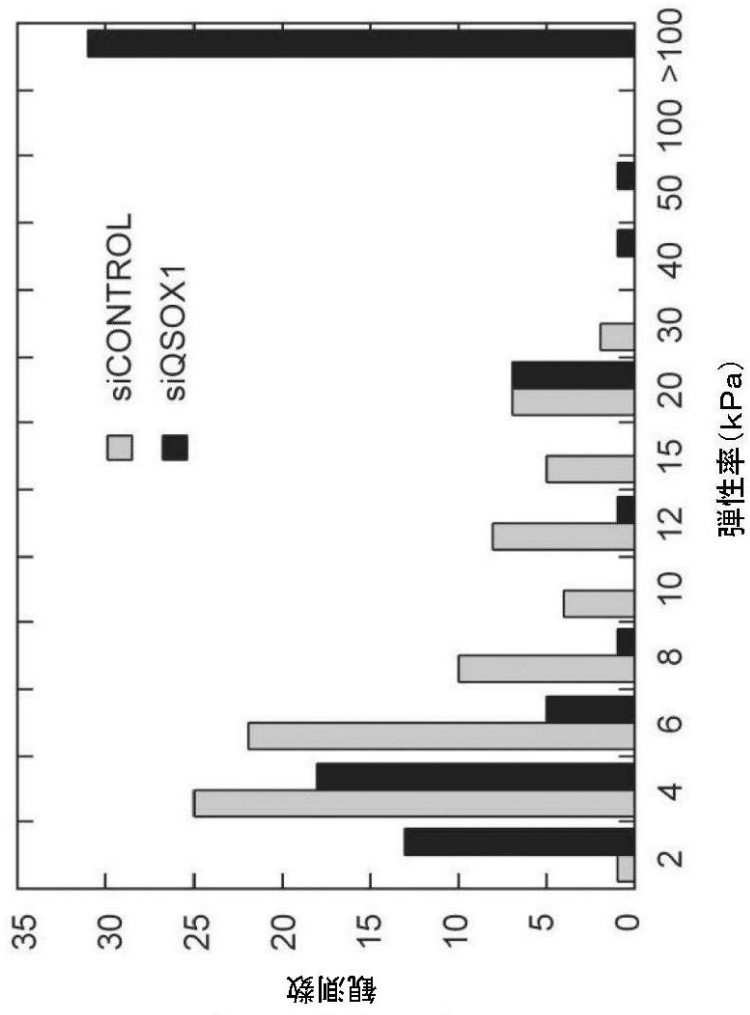


FIG. 6Q

【 図 6 T 】

FIG. 6T



【 図 7 A - 7 D 】

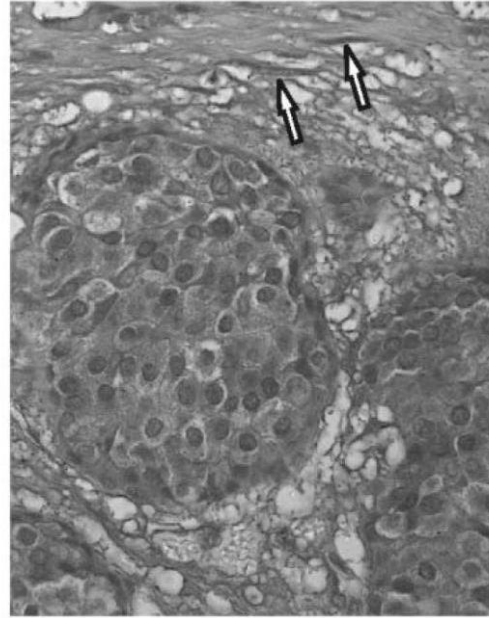
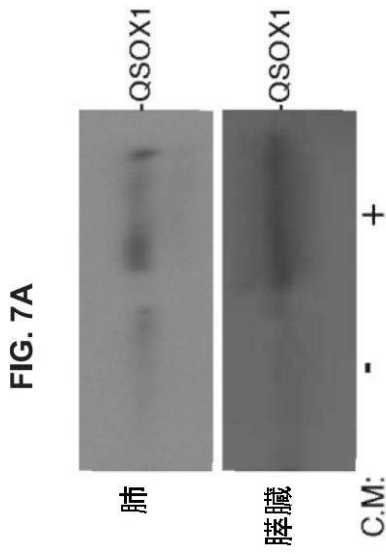
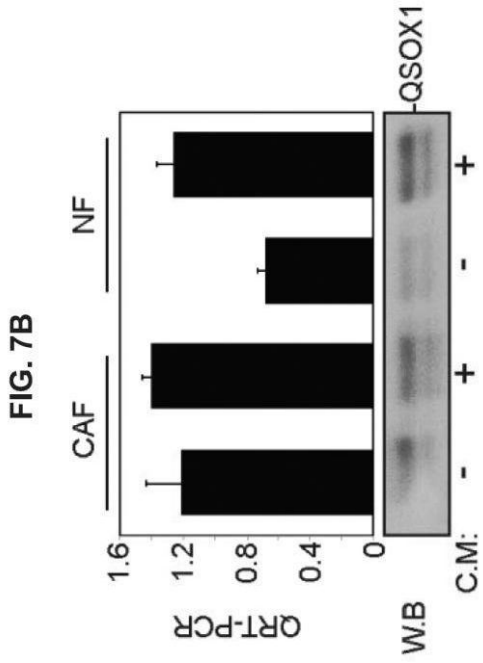


FIG. 7D

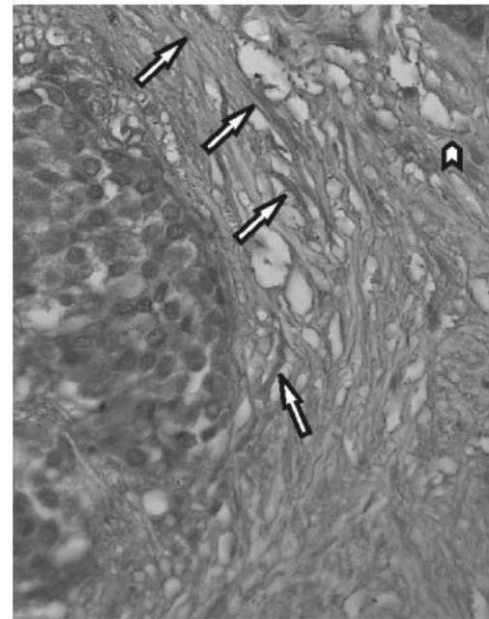
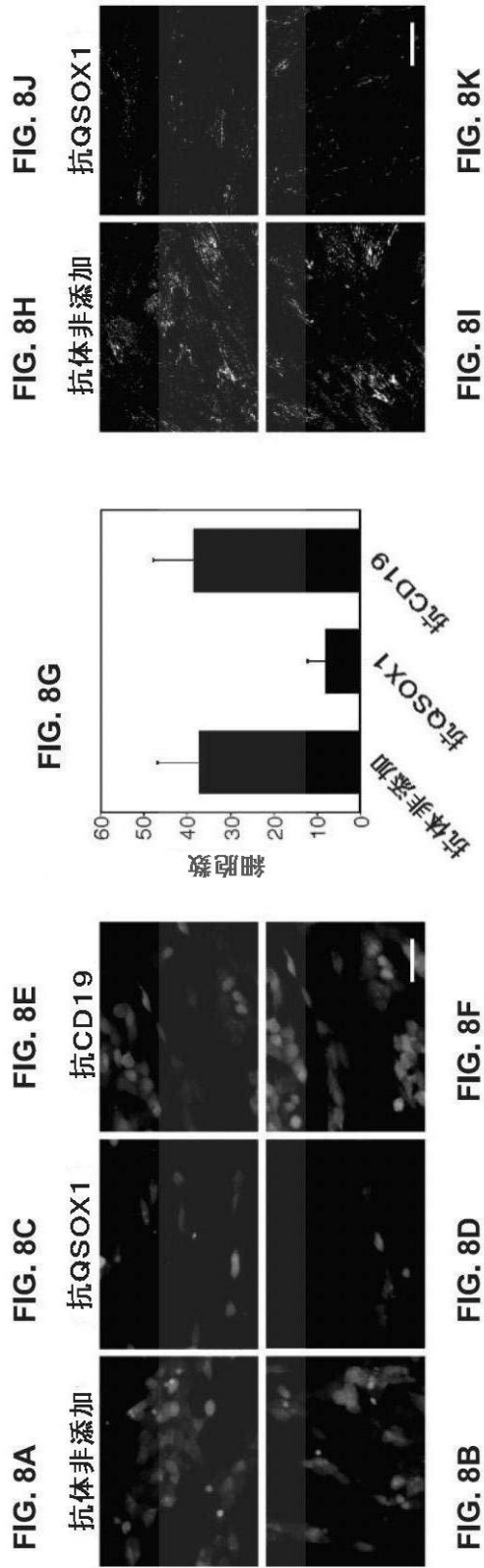
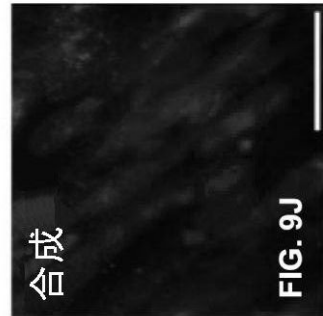
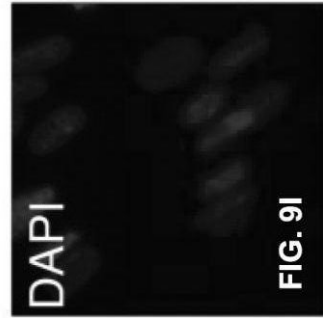
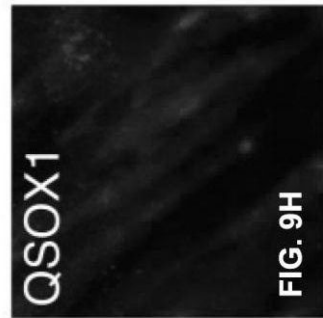
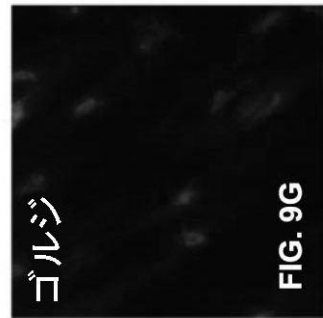
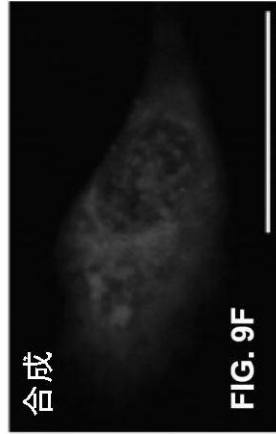
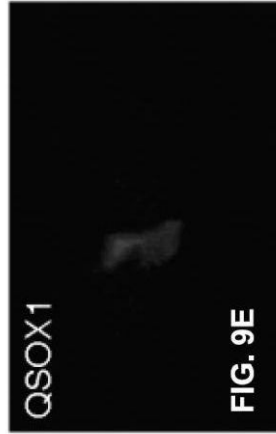
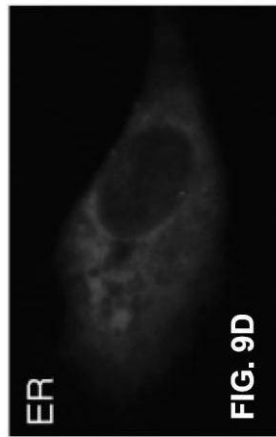
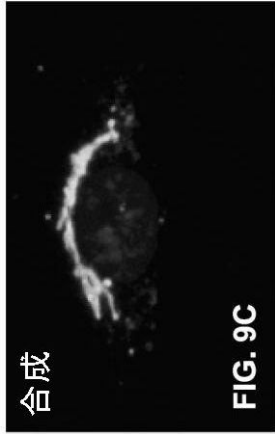
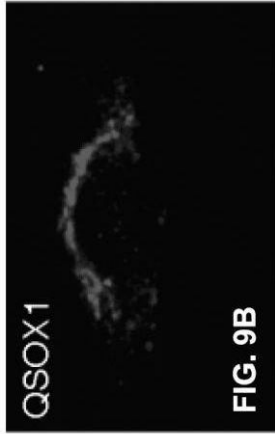
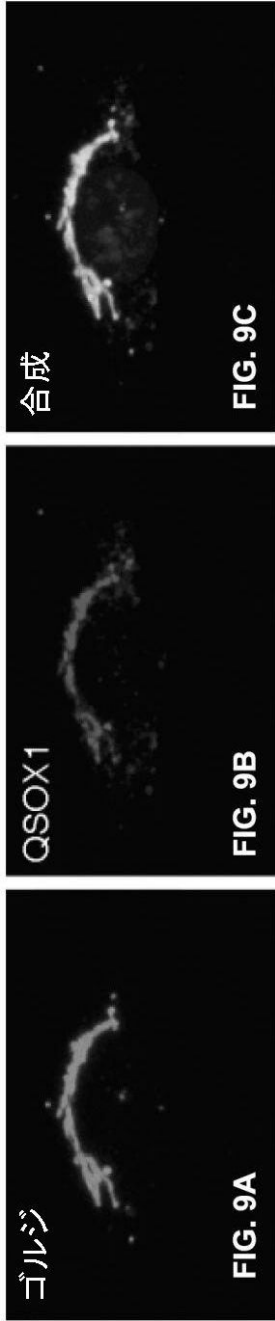


FIG. 7C

【 図 8 A - 8 K 】



【 図 9 A - 9 J 】



【 図 9 K - 9 L 】

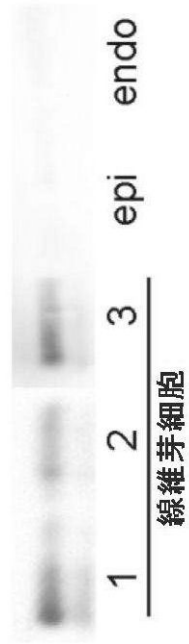
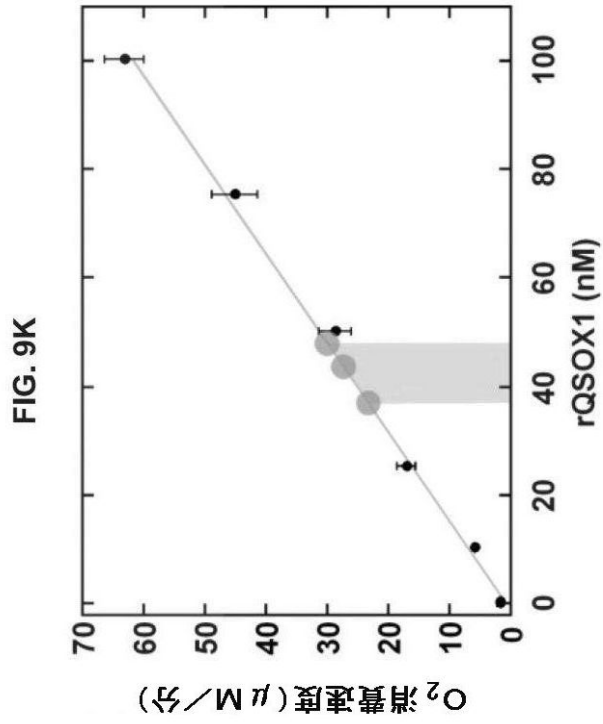


FIG. 9L

QSOX1の下側バンドのトリプシン切断

1 MRRNSGSGPPPSLLLLLLWLLAVPGANAAPRSALYSPSDPLTLLQADTV
 51 RGAVLGRSAWAVEFFASWCCHCIAFAPTWKALAEADVKAWRPALYLAALD
 101 CAEETNSAVCRDFNIPGFFT~~V~~RFKFTKNGSGAVFPVAGADVQTLRERL
 151 IDALESHDTPPACPPLEPAKLEEIDGFFARNNEEYLALIFEKGGSYLG
 201 REVALDLSQHKGVAVRRVLT~~E~~ANVVRKFGVTDFFSCYLLFRNGSVSRVP
 251 VLME~~S~~RFY~~T~~AYL~~Q~~RL~~S~~GL~~T~~REAAQT~~V~~APT~~T~~ANKI~~A~~PT~~V~~WKLADRSKIY
 301 MADLESALHYILRIEVGRFPVLE~~Q~~RLVALKKFVA~~V~~LAKYFPPGRPLVQNF
 351 LHSVNEWLKRQ~~R~~NKI~~P~~YSFFK~~T~~ALDDRRKEGAVLAKKVNWIGCQGSEPHF
 401 RGFPCSLWVLFHFLTVQAA~~R~~QNV~~D~~HSQEA~~A~~KAKEV~~L~~PAIRGYVHYFFGCR
 451 DCASHFEQMAAAS~~M~~H~~R~~VGS~~P~~NA~~A~~V~~L~~W~~S~~SHNRV~~N~~ARLAGAPSEDQFPK
 501 VQWPPRELCSACHNERLDV~~V~~VD~~V~~EATL~~N~~FLKAH~~F~~SPSNIILDFPAAGSA
 551 ARRDVQNVAAPELAMGALELES~~R~~N~~S~~TLD~~P~~GKPE~~M~~KSP~~T~~N~~T~~TPHVPAEG-PELI (604)
 601 PEASRPPK~~L~~HPGLRAAPGQEPPEHMAELQ~~R~~NEQE~~Q~~PLGQ~~W~~HLSKRD~~T~~GAA
 651 LLAESRAEK~~N~~RLW~~G~~PLEVRRVGRSSK~~Q~~LVDIPEGQLEARAGRGRGQWLQV
 701 LGGGFSYLDISLCVGLYSL~~S~~FMGLLAMYTYFQAKIRALKGHAGHPAA (747)

配列番号35

FIG. 10A

QSOX1の下側バンドのキモトリプシン切断

1 MRRNSGSGPPPSLLLLLLWLLAVPGANAAPRSALYSPSDPLTLLQADTV
 51 RGAVLGRSAWAVEFFASWCCHCIAFAPTWKALAEADVKAWRPALYLAALD
 101 CAEETNSAVCRDFNIPGFFT~~V~~RFKFTKNGSGAVFPVAGADVQTLRERL
 151 IDALESHDTPPACPPLEPAKLEEIDGFFARNNEEYLALIFEKGGSYLG
 201 REVALDLSQHKGVAVRRVLT~~E~~ANVVRKFGVTDFFSCYLLFRNGSVSRVP
 251 VLME~~S~~RFY~~T~~AYL~~Q~~RL~~S~~GL~~T~~REAAQT~~V~~APT~~T~~ANKI~~A~~PT~~V~~WKLADRSKIY
 301 MADLESALHYILRIEVGRFPVLE~~Q~~RLVALKKFVA~~V~~LAKYFPPGRPLVQNF
 351 LHSVNEWLKRQ~~R~~NKI~~P~~YSFFK~~T~~ALDDRRKEGAVLAKKVNWIGCQGSEPHF
 401 RGFPCSLWVLFHFLTVQAA~~R~~QNV~~D~~HSQEA~~A~~KAKEV~~L~~PAIRGYVHYFFGCR
 451 DCASHFEQMAAAS~~M~~H~~R~~VGS~~P~~NA~~A~~V~~L~~W~~S~~SHNRV~~N~~ARLAGAPSEDQFPK
 501 VQWPPRELCSACHNERLDV~~V~~VD~~V~~EATL~~N~~FLKAH~~F~~SPSNIILDFPAAGSA
 551 ARRDVQNVAAPELAMGALELES~~R~~N~~S~~TLD~~P~~GKPE~~M~~KSP~~T~~N~~T~~TPHVPAEG-PELI (604)
 601 PEASRPPK~~L~~HPGLRAAPGQEPPEHMAELQ~~R~~NEQE~~Q~~PLGQ~~W~~HLSKRD~~T~~GAA
 651 LLAESRAEK~~N~~RLW~~G~~PLEVRRVGRSSK~~Q~~LVDIPEGQLEARAGRGRGQWLQV
 701 LGGGFSYLDISLCVGLYSL~~S~~FMGLLAMYTYFQAKIRALKGHAGHPAA (747)

配列番号36

FIG. 10B

【 図 1 0 C - 1 0 D 】

QSOX1の上側バンドのトリプシン切断

1 MRRCSGGPPPSLLLLLWLLAVPGANAAPRSALYSPDPLTLLQADTV
 51 RGAVLGSRSAWAVEFFASWCGHCIAFAPTWKALAEDVKAWRPALYLAALD
 101 CAEETNSAVCRDFNIPGFTVRFKFTKNGSGAVFPVAGADVQTLRERL
 151 IDALESHDHTWPPACPPLEPAKLEEDGFFARNNEEYLALIFEKGGSYLG
 201 REVALDLSQHKGVAVRRVLTNTEANVVRKFGVTDFFPCYLLFRNGSVSRVP
 251 VLMESSRFYTYLQRLSGLTREAAGTTVAQTANKIAPTVMKLABDRSKIY
 301 MADLESALHYILRIEVGRFPVLEGGRLVALKKFVAVLAKYFFPGRPLVQNF
 351 LHSVNEWLKRQKRNKIPYFFKTDALDDRKEGAVLAKKVNWIGCQGSEPHF
 401 RGFP CSLWVLFHFLTVQAAARQNVDSQEAAKAKEVLP AIRGYVHYFFGCR
 451 DCASHFEQMAAASMRVGVSPNAAVLWLSHNRVNARLAGAPSEDPQFPK
 501 VQWPPRELCSACHNERLDVPVWDVEATLNLKAHFSPSNIILDFPAAGSA
 551 ARRDVQNVAAPELAMGALELESRNSTLDPGKPEMMKSPNTTTPHVP AEG-PELI (604)
 601 PEASRPPK LHPGLRAAPGQEPPEHMAELQRNEQEQLGQWHL SKRDTGAA
 651 LLAESRAEKNRLWGPLEVRRVGRSSKQLVDIPEGQLEARAGRGRGQWLQV
 701 LGGGFSYLDISLCVGLYSLSFMGLLAMYTYFQAKIRALKGHAGHPAA (747)

配列番号37

FIG. 10C

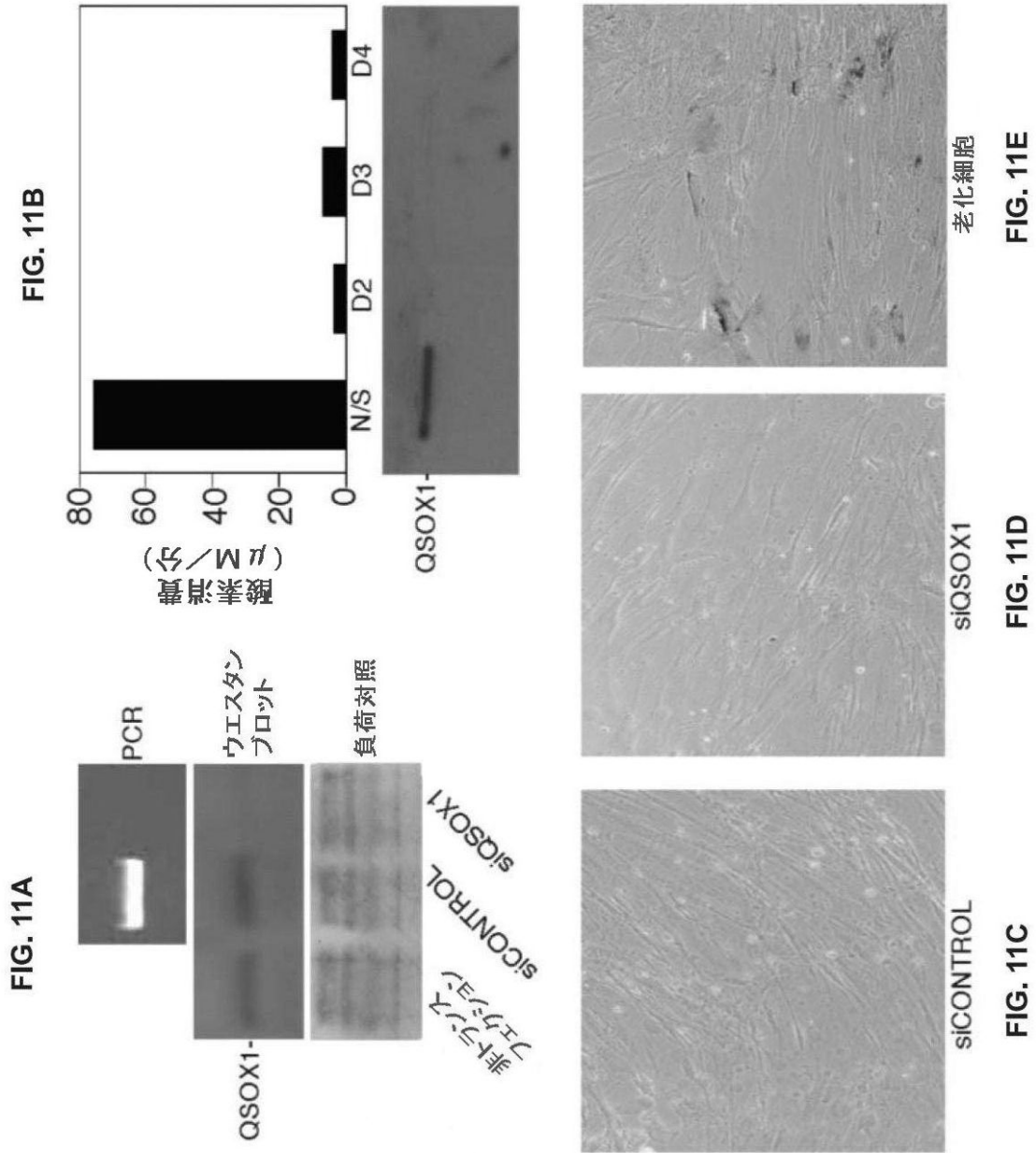
QSOX1の上側バンドのキモトリプシン切断

1 MRRCSGGPPPSLLLLLWLLAVPGANAAPRSALYSPDPLTLLQADTV
 51 RGAVLGSRSAWAVEFFASWCGHCIAFAPTWKALAEDVKAWRPALYLAALD
 101 CAEETNSAVCRDFNIPGFTVRFKFTKNGSGAVFPVAGADVQTLRERL
 151 IDALESHDHTWPPACPPLEPAKLEEDGFFARNNEEYLALIFEKGGSYLG
 201 REVALDLSQHKGVAVRRVLTNTEANVVRKFGVTDFFPCYLLFRNGSVSRVP
 251 VLMESSRFYTYLQRLSGLTREAAGTTVAQTANKIAPTVMKLABDRSKIY
 301 MADLESALHYILRIEVGRFPVLEGGRLVALKKFVAVLAKYFFPGRPLVQNF
 351 LHSVNEWLKRQKRNKIPYFFKTDALDDRKEGAVLAKKVNWIGCQGSEPHF
 401 RGFP CSLWVLFHFLTVQAAARQNVDSQEAAKAKEVLP AIRGYVHYFFGCR
 451 DCASHFEQMAAASMRVGVSPNAAVLWLSHNRVNARLAGAPSEDPQFPK
 501 VQWPPRELCSACHNERLDVPVWDVEATLNLKAHFSPSNIILDFPAAGSA
 551 ARRDVQNVAAPELAMGALELESRNSTLDPGKPEMMKSPNTTTPHVP AEG-PELI (604)
 601 PEASRPPK LHPGLRAAPGQEPPEHMAELQRNEQEQLGQWHL SKRDTGAA
 651 LLAESRAEKNRLWGPLEVRRVGRSSKQLVDIPEGQLEARAGRGRGQWLQV
 701 LGGGFSYLDISLCVGLYSLSFMGLLAMYTYFQAKIRALKGHAGHPAA (747)

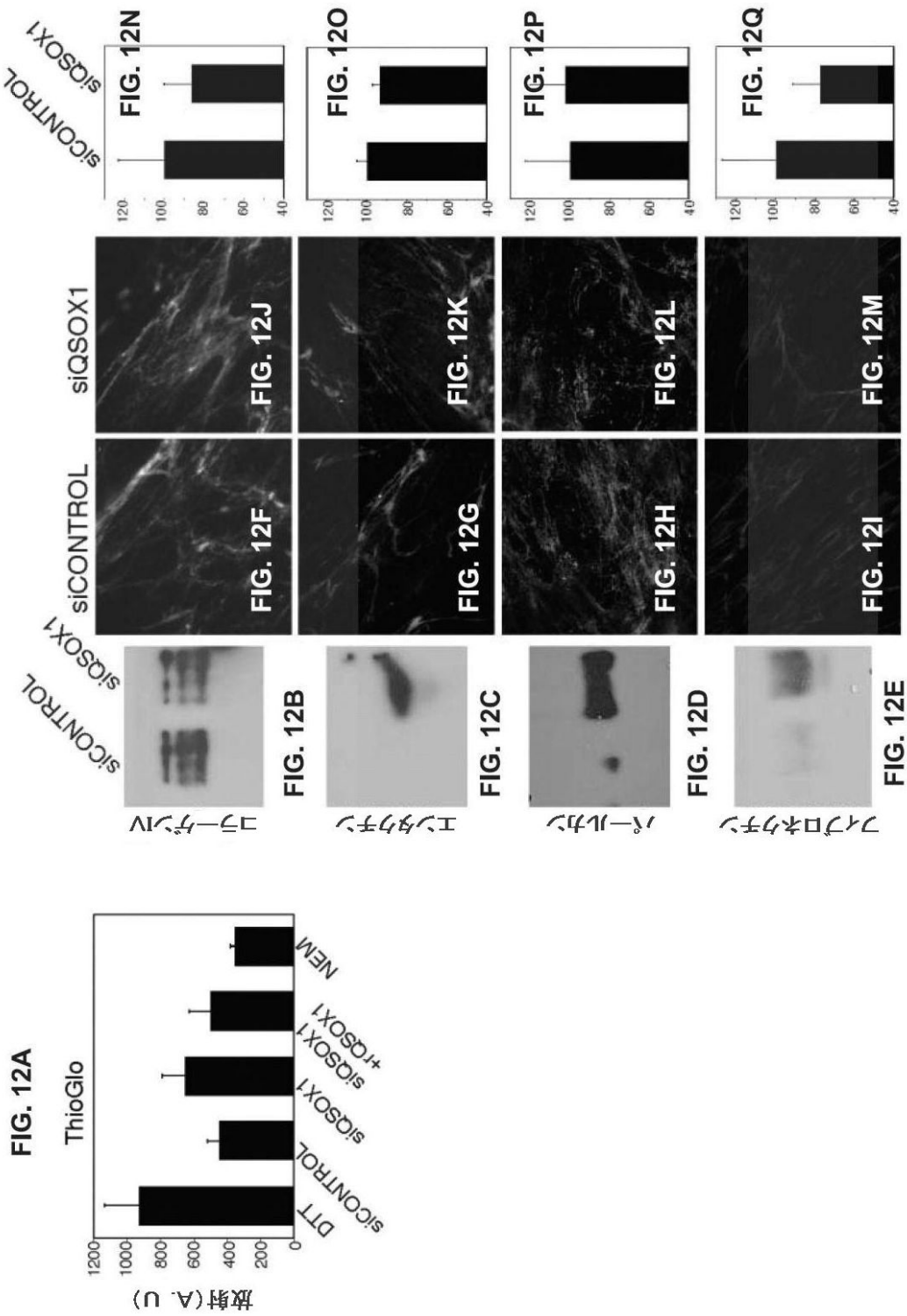
配列番号38

FIG. 10D

【 図 1 1 A - 1 1 E 】



【 図 12 A - 12 Q 】



【 図 1 3 A - 1 3 F 】

FIG. 13A

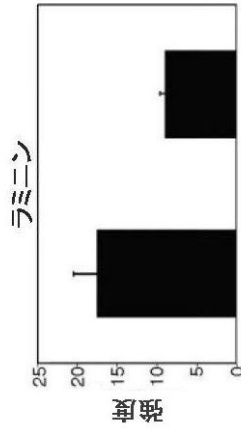


FIG. 13B

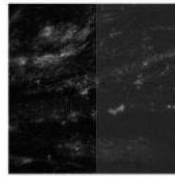


FIG. 13D

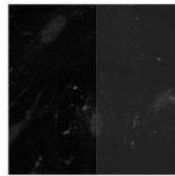


FIG. 13C

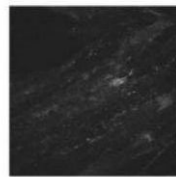
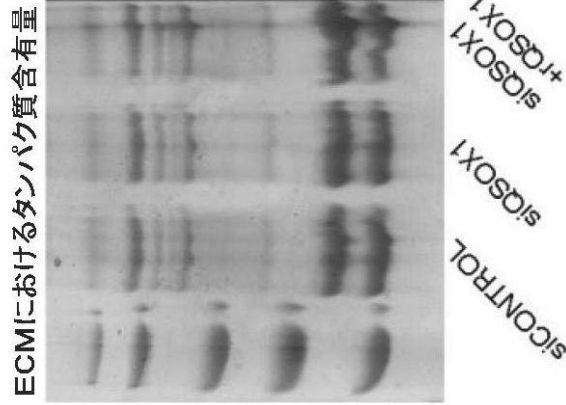


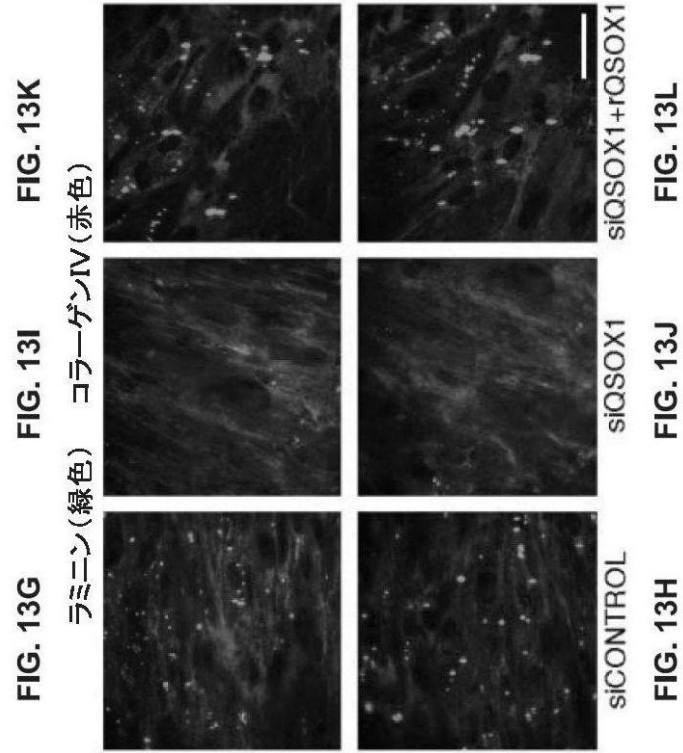
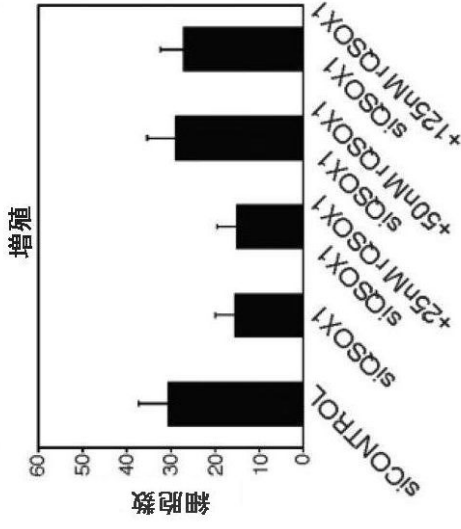
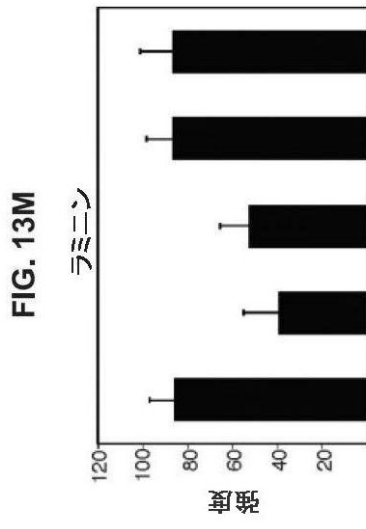
FIG. 13E



FIG. 13F

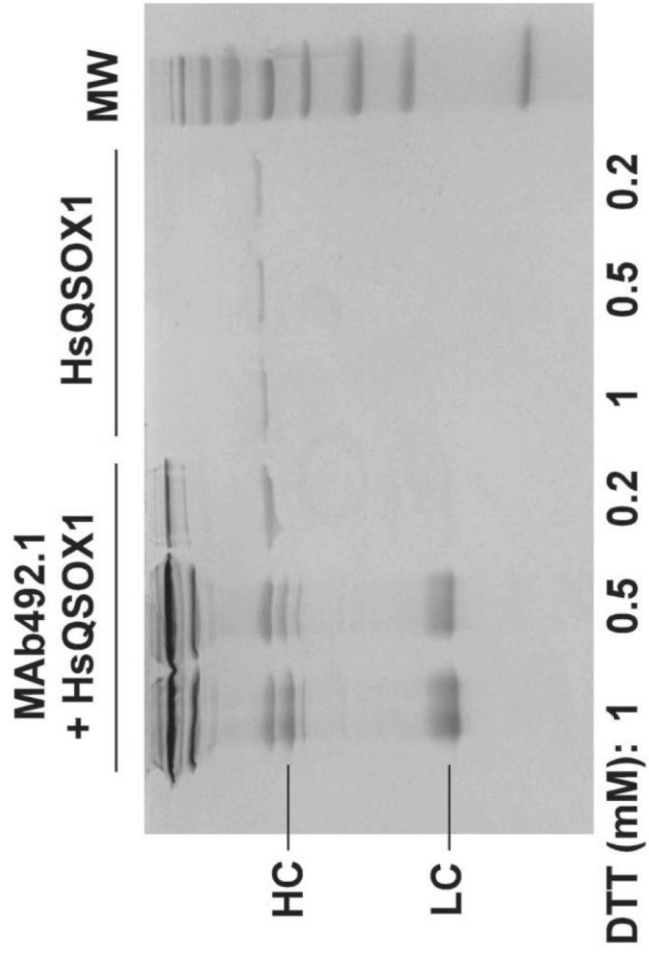


【 図 1 3 G - 1 3 N 】



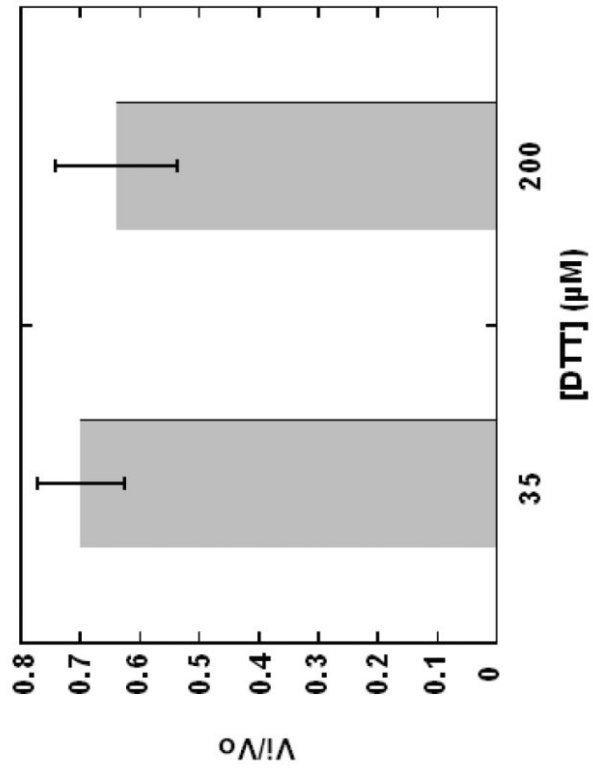
【 図 15 C 】

FIG. 15C



【 図 1 5 D 】

FIG. 15D



【 図 16 A - 16 D 】

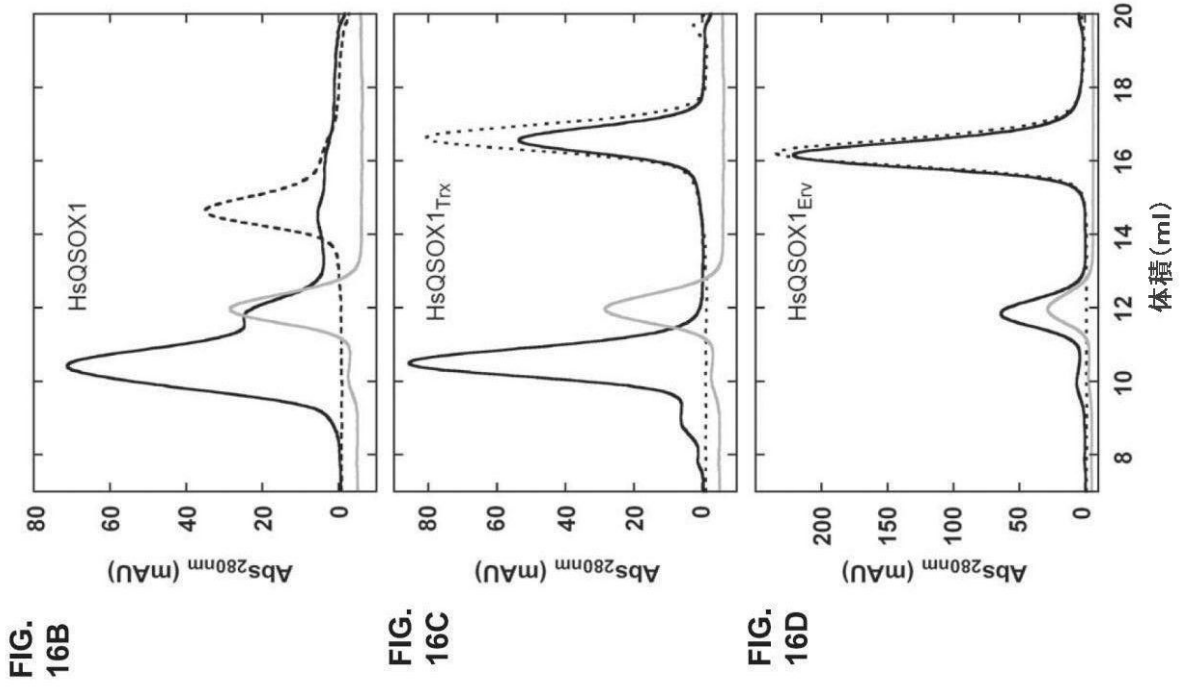


FIG. 16B

FIG. 16C

FIG. 16D

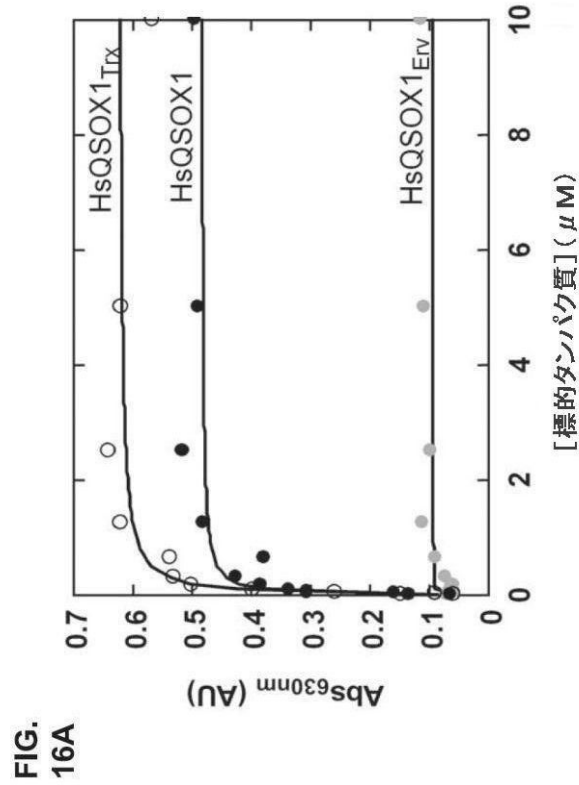
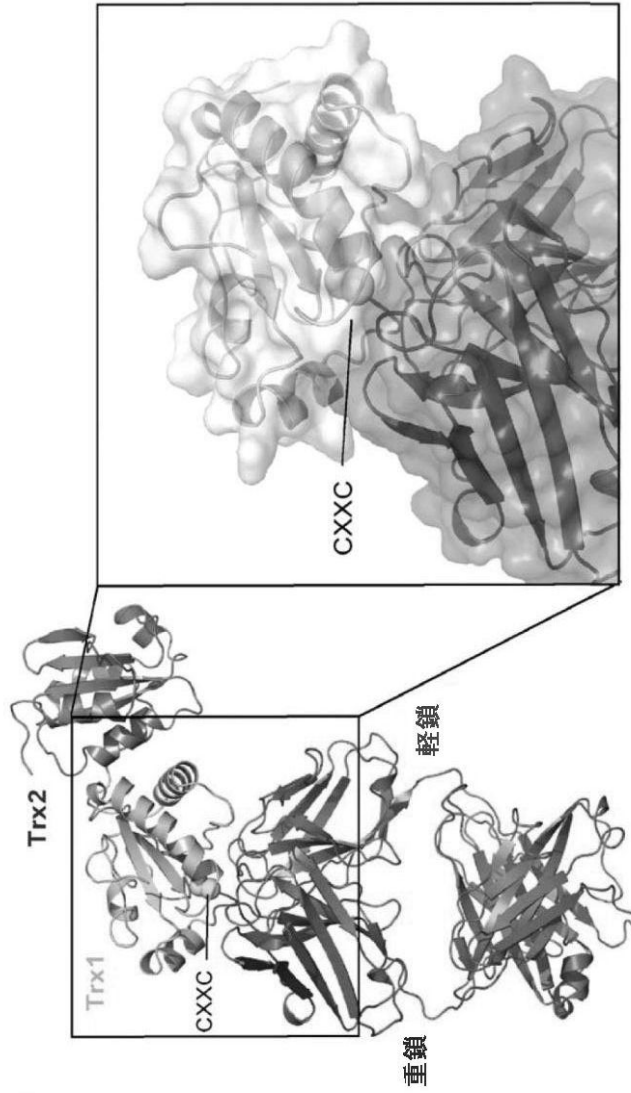


FIG. 16A

【 図 19 A 】

FIG. 19A



【 図 19 B - 19 C 】

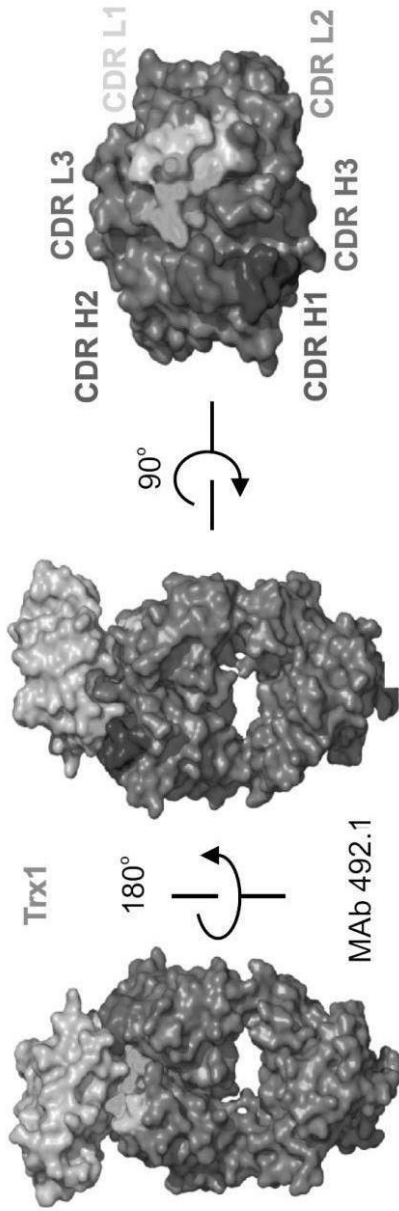


FIG. 19B

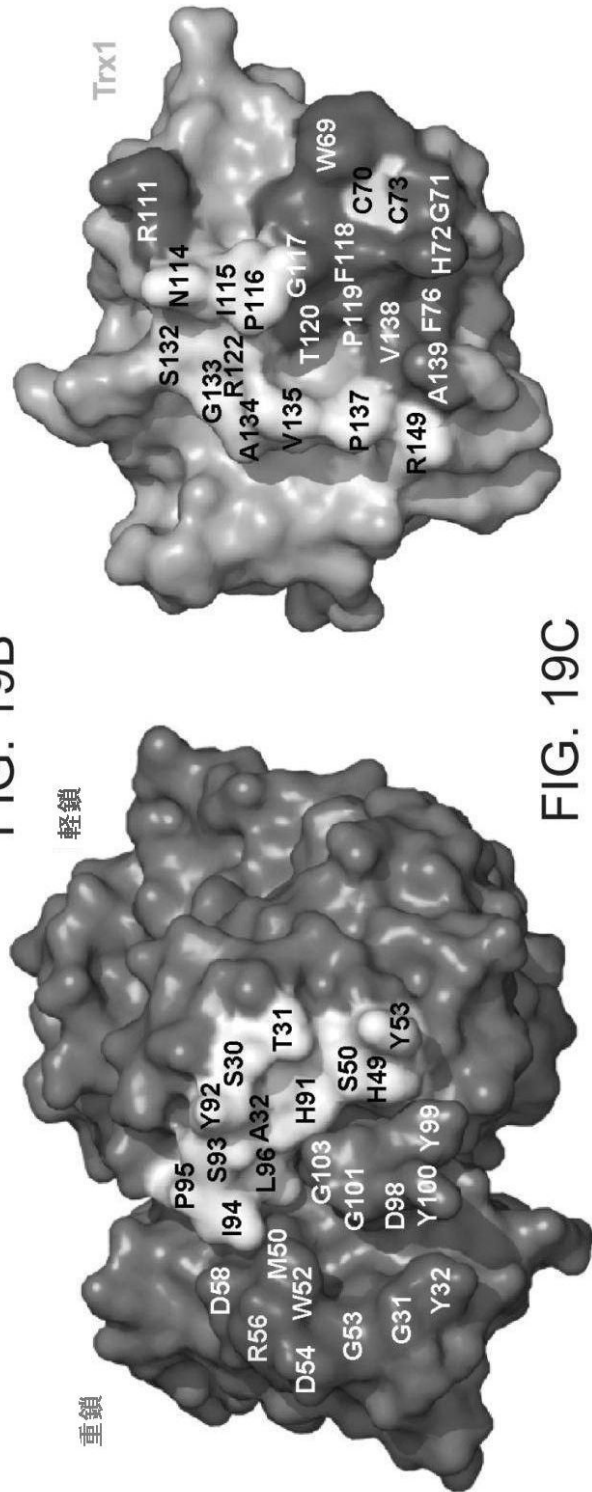


FIG. 19C

【 20A - 20B 】

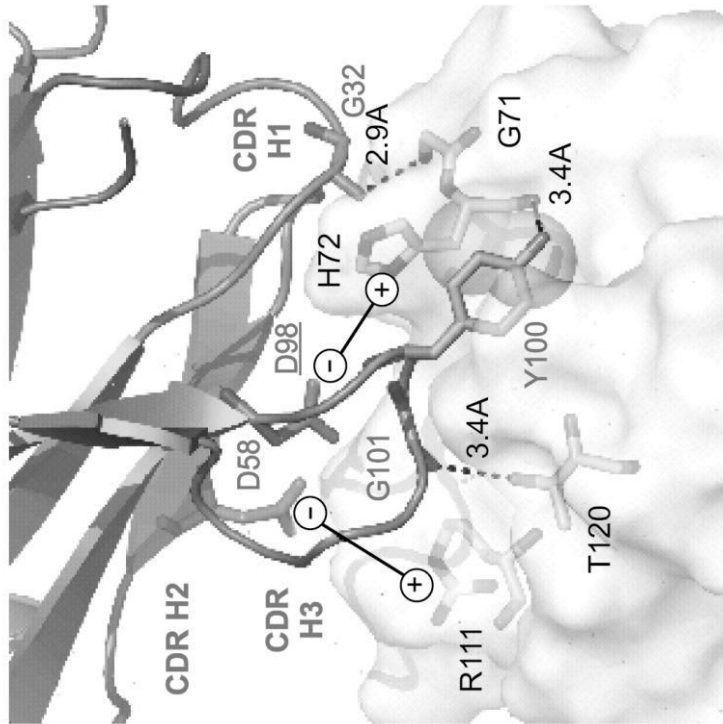


FIG. 20B

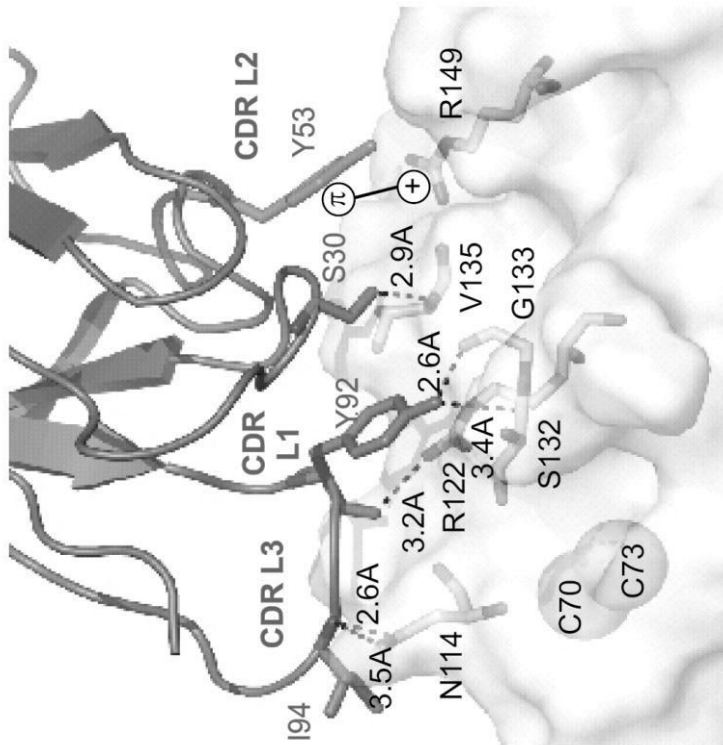
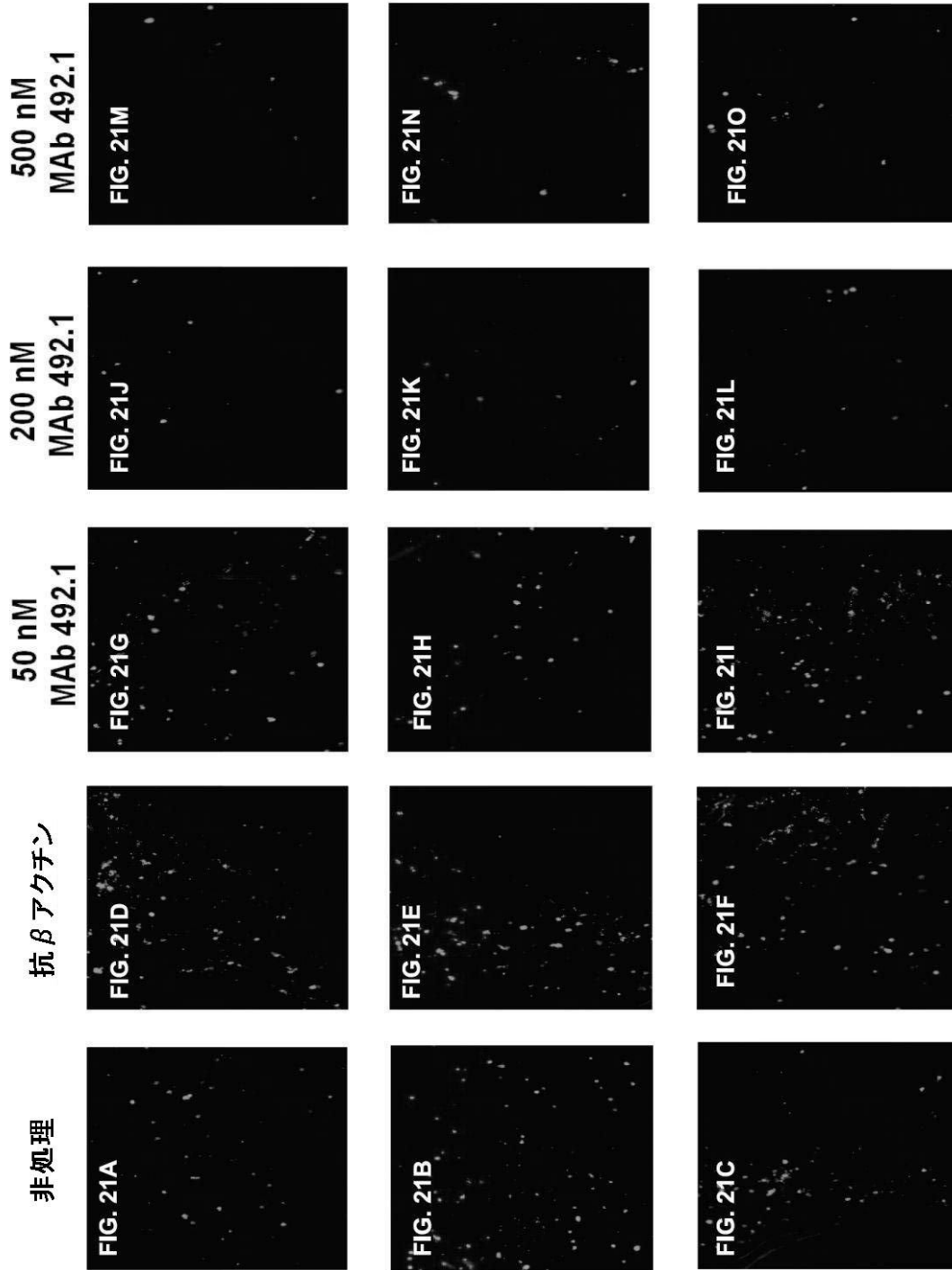


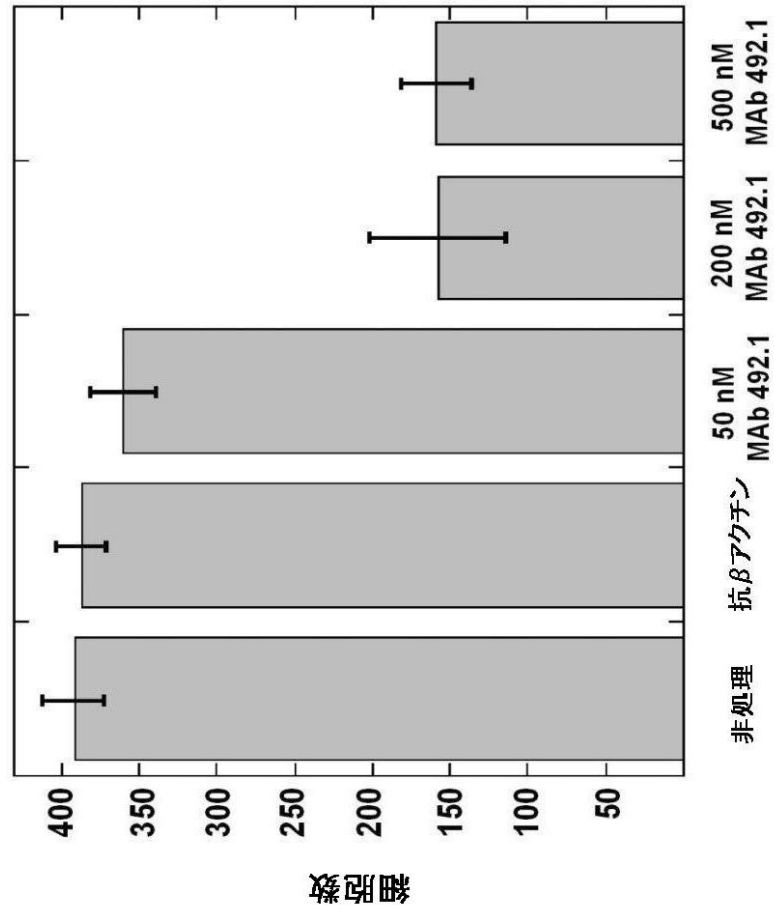
FIG. 20A

【 図 2 1 A - 2 1 O 】



【 図 2 2 】

FIG. 22



【 図 2 3 】

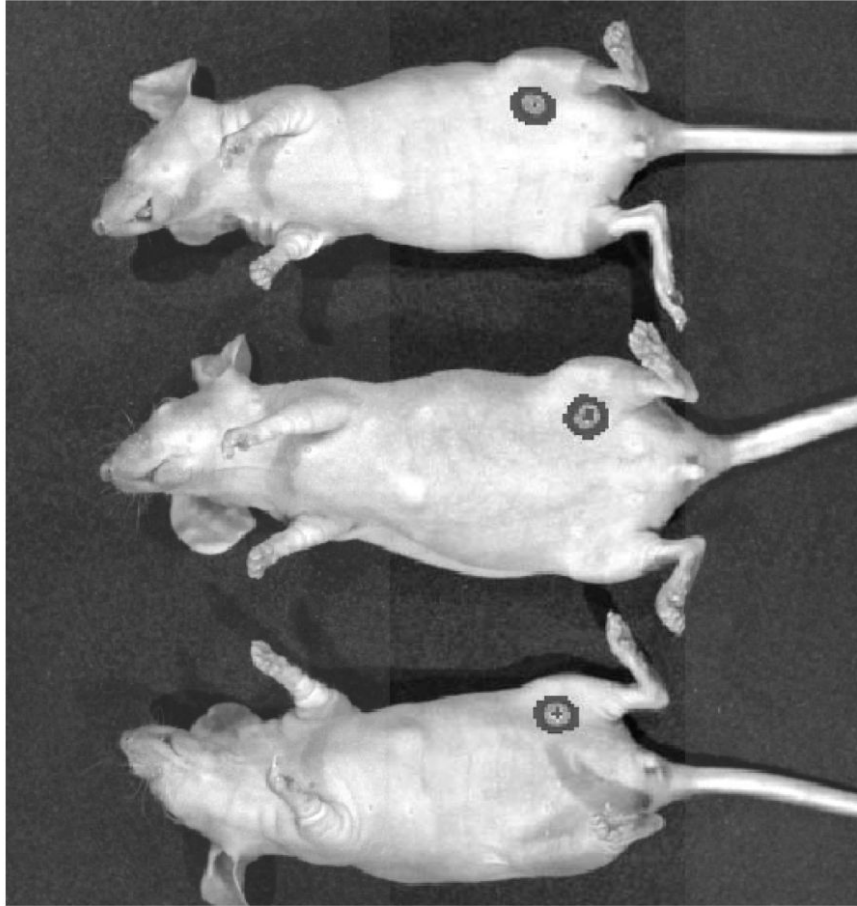


FIG. 23

【 図 2 4 】

FIG. 24

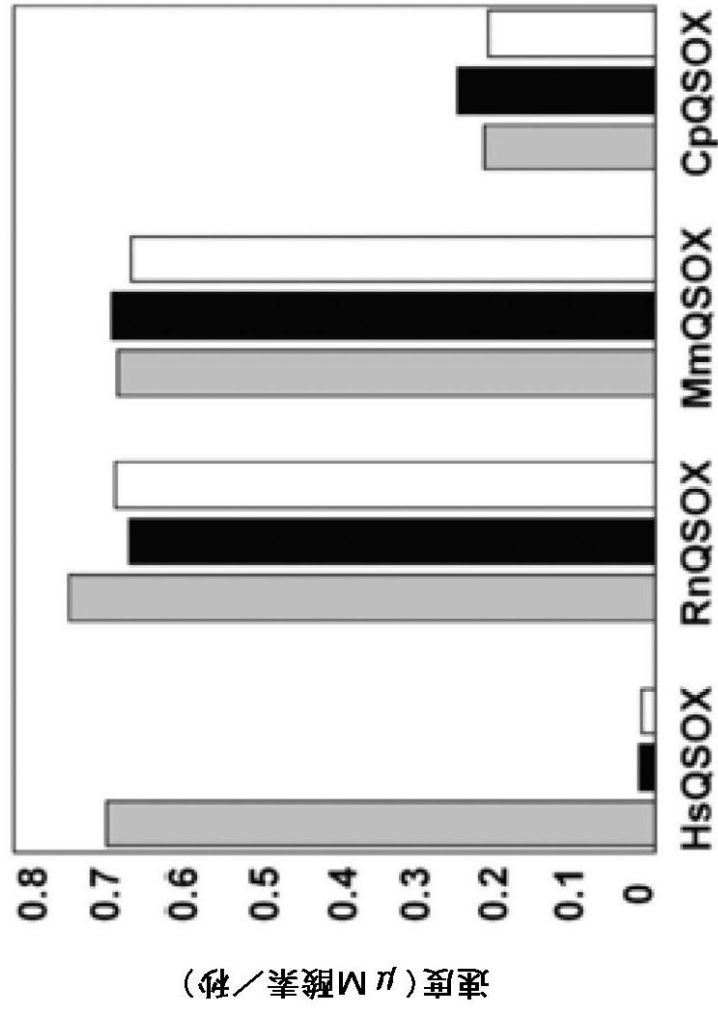
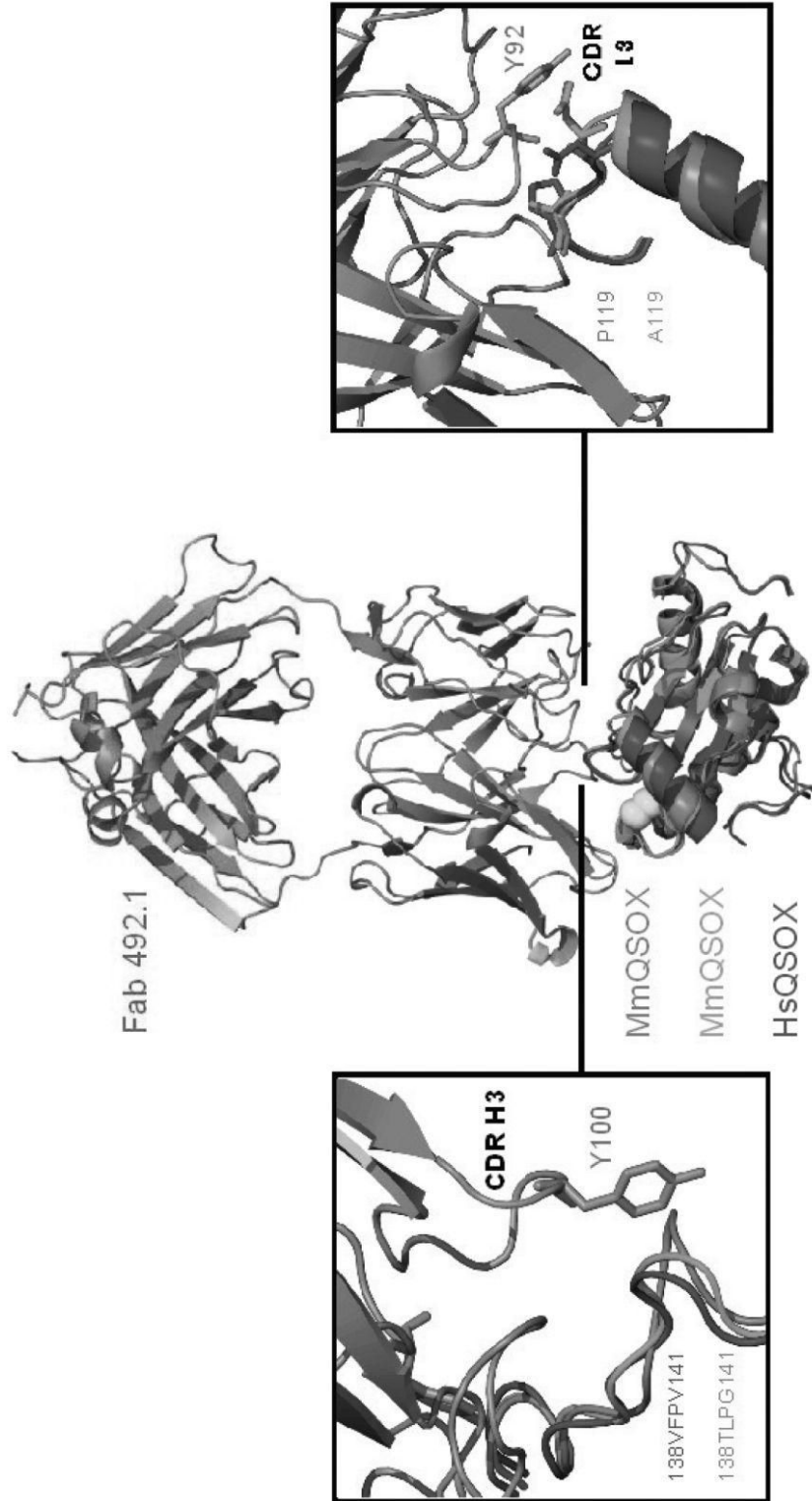


FIG. 25

				配列番号:	
ヒト	69	WCGHCIA F FAPT	79...108	AVCRDFNI P GFPTV R FFKAF T KN G SA V FP V AGADVQTL R ER	3
モルモット	69	WCGHCIA F FAPT	80...109	AVCRDFNIAGF P SV R FFKAF S KN S TG T LPVAGANVQML R ER	41
ラット	69	WCGHCIA F FAPT	82...111	AVCRE F NIAGF P TV R FFKAF S KN G TG T AL P AAGANVQTL R MR	42
マウス	69	WCGHCIA F FAPT	82...111	AVCRE F NIAG F PT V RFFQAF T KN G SA T LL P GA G ANVQTL R MR	43

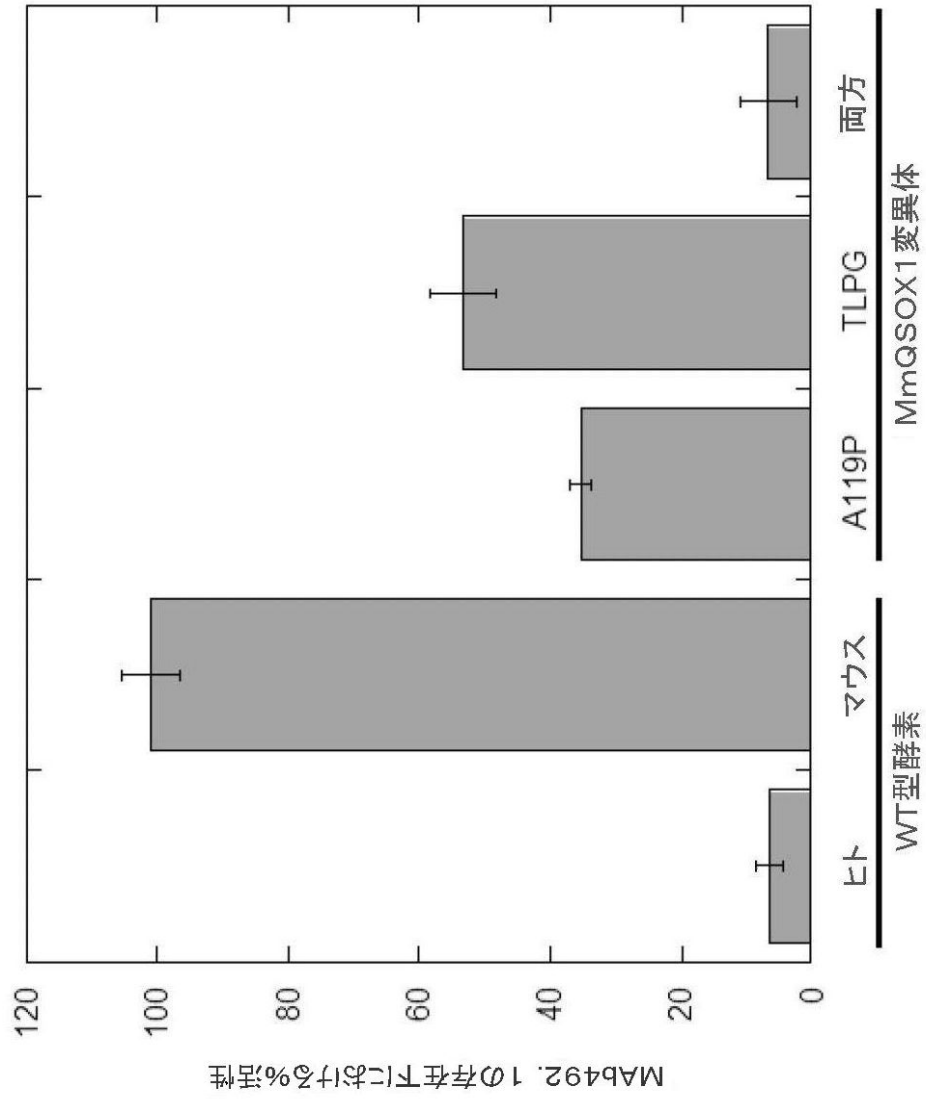
【 図 26 】

FIG. 26



【 図 27 】

FIG. 27



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IL2013/050209

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/40 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2012/040095 A1 (UNIV ARIZONA [US]; LAKE DOUGLAS [US]; KATCHMAN BENJAMIN [US]) 29 March 2012 (2012-03-29) figure 7; example 2 -----	1-5, 7-9, 21, 22
X	WO 02/06315 A2 (COMPUGEN LTD [IL]; MINTZ LIAT [IL]; FREILICH SHIRI [IL]; BERNSTEIN JEA) 24 January 2002 (2002-01-24) sequence 173 -----	54
X	CN 101 503 679 A (UNIV EAST CHINA SCIENCE & TECH [CN]) 12 August 2009 (2009-08-12) sequence 2 ----- ----- -/--	55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
24 May 2013		05/06/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Vadot, Pierre

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IL2013/050209

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Jack Geltosky: "QS0X1 as an anti-neoplastic drug target", 30 August 2011 (2011-08-30), pages 1-1, XP055011559, Retrieved from the Internet: URL:http://azte.technologypublisher.com/files/sites/ncs-m11-003.pdf [retrieved on 2011-11-08] the whole document</p> <p>-----</p>	1-56
X	<p>KATCHMAN BENJAMIN A ET AL: "Quiescin sulphydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases.", MOLECULAR CANCER RESEARCH : MCR DEC 2011, vol. 9, no. 12, December 2011 (2011-12), pages 1621-1631, XP002697583, ISSN: 1557-3125</p>	1-5,7-9, 21,22
Y	<p>page 1626, par. "Role of QS0X1 in tumour cell invasion"</p> <p>-----</p>	1-56
Y	<p>WO 2010/077921 A1 (UNIV ARIZONA; LAKE DOUGLAS F [US]; ANTWI KWASI [US]; HOSTETTER GALEN [] 8 July 2010 (2010-07-08) cited in the application examples</p> <p>-----</p>	1-56

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2013/050209

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012040095 A1	29-03-2012	NONE	
WO 0206315 A2	24-01-2002	AU 7865501 A WO 0206315 A2	30-01-2002 24-01-2002
CN 101503679 A	12-08-2009	NONE	
WO 2010077921 A1	08-07-2010	NONE	

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 P	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 0 1 A	
	G 0 1 N 33/50 Z	
	G 0 1 N 33/15 Z	
	A 6 1 K 48/00	
	A 6 1 K 39/395 D	

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

(72)発明者 グロスマン, イリス
イスラエル, 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ
ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロッ
プメント カンパニー リミテッド内

(72)発明者 イラニ, タル
イスラエル, 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ
ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロッ
プメント カンパニー リミテッド内

(72)発明者 アロン, アッサフ
イスラエル, 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト, ピー.オー. ボックス 95, アット ザ
ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス, イェダ リサーチ アンド デベロッ
プメント カンパニー リミテッド内

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BB20 BB24 CA25 CA26 CB01
CB02 CB03 CB07 CB08 CB14 CB17 DA20 DA36 FA16 FA37
FB01 FB02 FB03 FB08 FB12 FB13 FB15 GC15
4B024 AA01 AA12 BA08 BA53 BA61 CA01 CA04 CA07 CA11 CA20
DA06 EA04 GA03 GA11 HA15

专利名称(译)	用于抑制Qiesin巯基氧化酶 (QSOX 1) 的组合物和该组合物的用途		
公开(公告)号	JP2015516371A	公开(公告)日	2015-06-11
申请号	JP2014560523	申请日	2013-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
[标]发明人	ファスデボラ グロスマンイリス イラニタル アロンアッサフ		
发明人	ファス, デボラ グロスマン, イリス イラニ, タル アロン, アッサフ		
IPC分类号	A61K45/00 C12P21/08 C12N15/09 C12N9/02 C12N15/113 C07K16/40 C07K16/46 A61P35/00 A61P43/00 A61P35/04 A61P19/04 A61K39/395 A61K38/55 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/713 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/543 G01N33/50 G01N33/15 A61K48/00		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P19/04 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C07K16/40 C07K2299/00 C07K2317/33 C07K2317/55 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/76 C07K2317/92 C12N15/1137 C12N2310/14 C12Y108/03002		
FI分类号	A61K45/00.ZNA C12P21/08 C12N15/00.A C12N9/02 C12N15/00.G C07K16/40 C07K16/46 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P35/04 A61P19/04 A61K39/395.E A61K39/395.T A61P43/00.111 A61K37/64 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/713 A61K39/395.P G01N33/53.D G01N33/574.A G01N33/543.501.A G01N33/50.Z G01N33/15.Z A61K48/00 A61K39/395.D		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB08 2G045/CB14 2G045/CB17 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA08 4B024/BA53 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B050/CC03 4B050/DD11 4B050/FF12E 4B050/FF14E 4B050/LL01 4B050/LL03 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZC20 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/BB22 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/BB44 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	Kazehaya信明 浅野纪子		
优先权	61/607696 2012-03-07 US 61/665365 2012-06-28 US		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

公开了抑制或防止基底膜中层粘连蛋白组装的方法。该方法包括使组织与抑制QSOX1活性或表达的试剂接触，从而抑制或阻止基底膜中的层粘连蛋白组装。【选择图】无

遺伝子	siQ対siC	siQ+r対siC	siQ+r対siQ	siCにおけるレベル
LAMA1	1.6	1.5	-1.1	6.7
LAMA2	1.5	2.5	1.7	7.8
LAMA3	ND	ND	ND	ND
LAMA4	-1.0	-1.2	-1.2	10.3
LAMA5	ND	ND	ND	ND
LAMB1	1.1	-1.0	-1.1	10.8
LAMB2	-1.3	-1.3	-1.1	8.1
LAMB3	ND	ND	ND	ND
LAMB4	ND	ND	ND	ND
LAMC1	1.1	1.0	-1.0	10.7
LAMC2	ND	ND	ND	ND
LAMC3	ND	ND	ND	ND