

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-205430

(P2019-205430A)

(43) 公開日 令和1年12月5日(2019.12.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 C O 7 6
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 C O 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 C O 8 5
審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 58 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-100296 (P2019-100296)
 (22) 出願日 令和1年5月29日 (2019.5.29)
 (62) 分割の表示 特願2016-518089 (P2016-518089) の分割
 原出願日 平成26年10月8日 (2014.10.8)
 (31) 優先権主張番号 61/889,340
 (32) 優先日 平成25年10月10日 (2013.10.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 505415019
 ベス イスラエル デアコネス メディカル センター インコーポレイティッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ブルックリン アベニュー 330
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TM4SF1結合性タンパク質およびそれを使用する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】病的血管新生と関連する障害を治療するためのTM4SF1を標的とした結合性ドメインを含む化合物を提供する。

【解決手段】TM4SF1のアミノ酸配列を含むエピトープにおいてポリペプチドと特異的に結合する化合物(例えば、TM4SF1結合性タンパク質、例えば、抗TM4SF1抗体)、特に、エピトープとの結合後にTM4SF1発現細胞(例えば、腫瘍細胞または血管新生血管内皮細胞)中へインターナライズされることが可能である化合物を開示する。また、病的血管新生と関連する障害を有する対象を治療する方法も開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列

NYTFASTEGQYLLDSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープにおいてポリペプチドと特異的に結合する結合性ドメインを含む、化合物。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1 (TM4SF1) である、請求項1に記載の化合物。

【請求項 3】

前記TM4SF1がヒトTM4SF1である、請求項2に記載の化合物。

【請求項 4】

前記ヒトTM4SF1がグリコシル化ヒトTM4SF1である、請求項3に記載の化合物。

【請求項 5】

前記グリコシル化ヒトTM4SF1が、残基N129または残基N159でグリコシル化されている、請求項4に記載の化合物。

【請求項 6】

前記グリコシル化ヒトTM4SF1が、残基N129および残基N159でグリコシル化されている、請求項5に記載の化合物。

【請求項 7】

10 nM以下のKd値で前記グリコシル化ヒトTM4SF1に特異的に結合することができる、請求項6に記載の化合物。

【請求項 8】

前記Kd値が2 nM以下である、請求項7に記載の化合物。

【請求項 9】

前記Kd値が500 pM以下である、請求項8に記載の化合物。

【請求項 10】

前記結合性ドメインが、

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG

(SEQ ID NO: 3), RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5),

KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHVYT (SEQ ID NO: 7)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1~9のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 11】

前記結合性ドメインが、

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG

(SEQ ID NO: 3), および RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の化合物。

【請求項 12】

前記結合性ドメインが、

RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHVYT (SEQ ID NO: 7)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の化合物。

【請求項 13】

前記結合性ドメインが、

10

20

30

40

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVK (SEQ ID NO: 3),
 RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID
 NO: 6), および SQSTHVYT (SEQ ID NO: 7)

の6つのアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の化合物。

【請求項14】

抗体である、請求項1～13のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項15】

前記抗体がハイブリドーママウス細胞株8G4-5-13-13F(PTA-120523)によって産生される、請求項14に記載の化合物。

10

【請求項16】

前記抗体の重鎖が、
 EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRF
 TISRDNKNTVHLQMSSLRSEDTAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:
 8)

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14または15に
 記載の化合物。

【請求項17】

前記抗体の軽鎖が、
 AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDR
 FSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

20

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14または15に
 記載の化合物。

【請求項18】

前記抗体の重鎖が、
 EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRF
 TISRDNKNTVHLQMSSLRSEDTAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:
 8)

30

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ

前記抗体の軽鎖が、
 AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDR
 FSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14または15に
 記載の化合物。

【請求項19】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または合成抗体である、
 請求項14～18のいずれか一項に記載の化合物。

40

【請求項20】

前記抗体が抗体断片である、請求項14～19のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項21】

作用物質をさらに含む、請求項1～20のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項22】

前記作用物質が治療的作用物質または診断的作用物質である、請求項21に記載の化合物
 。

【請求項23】

前記治療的作用物質が生物活性部分である、請求項22に記載の化合物。

50

- 【請求項 2 4】
前記診断的作用物質が標識である、請求項22に記載の化合物。
- 【請求項 2 5】
前記生物活性部分が、細胞傷害性物質、化学療法薬、タンパク質、ペプチド、抗体、成長阻害物質、および抗ホルモン薬からなる群より選択される、請求項23に記載の化合物。
- 【請求項 2 6】
細胞傷害性物質が、リボソーム不活性化タンパク質、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビター、チューブリンインヒビター、アルキル化薬、抗生物質、抗腫瘍薬、増殖抑制薬、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼIまたはIIインヒビター、ホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、免疫調節物質、DNA副溝バインダー、および放射性物質からなる群より選択される、請求項25に記載の化合物。 10
- 【請求項 2 7】
リボソーム不活性化タンパク質がサポリンである、請求項26に記載の化合物。
- 【請求項 2 8】
前記標識が、蛍光標識、発色標識、または放射標識である、請求項24に記載の化合物。
- 【請求項 2 9】
前記作用物質が、前記化合物に直接的にコンジュゲートされている、請求項21～28のいずれか一項に記載の化合物。
- 【請求項 3 0】
前記作用物質が、リンカーによって前記化合物に間接的にコンジュゲートされている、請求項21～28のいずれか一項に記載の化合物。 20
- 【請求項 3 1】
請求項1～30のいずれか一項に記載の化合物を含む、薬学的組成物。
- 【請求項 3 2】
薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、請求項31に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 3 3】
対象における病的血管新生と関連する障害を治療するために製剤化されている、請求項31または請求項32に記載の薬学的組成物。
- 【請求項 3 4】
請求項1～30のいずれか一項に記載の化合物をコードする、ポリヌクレオチド。 30
- 【請求項 3 5】
請求項34に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。
- 【請求項 3 6】
請求項35に記載のベクターを含む、宿主細胞。
- 【請求項 3 7】
哺乳動物細胞である、請求項36に記載の宿主細胞。
- 【請求項 3 8】
原核細胞である、請求項36に記載の宿主細胞。
- 【請求項 3 9】
培養培地において請求項36に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、請求項1～30のいずれか一項に記載の化合物を製造する方法。 40
- 【請求項 4 0】
前記宿主細胞または前記培養培地から前記化合物を回収する工程をさらに含む、請求項39に記載の方法。
- 【請求項 4 1】
病的血管新生と関連する障害を有する対象を治療する方法であって、治療有効量の請求項1～23、25～27、29、および30のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的組成物を投与し、それによって該対象を治療する工程を含む、方法。
- 【請求項 4 2】
50

前記化合物が約0.01 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で前記対象へ投与される、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記化合物が約0.1 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で前記対象へ投与される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記化合物が約3 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で前記対象へ投与される、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記病的血管新生と関連する障害が癌である、請求項41～44のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項46】

前記癌が、乳癌、卵巣癌、腎臓癌 (renal cancer)、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌、皮膚癌、食道癌、腎臓癌 (kidney cancer)、脳腫瘍、甲状腺癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、精巣癌、小腸癌、唾液腺癌、および副腎癌からなる群より選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記病的血管新生と関連する障害が、肥満、黄斑変性、糖尿病性網膜症、乾癬、関節リウマチ、細胞性免疫、アテローム性動脈硬化症、または酒さである、請求項41または請求項42に記載の方法。

20

【請求項48】

前記化合物が、アミノ酸配列

NYTFASTEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含む前記エピトープとの結合後にTM4SF1発現細胞中へインターナライズされることが可能である、請求項41～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

前記化合物が、前記TM4SF1発現細胞の細胞質中へインターナライズされる、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記化合物が、前記TM4SF1発現細胞の核中へインターナライズされる、請求項48に記載の方法。

30

【請求項51】

前記TM4SF1発現細胞が、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍細胞である、請求項48に記載の方法。

【請求項52】

前記化合物または前記薬学的組成物が、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、腹膜に、皮下に、結膜下に、小嚢内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局所的に、局在的に、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在的な灌流によって、カテーテルによって、洗浄によって、クリーム形態で、または脂質組成物の形態で投与される、請求項41～51のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項53】

前記対象が、少なくとも一用量の前記化合物または前記薬学的組成物の投与を受ける、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

前記対象が、少なくとも二用量の前記化合物または前記組成物の投与を受ける、請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記化合物または前記組成物が、1週間に1～7回、前記対象へ投与される、請求項53に

50

記載の方法。

【請求項 5 6】

前記化合物または前記組成物が、4日に1回、前記対象へ投与される、請求項55に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記対象がヒトである、請求項41～55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

生物学的サンプル中のアミノ酸配列

NYTFASTEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むポリペプチドを検出するための方法であって、

- (a) 該生物学的サンプルおよび対照サンプルを提供する工程；
- (b) 該生物学的サンプルおよび該対照サンプルと、請求項1～22、24、もしくは28～30のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的組成物とを接触させる工程；ならびに
- (c) 該生物学的サンプルおよび該対照サンプル中に存在する該化合物と該ポリペプチドとの複合体の量を決定する工程

を含む、方法。

【請求項 5 9】

前記生物学的サンプルが、病的血管新生と関連する障害を有する疑いのある対象から得られる、請求項58に記載の方法。

【請求項 6 0】

(a) 請求項31～33のいずれか一項に記載の薬学的組成物；および

(b) 病的血管新生と関連する障害を治療するために該薬学的組成物を対象へ投与するための説明書を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

連邦政府支援研究に関する声明

本発明は、部分的に、国立衛生研究所 (NIH) によって与えられた助成金番号P01CA92644の下で政府の支援を受けてなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

血管新生は、血管内皮細胞 (EC) が増殖し、一部除去され、かつ再編して、既存の血管網から新しい血管を形成する、重要な細胞的事象である。血管供給の発達、正常および病的な増殖プロセスに必須であるという有力な証拠がある。酸素および栄養素の送達、ならびに異化産物の除去は、多細胞生物において生じる大多数の成長プロセスにおいて律速段階を示す。従って、血管区画は、胚形成中の器官発達および分化に対してだけでなく、成人における創傷治癒および生殖機能に対しても必要であると一般に考えられている。

【0 0 0 3】

血管新生はまた、癌、肥満、増殖性網膜症、加齢黄斑変性、腫瘍、酒さ、アテローム性動脈硬化症、関節リウマチ (RA)、細胞性免疫、および乾癬を含むがこれらに限定されない、様々な障害の病因に関与する。血管新生は、プロテアーゼの放出後の局所の細胞外基質の分解、毛細血管ECの増殖、および血管新生刺激への毛細血管の移動からなるプロセスのカスケードである。血管新生の注目すべき生理学および病理学的な重要性を考慮して、多くの研究が、このプロセスを調節することができる因子の解明に力を注いできた。

【0 0 0 4】

4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1 (Transmembrane-4 L six family member-1) (TM4SF1) は、多くの癌細胞上において豊富に発現されていたことから、「L6抗原」または「腫瘍細胞抗原」として1986年に発見された (Hellstrom et al. Cancer Res. 46: 3917-39

10

20

30

40

50

23, 1986 (非特許文献1))。予想外に、それはまた、正常組織に供給を行う血管の血管EC上において弱く発現されることがわかった (DeNardo et al. *Int J Rad Appl Instrum B*. 18: 621-631, 1991 (非特許文献2); Wright et al. *Protein Sci*. 9: 1594-1600, 2000 (非特許文献3); Richman et al. *Cancer Res*. 5916s-5920s, 1995 (非特許文献4); O'Donnell et al. *Prostate*. 37: 91-97, 1998 (非特許文献5))。TM4SF1は、いくつかのヒト癌に供給を行う血管の内側のECによって (Shih et al. *Cancer Res*. 69: 3272-3277, 2009 (非特許文献6); Zukauskas et al. *Angiogenesis*. 14: 345-354, 2011 (非特許文献7))、発達中の網膜血管のECによって (English et al. *J Biomed Inform*. 42: 287-295, 2009 (非特許文献8))、およびVEGF-Aを発現するアデノウイルスでマウスにおいて誘導された血管新生血管のECによって (Shih et al. *Cancer Res*. 69: 3272-3277, 2009 (非特許文献6)) 高度に発現されるが、多くの他の細胞タイプによって発現されることはない (Shih et al. *Cancer Res*. 69: 3272-3277, 2009 (非特許文献6); Zukauskas et al. *Angiogenesis*. 14: 345-354, 2011 (非特許文献7))。

10

【0005】

TM4SF1が癌などの病的血管新生と関連する障害を治療するための血管標的としての可能性を有することを示唆する知見にもかかわらず、TM4SF1を標的とし (例えば、TM4SF1特異的結合性ポリペプチド、例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、抗ヒトTM4SF1抗体)、商業および治療目的に有用かつ拡張可能である化合物についての満たされていない必要性が依然として存在する。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Hellstrom et al. *Cancer Res*. 46: 3917-3923, 1986

【非特許文献2】DeNardo et al. *Int J Rad Appl Instrum B*. 18: 621-631, 1991

【非特許文献3】Wright et al. *Protein Sci*. 9: 1594-1600, 2000

【非特許文献4】Richman et al. *Cancer Res*. 5916s-5920s, 1995

【非特許文献5】O'Donnell et al. *Prostate*. 37: 91-97, 1998

【非特許文献6】Shih et al. *Cancer Res*. 69: 3272-3277, 2009

【非特許文献7】Zukauskas et al. *Angiogenesis*. 14: 345-354, 2011

【非特許文献8】English et al. *J Biomed Inform*. 42: 287-295, 2009

30

【発明の概要】

【0007】

本発明は、療法 (例えば、病的血管新生と関連する障害、例えば癌、の治療) に特に有利であることを示す特性を有する、TM4SF1と (例えば、TM4SF1のECL2ドメイン上の特定のエピトープにおいて) 特異的に結合する化合物 (例えば、抗体) の同定に部分的に基づく。

【0008】

第1局面において、本発明は、アミノ酸配列

NYTFASTEGQYLLDSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープにおいてポリペプチドと特異的に結合する結合性ドメインを含む化合物を特徴とする。いくつかの態様において、ポリペプチドは4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1 (TM4SF1) である。いくつかの態様において、TM4SF1はヒトTM4SF1である。いくつかの態様において、ヒトTM4SF1はグリコシル化 (例えば、N-グリコシル化) ヒトTM4SF1である。いくつかの態様において、グリコシル化ヒトTM4SF1は、残基N129または残基N159でグリコシル化されている。いくつかの態様において、グリコシル化ヒトTM4SF1は、残基N129および残基N159でグリコシル化されている。いくつかの態様において、化合物は、10 nM以下 (例えば、10 nM、5 nM、2 nM、1 nM、500 pM、100 pM、50 pM、1 pM、または500 fM以下) のKd値でグリコシル化ヒトTM4SF1に特異的に結合することができる。いくつかの態様において、化合物の結合性ドメインは、

40

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVK (SEQ ID NO: 3), RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)

からなる群より選択される少なくとも1つアミノ酸配列 (例えば、1、2、3、4、5、または6つのアミノ酸配列) を含む。いくつかの態様において、結合性ドメインは、

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVK (SEQ ID NO: 3), および RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、化合物は、

RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む結合性ドメインを含む。いくつかの態様において、化合物は、

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2),

TISSGSIYIYYTDGVK (SEQ ID NO: 3), RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)

の6つのアミノ酸配列を含む結合性ドメインを含む。

【0009】

いくつかの態様において、化合物は抗体である。いくつかの態様において、抗体は、ハイブリドーマウス細胞株8G4-5-13-13F(PTA-120523)によって産生される。いくつかの態様において、抗体の重鎖は、

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRFTISR
DNAKNTVHLQMSSLRSEDAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性 (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性) を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗体の軽鎖は、

AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性 (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性) を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗体の重鎖は、

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRFTISR
DNAKNTVHLQMSSLRSEDAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性 (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性) を有するアミノ酸配列を含み、かつ抗体の軽鎖は、

AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDRFSG
SGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性 (例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性) を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または合成抗体である。いくつかの

10

20

30

40

50

態様において、抗体は抗体断片である。いくつかの態様において、化合物（例えば、抗体）は、裸であり、コンジュゲートされておらず、かつ/または修飾されていない。

【0010】

いくつかの態様において、化合物は作用物質をさらに含む。いくつかの態様において、作用物質は治療的作用物質または診断的作用物質である。いくつかの態様において、治療的作用物質は生物活性部分である。いくつかの態様において、生物活性部分は、細胞傷害性物質、化学療法薬、タンパク質、ペプチド、抗体、成長阻害物質、および抗ホルモン薬からなる群より選択される。いくつかの態様において、細胞傷害性物質は、リボソーム不活性化タンパク質、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビター、チューブリンインヒビター、アルキル化薬、抗生物質、抗腫瘍薬、増殖抑制薬、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼIまたはIIインヒビター、ホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、免疫調節物質、DNA副溝バインダー、および放射性物質からなる群より選択される。ある態様において、リボソーム不活性化タンパク質はサポリンである。いくつかの態様において、診断的作用物質は標識である。いくつかの態様において、標識は、蛍光標識、発色標識、または放射標識である。いくつかの態様において、作用物質は、化合物に直接的にコンジュゲートされている。他の態様において、作用物質は、任意でリンカーによって、化合物に間接的にコンジュゲートされている。

10

【0011】

第2局面において、本発明は、第1局面の化合物を含む薬学的組成物を特徴とする。いくつかの態様において、薬学的組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、および/または希釈剤をさらに含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、対象における病的血管新生と関連する障害を治療するために製剤化されている。

20

【0012】

第3局面において、本発明は、1つまたは複数の第1局面のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを特徴とする。1つまたは複数の第3局面のポリヌクレオチドは、任意でベクター（例えば、組換え発現ベクター）中に含まれ得る。

【0013】

第4局面において、本発明は、1つまたは複数の第3局面のポリヌクレオチドおよび/またはベクターを含む宿主細胞を特徴とする。いくつかの態様において、宿主細胞は哺乳動物細胞（例えば、HUVEC、CHO、HeLa、3T3、BHK、COS、293、およびJurkat細胞）である。他の態様において、宿主細胞は原核細胞（例えば、大腸菌（E.coli）細胞）である。

30

【0014】

第5局面において、本発明は、培養培地において第4局面の宿主細胞を培養する工程を含む、第1局面の化合物を製造する方法を特徴とする。いくつかの態様において、方法は、宿主細胞または培養培地からポリペプチドを回収する工程をさらに含む。いくつかの態様において、方法は、インビトロまたはエクスピボで行われる。

【0015】

第6局面において、本発明は、治療有効量の第2局面の薬学的組成物を対象へ投与し、それによって対象を治療する工程を含む、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を有する対象を治療する方法を特徴とする。いくつかの態様において、組成物は約0.01 mg/kg/4日～約10 mg/kg/4日の投薬量で対象へ投与される。いくつかの態様において、組成物は約0.1 mg/kg/4日～約10 mg/kg/4日の投薬量で対象へ投与される。いくつかの態様において、組成物は約3 mg/kg/wk～約10 mg/kg/wkの投薬量で対象へ投与される。

40

【0016】

第6局面の任意の態様において、病的血管新生と関連する障害は癌であり得る。いくつかの態様において、癌は、乳癌、卵巣癌、腎臓癌（renal cancer）、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌（gastric cancer）、胃癌（stomach cancer）、皮膚癌、食道癌、腎臓癌（kidney cancer）、脳腫瘍、甲状腺癌、前立腺癌、膵臓癌、および肺癌、精巣癌、小腸癌、唾液腺癌、および副腎癌からなる群より選択される。他の態様において、病的血管新生と関連する障害は、肥満、黄斑変性、糖尿病性網膜症、乾癬、関節リウマチ、細胞性免疫、アテ

50

ローム性動脈硬化症、または酒さである。

【0017】

第6局面の任意の態様において、化合物は、アミノ酸配列 NYTFASTEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープとの結合後にTM4SF1発現細胞中ヘインターナライズされることが可能であり得る。いくつかの態様において、化合物は、TM4SF1発現細胞の細胞質中ヘインターナライズされる。いくつかの態様において、化合物は、TM4SF1発現細胞の核中ヘインターナライズされる。いくつかの態様において、TM4SF1発現細胞は、腫瘍血管ECまたは腫瘍細胞である。

【0018】

いくつかの態様において、第2局面の組成物は、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、腹膜に、皮下に、結膜下に、小嚢内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局所的に、局在的に、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在的な灌流によって、カテーテルによって、洗浄によって、クリームで、または脂質組成物の形態で投与される。いくつかの態様において、組成物は、局在的な薬物送達によって投与され得る。いくつかの態様において、局在的な薬物送達システムは、組成物の徐放をもたらす。いくつかの態様において、対象は、少なくとも一用量（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多くの用量）の組成物の投与を受け、または毎日、毎週、毎月、または毎年、少なくとも一用量（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多くの用量）の投与を受ける。投与期間は、規定されてもよく（例えば、1~4週間、1~12カ月間、1~20年間）、または対象の一生にわたってもよい。他の態様において、対象は、少なくとも二用量（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多くの用量）の組成物の投与を受ける。さらに他の態様において、組成物は1週間に1~7回対象へ投与される。病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を治療する場合、本発明の第2局面の組成物は、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）の症状の発生もしくは確定診断の前か、または診断もしくは症状が明らかになった後のいずれかに、対象に投与され得る。組成物は、例えば、診断もしくは症状の臨床的認識の直後に、あるいは診断もしくは症状の検出の2、4、6、10、15もしくは24時間後、2、3、5もしくは7日後、2、4、6もしくは8週間後、またはさらには3、4もしくは6カ月後に投与され得る。

【0019】

第7局面において、本発明は、生物学的サンプル中のアミノ酸配列 NYTFASTEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むポリペプチドを検出するための方法であって、(a)生物学的サンプルおよび対照サンプルを提供する工程；(b)生物学的サンプルおよび対照サンプルと、第1局面の化合物または第2局面の薬学的組成物とを接触させる工程；ならびに(c)生物学的サンプルおよび対照サンプル中に存在する前記化合物と前記ポリペプチドとの複合体の量を決定する工程を含む方法の特徴とする。いくつかの態様において、生物学的サンプルは、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を有する疑いのある対象から得られる。

【0020】

最終局面において、本発明は、(a)本発明の第2局面の薬学的組成物；および(b)病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を治療するために薬学的組成物を対象へ投与するための説明書を含む、キットを特徴とする。

【0021】

本発明の全ての局面の好ましい態様において、対象は、哺乳動物、好ましくはヒトである。

[本発明1001]

アミノ酸配列

10

20

30

40

50

NYTFASLEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープにおいてポリペプチドと特異的に結合する結合性ドメインを含む、化合物。

[本発明1002]

前記ポリペプチドが4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1 (TM4SF1) である、本発明1001の化合物。

[本発明1003]

前記TM4SF1がヒトTM4SF1である、本発明1002の化合物。

[本発明1004]

前記ヒトTM4SF1がグリコシル化ヒトTM4SF1である、本発明1003の化合物。

[本発明1005]

前記グリコシル化ヒトTM4SF1が、残基N129または残基N159でグリコシル化されている、本発明1004の化合物。

[本発明1006]

前記グリコシル化ヒトTM4SF1が、残基N129および残基N159でグリコシル化されている、本発明1005の化合物。

[本発明1007]

10 nM以下のKd値で前記グリコシル化ヒトTM4SF1に特異的に結合することができる、本発明1006の化合物。

[本発明1008]

前記Kd値が2 nM以下である、本発明1007の化合物。

[本発明1009]

前記Kd値が500 pM以下である、本発明1008の化合物。

[本発明1010]

前記結合性ドメインが、
GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG
(SEQ ID NO: 3), RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5),
KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHVYT (SEQ ID NO: 7)

からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1001 ~ 1009のいずれかの化合物。

[本発明1011]

前記結合性ドメインが、
GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG
(SEQ ID NO: 3), および RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む、本発明1010の化合物。

[本発明1012]

前記結合性ドメインが、
RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHVYT (SEQ ID NO: 7)
より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む、
本発明1010の化合物。

[本発明1013]

前記結合性ドメインが、
GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG (SEQ ID NO: 3),
RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID
NO: 6), および SQSTHVYT (SEQ ID NO: 7)

の6つのアミノ酸配列を含む、本発明1010の化合物。

[本発明1014]

10

20

30

40

50

抗体である、本発明1001～1013のいずれかの化合物。

[本発明1015]

前記抗体がハイブリドーマウス細胞株8G4-5-13-13F(PTA-120523)によって産生される、本発明1014の化合物。

[本発明1016]

前記抗体の重鎖が、
 EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRF
 TISRDNKNTVHLQMSSLRSEDAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:
 8)

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1014または1015の化合物。

[本発明1017]

前記抗体の軽鎖が、
 AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDR
 FSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1014または1015の化合物。

[本発明1018]

前記抗体の重鎖が、
 EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRF
 TISRDNKNTVHLQMSSLRSEDAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:
 8)

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ

前記抗体の軽鎖が、
 AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDR
 FSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、本発明1014または1015の化合物。

[本発明1019]

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または合成抗体である、本発明1014～1018のいずれかの化合物。

[本発明1020]

前記抗体が抗体断片である、本発明1014～1019のいずれかの化合物。

[本発明1021]

作用物質をさらに含む、本発明1001～1020のいずれかの化合物。

[本発明1022]

前記作用物質が治療的作用物質または診断的作用物質である、本発明1021の化合物。

[本発明1023]

前記治療的作用物質が生物活性部分である、本発明1022の化合物。

[本発明1024]

前記診断的作用物質が標識である、本発明1022の化合物。

[本発明1025]

前記生物活性部分が、細胞傷害性物質、化学療法薬、タンパク質、ペプチド、抗体、成長阻害物質、および抗ホルモン薬からなる群より選択される、本発明1023の化合物。

[本発明1026]

細胞傷害性物質が、リボソーム不活性化タンパク質、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)イ

10

20

30

40

50

ンヒビター、チューブリンインヒビター、アルキル化薬、抗生物質、抗腫瘍薬、増殖抑制薬、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼIまたはIIインヒビター、ホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、免疫調節物質、DNA副溝バインダー、および放射性物質からなる群より選択される、本発明1025の化合物。

[本発明1027]

リボソーム不活性化タンパク質がサポリンである、本発明1026の化合物。

[本発明1028]

前記標識が、蛍光標識、発色標識、または放射標識である、本発明1024の化合物。

[本発明1029]

前記作用物質が、前記化合物に直接的にコンジュゲートされている、本発明1021～1028のいずれかの化合物。 10

[本発明1030]

前記作用物質が、リンカーによって前記化合物に間接的にコンジュゲートされている、本発明1021～1028のいずれかの化合物。

[本発明1031]

本発明1001～1030のいずれかの化合物を含む、薬学的組成物。

[本発明1032]

薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含む、本発明1031の薬学的組成物。

[本発明1033]

対象における病的血管新生と関連する障害を治療するために製剤化されている、本発明1031または本発明1032の薬学的組成物。 20

[本発明1034]

本発明1001～1030のいずれかの化合物をコードする、ポリヌクレオチド。

[本発明1035]

本発明1034のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

[本発明1036]

本発明1035のベクターを含む、宿主細胞。

[本発明1037]

哺乳動物細胞である、本発明1036の宿主細胞。 30

[本発明1038]

原核細胞である、本発明1036の宿主細胞。

[本発明1039]

培養培地において本発明1036の宿主細胞を培養する工程を含む、本発明1001～1030のいずれかの化合物を製造する方法。

[本発明1040]

前記宿主細胞または前記培養培地から前記化合物を回収する工程をさらに含む、本発明1039の方法。

[本発明1041]

病的血管新生と関連する障害を有する対象を治療する方法であって、治療有効量の本発明1001～1023、1025～1027、1029、および1030のいずれかの化合物またはその薬学的組成物を投与し、それによって該対象を治療する工程を含む、方法。 40

[本発明1042]

前記化合物が約0.01 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で前記対象へ投与される、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記化合物が約0.1 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で前記対象へ投与される、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記化合物が約3 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で前記対象へ投与される、本発明1043の 50

方法。

[本発明1045]

前記病的血管新生と関連する障害が癌である、本発明1041～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

前記癌が、乳癌、卵巣癌、腎臓癌 (renal cancer)、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌、皮膚癌、食道癌、腎臓癌 (kidney cancer)、脳腫瘍、甲状腺癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、精巣癌、小腸癌、唾液腺癌、および副腎癌からなる群より選択される、本発明1045の方法。

[本発明1047]

前記病的血管新生と関連する障害が、肥満、黄斑変性、糖尿病性網膜症、乾癬、関節リウマチ、細胞性免疫、アテローム性動脈硬化症、または酒さである、本発明1041または本発明1042の方法。

[本発明1048]

前記化合物が、アミノ酸配列

NYTFASLEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含む前記エピトープとの結合後にTM4SF1発現細胞中へインターナライズされることが可能である、本発明1041～1047のいずれかの方法。

[本発明1049]

前記化合物が、前記TM4SF1発現細胞の細胞質中へインターナライズされる、本発明1048の方法。

[本発明1050]

前記化合物が、前記TM4SF1発現細胞の核中へインターナライズされる、本発明1048の方法。

[本発明1051]

前記TM4SF1発現細胞が、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍細胞である、本発明1048の方法。

[本発明1052]

前記化合物または前記薬学的組成物が、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、腹膜に、皮下に、結膜下に、小嚢内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局所的に、局在的に、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在的な灌流によって、カテーテルによって、洗浄によって、クリームの形態で、または脂質組成物の形態で投与される、本発明1041～1051のいずれかの方法。

[本発明1053]

前記対象が、少なくとも一用量の前記化合物または前記薬学的組成物の投与を受ける、本発明1052の方法。

[本発明1054]

前記対象が、少なくとも二用量の前記化合物または前記組成物の投与を受ける、本発明1053の方法。

[本発明1055]

前記化合物または前記組成物が、1週間に1～7回、前記対象へ投与される、本発明1053の方法。

[本発明1056]

前記化合物または前記組成物が、4日に1回、前記対象へ投与される、本発明1055の方法。

[本発明1057]

前記対象がヒトである、本発明1041～1055のいずれかの方法。

[本発明1058]

生物学的サンプル中のアミノ酸配列

NYTFASLEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

10

20

30

40

50

を含むポリペプチドを検出するための方法であって、

- (a) 該生物学的サンプルおよび対照サンプルを提供する工程；
- (b) 該生物学的サンプルおよび該対照サンプルと、本発明1001～1022、1024、もしくは1028～1030のいずれかの化合物またはその薬学的組成物とを接触させる工程；ならびに
- (c) 該生物学的サンプルおよび該対照サンプル中に存在する該化合物と該ポリペプチドとの複合体の量を決定する工程

を含む、方法。

[本発明1059]

前記生物学的サンプルが、病的血管新生と関連する障害を有する疑いのある対象から得られる、本発明1058の方法。

[本発明1060]

- (a) 本発明1031～1033のいずれかの薬学的組成物；および
 - (b) 病的血管新生と関連する障害を治療するために該薬学的組成物を対象へ投与するための説明書
- を含む、キット。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1Aは、4つの膜貫通ドメイン(M1、M2、M3、およびM4)によって分離されている2つの細胞外ループ(ECL1およびECL2)、N末端およびC末端、ならびに細胞内ループ(ICL)を示す、TM4SF1の略図である。ECL2は、「n」と表示される、2つのN-グリコシル化部位を含有する。図1Bは、TM4SF1タンパク質ドメインおよび各ドメイン中のアミノ酸数の表である。

【図2A】8G4抗体を使用する免疫細胞化学を用いて行われた最初のスクリーニングを示す一連の画像であり、ここで、ヒトTM4SF1を過剰発現する(TM4SF1-OE)ように形質導入されたHUVEC((a)左パネル)およびHDF(ヒト皮膚線維芽細胞)((b)右パネル、HDF対照としての中央パネルを伴う)に対して陽性であったが、非常に低いレベル(約5 mRNAコピー/細胞)でTM4SF1を発現した天然HDFを染色しなかった、15個のクローンを同定した。

【図2B】エピトープマッピング実験において用いられたTM4SF1野生型、変異体、およびマウス-ヒトTM4SF1キメラ構築物のダイアグラムである。検出可能なレベルでTM4SF1を発現しないHEMn(ヒト表皮メラニン細胞、新生児)細胞中へ形質導入された様々なTM4SF1構築物に対する免疫細胞化学によって、エピトープマッピングを行った。ドメイン情報をHuman Protein Reference Databaseから得た。FL(完全長)TM4SF1タンパク質；ECL1、細胞外ループ1を発現する変異体；ECL2、細胞外ループ2を発現する変異体；N129/159G、アミノ酸位置129および159でのN-グリコシル化のための2つのアスパラギンがグリシンへ変異されている。N129/159Gの場合、2つの個別のPCR断片を調製し、DraIII制限酵素で切断し、次いでT4 DNAリガーゼでライゲートした。マウス-ヒトキメラ(Mu-Hu TM4SF1)は、アミノ酸17から始まるヒトTM4SF1配列を含有し、Integrated DNA Technology(Coraville, IA)によって化学的に合成された。各構築物を約500 mRNAコピー/細胞で発現させた。

【図2C】8G4抗体がグリコシル化依存性様式でECL2上のエピトープと特異的に結合することを示す一連の画像である。8G4およびファロイジンで染色するために、(i)空ベクター対照、(ii)FL-TM4SF1、(iii)ECL1、(iv)ECL2、または(v)N129/159GをHEMnに形質導入した。ECL2が存在しなかった場合(iii)または両方のn-グリコシル化領域が変異された場合(v)、染色は失われた。

【図2D】(i)空ベクター対照、(ii)マウスTM4SF1(Mu-TM4SF1)、または(iii)Mu-Hu TM4SF1キメラを発現するようにトランスフェクトされたHEK293細胞の8G4免疫染色の一連の画像である。8G4は、Mu-Hu TM4SF1キメラを認識したが、天然マウスTM4SF1を認識しなかった。

【図2E】ヒト、サル、およびマウスTM4SF1 ECL2ドメインのアミノ酸配列の比較配列アラインメントである。各ECL2配列内の2つのN結合型グリコシル化部位に下線を引いており、8G4抗体によって認識されるヒトTM4SF1上のエピトープを区切っている。8G4エピトープ

10

20

30

40

50

は、第1および第2グリコシル化部位にわたるヒトTM4SF1 ECL2のアミノ酸配列（即ち、ヒトTM4SF1のアミノ酸129～161）を含む。

【図3A】Triton X-100抽出無しでの、8G4、ファロイジン、およびDAPIで免疫染色された、ガラスディスク上で増殖されたHUVECの画像である。8G4は、TM4SF1を原形質膜ならびに細胞質および核部位へと位置決めした（白色矢印）。スケールバー、10 μm 。

【図3B】F-アクチン（ファロイジン染色、黄色矢印）が、細胞運動および細胞間相互作用において役割を有する、細胞表面からの薄く脆い膜突出部であるナノポジア（nanopodia）の最も近位の部分中へのみ広がったことを示す、図3Aの囲み(i)の拡大画像である。

【図3C】8G4がTM4SF1をナノポジア（桃色矢印）へと位置決めしたことを示す、図3Aの囲み(i)の拡大画像である。画像はまた、図3Bに示されるF-アクチンのファロイジン染色（黄色矢印）を示す。

【図3D】指定の濃度でのTriton X-100抽出を伴う、8G4、ファロイジン、およびDAPIで免疫染色された、ガラスディスク上で増殖されたHUVECの一連の画像である。残存する核周囲および核染色（白色矢印）は完全な除去のためには0.1% Triton X-100を必要としたが、8G4によって認識されたTM4SF1は、0.05%（しかし0.01%ではない）Triton X-100で大部分が抽出された。スケールバー、10 μm 。

【図3E】3つ全ての主な（28kD、25kD、および22kD）TM4SF1バンドが0.05%（しかし0.01%ではない）Triton X-100によって抽出されたことを示す、8G4抗体でTM4SF1について染色された免疫プロットである；より長い曝露は、0.1% Tritonによる残存28kD TM4SF1の抽出を実証した。

【図3F】TM4SF1の細胞内分布を示す、8G4抗体でTM4SF1について染色された免疫プロットである。

【図4A】8G4、CD144、およびDAPIで免疫染色されたヒト胃癌関連血管内皮細胞（EC）（桃色矢印）の免疫蛍光画像である。ヒト胃癌関連血管ECは強い8G4染色を示した。右の画像は、左の画像の囲み(i)の拡大画像である。L、管腔。スケールバー、10 μm 。

【図4B】CD144陽性血管（白色矢印）の弱い染色を示す、図4A中の胃癌関連血管ECに隣接する正常組織の免疫蛍光画像である。L、管腔。スケールバー、10 μm 。

【図4C】腫瘍血管の内側のECの8G4染色を示すイムノ-ナノゴールド-透過型電子顕微鏡写真（TEM）の画像である。

【図4D】断続的な金粒子（桃色矢印）が、(E)反管腔側の原形質膜よりも遥かに大きな程度まで(D)管腔の原形質膜を装飾していることを示す、図4Cの囲み(i)の拡大画像である。スケールバー、100 nm。

【図4E】断続的な金粒子（桃色矢印）が、(E)反管腔側の原形質膜よりも遥かに大きな程度まで(D)管腔の原形質膜を装飾していることを示す、図4Cの囲み(ii)の拡大画像である。スケールバー、100 nm。

【図4F】核質中の金粒子を示す青色矢印を有する図4Cの囲み(iii)の拡大画像である。スケールバー、100 nm。

【図4G】血管腔へ広がり経管的架橋を形成する、8G4標識（8G4-labeled）ナノポジア（緑色矢印）および基質充填された挿入成長様突出部（stroma-filled, intussusception-like projection）を示す、別の腫瘍血管のECのイムノ-ナノゴールド-TEM 8G4染色の画像である。

【図4H】血管腔へ広がり経管的架橋を形成する、基質充填された挿入成長様突出部を示す、図4Gの囲み(i)の拡大画像である。スケールバー、100 nm。

【図4I】胃中の隣接する正常血管ECのイムノ-ナノゴールド-TEM 8G4染色の画像である。

【図4J】胃中の隣接する正常血管ECが、ナノポジアを欠いており、遥かにより低い管腔8G4標識化（桃色矢印）および存在しない反管腔側8G4標識化を示すことを表している、図4Iの囲み(i)の拡大画像である。スケールバー、100 nm。

【図5A】フローサイトメトリー（ 10^4 細胞/測定）によって測定された細胞表面8G4強度が、24時間にわたって95.1%から4.9%へ下がったことを示す、8G4または対照マウス-IgGを有

10

20

30

40

50

する懸濁液中において4で1時間プレインキュベートされ、冷PBSで3回洗浄され、かつ記載の時間(0~24時間)再平板培養された、トリプシン処理HUVECの一連のフローサイトメトリーヒストグラムである。

【図5B】2、4、または24時間再平板培養され、8G4、ファロイジン、およびDAPIで染色されたHUVEC細胞を示す、一連の免疫細胞化学的画像である。画像は、2時間での8G4の細胞質沈着、4時間での沈着の増加、および24時間での無視できる染色を実証している。

【図5C】2時間での、GFP-形質導入されたHUVECの核質(フレーム-6、白色矢印)へと、およびさらに核周囲細胞質(フレーム-15、黄色矢印)へと8G4を局在化させている、共焦点-3D Z-スタック(22個のフレーム;細胞表面から基質へ220 nm/フレーム)画像である。

【図5D】培養の0、4および24時間での8G4標識HUVECから調製された核抽出物中の8G4抗体の重鎖および軽鎖の両方を示す免疫プロットである。

【図5E】8G4標識化の2時間後のHUVECのイムノ-ナノゴールド-TEM画像である。培養の2時間での細胞質、核膜孔(赤色矢印)、および核質(青色矢印)中の8G4の顕著な沈着の出現によって実証されたように、8G4はエンドサイトーシスによって取り込まれた。

【図5F】8G4がTM4SF1発現HUVEC中へインターナライズされることが可能であることを示す、図5Eの囲み(i)の拡大画像である。

【図6】図6Aおよび6Bは、培養4時間後、(A) 200 ng 8G4および対照(Ctl)ADC(サポリンコンジュゲートヤギIgG Fab断片)または(B) 200 ng 8G4および実験(Exp)ADC(サポリンコンジュゲートヤギ抗マウスFab断片)へ曝露し、続いて(A) 8G4/Ctl-ADCまたは(B) 8G4/Exp-ADCと共に72時間培養を継続し、その後免疫細胞化学を行った、24ウェルプレート中のガラスディスク上において培養されたHUVECの共焦点-3D Z-スタックイメージ(33個のフレーム;細胞表面から基質へ220 nm/フレーム)であり、これらは、(i) 8G4/Ctl-ADCと比較して(ii) 8G4/Exp-ADCへ曝露されたHUVECにおいて高レベルの張線維を示している。個々のフレームは、核(フレーム-12および-16;白色矢印)および核周囲細胞質(フレーム-20;黄色矢印)中の陽性Alexa-594シグナルを示す。図6Cは、MTTアッセイ(下記実施例1を参照のこと)の第5日におけるCtl-ADCと比較しての8G4/Exp-ADCでのHUVECの>80%殺傷(p, <0.0001、スチューデントt検定)を示すグラフである。抗体単独と共に培養されたHUVECは影響を受けなかった。

【図7】8G4-サポリン複合体誘導殺傷がTM4SF1発現細胞に限定されることを示すグラフである。HUVECと同様のレベルでTM4SF1を発現するPC3腫瘍細胞、または検出可能なTM4SF1を発現しないHEK293細胞を、MTTアッセイのために96ウェル(5×10³細胞/ウェル)プレートにおいて培養した。細胞を200 ng 8G4/Ctl-ADCまたは8G4/Exp-ADCと共に5日間培養した。MTTアッセイは、8G4/Exp-ADCを用いた場合、8G4の存在下でPC3細胞の>50%殺傷(p, <0.0001、スチューデントt検定)を示すが、8G4/Ctl-ADCを用いた場合、示さない。8G4/Exp-ADCは、HEK293細胞において検出可能な細胞傷害性を誘導しなかった。

【0023】

本発明の他の特徴および利点は以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなるだろう。

【発明を実施するための形態】

【0024】

発明の態様の詳細な説明

1. 定義

本明細書において用いる場合、用語「約」は、記載された値の+/-10%を意味する。

【0025】

「4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1(TM4SF1)」、「L6」、「L6抗原」、「M3S1」、「腫瘍関連抗原L6(TAAL6)」は、腫瘍血管内皮細胞(EC)、腫瘍細胞(TC)、発達中の網膜血管のEC、および血管新生血管上において高度に発現される、4回膜貫通型スーパーファミリー/テトラスパニンファミリーのポリペプチドを意味する。TM4SF1は、例えば、ヒトTM4SF1タンパク質(NCBI RefSeq No. NP_055035.1)を含み、これは202アミノ酸長であ

10

20

30

40

50

る。

【0026】

用語「抗体」および「免疫グロブリン(Ig)」は、最も広義に互換的に使用され、モノクローナル抗体(例えば、完全長または無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、それらが所望の生物活性を示す限り、二重特異性抗体)を含み、ある種の抗体断片も含み得る(本明細書においてより詳細に記載する)。抗体は、典型的には、「軽鎖」および「重鎖」の両方を含む。任意の脊椎動物種からの抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()およびラムダ()と呼ばれる、2つの明確に異なるタイプのうちの1つに割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは種々のクラスに割り当てることができる。免疫グロブリンには5つの主要なクラス: IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMがあり、これらのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2にさらに細分することができる。免疫グロブリンの種々のクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 、 、 、 および μ と呼ばれる。免疫グロブリンの種々のクラスのサブユニット構造および三次元配置は周知である。

10

【0027】

「抗体断片」または「断片」は、無傷抗体の一部分のみを含み、ここで、該部分は、好ましくは、無傷抗体中に存在する場合のその部分と通常関連する機能のうちの少なくとも1つ、好ましくは大部分または全てを保持している。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、およびFv断片(例えば、単鎖可変断片(scFv))；ダイアボディ；直鎖抗体；単鎖抗体分子；および抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化は、各々が単一の抗原結合性部位を有する、「Fab」断片と呼ばれる、2つの同一の抗原結合性断片と、容易に結晶化する能力を反映して命名された残りの「Fc」断片とを産生する。ペプシン処理は、2つの抗原結合性部位を有して、依然として抗原を架橋することができる $F(ab')_2$ 断片を生じる。一態様において、抗体断片は、無傷抗体の抗原結合性部位を含み、従って抗原に結合する能力を保持している。他の態様において、抗体断片、例えば、Fc領域を含むものは、無傷抗体中に存在する場合のFc領域と通常関連する生物学的機能、例えば、FcRn結合、抗体半減期調節、ADCC(抗体依存性細胞媒介性細胞傷害)機能、および補体結合のうちの少なくとも1つを保持している。一態様において、抗体断片は、無傷抗体と実質的に同様のインビボ半減期を有する一価抗体である。例えば、そのような抗体断片は、断片にインビボ安定性を与えることができるFc配列と連結された抗原結合性アームを含み得る。

20

30

【0028】

本明細書において用いる場合、抗体またはその断片の「可変ドメイン」は、相補性決定領域(CDR；即ち、CDR-1、CDR-2、およびCDR-3)ならびにフレームワーク領域(FR)のアミノ酸配列を含む抗体分子の軽鎖および重鎖の部分を目指す。VHは重鎖の可変ドメインを指す。VLは軽鎖の可変ドメインを指す。本発明において用いられる方法によれば、CDRおよびFRに割り当てられるアミノ酸位置は、Kabat(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991))に従って定義され得る。抗体または抗原結合性断片のアミノ酸番号付けもKabatのそれに従う。

40

【0029】

本明細書において用いる場合、用語「相補性決定領域」または「CDR」は、その存在が抗原結合に必要である、抗体可変ドメインのアミノ酸残基を指す。各可変ドメインは、典型的には、CDR-1、CDR-2およびCDR-3として識別される3つのCDR領域を有する。各相補性決定領域は、Kabatにより定義される「相補性決定領域」からのアミノ酸残基(即ち、軽鎖可変ドメイン中のおよそ残基24~34(CDR-L1)、50~56(CDR-L2)および89~97(CDR-L3))と、重鎖可変ドメイン中のおよそ残基31~35(CDR-H1)、50~65(CDR-H2)および95~102(CDR-H3)；Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))、

50

ならびにノまたは「超可変ループ」からの残基（即ち、軽鎖可変ドメイン中のおよそ残基26～32 (CDR-L1)、50～52 (CDR-L2)および91～96 (CDR-L3)と、重鎖可変ドメイン中のおよそ残基26～32 (CDR-H1)、53～55 (CDR-H2)および96～101 (CDR-H3) ; Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) を含み得る。いくつかの場合において、相補性決定領域は、Kabatに従って定義されたCDR領域と超可変ループとの両方からのアミノ酸を含み得る。

【0030】

本明細書において用いる場合、抗体の「定常ドメイン」という用語は、可変ドメインではない任意のドメインを指す（例えば、CH1、CH2、CH3、およびCLドメイン）。

【0031】

「フレームワーク領域」（以後FR）は、CDR残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、典型的にはFR1、FR2、FR3およびFR4と識別される4つのFRを有する。CDRがKabatに従い定められたとすると、軽鎖FR残基は、およそ残基1～23 (LCFR1)、35～49 (LCFR2)、57～88 (LCFR3)、および98～107 (LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は、重鎖残基のおよそ残基1～30 (HCFR1)、36～49 (HCFR2)、66～94 (HCFR3)、および103～113 (HCFR4)に位置する。CDRが超可変ループからのアミノ酸残基を含有しているならば、軽鎖FR残基は、軽鎖のおよそ残基1～25 (LCFR1)、33～49 (LCFR2)、53～90 (LCFR3)、および97～107 (LCFR4)に位置し、重鎖FR残基は、重鎖残基のおよそ残基1～25 (HCFR1)、33～52 (HCFR2)、56～95 (HCFR3)、および102～113 (HCFR4)に位置する。いくつかの場合において、CDRが、Kabatにより定められたCDRと超可変ループのものの双方からのアミノ酸を含有しているならば、FR残基はそれに応じて調節される。例えば、CDR-H1がアミノ酸H26～H35を含んでいる場合、重鎖FR1残基は1～25位に存在し、FR2残基は36～49位に存在する。抗体またはその機能性断片の可変領域の共通の構造的な特徴は、当技術分野において周知である。特定の抗体をコードするDNA配列は、以下の周知の方法において一般に見られ得る：例えば、参考文献として本明細書に組み入れられる、Kabat, et al. 2987 Sequence of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda MDに記載されるもの。加えて、抗体からの機能性可変領域をクローニングするための一般法は、参考文献として本明細書に組み入れられる、Chaudhary, V.K., et al., 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1066において見られ得る。

【0032】

用語「モノクローナル抗体」は、本明細書において用いる場合、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、即ち、集団を構成する個々の抗体は、可能性のある突然変異、例えば、少量で存在し得る天然に存在する突然変異を除いて、同一である。従って、修飾語「モノクローナル」は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の特徴を示す。ある実施態様では、このようなモノクローナル抗体は、典型的には、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、ここで、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られた。例えば、この選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、または組換えDNAクローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択とすることができる。例えば、標的への親和性を向上させ、標的結合配列をヒト化し、細胞培養におけるその産生を向上させ、インビボでのその免疫原性を低減させ、多重特異性抗体を作製するなどのために、選択された標的結合配列を更に変化させることができること、および、変化させた標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることが理解されるべきである。異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して向けられている。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらに他の免疫グロブリンが典型的に混入していないという点で有利である。

【0033】

修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特徴を示

10

20

30

40

50

し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法（例えば、Kohler and Milstein., *Nature* 256:495-497 (1975); Hongo et al., *Hybridoma* 14 (3):253-260 (1995), Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)）、組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004) ; Fellouse, *PNAS USA* 101(34):12467-12472 (2004); およびLee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)を参照のこと）、ならびに、ヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座または遺伝子の一部もしくは全部を有する動物において、ヒトまたはヒト様抗体を産生するための技術（例えば、WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *PNAS USA* 90: 2551 (1993) ; Jakobovits et al., *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; および同第5,661,016号; Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996); およびLonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)を参照のこと)が含まれる。

10

20

【0034】

「キメラ」抗体（免疫グロブリン）は、特定の種に由来するまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である重鎖および/または軽鎖の部分を含むが、鎖の残部は別の種に由来するまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同である抗体、ならびに所望の生物活性を示す限り、そのような抗体の断片である（米国特許第4,816,567号; およびMorrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)）。

【0035】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。大部分は、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長動物などの非ヒト種の超可変領域からの残基（ドナー抗体）によって置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの場合において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられている。さらに、ヒト化抗体はレシピエント抗体またはドナー抗体において見いだされない残基を含み得る。これらの修飾は抗体性能をさらに洗練するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを実質的に含み、ここで、超可変ループの全てまたは実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FRの全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分、典型的にはヒト免疫グロブリンのそれを含む。さらなる詳細については、Jones et al. *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann et al. *Nature* 332:323-329 (1988); およびPresta. *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)を参照のこと。また、以下の総説およびそこに引用される参考文献も参照のこと: Vaswani and Hamilton. *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris. *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle and Gross. *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

30

40

【0036】

「結合性ドメイン」は、標的のエピトープ、抗原、リガンド、または受容体と特異的に

50

結合する、化合物または分子の部分を意味する。結合性ドメインとしては、抗体（例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、ヒト化抗体、およびキメラ抗体）、抗体断片（例えば、Fab断片、Fab'2、scFv抗体、SMIP、ドメイン抗体、ダイアボディ、ミニボディ、scFv-Fc、アフィボディ、ナノボディ、およびドメイン抗体）、受容体、リガンド、アダプター、ならびに同定された結合パートナーを有する他の分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0037】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、本明細書において互換的に用いられ、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドまたは塩基、および/もしくはそれらの類似体、または、DNAポリメラーゼもしくはRNAポリメラーゼによって、または合成反応によって、ポリマーに組み込まれ得る任意の基質であってよい。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体などを含み得る。ヌクレオチド構造への修飾は、存在するのであれば、ポリマーのアセンブリの前に付与されてもよく、その後付与されてもよい。ヌクレオチドの配列に非ヌクレオチド構成要素が介在してもよい。ポリヌクレオチドが、合成後に、例えば標識とのコンジュゲーションによって、さらに修飾されてもよい。他の種類の修飾には、例えば、「キャップ」；天然ヌクレオチドの1つまたは複数の、類似体による置換；ヌクレオチド間修飾、例えば、非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメートなど）を有するものおよび荷電結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を有するもの；ペンダント部分、例えばタンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）を含有するもの；インターカレーター（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を有するもの；キレート剤（例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化金属など）を含有するもの；アルキル化薬を含有するもの；修飾結合（例えば、アノマー核酸など）を有するもの；ならびに非修飾型のポリヌクレオチドが含まれる。さらに、糖に通常存在するヒドロキシル基のいずれかが、例えばホスホン酸基、リン酸基によって置き換えられてもよく、標準的な保護基によって保護されてもよく、またはさらなるヌクレオチドに対するさらなる結合を用意するために活性化されてもよく、または固体もしくは半固体支持体とコンジュゲートされてもよい。5'末端OHおよび3'末端OHはリン酸化されてもよく、またはアミンもしくは炭素原子1~20個の有機キャッピング基部分によって置換されてもよい。他のヒドロキシルを標準的な保護基へと誘導体化してもよい。また、ポリヌクレオチドが、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アシル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、 α -アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロースもしくはリキソースなど、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、および塩基性ヌクレオシド類似体、例えばメチルリボシドなどを含む、当技術分野において一般に公知のリボース糖またはデオキシリボース糖の類似型を含有してもよい。1つまたは複数のホスホジエステル結合を代替的な連結基によって置き換えてもよい。これらの代替的な連結基には、リン酸がP(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR'、COまたはCH₂（「ホルムアセタール」）によって置き換えられる態様が非限定的に含まれ、式中、各RまたはR'は独立して、H、またはエーテル（-O-）結合、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルもしくはアラルキル（araldyl）を含有してもよい置換アルキルもしくは非置換アルキル（1~20 C）である。ポリヌクレオチド中の結合のすべてが同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書において言及される全てのポリヌクレオチドへ適用される。

【0038】

用語「ベクター」は、本明細書において用いる場合、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指すように意図される。1つのベクター型は「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントをライゲーションすることができる環状の二本鎖DNAループを指す。ある種のベクターは、ベクターが導入される宿主細胞中で自己複製する

10

20

30

40

50

ことができる（例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよび哺乳動物エピソームベクター）。他のベクター（例えば、哺乳動物非エピソームベクター）は宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種のベクターは、ベクターに機能的に連結された遺伝子の発現を指示することができる。かかるベクターを、本明細書中で、「組換え発現ベクター」（または、簡潔に、「組換えベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミドの形態である。プラスミドは最も一般的に使用されるベクターの形態であるので、本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、時には、互換的に用いられ得る。

【0039】

本発明に従う「エピトープ」は、抗体の結合にエネルギー的に寄与する、標的ポリペプチドまたは抗原のアミノ酸残基を指す。抗体（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）に対する標的ポリペプチドまたは抗原（例えば、TM4SF1、またはその断片もしくはバリエーション）の結合は、免疫細胞化学的分析によって決定することができる。いくつかの態様において、標的ポリペプチドのエネルギー的に寄与する残基のいずれか1つの変異（例えば、アラニンもしくはホモログ変異による、または欠失もしくは切断による、野生型TM4SF1の変異）は、抗体の結合を妨害し得、その結果、抗体の相対的親和性比（IC50変異型TM4SF1/IC50野生型TM4SF1）は1よりも大きくなり得る（例えば、2、3、4、5、10、50、100、500、1000またはそれ以上）。

【0040】

関心対象の標的ポリペプチドまたは抗原に「結合する」本発明の化合物は、化合物が、標的タンパク質または抗原を発現する細胞または組織の標的化において診断的作用物質および/または治療的作用物質として有用であるように十分な親和性で標的ポリペプチドまたは抗原に結合し、他のタンパク質とは有意には交差反応しないものである。そのような態様において、「非標的」タンパク質に対する化合物の結合の程度は、例えば、蛍光標識細胞分取（FACS）分析、免疫組織化学、放射性免疫沈降法（RIA）、ELISA、または当技術分野において公知の任意の他の標準的な定量的もしくは半定量的技術によって、決定され得るように、その特定の標的タンパク質に対する化合物の結合の約10%未満であると考えられる。

【0041】

標的分子（例えば、TM4SF1ポリペプチド）に対する本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体）の結合に関して、特定のポリペプチド標的または特定のポリペプチド標的上のエピトープに関して「特異的に結合する」、「特異的結合」、および「に特異的な」という用語は、測定できるほどに非特異的相互作用とは異なる結合を意味する（例えば、非特異的相互作用はウシ血清アルブミンまたはカゼインとの結合であり得る）。特異的結合は、例えば、対照分子との結合と比較しての分子の結合を決定することによって、測定することができる。例えば、特異的結合は、標的と類似している対照分子、例えば、過剰の非標識標的との競合によって決定することができる。この場合、プローブとの標識標的の結合が過剰な非標識標的によって競合的に阻害される場合に、特異的結合が示される。本明細書において用いる場合、特定のポリペプチド標的または特定のポリペプチド標的上のエピトープに関して「特異的結合」または「と特異的に結合する」または「に特異的である」という用語は、例えば、約1 μM ~ 約1 fM、あるいは約200 nM ~ 約1 fM、あるいは約200 nM ~ 約1 pM、あるいは約150 nM ~ 約1 fM、あるいは約150 nM ~ 約1 pM、あるいは約100 nM ~ 約1 fM、あるいは約100 nM ~ 約1 pM、あるいは約60 nM ~ 約1 fM、あるいは約60 nM ~ 約1 pM、あるいは約50 nM ~ 約1 fM、あるいは約50 nM ~ 約1 pM、あるいは約30 nM ~ 約1 fM、あるいは約30 nM ~ 約1 pM、あるいは約20 nM ~ 約1 fM、あるいは約20 nM ~ 約1 pM、あるいは約10 nM ~ 約1 fM、あるいは約10 nM ~ 約1 pM、あるいは約8 nM ~ 約1 fM、あるいは約8 nM ~ 約1 pM、あるいは約6 nM ~ 約1 fM、あるいは約6 nM ~ 約1 pM、あるいは約4 nM ~ 約1 fM、あるいは約4 nM ~ 約1 pM、あるいは約2 nM ~ 約1 fM、あるいは約2 nM ~ 約500 pM、あるいは約1 nM ~ 約1 fM、あるいは約1 nM ~ 約1 pMの、標的についてのKdを有する化合物

10

20

30

40

50

によって、示され得る。一態様において、用語「特異的に結合する」は、化合物が、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープ標的に実質的に結合することなく、特定のポリペプチド標的または特定のポリペプチド標的上のエピトープに結合する、結合を指す。

【0042】

「病的血管新生と関連する障害」は、新生血管が、疾患状態において、過剰に、不十分に、または不適切に（例えば、血管新生の場所、タイミングまたは発生が医学的観点から望ましくない）増殖することを特徴とするか、またはそれが疾患状態を引き起こすような、任意の状態であり、これは、本発明の化合物またはその薬学的組成物での治療から恩恵を受けると考えられる。本明細書において治療される障害の非限定的な例としては、癌、

10

【0043】

用語「癌」および「癌性」は、制御されない細胞成長を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理的状态を指すかまたは表す。この定義には、良性および悪性癌、ならびに潜伏腫瘍または微小転移巣（micrometastases）が含まれる。癌の例としては、乳癌、卵巣癌、腎臓癌（renal cancer）、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌（gastric cancer）、胃癌（stomach cancer）、皮膚癌、食道癌、腎臓癌（kidney cancer）、脳腫瘍、甲状腺癌、前立腺癌、膵臓癌、および肺癌が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0044】

「腫瘍」は、本明細書において用いる場合、悪性または良性にかかわらず、全ての新生物性細胞成長および増殖、ならびに全ての前癌性および癌性細胞および組織を指す。用語「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、および「腫瘍」は、本明細書において言及される場合、相互に排他的ではない。

【0045】

「化学療法薬」は、癌の治療において有用な化学的化合物である。化学療法薬の例としては、例えば、パクリタキセルまたはトポテカンまたはペグ化リポソームドキシソルピシン（PLD）が挙げられる。化学療法薬の他の例としては、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミドなどのアルキル化薬；ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル類；ベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、およびウレドパ（uredopa）などのアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミン（trimethylolomelamine）を含むエチレンイミン類およびメチラメラミン類（methylamelamines）；アセトゲニン類（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成アナログを含む）；クリプトフィシン類（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログKW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノブエンピキン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンなどのニトロソ尿素類；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマ11およびカリケアマイシンオメガ11（例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照のこと）などの抗生物質；ジネミシンAを含むジネミシン；クロドロネートなどのビスホスホネート類；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォアおよび関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、アウトラマイシン（authramycin）、アザセリン、プレオマイシン類、カクチノマイシン（cactinomycin）、カラビ

30

40

50

シン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類 (chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN (登録商標) ドキソルピシン (モルホリノ-ドキソルピシン、シアノモルホリノ-ドキソルピシン、2-ピロリノ-ドキソルピシン、およびデオキシドキソルピシンを含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン類、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン; メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル (5-FU) などの代謝拮抗物質: デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン (pteropterin)、トリメトトレキサートなどの葉酸アナログ類; フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリンアナログ類; アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなどのピリミジンアナログ類; カルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン類; アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎薬 (anti-adrenals); フォリン酸などの葉酸補充薬; アセグラトン; アルドホスファミド配糖体; アミノレプリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル; ビサントレン; エダトラキサート (edatraxate); デフォファミン (defofamine); デメコルシン; ジアジクオン; エルフォルミチン (elformithine); エリプチニウムアセテート; エポチロン; エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダイニン (lonidainine); マイタンシンおよびアンサミトシンなどのマイタンシノイド類; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダンモール (mopidanmol); ニトラエリン (nitraerine); ペントスタチン; フェナメット; ビラルピシン; ロソキサントロン; ポドフィリン (podophyllinic) 酸; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; P SK (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); ラゾキサン; リゾキシシン; シゾフラン (sizofuran); スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジコン; 2,2',2''-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン類 (特に、T-2毒素、ベラキュリン (verracurin) A、ロリジンA、およびアングイジン); ウレタン; ビンデシン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトプロニトール; ミトラクトール; ピボプロマン; ガシトシン (gacytosine); アラビノシド (「Ara-C」); シクロホスファミド; チオテバ; タキソイド類、例えば、TAXOL (登録商標) パクリタキセル (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.); ABRAXANE (登録商標) クレモフォルフリー、アルブミンを用いて作られたパクリタキセルのナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.); およびTAXOTERE (登録商標) ドセタキセル (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); クロランブシル (chloranbucil); GEMZAR (登録商標) ゲムシタピン; 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキサート; シスプラチン、オキサリプラチンおよびカルボプラチンなどの白金アナログ類; ビンブラスチン; 白金; エトボシド (VP-16); イホスファミド; ミトキサントロン; ピンクリスチン; NAVELBINE (登録商標) ビノレルビン; ノバントロン; テニボシド; エダトレキサート; ダウノマイシン; アミノプテリン; ゼローダ; イバンドロネート; イリノテカン (Camptosar, CPT-11) (5-FUおよびロイコボリンと併せたイリノテカンの治療レジメンを含む); トポイソメラーゼインヒビター-RFS2000; ジフルオロメチルオルニチン (DMFO); レチノイン酸などのレチノイド類; カペシタピン; コンプレタスタチン; ロイコボリン (LV); オキサリプラチン治療レジメン (FOLFOX) を含むオキサリプラチン; ラパチニブ (Tykerb (登録商標)); 細胞増殖を低下させるPKC-、Raf、H-Ras、EGFR (例えば、エルロチニブ (Tarceva (登録商標))) およびVEGF-Aのインヒビター、ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0046】

用語「細胞傷害性物質」は、本明細書において用いる場合、細胞の機能を阻害もしくは

防止し、かつ/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、およびLuの放射性同位体）、化学療法薬、例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ビンカルカロイド類（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシンまたは他のインターカレート剤、核酸分解酵素などの酵素およびその断片、抗生物質、および細菌、真菌、植物または動物起源の小分子毒素または酵素活性毒素などの毒素（その断片および/またはバリエーションを含む）、ならびに下記に開示された様々な抗腫瘍薬または抗癌薬を含むように意図される。他の細胞傷害性物質を下述する。殺腫瘍薬は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【0047】

「成長阻害物質」は、本明細書において用いる場合、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞（例えば、TM4SF1を発現する細胞）の成長および/または増殖を阻害する化合物または組成物を指す。従って、成長阻害物質は、TM4SF1発現細胞のパーセンテージを有意に低減するものであり得る。成長阻害物質の例としては、G1停止およびM期停止を誘発する薬剤などの、細胞周期の進行を阻止する（S期以外の場所において）薬剤が挙げられる。古典的なM期阻止剤には、ピンカ類（ピンクリスチンおよびピンブラスチン）、タキサン類、およびトポイソメラーゼIIインヒビター、例えば、アントラサイクリン抗生物質ドキシソルピシン（(8S-cis)-10-[(3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-β-L-lyxo-ヘキサピラノシル)オキシ]-7,8,9,10-テトラヒドロ-6,8,11-トリヒドロキシ-8-(ヒドロキシアセチル)-1-メトキシ-5,12-ナフタセンジオン）、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、およびブレオマイシンが挙げられる。G1を停止させる薬剤はまた、S期停止にも影響を及ぼす；例えば、DNAアルキル化薬、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、およびara-C。さらなる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 特にp. 13において見られ得る。タキサン類（パクリタキセルおよびドセタキセル）は両方とも、イチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer）は、パクリタキセル（TAXOL（登録商標）、Bristol-Myers Squibb）の半合成アナログである。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の集合を促進し、そして脱重合を防止することにより微小管を安定化させ、これは、細胞内の有糸分裂の阻害をもたらす。

【0048】

「抗ホルモン薬」は、本明細書において用いる場合、癌の成長を促進し得るホルモンの効果を、調節、低下、遮断、および/または阻害し、全身性、または全身治療の形態であることが多い、化合物または組成物を指す。それらは、それら自体がホルモンであり得る。例としては、抗エストロゲン剤および選択的エストロゲン受容体調節薬（SERM）、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標）タモキシフェンを含む）、EVIISTA（登録商標）ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびFARESTON（登録商標）トレミフェン；抗プロゲステロン剤；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（ERD）；卵巣を抑制または遮断するように機能する薬剤、例えば、黄体化ホルモン放出ホルモン（leutinizing hormone-releasing hormone）（LHRH）アゴニスト、例えば、LUPRON（登録商標）およびELIGARD（登録商標）酢酸ロイプロリド、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリンおよびトリプテレリン（tripterelin）；他の抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド、ニルタミドおよびピカルタミド；ならびに副腎においてエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼインヒビター、例えば、4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）酢酸メゲストロール、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタニー（formestanie）、ファドロゾール、RIVISOR（登録商標）ポロゾール、FEMARA（登録商標）レトロゾール、およびARIMIDEX（登録商標）アナストロゾールが

10

20

30

40

50

挙げられる。加えて、化学療法薬のこのような定義は、ビスホスホネート類、例えば、クロドロナート（例えば、BONFOS（登録商標）またはOSTAC（登録商標））、DIDROCAL（登録商標）エチドロナート、NE-58095、ZOMETA（登録商標）ゾレドロン酸/ゾレドロナート、FOSAMAX（登録商標）アレンドロナート、AREDIA（登録商標）パミドロナート、SKELID（登録商標）チルドロナート、またはACTONEL（登録商標）リセドロナート；ならびにトロキサシタピン（1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与しているシグナル伝達経路における遺伝子、例えば、PKC-、Raf、H-Ras、および上皮成長因子受容体(EGF-R)の発現を阻害するもの；ワクチン、例えば、THERATOPE（登録商標）ワクチンおよび遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、およびVAXID（登録商標）ワクチン；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX（登録商標）GnRHアンタゴニスト；ラパチニブジトシラート（ErbB-2およびEGFRデュアルチロシンキナーゼ小分子インヒビター、GW572016としても公知）；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体を含む。

10

【0049】

用語「リンカー」は、本明細書において用いる場合、一方の分子（例えば、本発明の化合物、例えば、抗TM4SF1抗体）を別の分子（例えば、作用物質、例えば、治療的作用物質、例えばサポリン、または診断的作用物質、例えば蛍光標識もしくは放射性標識）へと、ペプチド結合を介して共有結合する、1つもしくは複数のアミノ酸、または、フレキシブルアーム、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個の炭素原子を含み得る化学連結剤（例えば、ホモ二官能性およびヘテロ二官能性架橋剤（コンジュゲーション剤））を指す。

20

【0050】

用語「サンプル」および「生物学的サンプル」は、互換的に用いられ、体液、体内組織（例えば、腫瘍組織）、細胞、または他の供給源を含む、個体から得られる任意の生物学的サンプルを指す。体液は、例えば、リンパ液、血清、新鮮全血、末梢血単核球、凍結全血、血漿（新鮮または凍結を含む）、尿、唾液、精液、滑液および脊髄液である。サンプルには、胸部組織、腎組織、結腸組織、脳組織、筋組織、滑膜組織、皮膚、毛包、骨髄、および腫瘍組織も含まれる。組織生検物および体液を哺乳動物から得る方法は当技術分野において周知である。

30

【0051】

本明細書において用いる場合、「治療」（およびその文法上の変形物、例えば、「治療する」または「治療すること」）は、治療される個体の自然過程を変えようとする臨床的介入を指し、予防のため、または臨床病理の過程において行うことができ、疾患または障害（例えば、病的血管新生と関連する障害、例えば癌）の進行または重症度の、または対象（例えば、ヒト対象）における疾患または障害の1つまたは複数の症状の進行、重症度、または頻度の、（例えば、少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、またはさらには100%の）減少をもたらし得る。望ましい治療効果としては、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患のあらゆる直接的または間接的な病理学的帰結の低減、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解、または予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0052】

「薬学的組成物」は、薬学的に許容される担体と共に製剤化され、哺乳動物における疾患を治療するための治療レジメンの一部としての政府規制機関の認可によって製造または販売される、本明細書に記載の化合物を含有する組成物を意味する。薬学的組成物は、例えば、経口投与用に単位剤形に（例えば、錠剤、カプセル剤、カプレット剤、ゲルカップ剤、またはシロップ剤）；局所投与用に（例えば、クリーム剤、ゲル剤、ローション剤、または軟膏剤として）；静脈内投与用に（例えば、微粒子塞栓を含まず、静脈内使用に適した溶媒系中の、無菌液剤として）；または本明細書に記載されている任意の他の製剤に製剤化することができる。

50

【 0 0 5 3 】

「薬学的に許容される担体」は、投与される化合物の治療的性質を保持しながら、治療される哺乳動物（例えば、ヒト）に生理学的に許容される担体を意味する。一つの例示的な薬学的に許容される担体は生理食塩水である。他の生理学的に許容される担体およびそれらの製剤は当業者に公知であり、例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Remington's Pharmaceutical Sciences (18th edition, A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA)に記載されている。

【 0 0 5 4 】

「配列同一性」または「配列類似性」は、2以上のアミノ酸配列の間または2以上のヌクレオチド配列の間の同一性または類似性が、配列間の同一性または類似性によって表されることを意味する。配列同一性は、パーセンテージ同一性によって測定でき；パーセンテージが高いほど、配列はより同一である。配列類似性は、パーセンテージ類似性（これは保存的アミノ酸置換を考慮する）によって測定でき；パーセンテージが高いほど、配列はより類似である。核酸またはアミノ酸配列のホモログまたはオルソログは、標準方法を用いてアラインメントされる場合に相対的に高い程度の配列同一性/類似性を有する。

【 0 0 5 5 】

配列比較のためのアラインメント方法は当技術分野において周知である。様々なプログラムおよびアラインメントアルゴリズムが記載されている：Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins & Sharp, Gene, 73:237-44, 1988; Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-3, 1989; Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90, 1988; Huang et al. Computer Appls. in the Biosciences 8, 155-65, 1992; およびPearson et al., Meth. Mol. Bio. 24:307-31, 1994。Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990は、配列アラインメント方法および相同性計算の詳細な考察を示している。

【 0 0 5 6 】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990) は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxに関しての使用のために、いくつかのソース、例えば、National Center for Biological Information (NCBI, National Library of Medicine, Building 38A, Room 8N805, Bethesda, MD 20894)からおよびインターネット上で入手可能である。これらのソフトウェアプログラムは、様々な置換、欠失、および他の修飾に対して相同性の程度を割り当てることによって、類似する配列をマッチングする。保存的置換は、典型的には、以下のグループ内での置換を含む：グリシン、アラニン；バリン、イソロイシン、ロイシン；アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン；セリン、トレオニン；リジン、アルギニン；およびフェニルアラニン、チロシン。追加の情報はNCBIウェブサイトで見られ得る。

【 0 0 5 7 】

BLASTPはアミノ酸配列を比較するために用いられるが、BLASTNは核酸配列を比較するために用いられる。2つの核酸配列を比較するために、オプションは下記のようにセットできる：-iは比較される1番目の核酸配列を含むファイルにセットされ(C:\seq1.txtのように)；-jは比較される2番目の核酸配列を含むファイルにセットされ(C:\seq2.txtのように)；-pはblastnにセットされ；-oは任意の所望のファイル名にセットされ(C:\output.txtのように)；-qは-1にセットされ；-rは2にセットされ；そして全ての他のオプションはデフォルト設定のままにされる。例えば、以下のコマンドが、2つの配列間の比較を含むアウトプットファイルを作るために使用され得る：C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2。

【 0 0 5 8 】

2つのアミノ酸配列を比較するために、BI2seqのオプションは下記のようにセットできる：-iは比較される1番目のアミノ酸配列を含むファイルにセットされ(C:\seq1.txtのよ

10

20

30

40

50

うに) ; -jは比較される2番目のアミノ酸配列を含むファイルにセットされ(C:\seq2.txtのように) ; -pはblastpにセットされ ; -oは任意の所望のファイル名にセットされ(C:\output.txtのように) ; そして全ての他のオプションはデフォルト設定のままにされる。例えば、以下のコマンドが、2つのアミノ酸配列間の比較を含むアウトプットファイルを作るために使用され得る : C:\Bl2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt。もし2つの比較された配列が相同性を有するならば、指定されたアウトプットファイルはアラインメントされた配列における相同性のある部分を提示する。もし2つの比較配列が相同性を有しなければ、指定されたアウトプットファイルはアラインメントされた配列を提示しない。

【0059】

いったんアラインメントされると、同一のアミノ酸またはヌクレオチド残基が両配列において提示されている位置の数をカウントすることにより、マッチ数値が決定される。パーセント配列同一性は、マッチ数値を、特定された配列に示される配列の長さで除すかまたは連結された長さ(例えば、特定された配列に示される配列からの100個の連続したヌクレオチドまたはアミノ酸残基)で除した後、得られた値に100を乗じることによって決定できる。ポリペプチドについての、いくつかの例において、比較配列の長さは、一般に、少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、50、75、90、100、125、150、200、250、300、または350個の連続したアミノ酸である。

【0060】

用語「治療有効量」は、対象における、病的血管新生と関連する障害などの、疾患または障害を治療するための本発明の化合物または組成物(例えば、薬学的組成物)の量を指す。癌性腫瘍などの、癌の場合、治療有効量の化合物または組成物は、癌細胞数を低減する ; 原発性腫瘍サイズを低減する ; 周辺器官への癌細胞浸潤を阻害する(即ち、ある程度遅延させる、好ましくは阻止する) ; 腫瘍転移を阻害する(即ち、ある程度遅延させる、好ましくは阻止する) ; 腫瘍成長を、ある程度、阻害する ; および / または癌と関連する1つまたは複数の症状をある程度の軽減することができる。化合物または組成物が成長を防止し得るおよび / または既存の癌細胞を死滅させ得る限り、それは細胞増殖抑制性および / または細胞傷害性であってよい。癌治療について、インビボにおける効力は、例えば、生存期間、疾患進行までの時間(TTP)、奏効率(RR)、奏効期間、および / または生活の質を評価することによって測定することができる。

【0061】

「低減するまたは阻害する」は、好ましくは20%またはそれ以上、より好ましくは50%またはそれ以上、最も好ましくは75%、85%、90%、95%またはそれ以上の全体的な減少を引き起こす能力を意味する。低減するまたは阻害するは、治療される障害(例えば、病的血管新生と関連する障害、例えば癌)の症状、転移の存在もしくはサイズ、原発性腫瘍のサイズ、または血管新生障害における血管のサイズもしくは数を指し得る。

【0062】

本明細書において用いる場合、「投与する」は、化合物または組成物(例えば、薬学的組成物)の投薬量を対象へ与える方法を意味する。本明細書に記載の方法において用いられる組成物は、例えば、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、腹膜に、皮下に、結膜下に、小嚢内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局所的に、局在的に、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在的な灌流によって、カテーテルによって、洗浄によって、クリーム形態で、または脂質組成物の形態で投与され得る。好ましい投与方法は、様々な因子(例えば、投与される化合物または組成物、および治療される状態、疾患または障害の重症度)次第で、変わり得る。

【0063】

本明細書および特許請求の範囲を通して、「含む(comprise)」という単語、または「含む(comprises)」または「含むこと(comprising)などの変形物は、記載された整数または

10

20

30

40

50

整数の群の包含を暗示するが、任意の他の整数または整数の群の除外を暗示しないことが理解されるだろう。

【0064】

「対象」は、哺乳動物（例えば、ヒト）を意味する。

【0065】

II. 4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1 (TM4SF1)

4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1 (Transmembrane-4 L six family member-1) (TM4SF1) は、多くの癌細胞上において豊富に発現されていたことから、「L6抗原」または「腫瘍細胞抗原」として1986年に発見された (Hellstrom et al. Cancer Res. 46: 3917-3923, 1986)。予想外に、それはまた、正常組織に供給を行う血管の血管内皮上において弱く発現されることがわかった (DeNardo et al. Int J Rad Appl Instrum B. 18: 621-631, 1991; Wright et al. Protein Sci. 9: 1594-1600, 2000; Richman et al. Cancer Res. 59: 5916s-5920s, 1995; O'Donnell et al. Prostate. 37: 91-97, 1998)。

10

【0066】

TM4SF1は、テトラスパニントポロジを有するがホモロジを有さない小さな原形質膜糖タンパク質 (NCBI RefSeq No. NP_055035.1) である (Wright et al. Protein Sci. 9: 1594-1600, 2000)。それは、TM4SF1リッチドメイン (TM4SF1-enriched domain) (TMED) を原形質膜上に形成し、ここで、本物のテトラスパニンのように、それは、機能的に関連する膜および細胞質ゾル分子を動員する分子ファシリテーターとして役立ち (Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al., Angiogenesis. 14: 345-354, 2011)、癌細胞増殖 (Hellstrom et al. Cancer Res. 46: 3917-3923, 1986)、運動性 (Chang et al. Int J Cancer. 116: 243-252, 2005)、および転移 (Richman et al. Cancer Res. 59: 5916s-5920s, 1995) において重要な役割を果たす。

20

【0067】

TM4SF1は、いくつかのヒト癌に供給を行う血管の内側のECによって (Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. Angiogenesis. 14: 345-354, 2011)、発達中の網膜血管によって (English et al. J Biomed Inform. 42: 287-295, 2009)、およびVEGF-Aを発現するアデノウイルスでマウスにおいて誘導された血管新生血管において (Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009)、高度に発現されるが、多くの他の細胞タイプによって発現されることはない (Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. Angiogenesis. 14: 345-354, 2011)。さらに、TM4SF1は、培養されたECによって高度に発現され、ここで、それは、原形質膜へ、および細胞表面から最大50 μm広がる薄くて細長い膜突出部であるナノボジアへ、局在化される (Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. Angiogenesis. 14: 345-354, 2011)。TM4SF1は、EC分極、増殖および指向性移動を調節する (Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. Angiogenesis. 14: 345-354, 2011)。

30

【0068】

まとめると、これらの知見は、TM4SF1が癌を治療するための血管標的としての可能性を有することを示唆した。本明細書において、本発明者らは、この可能性を支持する証拠を報告する。本発明者らは、TM4SF1に対するマウスモノクローナル抗体のパネルを調製した。本発明者らは、さらなる研究のために、これらの抗体のうちの1つである8G4を選択した。8G4は、細胞外ループ2 (ECL2) 上の独特のエピトープ (SEQ ID NO: 1) に特異的に結合した。重要なことには、また驚くべきことには、培養培地へ添加すると、8G4は、EC中へ徐々にインターナライズされ、治療的作用物質 (例えば、サポリン) と複合体化された場合は、広範囲なEC殺傷を引き起こした。従って、本発明者らの結果は、8G4抗体、およびTM4SF1のECL2上のエピトープとのその独特かつ新規な結合を共有する化合物は、病的血管新生と関連する障害 (例えば、癌) を有する対象を治療する方法などの、診断的および治療的療法のために使用することができることを強く示唆している。

40

【0069】

III. 本発明の化合物

50

従って、本発明は、アミノ酸配列

NYTFASTEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープにおいてポリペプチドと結合する（例えば、特異的に結合する）結合性ドメインを含む化合物を特徴とする。化合物は、SEQ ID NO: 1を含むエピトープにおいて4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1(TM4SF1)またはその断片、例えば、ヒトTM4SF1(NCBI RefSeq No. NP_055035.1)またはその断片と特異的に結合する結合性ドメインを含み得る。いくつかの場合において、ヒトTM4SF1ポリペプチドは、例えば、残基N129または残基N159で、グリコシル化（例えば、N-グリコシル化）されている。いくつかの場合において、グリコシル化ヒトTM4SF1ポリペプチドは、残基N129およびN159の両方でグリコシル化されている。化合物は、10 nM以下（例えば、10 nM、5 nM、2 nM、1 nM、500 pM、100 pM、50 pM、1 pM、または500 fM以下）であるKd値でグリコシル化ヒトTM4SF1に特異的に結合し得る。化合物は、

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2),

TISSGSIYIYYTDGVKG (SEQ ID NO: 3), RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH

(SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)

からなる群より選択される少なくとも1つアミノ酸配列（例えば、1、2、3、4、5、または6つのアミノ酸配列）を含む結合性ドメインを含み得る。化合物は、例えば、GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG (SEQ ID NO: 3), および

RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む結合性ドメインを含み得る。化合物は、例えば、

RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)

より選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つ全てのアミノ酸配列を含む結合性ドメインを含み得る。化合物は、例えば、

GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2), TISSGSIYIYYTDGVKG (SEQ ID NO: 3),

RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4), RSSQSLVHSNGNTYLH (SEQ ID NO: 5), KVSNRFS (SEQ ID NO: 6), および SQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)

の6つのアミノ酸配列を含む結合性ドメインを含み得る。

【0070】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、抗体、またはその抗体断片であり得る。抗体は、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または合成抗体であり得る。いくつかの場合において、抗体は、ハイブリドーママウス細胞株8G4-5-13-13F(PTA-120523)によって産生される（即ち、8G4抗体）。いくつかの場合において、抗体の重鎖は、

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLWVATISSGSIYIYYTDGVKGRFTISRDNKNTVHLQMSSLRSEDTAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 8)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合において、抗体の軽鎖は、

AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合において、抗体の重鎖は、

10

20

30

40

50

EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSFAMSWVRQTPEKRLEWVATISSGSIYIYYTDGVKGRFTIS
 RDNAKNTVHLQMSSLRSEDTAMYYCARRGIYYGYDGYAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 8)
 に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含み、かつ抗体の軽鎖は、
 AVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYMQKPGQSPKVLIIYKVSNRFSGVPDRFSG
 SGS GTDFTLKISRVEADDLGIYFCSQSTHIPLAFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 9)

に対して少なくとも60%、65%、70%、75%、または80%の配列同一性（例えば、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性）を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合において、化合物は、裸であるか、コンジュゲートされていないか、または修飾されていない化合物、例えば、裸であるか、コンジュゲートされていないか、または修飾されていない抗体であり得る。

【0071】

上述したように、本発明は、本明細書に記載される、8G4抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列と100%未満のアミノ酸配列同一性を有する、抗TM4SF1抗体などの、化合物を特徴とする。バリエーション化合物は、より低度の配列同一性（例えば、100%未満の配列同一性、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）を有するが、アミノ酸配列によって本明細書に記載されるポリペプチドによって行われるのと同じ機能のうち1つまたは複数を行うために十分な類似性を有する。ポリペプチドについての類似性は、保存されたアミノ酸置換によって決定される。そのような置換は、ポリペプチドの特定のアミノ酸を、類似した特性の別のアミノ酸によって置換するものである。保存的置換は、表現型的にサイレントである可能性が高い。保存的置換として典型的に見られるのは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、LeuおよびIle間での互いの置き換え；ヒドロキシル残基SerおよびThrの入れ替え、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGln間の置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基Phe、TyrおよびTrp間での置き換えである。どのアミノ酸の変更が表現型的にサイレントである可能性が高いかに関する指針は、例えば、Bowie et al. (Science, 247: 1306-1310, 1990)および下記表1に見られる。

【0072】

(表1) 保存的アミノ酸置換

芳香族	フェニルアラニン トリプトファン チロシン
疎水性	ロイシン イソロイシン バリン
極性	グルタミン アスパラギン
塩基性	アルギニン リジン ヒスチジン
酸性	アスパラギン酸 グルタミン酸
小さい	アラニン セリン トレオニン メチオニン グリシン

【0073】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、例えば、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）の治療において腫瘍細胞（TC）および/または腫瘍血管内皮細胞（EC）を殺

傷または阻害するように、化合物と相加的にまたは相乗的に作用する、1つまたは複数の作用物質（例えば、1、2、3、または4つ以上の作用物質）、例えば治療的作用物質をさらに含む、コンジュゲート（即ち、コンジュゲートされた化合物）であり得る。治療的作用物質は、例えば、生物活性部分、例えば、細胞傷害性物質、化学療法薬、タンパク質、ペプチド、抗体、成長阻害物質、および/または抗ホルモン薬であり得る。

【0074】

細胞傷害性物質は、例えば、リボソーム不活性化タンパク質（例えば、サポリン）、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビター、チューブリンインヒビター、アルキル化薬、抗生物質、抗腫瘍薬、増殖抑制薬、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼIまたはIIインヒビター、ホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、免疫調節物質、DNA副溝バインダー、および放射性物質であり得る。本発明の化合物に、直接的にまたは間接的に、コンジュゲートされ得る例示的なチューブリンインヒビターの例としては、非限定的に、下記表2に列挙されるものが挙げられる。

10

【0075】

(表2) 例示的なチューブリンインヒビター

チューブリンインヒビターのクラス	結合性ドメイン	関連の薬物またはアナログ
重合インヒビター	ビンカドメイン	ビンブラスチン
		ビンクリスチン
		ビノレルビン
		ビンフルニン
		クリプトフィシン52
		ハリコンドリン
		ドラスタチン
		ヘミアステルリン
	コルヒチンドメイン	コルヒチン
		コンプレタスタチン
2-メトキシエストラジオール		
		E7010
脱重合インヒビター	タキサン部位	パクリタキセル (Taxol)
		ドセタキセル (Taxotere)
		エポチロン
		ジスコデルモリド

20

30

【0076】

本発明の化合物にコンジュゲートするのに有用な化学療法薬を記載する。使用され得る酵素的に活性な毒素およびその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolaca americana*）タンパク質（PAPI、PAPII、およびPAP-S）、ニガウリ（*Momordica charantia*）インヒビター、クルシン、クロチン、サポウソウ（*Saponaaria officinalis*）インヒビター、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）、およびトリコテセン類が挙げられる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO 93/21232を参照のこと。様々な放射性核種が、ラジオコンジュゲートされた本発明の化合物の製造のために利用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、および ^{186}Re が挙げられる。あるいは、本発明の化合物は、1つまたは複数の小分子毒素、例えば、カリケアマイシン、メイタンシノイド類、ドラスタチン類、アウロスタチン類（aurostatins）、トリコテセン、およびCC1065、ならびに毒素活性を有するこれらの毒素の

40

50

誘導体にコンジュゲートされ得、これらも本明細書において意図される。本発明の化合物にコンジュゲートされ得る他の治療的作用物質（具体的には抗癌薬）としては、BCNU、ストレプトゾイシン（streptozocin）、ピンクリスチンおよび5-フルオロウラシル、米国特許第5,053,394号および同第5,770,710号に記載される集成的にLL-E33288複合体として公知の薬剤ファミリー、ならびにエスペラマイシン類（米国特許第5,877,296号）が挙げられる。

【0077】

TCの選択的破壊のために、本発明の化合物は、高放射性原子を含み得る。様々な放射性同位体が、ラジオコンジュゲートされた化合物の製造のために利用可能である。例としては、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²、およびLuの放射性同位体が挙げられる。放射標識または他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに組み入れられ得る。例えば、ラジオコンジュゲートされた本発明の化合物は、生合成されてもよく、または、例えば水素の代わりにフッ素-19を含む、適切なアミノ酸前駆体を用いる化学的アミノ酸合成によって合成されてもよい。tc^{99m}またはI¹²³、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸およびIn¹¹¹などの標識は、ペプチド中のシステイン残基を介して結合することができる。イットリウム-90はリジン残基を介して結合することができる。IODOGEN法（Fraker et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57, 1978）は、ヨウ素-123を組み入れるために使用することができる。"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)は他の方法を詳細に記載している。

10

【0078】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、1つまたは複数の作用物質（例えば、1、2、3、または4つ以上の作用物質）、例えば診断的作用物質をさらに含む、コンジュゲート（即ち、コンジュゲートされた化合物）であり得る。診断的作用物質は、例えば、蛍光標識、発色標識、または放射標識などの、標識であり得る。従って、標識は、検出目的のために使用され得、蛍光化合物、酵素、補欠分子族、発光物質、生物発光物質、または放射性物質であり得る。放射標識は、例えば、シンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば、Tc^{99m}もしくはI¹²³、または核磁気共鳴（NMR）画像法（磁気共鳴画像法、MRIとしても公知）用のスピン標識、例えば、再びヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄を含み得る。

20

【0079】

いくつかの態様において、本発明の化合物は、2つ以上の作用物質（例えば、2、3、または4つ以上の作用物質）を含む、コンジュゲート（即ち、コンジュゲートされた化合物）であり得、ここで、上述の治療的作用物質および診断的作用物質のように、少なくとも1つの作用物質は治療的作用物質であり、少なくとも1つの作用物質は診断的作用物質である。

30

【0080】

1つまたは複数の作用物質（例えば、治療的作用物質および/または診断的作用物質）は、作用物質が化合物に直ちにコンジュゲートされるように、（例えば、直接的な共有結合的または非共有結合的相互作用によって）本発明の化合物に直接的にコンジュゲートされ得る。作用物質は、例えば直接的なペプチド結合によって、本発明の化合物に直接的にコンジュゲートされ得る。他の場合において、直接的なコンジュゲーションは、直接的な非共有結合的相互作用、例えば、本発明の化合物と化合物に特異的に結合する作用物質（例えば、抗体作用物質）との相互作用による。

40

【0081】

1つまたは複数の作用物質（例えば、治療的作用物質および/または診断的作用物質）は、（例えば、直接的な共有結合的または非共有結合的相互作用を有するリンカーによって）本発明の化合物に間接的にコンジュゲートされ得る。リンカーは、化学連結剤、例えば、ホモ二官能性およびヘテロ二官能性架橋剤であり得、これらは多くの商業的供給源から入手可能である。架橋に利用可能な領域は、本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体）において見られ得る。リンカーは、フレキシブルアーム、例えば、2、3、4、5、6、7、8

50

、9、10、11、12、13、14、または15個の炭素原子を含み得る。例示的なリンカーとしては、BS3 ([スベリン酸ビス(スルホスクシンイミジル)]; BS3は、アクセス可能な第一級アミンを標的とするホモ二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルである)、NHS/EDC (N-ヒドロキシスクシンイミドおよびN-エチル-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド; NHS/EDCは一級アミン基とカルボキシル基とのコンジュゲーションを可能にする)、スルホ-EMCS ([N-e-マレイミドカプロン酸]ヒドラジド; スルホ-EMCSは、スルフヒドリルおよびアミノ基に対して反応性のヘテロ二官能性反応基(マレイミドおよびNHS-エステル)である)、ヒドラジド(ほとんどのタンパク質は露出された糖を含有し、ヒドラジドはカルボキシル基を一級アミンと連結するための有用な試薬である)、およびSATA (N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート; SATAはアミンに対して反応性であり、保護スルフヒドリル基を加える)が挙げられる。

10

【0082】

共有結合を形成するために、化学反応基として、ヒドロキシル部分がペプチドを改変するのに必要なレベルで生理学的に許容される様々な活性カルボキシル基(例えば、エステル)を用いることができる。特定の薬剤としては、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、N-ヒドロキシ-スルホスクシンイミド(スルホ-NHS)、マレイミド-ベンゾイル-スクシンイミド(MBS)、 α -マレイミド-ブチリルオキシスクシンイミドエステル(GMBS)、マレイミドプロピオン酸(MPA)、マレイミドヘキサン酸(MHA)、およびマレイミドウンデカン酸(MUA)が挙げられる。

20

【0083】

第一級アミンは、NHSエステルにとって主要な標的である。タンパク質のN末端に存在するアクセス可能な α -アミノ基およびリジンの ϵ -アミンがNHSエステルと反応する。NHSエステルコンジュゲーション反応物が第一級アミンと反応し、N-ヒドロキシスクシンイミドを遊離する場合に、アミド結合が形成される。これらのスクシンイミド含有反応基を本明細書ではスクシンイミジル基と呼ぶ。本発明のある態様において、タンパク質上の官能基はチオール基であり、化学反応基は α -マレイミド-ブチリルアミド(GMBAまたはMPA)などのマレイミド含有基である。そのようなマレイミド含有基を本明細書ではマレイド基と呼ぶ。

【0084】

マレイミド基は、反応混合物のpHが6.5~7.4である場合、ペプチド上のスルフヒドリル基に対して最も選択性が高い。pH 7.0では、マレイミド基とスルフヒドリル(例えば、血清アルブミンまたはIgGなどのタンパク質上のチオール基)との反応速度は、アミンとの反応よりも1000倍速い。従って、マレイミド基とスルフヒドリルとの間の安定なチオエーテル結合を形成させることができる。

30

【0085】

他の態様において、リンカーは、少なくとも1個のアミノ酸(例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、10、15、20、25、40、または50個のアミノ酸のペプチド)を含む。ある態様において、リンカーは単一のアミノ酸(例えば、任意の天然に存在するアミノ酸、例えばCys)である。他の態様において、米国特許第7,271,149号に記載されるようなペプチドなどの、グリシンリッチペプチドを使用することができる。他の態様において、米国特許第5,525,491号に記載されるような、セリンリッチペプチドリンカーを使用することができる。いくつかの場合において、リンカーは、単一のアミノ酸(例えば、任意のアミノ酸、例えばGlyまたはCys)であり得る。

40

【0086】

適切なリンカーの例は、コハク酸、Lys、Glu、およびAsp、またはジペプチド、例えばGly-Lysである。リンカーがコハク酸である場合、その一方のカルボキシル基はアミノ酸残基のアミノ基とアミド結合を形成し得、その他方のカルボキシル基は、例えば、ペプチドまたは置換基のアミノ基とアミド結合を形成し得る。リンカーがLys、Glu、またはAspである場合、そのカルボキシル基はアミノ酸残基のアミノ基とアミド結合を形成し得、そのアミノ基は、例えば、置換基のカルボキシル基とアミド結合を形成し得る。Lysをリンカ

50

ーとして用いる場合、さらなるリンカーをLysの -アミノ基と置換基との間に挿入しうる。ある特定の態様において、そのさらなるリンカーはコハク酸であり、例えば、Lysの -アミノ基と、および置換基に存在するアミノ基とアミド結合を形成する。一態様において、さらなるリンカーはGluまたはAspであり（例えば、Lysの -アミノ基とアミド結合および置換基に存在するカルボキシル基と別のアミド結合を形成する）、即ち、置換基はN -アシル化リジン残基である。

【0087】

IV. ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、および組換え方法

i. ポリヌクレオチド

本発明は、1つまたは複数（例えば、1、2、3、または4つ以上）の本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）をコードするポリヌクレオチド、またはその断片もしくは部分を特徴とする。1つまたは複数の本発明の化合物をコードするポリヌクレオチド配列は、標準的な組換え技術を用いて得ることができる。例えば、1つまたは複数の（例えば、1、2、3、または4つ以上）クローニング部位（例えば、EcoRVクローニング部位）を含む、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含むエピトープにおいてポリペプチドと特異的に結合する結合性ドメインを含む化合物またはその部分（例えば、8G4）のcDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって調製することができる。

【0088】

ii. ベクター

本発明は、1つまたは複数（例えば、1、2、3、または4つ以上）の本発明の化合物を含むベクターを特徴とする。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、単離され、かつさらなるクローニング（DNAの増幅）のためまたはコードポリペプチド化合物の発現のために複製可能なベクター中へ挿入され得る。例えば、化合物が抗TM4SF1抗体である場合、ポリヌクレオチドは、pBluescriptプラスミドへクローニングされ、配列が確認され、その後、Fcコーディングプラスミド、例えばpFUSE-hIgG1-Fc1(InvivoGen)へDNAがサブクローニングされ得る。多くのベクターが入手可能である。ベクターの選択は、使用される宿主細胞に部分的に依存する。各ベクターは、その機能（異種ポリヌクレオチドの増幅もしくは発現、または両方）、およびそれが存在する特定の宿主細胞とその適合性に依りて、様々な構成要素を含有する。ベクター構成要素には、一般に以下が含まれるが、これらに限定されない：複製起点、選択マーカー遺伝子、プロモーター、リボソーム結合部位（RBS）、シグナル配列、異種核酸挿入物、および転写終結配列。

【0089】

一般に、宿主細胞との適合性がある種に由来するレプリコンおよび制御配列を含有するプラスミドベクターは、これらの宿主に関連して使用される。ベクターは、通常、複製部位、ならびに形質転換細胞における表現型選択を提供することができるマーキング配列を有する。例えば、大腸菌は、大腸菌種に由来するプラスミドであるpBR322を用いて典型的に形質転換される。pBR322は、アンピシリン(Amp)およびテトラサイクリン(Tet)耐性をコードする遺伝子を含有し、従って、形質転換細胞を同定するための簡単な手段を提供する。pBR322、その派生物、または他の微生物プラスミドもしくはバクテリオファージは、また、内因性タンパク質の発現のために微生物により使用されることができるプロモーターを含んでもよい、または含むように改変してもよい。特定の抗体の発現のために使用されるpBR322派生物の例が、Carter et al. (米国特許第5,648,237号)に詳細に記載されている。

【0090】

加えて、宿主微生物と適合するレプリコンおよび制御配列を含むファージベクターを、これらの宿主に関連して形質転換ベクターとして使用することができる。例えば、バクテリオファージ、例えば GEM-11 (商標) を、感受性宿主細胞、例えば大腸菌LE392を形質転換するために使用することができる組換えベクターを作製する際に利用してもよい。

【0091】

本発明の発現ベクターは、ポリペプチド構成要素の各々をコードする2つまたはそれ以

10

20

30

40

50

上のプロモーター-シストロン対を含み得る。プロモーターは、その発現を調節するシストロンの上流(5')に位置付けられる非翻訳調節配列である。原核生物プロモーターは、典型的に、2つのクラス(誘導的および構成的)に分類される。誘導的プロモーターは、その制御下で、培養条件における変化、例えば、栄養分の存在もしくは非存在または温度における変化に应答して、増加したレベルのシストロンの転写を開始するプロモーターである。

【0092】

種々の潜在的な宿主細胞により認識される多数のプロモーターが、周知である。制限酵素消化によって供給源DNAからプロモーターを除去し、単離されたプロモーター配列を本発明のベクター中に挿入することにより、選択されたプロモーターを、軽鎖または重鎖をコードするシストロンDNAに機能的に連結することができる。天然プロモーター配列および多くの異種プロモーターの両方を使用し、標的遺伝子の増幅および/または発現に向けてもよい。いくつかの態様において、異種プロモーターを利用し、何故ならば、それらは、一般的に、天然標的ポリペプチドプロモーターと比較して、発現される標的遺伝子のより多い転写およびより高い産出を可能にするためである。

【0093】

原核生物宿主との使用のために適したプロモーターとしては、PhoAプロモーター、ガラクタマーゼおよびラクトースプロモーターシステム、トリプトファン(trp)プロモーターシステムおよびハイブリッドプロモーター(例えばtacまたはtrcプロモーターなど)が挙げられる。しかし、細菌において機能的である他のプロモーター(例えば他の公知の細菌またはファージのプロモーターなど)も適している。それらのヌクレオチド配列は公表されており、そのため、当業者が、任意の要求される制限部位を供給するためのリンカーまたはアダプターを使用して、標的軽鎖および重鎖をコードするシストロンにそれらを機能的に連結することが可能である(Siebenlist et al., Cell. 20: 269, 1980)。

【0094】

iii. 宿主細胞

本発明は、1つまたは複数の本発明のベクターを含む宿主細胞、例えば、原核生物起源(例えば、大腸菌細胞)または真核生物起源(一般に哺乳動物(例えば、ヒト臍帯静脈EC(HUVEC))であるが、真菌(例えば、酵母)、昆虫(例えば、ショウジョウバエ(*Drosophila*) S2細胞)、植物、および他の多細胞生物由来の有核細胞も含まれる)の宿主細胞を特徴とする。いくつかの態様において、安定なクローンは、Zeocin選択などの、従来の選択方法を用いて調製することができる。

【0095】

a. 原核宿主細胞

本発明の化合物(抗TM4SF1抗体)を発現させるために適した原核宿主細胞は、古細菌(Archaeobacteria)および真正細菌(Eubacteria)、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物を含む。有用な細菌の例は、エシェリキア属(*Escherichia*) (例えば、大腸菌)、バシラス属(*Bacilli*) (例えば、枯草菌(*B. subtilis*))、腸内細菌、シュードモナス属(*Pseudomonas*)の種(例えば、緑膿菌)、サルモネラ・チフィリウム(*Salmonella typhimurium*)、セラチア・マルセセンス(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、プロテウス属(*Proteus*)、シゲラ属(*Shigella*)、リゾビウム属(*Rhizobia*)、ビトレオシラ属(*Vitreoscilla*)、またはパラコッカス属(*Paracoccus*)を含む。一態様において、グラム陰性細胞を使用する。一態様において、大腸菌細胞を本発明のための宿主として使用する。大腸菌株の例は、W3110株(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 119 0-1219; ATCC Deposit No. 27,325)およびその派生物、例えば、遺伝子型W3110 fhuA (tonA) ptr3 lac lq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kanRを有する33D3株(米国特許第5,639,635号)を含む。他の株およびその派生物、例えば大腸菌294(ATCC 31,446)、大腸菌B、大腸菌 1776(ATCC 31,537)および大腸菌RV308(ATCC 31,608)なども適する。これらの例は、限定的というよりも、むしろ説明的である。定義された遺伝子型を有する上

記の細菌のいずれかの派生物を構築するための方法が、当技術分野において公知であり、例えば、Bass et al., Proteins 8:309-314 (1990)に記載される。一般的に、細菌の細胞におけるレプリコンの複製能を考慮に入れて適切な細菌を選択することが必要である。例えば、大腸菌、セラチア属 (Serratia)、またはサルモネラ属 (Salmonella) の種が、周知のプラスミド (例えば、pBR322、pBR325、pACYC177、またはpKN410) を、レプリコンを供給するために使用する場合、宿主として使用するのに適し得る。典型的には、宿主細胞は、最小量のタンパク質分解酵素を分泌すべきであり、追加のプロテアーゼインヒビターが望ましくは細胞培養に組み入れられ得る。

【0096】

b. 真核宿主細胞

ベクター構成要素には、一般に以下のうちの1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない：シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター、および転写終結配列。

【0097】

真核宿主細胞における使用のための本発明のベクターは、関心対象の成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特定の切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドを含んでもよい。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞により認識され、プロセッシングされる (即ち、シグナルペプチダーゼにより切断される) ものであり得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルを利用可能である。そのような前駆体領域のためのDNAを、リーディングフレーム中で、ポリペプチドをコードするDNAにライゲートする。

【0098】

一般に、複製起点構成要素は、哺乳動物発現ベクターのために必要とされない。例えば、SV40起点を典型的に使用してもよいが、単にそれが初期プロモーターを含むためである。

【0099】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択遺伝子 (選択マーカーとも呼ばれる) を含んでもよい。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、またはテトラサイクリンに対して耐性を付与する、(b) 栄養要求性欠損を補完する、適切な場合、または(c) 複合培地から利用可能ではない決定的な栄養分を供給する、タンパク質をコードする。

【0100】

選択スキームの一例では、宿主細胞の増殖を停止させるための薬物を利用する。異種遺伝子を用いて首尾よく形質転換されるそれらの細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生し、従って、このように選択レジメンにおいて生き残る。そのような優性選択の例では、薬物 (ネオマイシン、ミコフェノール酸、およびハイグロマイシン) を使用する。

【0101】

哺乳動物細胞のための適した選択マーカーの別の例は、本発明の化合物 (例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4) をコードする核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能にするもの、例えば、DHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインIおよびII、好ましくは霊長動物メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

【0102】

例えば、DHFR選択遺伝子を用いて形質転換された細胞は、最初に、メトトレキサート (Mtx) (DHFRの競合的アンタゴニスト) を含む培養培地中で形質転換体の全てを培養することにより同定される。野生型DHFRを用いた場合での適切な宿主細胞は、DHFR活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株 (例えば、ATCC CRL-9096) である。

【0103】

あるいは、本発明の化合物をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、および別の選択マーカー (例えば、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ (APH)) を用いて

10

20

30

40

50

形質転換または同時形質転換された宿主細胞（特に、内因性DHFRを含む野生型宿主）を、選択マーカー用の選択薬剤（例えば、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン、またはG418）を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。例えば、米国特許第4,965,199号を参照のこと。

【0104】

化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）をコードするDNAの、より高等な真核生物による転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより増加させることができる。多くのエンハンサー配列が、現在、哺乳動物遺伝子（例えば、グロビン、エラストラーゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン遺伝子）から公知である。また、真核細胞ウイルスからのエンハンサーが使用され得る。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー（bp 100~270）、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。増強が達成されるならば、エンハンサーは、化合物コード配列に対して位置5'または3'でベクター中に接合され得るが、一般にはプロモーターから部位5'に位置付けられる。

10

【0105】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識され、化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）をコードする核酸配列に機能的に連結されているプロモーターを含む。真核生物についてのプロモーター配列は公知である。実質的に全ての真核生物遺伝子が、転写が開始される部位からおよそ25~30塩基上流に位置付けられるATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70~80塩基上流に見出される別の配列は、CNCAAT領域であり、ここでNは任意のヌクレオチドであり得る。大半の真核生物の3'末端は、AATAAA配列であり、それはコード配列の3'末端へのポリAテールの付加のためのシグナルであり得る。これらの配列の全てを真核生物発現ベクター中に適切に挿入する。

20

【0106】

哺乳動物宿主細胞における化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）をコードするベクターからの転写は、そのようなプロモーターが宿主細胞系に適合する限り、例えば、以下から得られるプロモーターによって制御される：ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えばアデノウイルス2）、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、およびサルウイルス40(SV40)などのウイルスのゲノム；異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーター；または熱ショックプロモーター。

30

【0107】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含むSV40制限フラグメントとして便利に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII E制限フラグメントとして便利に得られる。ウシパピローマウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主においてDNAを発現させるためのシステムが、米国特許第4,419,446号に開示されている。このシステムの改変が、米国特許第4,601,978号に記載されている。あるいは、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列をプロモーターとして使用することができる。

40

【0108】

真核宿主細胞において使用される発現ベクターは、典型的にはまた、転写の終結のためにおよびmRNAを安定化させるために必要な配列を含む。そのような配列は、一般に、真核生物またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'および、時には3'の非翻訳領域から利用可能である。これらの領域は、TSP-1ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分におけるポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結構成要素は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である（例えば、WO94/11026およびその中で開示される発現ベクターを参照のこと）。

【0109】

50

本明細書に記載のベクター中のDNAをクローニングまたは発現するための適した宿主細胞は、本明細書に記載するより高等な真核細胞（脊椎動物宿主細胞を含む）を含む。培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、慣例の手順になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、以下である：SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651)；ヒト胚腎臓株(293細胞または浮遊培養中での増殖のためにサブクローニングされた293細胞、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977))；仔ハムスター腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR(CHO、Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))、例えば、CHO-K1細胞；マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70)；アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587)；ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2)；イヌ腎臓細胞(MDCK, ATCC CCL 34)；パッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442)；ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75)；ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065)；マウス乳房腫瘍(MMT 060562, ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC5細胞；FS4細胞；およびヒト肝細胞癌株(Hep G2)。

10

【0110】

iv. 組換え方法

本発明はまた、1つまたは複数の本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）を製造する方法を特徴とし、それによって、宿主細胞が培養培地において培養され得、本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）が宿主細胞または培養培地（例えば、プロテイン-A Sepharoseを用いて馴化無血清培地）から回収（例えば、精製）され得る。

20

【0111】

本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）を産生するために使用される宿主細胞を、種々の培地中で培養してもよい。市販されている培地、例えばHam's F10(Sigma)、最小必須培地((MEM)、(Sigma)、RPMI-1640(Sigma)、およびダルベッコ改変イーグル培地((DMEM)、Sigma)などが、宿主細胞を培養するために適している。加えて、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号；同第4,657,866号；同第4,927,762号；同第4,560,655号；もしくは同第5,122,469号；WO 90/03430；WO 87/00195；または米国再発行特許第30,985号に記載される培地のいずれかを宿主細胞用の培養培地として使用してもよい。これらの培地のいずれかに、必要に応じて、以下を補給してもよい：ホルモンおよび/または他の増殖因子（例えば、インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子）、塩（例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、緩衝剤（例えば、HEPES）、ヌクレオチド（例えば、アデノシンおよびチミジン）、抗生物質（例えば、GENTAMYCIN(商標)薬物）、微量元素（通常マイクロモル範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、およびグルコースまたは等価のエネルギー供給源。任意の他の必要な補給剤を、また、当業者に公知であろう適切な濃度で含めてもよい。培養条件、例えば温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞と共に以前に使用されたものであり、当業者に明らかであろう。

30

【0112】

当技術分野において公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の手順は適切な精製手順の例示である：免疫親和性カラムまたはイオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上または陽イオン交換樹脂（例えばDEAE）上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、疎水性相互作用カラム（HIC）、硫酸塩析、およびゲル濾過（例えば、Sephadex G-75を使用）。

40

【0113】

一態様において、化合物が抗体である場合、プロテインAが固相に固定化され、本発明の抗体（例えば、8G4）の免疫親和性精製のために使用され得る。プロテインAは黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）からの41kDa細胞壁タンパク質であり、高親和性を伴い抗体のFc領域に結合する（Lindmark et al. J. Immunol. Meth. 62: 1-13, 1983）。プロ

50

テインAが固定化される固相は、好ましくは、ガラスまたはシリカ表面を含むカラム、より好ましくは制御された細孔ガラスカラムまたはケイ酸カラムである。一部の適用において、カラムは、混入物の非特異的付着を防止するために、試薬（例えば、グリセロール）でコートされている。

【0114】

精製の第1段階として、上述の細胞培養に由来する調製物をプロテインA固定化固相上へ適用し、プロテインAに対する関心対象の抗TM4SF1抗体の特異的結合を可能にする。次いで、固相を洗浄し、固相に非特異的に結合された混入物を除去する。関心対象の抗TM4SF1抗体は、カオトロピック剤またはマイルドな界面活性剤を含有する溶液中への溶出によって、固相から回収され得る。例示的なカオトロピック剤としては、尿素、グアニジン-HCl、過塩素酸リチウム、ヒスチジン、およびアルギニンが挙げられるが、これらに限定されない。例示的なマイルドな界面活性剤としては、Tween（例えば、Tween-20）、Triton（例えば、Triton X-100）、NP-40（ノニルフェノキシポリエトキシエタノール）、Nonidet P-40（オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）、およびドデシル硫酸ナトリウム（SDS）挙げられるが、これらに限定されない。カラム（例えば、mAbSureカラム）からの溶出後にカオトロピック剤またはマイルドな界面活性剤を含有する溶液中へ抗TM4SF1抗体を希釈することは、溶出後の抗TM4SF1抗体の安定性を維持する。

10

【0115】

他の態様において、発現されたポリHisタグ化された本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体）は、例えば、以下のようにNi²⁺-キレートアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。抽出物は、Rupert et al. (Nature, 362: 175-179, 1993)によって記載されるような組換えウイルス感染S2細胞から調製され得る。簡潔には、S2細胞を、洗浄し、超音波処理バッファー（25 mL HEPES pH 7.9; 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10%グリセロール; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl）中に再懸濁し、氷上で20秒間2回超音波処理する。超音波処理物を遠心分離によって透明にし、上清をローディングバッファー（50 mMリン酸塩; 300 mM NaCl; 10%グリセロール pH 7.8）中に50倍希釈し、0.45 μmフィルターによって濾過する。Ni²⁺-NTAアガロースカラム(Qiagenから市販)を、5 mLのベッド容積で調製し、25 mLの水で洗浄し、25 mLのローディングバッファーで平衡化する。濾過された細胞抽出物を1分当たり0.5 mLでカラムへロードする。カラムをローディングバッファーでベースラインA₂₈₀まで洗浄し、この時点でフラクション収集を開始する。次に、カラムを第2洗浄バッファー（50 mMリン酸塩; 300 mM NaCl; 10%グリセロール pH 6.0）で洗浄し、非特異的に結合されたタンパク質を溶出する。再びA₂₈₀ベースラインに達した後、カラムを、第2洗浄バッファー中0から500 mMへのイミダゾール勾配で展開する。1 mLフラクションを収集し、SDS-PAGEおよび銀染色またはアルカリホスファターゼとコンジュゲートされたNi²⁺-NTA (Qiagen) を利用したウェスタンブロットによって分析する。溶出されたポリHisタグ化された本発明の化合物を含有するフラクションをプールし、ローディングバッファーに対して透析する。

20

30

【0116】

本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）の精製はまた、例えば、プロテインAまたはプロテインGカラムクロマトグラフィーを含む、公知のクロマトグラフィー技術を用いて行うことができる。本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）は、カオトロピック剤またはマイルドな界面活性剤を含有する溶液中への溶出によって、カラムの固相から回収され得る。例示的なカオトロピック剤およびマイルドな界面活性剤としては、グアニジン-HCl、尿素、過塩素酸リチウム（lithium perchlorate）、アルギニン、ヒスチジン、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、Tween、Triton、およびNP-40が挙げられるが、これらに限定されず、これらは全て市販されている。ウェスタンブロットイング（例えば、化合物またはコンジュゲートされた作用物質（例えばタグ）に対するポリクローナル抗体を用いる）は、正確な分子量のタンパク質が製造されたことを確認するために使用され得る。

40

【0117】

50

V. 本発明の組成物

上述のものなどの、本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）または本発明の化合物をコードするポリヌクレオチドのいずれか1つは、組成物（例えば、薬学的組成物）中に含まれ得る。本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または希釈剤をさらに含み得る。

【0118】

本明細書に記載されるように、薬学的組成物のいずれか1つは、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌、例えば、乳癌、卵巣癌、腎臓癌、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌、および肺癌；肥満；黄斑変性；糖尿病性網膜症；乾癬；関節リウマチ；細胞性免疫；ならびに酒さ）を有する対象（例えば、ヒト）を治療するために製剤化されていてもよい。

10

【0119】

VI. 本発明の治療方法

アミノ酸配列

NYTFASLEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープにおいてポリペプチド（例えば、TM4SF1）と結合する（例えば、特異的に結合する）結合性ドメインを含む本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）は、治療適用のために使用され得る。従って、本発明は、対象を治療するために治療有効量の本発明の化合物またはその薬学的組成物を投与する工程を含む、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌、例えば、乳癌、卵巣癌、腎臓癌、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌、および肺癌；肥満；黄斑変性；糖尿病性網膜症；乾癬；関節リウマチ；細胞性免疫；ならびに酒さ）を有する対象を治療する方法を特徴とする。化合物または薬学的組成物は、適正な医療行為と一致する様式で処方、投薬、および投与されると考えられる。本発明に従う療法は、単独でまたは別の療法と共に行われ得、家庭、診療所、クリニック、病院の外来、または病院で提供され得る。医師が療法の効果を厳密に観察し、必要である何らかの調節をすることができるように、治療は任意で入院中に始められ、またはそれは外来患者方式で始められてもよい。療法の期間は、治療される疾患または障害のタイプ、患者の年齢および状態、患者の疾患の病期およびタイプ、ならびに治療に対する患者の反応に依存する。さらに、増殖性または病原性疾患を発症する危険性がより高い人は、症状の発症を阻害するまたは遅延させるために治療を受けることができる。

20

【0120】

上述の方法において、本発明の化合物、またはその薬学的組成物は、アミノ酸配列 NYTFASLEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)

を含むエピトープとの結合後にTM4SF1発現細胞（例えば、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍細胞）中へインターナライズされ（例えば、エンドサイトーシスによって取り込まれ）得る。いくつかの態様において、化合物、またはその薬学的組成物は、TM4SF1発現細胞の細胞質中へインターナライズされ得、そしてTM4SF1発現細胞の核中へインターナライズされ得る。従って、治療有効量の化合物、またはその薬学的組成物は、障害の症状の軽減、低減、治療、および/または停止、例えば、原発性腫瘍サイズの低減（例えば、本発明の化合物または薬学的組成物の投与後の対象における原発性腫瘍のサイズにおける、対照治療のそれと比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%またはそれ以上の低減）；TM4SF1発現細胞（例えば、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍細胞）の数の減少（例えば、本発明の化合物または薬学的組成物の投与後の対象におけるTM4SF1発現細胞の数における、対照治療のそれと比較して5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%またはそれ以上の減少）；および/またはTM4SF1発現細胞（例えば、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍細胞）のアポトーシスの増加（例えば、本発明の化合物または薬学的組成物の投与後の対象におけるTM4SF1発現

30

40

50

細胞のアポトーシスにおける、対照治療のそれと比較しての5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%またはそれ以上の誘発)をもたらし得る。病的血管新生と関連する障害のこれらの症状および/または他の症状ならびに治療中のそれらの消散は、例えば、身体検査中に医師によってまたは当技術分野において公知の他の検査および方法によって測定することができる。いくつかの態様において、1つまたは複数の本発明の化合物または薬学的組成物を用いる治療は、対象において障害の進行を停止させ得る。他の態様において、1つまたは複数の本発明の化合物またはその薬学的組成物を用いる治療は、一般的なまたは従来療法(例えば、手術、放射線療法、化学療法、免疫療法、またはホルモン療法)と比較して、対象において障害の進行を遅らせ得る。

10

【0121】

i. 投与方法

本明細書に記載の本発明に従う化合物および組成物(例えば、薬学的組成物)は、投与直後に(例えば、標的指向送達)、または制御または持続放出製剤を用いて投与後の任意の所定の期間で、放出されるように製剤化され得る。制御または持続放出製剤での化合物または組成物の投与は、化合物または組成物が、単独または組み合わせのいずれかで、以下を有する場合に有用である:(i)狭い治療指数(例えば、有害な副作用または中毒反応へ至る血漿濃度と、治療効果へ至る血漿濃度との差異が小さい;一般に、治療指数TIは半数致死量(LD₅₀)対半数有効量(ED₅₀)の比率として定義される);(ii)放出部位(例えば、胃腸管)での狭い吸収ウィンドウ、または(iii)治療レベルを持続するために1日を通して頻繁な投薬が要求されるような短い生物学的半減期。

20

【0122】

多くの戦略は、放出速度が薬学的組成物の代謝速度を上回る制御または持続放出を得られるように遂行され得る。例えば、制御放出は、例えば適切な制御放出組成およびコーティングを含む、製剤パラメータおよび成分の適切な選択により得ることができる。適切な製剤は当業者に公知である。例としては、単または複ユニット錠剤またはカプセル組成物、油溶液、懸濁液、乳濁液、マイクロカプセル、ミクロスフェア、ナノ粒子、パッチ、およびリポソームが挙げられる。

30

【0123】

任意で、組成物は、例えば、局在的な薬物送達(例えば、局在的な徐放または徐放性薬物送達システム)による投与のために、製剤化され得る。徐放性調製物の適切な例としては、本発明の化合物を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成形品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。マイクロカプセルは、例えば、コアセルベーション技術によってまたは界面重合によって調製され得る:例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)(poly-(methacrylate))マイクロカプセル;コロイド薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中またはマクロエマルジョン中。除放性マトリクスの例としては、ポリエステルヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール))、ポリアクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸および-L-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なミクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に渡って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短い期間の間タンパク質を放出する。カプセル化される場合、本発明の化合物(例えば、抗TM4SF1抗体)が身体内に長時間残ると、それらは37%の水分に露出されることにより変性または凝集し、その結果、生物活性の低下および起こりうる免疫原性の

40

50

変化がもたらされ得る。合理的な戦略は、含まれる機構に依存して安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオジスルフィド交換を通じた分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、および特定のポリマーマトリクス組成物の開発によって達成され得る。

【0124】

任意で、組成物は、例えば、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクターまたはポックスウイルスベクター）による投与のために、製剤化され得る。組換えアデノウイルスは、例えば、1つまたは複数の本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体）の発現のためのベクターとしての使用についていくつかの著しい利点を示す。ウイルスは、高力価へ調製され得、非複製性細胞に感染し得、標的細胞集団との接触後のエクスピボでの標的細胞の高効率形質導入を与え得る。さらに、アデノウイルスは、それらのDNAを宿主ゲノムへ組込まない。従って、発現ベクターとしてのそれらの使用は、自然発生の増殖性障害を誘発する危険性を低下させる。動物モデルにおいて、アデノウイルスベクターは、一般におよそ1週間の高レベル発現を媒介することがわかった。導入遺伝子発現（本発明の核酸分子の発現）の継続期間は、細胞または組織特異的プロモーターを用いることによって延長することができる。アデノウイルスベクター自体の分子工学における他の改善は、より多くの持続した導入遺伝子発現およびより少ない炎症をもたらした。これは、追加の初期アデノウイルス遺伝子において特定の変異を有する、いわゆる「第二世代」ベクター、およびCre-Lox戦略を用いてウイルスの遺伝子の実質的に全てが欠失されている「ガットレス（gutless）」ベクターで見られる（各々が参照により本明細書に組み入れられる、Engelhardt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6196 (1994)およびKochanek et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:5731 (1996)）。

10

20

【0125】

各々が参照により本明細書に組み入れられる、国際特許出願公開公報WO 2006/040330およびWO 2007/104792に開示されるアデノウイルスベクターが、本発明のベクターとして特に有用である。これらのアデノウイルスベクターは、血管新生と関連する病的状態（例えば、癌）を有する対象を治療するために1つまたは複数の本発明の化合物（例えば、抗TM4SF1抗体）をコードおよび/または送達することができる。いくつかの態様において、2種類以上の本発明の化合物を発現するために、1つまたは複数の組換えアデノウイルスベクターを対象へ投与することができる。アデノウイルスベクターに加えて、対象（例えば、ヒト）における1つまたは複数の本発明の化合物の送達および/または発現を促進するために用いることができる他のウイルスベクターおよび技術が、当技術分野において公知である。これらのウイルスとしては、ポックスウイルス（例えば、ワクシニアウイルスおよび変異ワクシニアウイルスアンカラ(MVA)；例えば、各々が参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第4,603,112号および同第5,762,938号を参照のこと）、ヘルペスウイルス、トガウイルス（例えば、ベネズエラウマ脳炎ウイルス；例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,643,576号を参照のこと）、ピコルナウイルス（例えば、ポリオウイルス；例えば、参照により本明細書に組み入れられる、米国特許第5,639,649号を参照のこと）、バキュロウイルス、および、参照により本明細書に組み入れられる、Wattanapitayakul and Bauer (Biomed. Pharmacother. 54:487 (2000)によって記載される他のものが挙げられる。

30

40

【0126】

本明細書に記載される方法に用いられる化合物および/または組成物は、例えば、筋肉内に、静脈内に、皮内に、経皮的に、動脈内に、腹腔内に、病巣内に、頭蓋内に、関節内に、前立腺内に、胸膜内に、気管内に、鼻腔内に、硝子体内に、腔内に、直腸内に、局所的に、腫瘍内に、腹膜に、皮下に、結膜下に、小嚢内に、粘膜に、心膜内に、臍帯内に、眼内に、経口的に、局所的に、局在的に、吸入によって、注射によって、注入によって、持続注入によって、標的細胞を直接浸す局在的な灌流によって、カテーテルによって、洗浄によって、クリーム形態で、または脂質組成物の形態で投与するために、製剤化され

50

得る。

【0127】

好ましい投与方法は、種々の因子（例えば、投与される組成物の構成要素、および治療される状態の重症度、例えば、癌の特定の病期）に依存して変動し得る。経口投与または経鼻投与に適した製剤は、所定量の本発明の組成物または組成物をコードするポリヌクレオチドを各々が含む、希釈剤（例えば、水、生理食塩水またはPEG-400）中に溶解された有効量の組成物などの液体溶液、カプセル剤、サシェ剤、錠剤またはゲルからなり得る。薬学的組成物は、例えば気管支通路への吸入のためのエアロゾル製剤でもあり得る。エアロゾル製剤は、加圧された薬学的に許容される噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、または窒素）と混合され得る。特に、吸入による投与は、例えば、トリクロロフルオロメタン、ジクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、または任意の他の生物学的に適合性の噴霧剤ガスと一緒に、例えば、ソルビタントリオレートまたはオレイン酸を含むエアロゾルを使用することによって、達成され得る。

10

【0128】

本発明の組成物は、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を対象が有すると診断された後に、投与され得る。組成物は、例えば、診断後15~30分、または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、20、24、48もしくは72時間、2、3、5もしくは7日、2、4、6もしくは8週間、3、4、6もしくは9ヵ月、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15もしくは20年またはそれ以上で、対象へ投与され得る。対象には、単一用量の組成物（または、例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも多くの用量）が投与され得、または対象には、毎日、毎週、毎月、または毎年、少なくとも一用量（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも多くの用量）が投与され得る。投与期間は、規定されてもよく（例えば、1~4週間、1~12ヵ月間、1~20年間）、または対象の一生にわたってもよい。

20

【0129】

病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を治療する場合、本発明の組成物は、症状の発生もしくは確定診断の前、または診断もしくは症状が明らかになった後のいずれかに、対象に投与され得る。従って、組成物は、例えば、診断もしくは症状の臨床的認識の直後に、あるいは診断もしくは症状の検出の2、4、6、10、15もしくは24時間後、2、3、5もしくは7日後、2、4、6もしくは8週間後、またはさらには3、4もしくは6ヵ月後に投与され得る。

30

【0130】

組成物は、従来の滅菌技術によって滅菌され得るか、または滅菌濾過され得る。得られた水溶液は、そのまま使用のために包装され得るかまたは凍結乾燥され得、凍結乾燥された調製物は、粉末形態で投与され得るか、または投与の前に、滅菌水性担体と組み合わせられ得る。調製物のpHは、典型的には、3~11、より好ましくは5~9または6~8、最も好ましくは7~8、例えば7~7.5である。固体形態で得られた組成物は、複数の単一用量単位で包装され得、その単一用量単位の各々は、必要に応じて、錠剤もしくはカプセル剤の密封包装中、または1つまたは複数の用量を投与することが可能な適切なドライパウダー吸入器(DPI)中等に、固定量の、化合物および/または1つもしくは複数の化合物をコードする1つもしくは複数の核酸を含む。

40

【0131】

iii. 投薬量

投与される投薬量は、治療される対象（例えば、治療される対象の年齢、体重、免疫系の能力、および全体的な健康）、投与形態（例えば、固体または液体として）、投与様式（例えば、注射、吸入、ドライパウダー噴霧剤によって）、ならびに、潜在的に、標的とされるTM4SF1発現細胞（例えば、TCまたはEC、例えば、血管新生血管のもの）に依存する。さらに、特定の患者についての薬理ゲノム学的（治療薬の薬物動態、薬力学、または効能プロファイルに対する遺伝子型の影響）情報が、用いられる投薬量に影響を与え得る。組成物は、治療によって過度の生理学的有害効果が引き起こされることなく、対象におい

50

て治療効果をもたらすために十分なレベルの化合物（例えば、抗TM4SF1抗体、例えば、8G4）を提供する量で、好ましくは投与される。

【0132】

本発明の組成物（例えば、1つまたは複数の本発明の化合物を含む組成物）の用量または本発明の組成物を使用する治療の回数は、対象における病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）の重症度、発生または進行に基づいて（例えば、障害の1つまたは複数の症状の重症度に基づいて）、増加または減少され得る。

【0133】

本発明の化合物または薬学的組成物を、約0.01 mg/kg～約10 mg/kg、例えば約0.1 mg/kg～約10 mg/kg、例えば約3 mg/kg～約10 mg/kgの投薬量で対象へ投与し得る。一例において、対象には、少なくとも一用量（例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも多くの用量）の化合物または薬学的組成物を投与する。化合物または組成物は、例えば、1週間に1～7回（例えば、1週間に1、2、3、4、5、6、または7回）、投与することができる。好ましくは、高用量（例えば、約10 mg/kg）の化合物または薬学的組成物を対象へ投与する場合、単一用量（即ち、一用量）を合計で与える。好ましくは、低用量（例えば、約3 mg/kg）の化合物または薬学的組成物を対象へ投与する場合、1を超える用量（例えば、2、3、4、または5またはそれよりも多くの用量）、例えば、4用量を合計で与える。

10

【0134】

加えて、本発明の組成物の単回または複数回投与が、対象へ（診断前または診断後に）与えられ得る（例えば、1回投与、または2回以上の投与）。例えば、特に、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）の影響を受けやすいか、その家族歴を有する対象は、治療効果を達成および/または維持するために、複数の治療を必要とし得る。病的血管新生と関連する障害を有する対象の治療について、本明細書に記載される薬学的組成物によって提供される治療の効能は、例えば、原発性腫瘍サイズ、TM4SF1発現細胞数、および/またはTM4SF1発現細胞（例えば、腫瘍血管内皮細胞または腫瘍細胞）のアポトーシスをモニタリングおよび/または測定することによって、モニタリングすることができ、それによって、原発性腫瘍サイズおよび/またはTM4SF1発現細胞数の低減または減少、および/または、EOC細胞のアポトーシスの誘発または増加は、有効な治療を示す。次いで、所望のレベルの反応を誘発するために必要に応じて、投薬量を調節するかまたは繰り返すことができる。

20

30

【0135】

1つまたは複数の本発明の組成物の単一用量は、診断前に治療効果を達成し得る。加えて、診断後に投与される単一用量は、本発明に従う治療として機能し得る。

【0136】

1つまたは複数の本発明の組成物の単一用量はまた、病的血管新生と関連する疾患（例えば、癌）について治療される対象において療法を達成するために使用することができる。複数の用量（例えば、2、3、4、5、またはそれよりも多くの用量）もまた、これらの対象へ、必要に応じて、投与することができる。

【0137】

iii. 担体、賦形剤、希釈剤

本発明の組成物の治療製剤は、所望の純度を有する有効成分を任意の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより、当技術分野において公知の標準方法を用いて調製され得る（Remington's Pharmaceutical Sciences (20th edition), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。許容される担体としては、食塩水、または緩衝液、例えば、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸；酸化防止剤、例えば、アスコルビン酸；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン；単糖類、二糖類、および他の炭水化物、例えば、グルコース

40

50

、マンノース、またはデキストリン；キレート剤、例えば、EDTA；糖アルコール、例えば、マンニトールまたはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；および/または非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはPEGが挙げられる。

【0138】

任意で、しかし好ましくは、製剤は、薬学的に許容される塩、好ましくは塩化ナトリウムを、好ましくはおよそ生理学的濃度で含有する。任意で、本発明の製剤は、薬学的に許容される保存剤を含有し得る。いくつかの態様において、保存剤濃度は0.1~2.0%（典型的にv/v）の範囲である。好適な保存剤としては、製薬分野において公知のものが挙げられる。ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン、およびプロピルパラベンが好ましい保存剤である。任意で、本発明の製剤は、薬学的に許容される界面活性剤を0.005~0.02%の濃度で含み得る。

10

【0139】

VII. キット

本発明は、本発明の組成物（例えば、薬学的組成物）（例えば、本発明の化合物、例えば抗TM4SF1抗体、例えば8G4、を含む組成物）を含むキットを提供する。キットは、臨床家（例えば、医師または看護師）が、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を治療するために、その中に含まれる組成物を対象へ投与することを可能にするための説明書を含む。

20

【0140】

好ましくは、キットは、有効量の本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含有する単一用量薬学的組成物の複数のパッケージを含む。任意で、薬学的組成物を投与するために必要な器具またはデバイスがキット中に含まれ得る。例えば、本発明のキットは、有効量の本発明のワクチン、ベクター、安定化三量体、または最適化ウイルスポリペプチドを含有する、1つまたは複数のプレフィルドシリンジを提供し得る。さらに、キットはまた、本発明の化合物またはポリヌクレオチドを含有する薬学的組成物を使用するための、病的血管新生と関連する障害（例えば、癌）を有する対象についての投与スケジュールに関する説明書などの、追加の構成要素を含み得る。

【0141】

様々な修飾および改変が、本発明の精神または範囲から逸脱することなく、本発明の組成物、方法、およびキットにおいて行われ得ることが、当業者に明らかであろう。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲およびそれらの等価物の範囲内に入る限り、本発明の修飾および改変を包含することが意図される。

30

【実施例】

【0142】

以下の実施例は、説明するために提供されるが、請求項に記載の発明を限定するものではない。

【0143】

実施例1. 材料および方法

TM4SF1に対するモノクローナル抗体の調製

40

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）をEGM2-MV完全培地（Lonza, Walkersville, MD）中で培養し、第3~6継代で使用した。ヒトTM4SF1を約400 mRNAコピー/細胞（天然HUVECのその約4x）のレベルで過剰発現（OE）するように、HUVECに形質導入した（Shih et al. *Cancer Res.* 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. *Angiogenesis.* 14: 345-354, 2011）。 10^7 TM4SF1 OE細胞を2週間隔x5で雌性6週齢Balb-cマウスへ腹腔内注射した。TM4SF1構造を図1に示す。ハイブリドーマスクリーニング工程およびエピトープマッピング戦略を下述し、図2に示す。15個の安定したクローンが得られた。TM4SF1の変異形態との反応性に基づいて、これらのうち、13個が細胞外ループ-2（ECL2）中のエピトープを認識し、2個が細胞内ドメイン中のエピトープを認識した（図2B~2E）。マウスTM4SF1とヒトTM4SF1との著しい構造差に恐らく起因して、ヒトECL2に対して向けられたクローンはいずれもマ

50

ウスTM4SF1とは反応しなかった（図2E）。

【0144】

免疫染色

実験手順は以前に記載された（Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. Angiogenesis. 14: 345-354, 2011）。簡潔には、細胞および組織切片を、25℃にて20分間4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで3回洗浄し、PBS/2% FBSでブロックし、その後、一次抗体（8G4またはヤギ抗ヒトCD144(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)）、続いてロバ抗マウスAlexa Fluor-488もしくは-594標識二次抗体、およびファロイジン(Life Technologies, Carlsbad, CA)で免疫細胞化学を行った。免疫-ナノゴールド透過型電子顕微鏡法（immune-nanogold transmission electron microscopy）（TEM）のために、ヤギ抗マウスAlexa Fluor-488/ナノゴールドFab-断片(Nanoprobes, Yaphank, NY)を二次抗体として使用した。HRP標識ヤギ抗マウス抗体(Cell Signaling, Danvers, MA)を免疫プロットのために使用した。細胞下分画キットをThermo Scientific (Logan, UT)から得た。

10

【0145】

MTTアッセイ

サポリンコンジュゲート非特異的ヤギFab（対照ADC）およびサポリンコンジュゲートヤギ抗マウスIgG Fab（実験ADC）をAdvanced Targeting Systems (San Diego, CA)から得、実験を製造業者の説明書に従って行った。簡潔には、200 ngの8G4または対照マウスIgG(mIgG)を、25℃で1時間、10 μl EGM2-MV完全培地(Lonza, Walkersville, MD)中において200 ngの対照ADCまたは実験ADCと共にプレインキュベートした。混合物を、4時間96ウェルプレート中において平板培養されたHUVEC(1 × 10³細胞/ウェル、200 μl EGM2-MV中；1群当たり4ウェル)へ添加した。MTTアッセイを第5日に行った（Life Technologies）。全ての実験を少なくとも3回繰り返した。%生存細胞を以下のように計算した：生存細胞(%) = (OD₅₇₀ADC - OD₅₇₀ADC)/(OD₅₇₀Exp対照 - OD₅₇₀Exp対照) × 100。

20

【0146】

実施例2．抗TM4SF1抗体8G4

ハイブリドーマスクリーニングおよびエピトープマッピング戦略を図2に示す。ECL2（図1Aおよび1B）上のエピトープに対して向けられた抗体のうち、8G4をその高アビディティ（K_d 約1nM）のために詳細な研究について選択した。

30

【0147】

8G4抗体を、American Type Culture Collection（登録商標）、PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA（ATCC（登録商標））に、その産生ハイブリドーマ、ハイブリドーママウス細胞株8G4-5-13-13Fによって寄託した：

細胞株	ATCC(登録商標)アクセッション番号	寄託日
ハイブリドーママウス細胞株8G4-5-13-13F	PTA-120523	2013年7月31日

【0148】

この寄託は、特許手続きのための微生物寄託の国際認識に関するブダペスト条約およびそれに基づく規則（ブダペスト条約）の規定の下で行われた。これは、寄託の日付から30年間、生存可能な寄託物が維持されることを保証するものである。細胞株は、ブダペスト条約の条項の下で、またベス イスラエル デアコネス メディカル センター インコーポレイティッド（Beth Israel Deaconess Medical Center, Inc.）とATCCとの間の合意を条件として、ATCCから入手することができ、これは、いずれが最初であろうとも、関連する米国特許の発行時または任意の米国もしくは外国特許出願の公開時に、細胞株の永続的かつ非限定的な入手可能性を保証し、米国特許法第122条およびそれに準ずる特許商標庁長官規則（特に886 OG 638に関連して37 CFR第1.14条を含む）に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者への細胞株の入手可能性を保証するものである。

40

【0149】

本出願の譲受人は、寄託された細胞株が適切な条件下での培養時に喪失または破壊され

50

た場合、通知を受けたら速やかにそれらを同じ細胞株の標本で置き換えることに同意した。寄託された細胞株の入手可能性は、特許法に従っていずれかの政府の権限下で付与される権利に違反して本発明を実施するライセンスとして解釈されるべきではない。

【0150】

実施例3．8G4およびHUVEC中のTM4SF1の細胞内分布

8G4は、HUVEC (図3A~3C) および他の培養された内皮細胞 (EC) 中のTM4SF1を染色した；原形質膜およびナノボジア上ならびに核周囲および核沈着物中の断続的なTM4SF1リッチドメイン (TM4SF1-enriched domain) (TMED) 中。免疫細胞化学は、TM4SF1がTriton-X100によって抽出され；膜関連染色は、核周囲および核沈着物のそれよりも大いに影響を受けたことを実証した (図3D)。TM4SF1は、28kD、25kDおよび22kDのアイソフォームを生じさせる、可能性のある代替のタンパク質翻訳開始部位を有する、2つの転写バリエーションから生じると考えられている (Zukauskas et al. *Angiogenesis*. 14: 345-354, 2011)。免疫プロットは、3つ全てのバンドが0.05%によって大部分が抽出されたが、0.01% Triton X-100によっては抽出されなかったことを実証した (図3E)。0.1% Tritonでの追加の抽出は、残存する28kDバンドを溶出した。28kDバンド (黒色矢印) は、可溶性核フラクションにおいて優勢であり、細胞骨格および核クロマチンフラクションにおいては排他的に存在した (図3F)。8G4は、TM4SF1発現を欠いている細胞と相互作用しなかった (図2Cおよび2D)。

10

【0151】

HUVECの細胞下分画 (図3F) は、膜フラクション中にほぼ等しい量での3つ全ての主なTM4SF1バンドを実証し；3つ全てのアイソフォームが可溶性核フラクション中にも存在した。28kD TM4SF1のみが、細胞骨格および核クロマチンフラクションにおいて見られた。TM4SF1は可溶性細胞質ゾルフラクションにおいては検出されなかった。

20

【0152】

実施例4．ヒト胃腺癌血管EC中のTM4SF1の分布

以前の免疫組織化学的研究は、TM4SF1が、いくつかの異なるヒト癌の血管の内側のECによって高度に発現されることを実証した (Chang et al. *Int J Cancer*. 116: 243-252, 2005)。8G4での免疫蛍光染色は、これらの結果を確認し、追加のヒト癌、胃腺癌へそれらを拡張した (図4Aおよび4B)。免疫-ナノゴールド染色を伴う透過型電子顕微鏡法 (TEM) は、原形質膜上の断続的なTMED焦点を実証した (図4C~4F)。管腔の染色は、反管腔側の染色と比べて一貫してより強かった (図4Dおよび4E)。癌血管ECはまた、最大30 μm の距離について血管腔中へ、TMED染色パターンを有する薄く長いナノボジアを広げた (図4G)。これらの広がりの一部は、典型的なナノボジアよりも厚く、膠原性基質を含有し、血管腔をより小さなチャネルへ分割する架橋を形成した (図4H)。同様のナノボジア様突出部が、マウス癌血管において (Nagy et al., *Cancer Res*. 55: 360-368, 1995)、およびVEGF-A¹⁶⁴を発現するアデノウイルスでマウスにおいて誘導された血管において (Shih et al., *Cancer Res*. 69: 3272-3277, 2009) 記載された。本発明者らの知る限りでは、これは、ヒト癌ECにおけるそのような突出部の最初の記載であり、それらが抗血管ターゲティングについて実質的に増加された表面積を提供する点で、重要である。この種の突出部は、隣接する正常血管の内側のECにおいては見られず、8G4での標識化もまたこのような血管において遙かにより弱かった (図4Iおよび4J)。

30

40

【0153】

実施例5．HUVECにおける8G4インターナライゼーション

8G4がTM4SF1を発現する細胞中にインターナライズされるかどうかを決定するために、8G4でプレ標識されたHUVECを培養において経時的に追跡した。フローサイトメトリーは、細胞表面シグナルの徐々の消失：2、4、および24時間で、それぞれ、20.8%、52.2%、および95%を明らかにし (図5A)、このことは、8G4がHUVEC中へ徐々にエンドサイトーシスによって取り込まれたことを示している。この消失の一部は細胞表面からの脱落を反映し得るが、共焦点-3D Z-スタック顕微鏡検査 (confocal-3D Z-stack microscopy) は、細胞質区画 (図5B) および核 (図5C、フレーム-6、白色矢印) 中への8G4シグナルの実質的で徐

50

々の取り込みを実証した。免疫プロットは、4時間までの核抽出物中の8G4重鎖および軽鎖の両方を実証し、これらは24時間においてより低レベルで存続した(図5D)。イムノ-ナノゴールド-EMは、ナノゴールドクラスターが核周囲細胞質中、核膜孔中、および核自体内で確認された点で、8G4エンドサイトーシスについてのさらなる証拠を提供した(図5Eおよび5F)。8G4インターナリゼーションは、非常に低いレベルでTM4SF1を発現した細胞(例えば、線維芽細胞)において検出できなかった。

【0154】

8G4抗体のインターナリゼーションを担う経路は不明のままであるが、クラスリン媒介機構の可能性は低い。TMEDインターナリゼーションの動態は、クラスリン依存性エンドサイトーシスについて報告されたものよりも遅く; HUVEC表面からのTM4SF1の50%消失は少なくとも4時間を必要としたが(図5Aおよび5B)、クラスリン依存性エンドサイトーシスは、典型的に数分だけを必要とする(McNiven. Trends Cell Biol. 16: 487-492, 2006)。また、PitStopなどのクラスリンインヒビターはTM4SF1取り込みを遮断しなかったし、TM4SF1細胞内ドメインはクラスリンモチーフを含有しない(Kelly and Owen. Curr Opin Cell Biol. 23: 404-412, 2011)。最後に、インターナライズされた8G4沈着(直径100~300 nm)は、クラスリン依存性小胞(直径約80 nm)によって収容されるには大きすぎたし、いずれにしても、それらは膜結合されなかった。これらの最後の観察はまた、小胞による8G4取り込みを除外する。HUVEC核中への8G4の進入(図5A~5F)は予想外であった。TM4SF1は、古典的な核局在配列を有さない(Wright et al. Protein Sci. 9: 1594-1600, 2000)。従って、アクチンおよびミオシンなどのTM4SF1相互作用性タンパク質が(Shih et al. Cancer Res. 69: 3272-3277, 2009; Zukauskas et al. Angiogenesis. 14: 345-354, 2011)担い得る可能性ある(Spencer. Communicative & Integrative Biology. 4: 511-512, 2011; Dzijak et al. PLoS ONE. 7: e30529, 2012; Weber et al. Nature. 431: 325-329, 2004)。

【0155】

実施例6. 抗体-薬物コンジュゲート(ADC)でのTM4SF1の標的化

TM4SF1と恐らくは複合体化された8G4は、HUVECによって効率的に取り込まれるため、本発明者らは、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)アプローチがEC殺傷を誘発するかどうかを試験した。最近の研究は、癌療法についてのアプローチとしてのADCの有用性を実証した(Kuroda et al. Prostate. 70: 1286-1294, 2010)。成功のための要件は、標的分子が細胞表面上において高度に発現されること、および抗体結合毒素が効率的にエンドサイトーシスによって取り込まれることである。TM4SF1および本発明の化合物、例えば、8G4抗TM4SF1抗体は、これらの基準を満たす。第一に、TM4SF1は、多くの癌細胞の表面上においてだけでなく、腫瘍血管ECの原形質膜上においても高度に発現され、その殺傷は、血流を妨げ、血管バリアを破壊し、それによって腫瘍細胞へのADCのアクセスが増加することが予想される。第二に、TM4SF1に対して向けられた8G4抗体は、大量のTM4SF1を発現するECおよび他の細胞によって容易にエンドサイトーシスにより取り込まれ、結合された毒素について細胞質および核アクセスを与え、結果として細胞殺傷が生じる。まとめると、これらの知見は、TM4SF1が、本発明の化合物を用いるADC癌療法などの、ADC癌療法について適切な血管および腫瘍細胞標的であり得ることを示唆しており、これは、アミノ酸配列 NYTFASLEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1) を含むエピトープに特異的に結合し、好ましくは、8G4抗体について観察されたものと同様または同一の様式で細胞中へインターナライズされることが可能である。

【0156】

この仮説を試験するために、タンパク質合成を停止させるモノマー-RNA N-グリコシダーゼである、サポリン(Polito et al. Int J Biochem Cell Biol. 41: 1055-1061, 2009)を、8G4 ADCの作製のための毒素として用いた。HUVECは、8G4/Exp-ADC(サポリンコンジュゲートヤギ抗マウスFab)を取り込み、第3日までに明らかな張線維(図6B)および第5日までに広範囲な細胞殺傷(図6C)が現れた。8G4もしくはマウス-IgG単独へ、または対照ADC(サポリンコンジュゲートヤギFab)へ曝露されたHUVECは(図6A)、検出可能な細

胞傷害性を示さなかった（図6C）。同様の結果が、TM4SF1を高レベルで発現するPC3前立腺癌細胞で得られたが、検出可能なTM4SF1を発現しないHEK293は、8G4-サボリン複合体に対して耐性であった（図7）。

【0157】

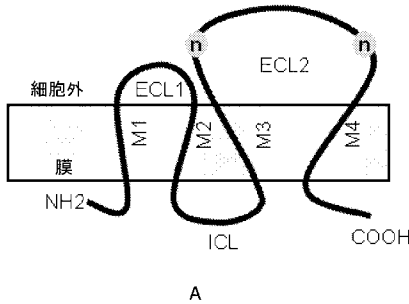
他の態様

本発明をその特定の態様と関連して記載したが、さらなる改変が可能であり、本出願は、一般に、本発明の原理に従い、上に述べた本質的な特性に適用し得る、本発明が属する技術分野内の既知のまたは通例の習慣内である本開示からの逸脱を含む、本発明のいかなるバリエーション、使用、または適応も包含することが意図されていることが理解されるだろう。

【0158】

全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が参照によりその全体が組み入れられるように具体的にかつ個々に示される場合と同じ程度まで、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる。そのような特許出願には、具体的には、2013年10月10日に提出された米国仮特許出願第61/889,340号が含まれ、その恩典を本出願は主張する。

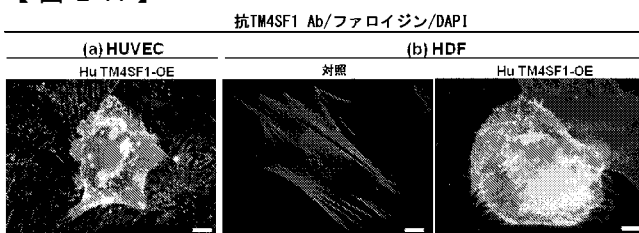
【図1】



タンパク質ドメイン	アミノ酸数
N N末端	9
TM1 膜 1	21
ECL1 細胞外ループ 1	15
TM2 膜 2	25
ICL 細胞内ループ 1	18
TM3 膜 3	28
ECL2 細胞外ループ 2	48
TM4 膜 4	28
C C末端	10

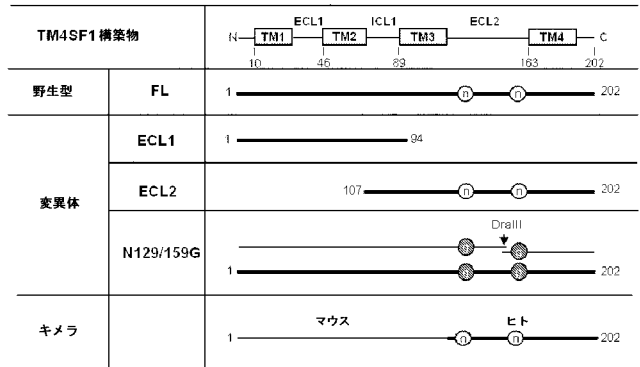
B

【図2A】

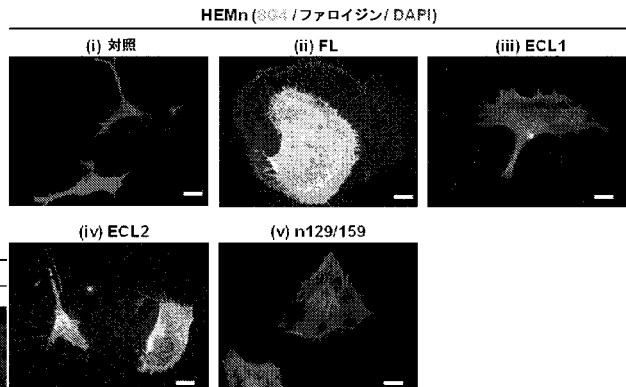


【図2B】

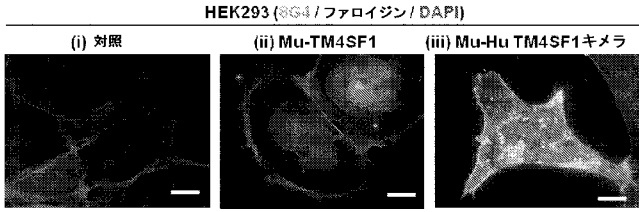
TM4SF1野生型、変異体、およびマウス-ヒトTM4SF1キメラ構築物



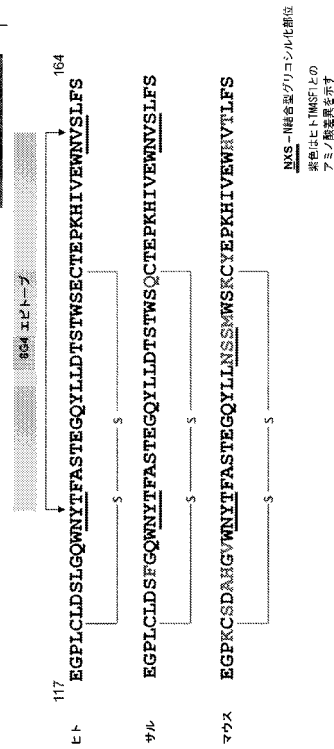
【図2C】



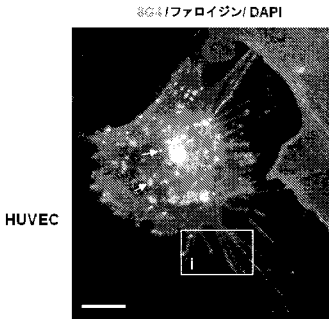
【 図 2 D 】



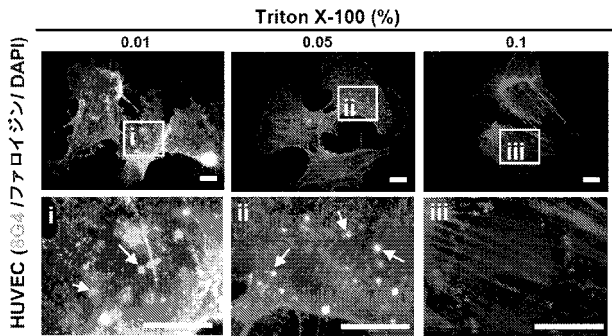
【 図 2 E 】



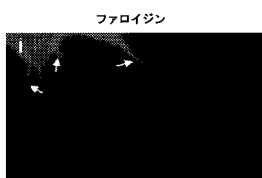
【 図 3 A 】



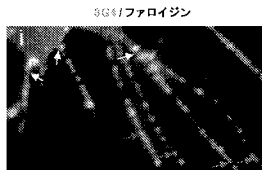
【 図 3 D 】



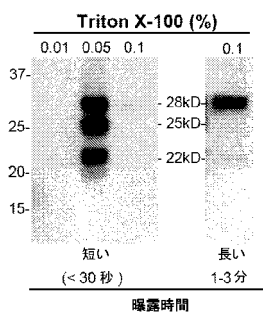
【 図 3 B 】



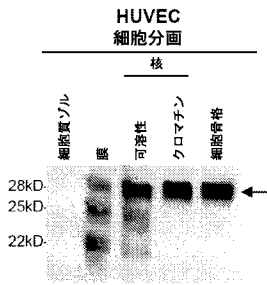
【 図 3 C 】



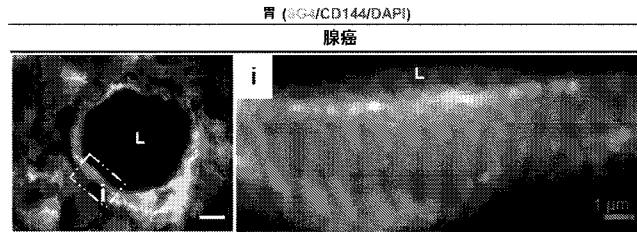
【 図 3 E 】



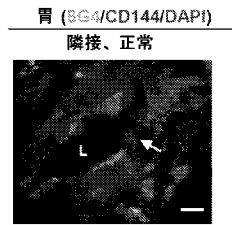
【図 3 F】



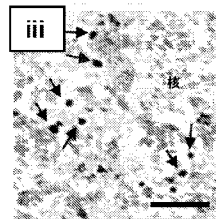
【図 4 A】



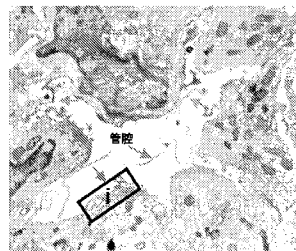
【図 4 B】



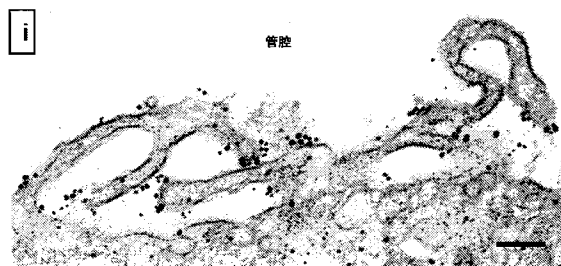
【図 4 F】



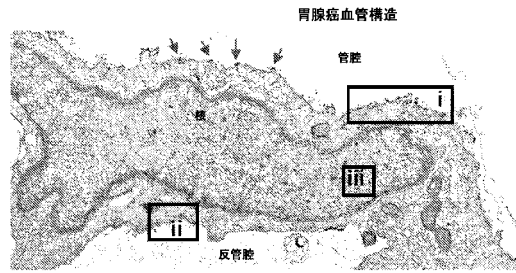
【図 4 G】



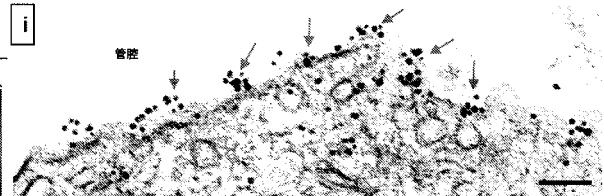
【図 4 H】



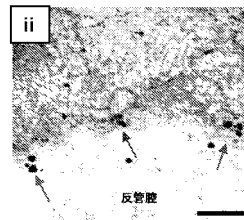
【図 4 C】



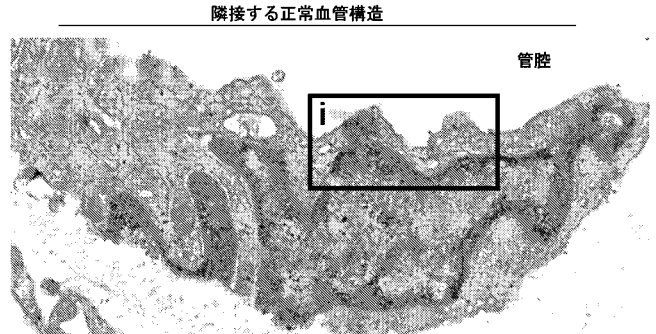
【図 4 D】



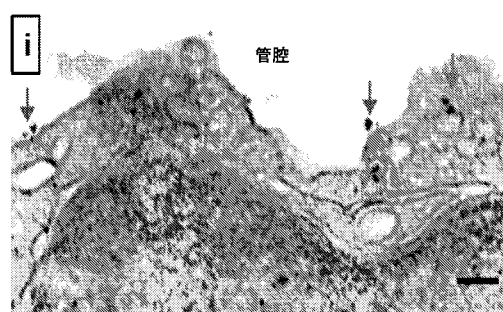
【図 4 E】



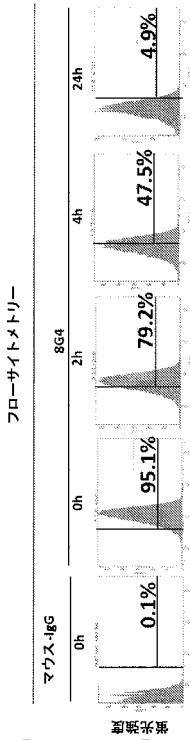
【図 4 I】



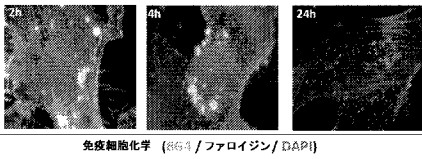
【図 4 J】



【 図 5 A 】

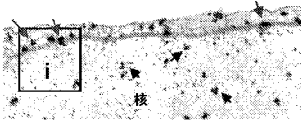


【 図 5 B 】

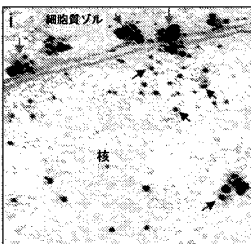


【 図 5 E 】

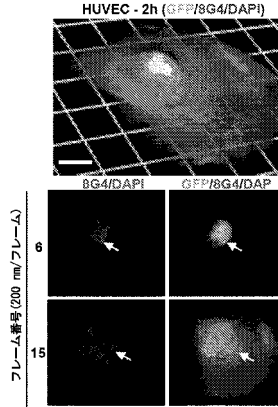
HUVEC - 2h 8G4 インターナライゼーション (EMイムノナノゴールド)



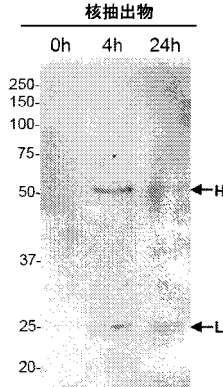
【 図 5 F 】



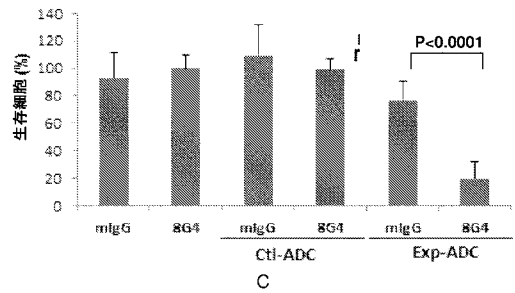
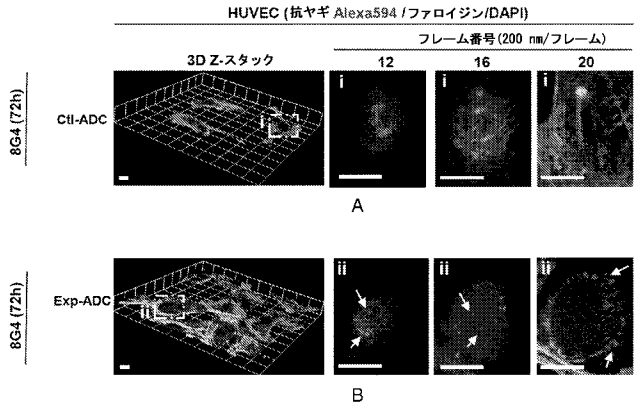
【 図 5 C 】



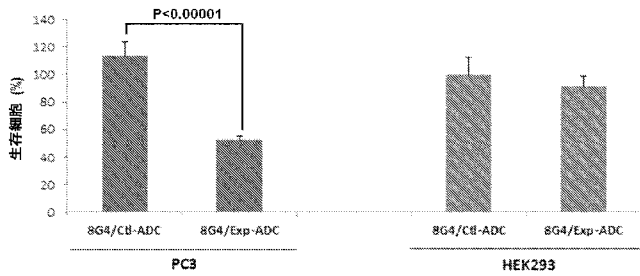
【 図 5 D 】



【 図 6 】



【図7】



【配列表】

2019205430000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年6月26日(2019.6.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体またはその抗体断片を含む組成物であって、該抗体または抗体断片が、アミノ酸配列NYTFASTEGQYLLDTSTWSECTEPKHIVEWNVS (SEQ ID NO: 1)を含む4回膜貫通型L6ファミリーメンバー1(TM4SF1)におけるポリペプチドに結合し、該ポリペプチドが、ヒトTM4SF1の残基N129および残基N159に対応する位置でグリコシル化部位を含み、かつ該抗体または抗体断片が、グリコシル化依存性様式で該ポリペプチドに結合する、前記組成物。

【請求項2】

前記ポリペプチドが、残基N129または残基N159の少なくとも1つでグリコシル化され、グリコシル化ポリペプチドを形成する、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記抗体または抗体断片が、前記グリコシル化ポリペプチドを発現する細胞の細胞質中へインターナライズされ得る、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

前記抗体または抗体断片が、10 nM以下のKd値で前記ポリペプチドに結合する、請求項1~3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記抗体または抗体断片が、2 nM以下のKd値で前記ポリペプチドに結合する、請求項1~4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

前記抗体または抗体断片が、500 pM以下のKd値で前記ポリペプチドに結合する、請求項1~5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

前記抗体が、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、または合成抗体である、請求項1~6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記抗体断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、SMIP、単一ドメイン抗体、ダイアボディ、ミニボディ、scFv-Fc、アフィボディ、またはナノボディである、請求項1~7のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

前記抗TM4SF1抗体または抗体断片が、治療的作用物質または診断的作用物質にコンジュゲートされている、請求項1~8のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

前記治療的作用物質が、細胞傷害性物質、化学療法薬、タンパク質、ペプチド、抗体、成長阻害物質、および抗ホルモン薬からなる群より選択される、請求項1~9のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

前記細胞傷害性物質が、リボソーム不活性化タンパク質、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビター、チュープリンインヒビター、アルキル化薬、抗生物質、抗腫瘍薬、増殖抑制薬、代謝拮抗物質、トポイソメラーゼIIまたはIIインヒビター、ホルモンアゴニストまたはアンタゴニスト、免疫調節物質、DNA副溝バインダー、および放射性物質からなる群より選択される、請求項10に記載の組成物。

【請求項 12】

前記抗体または抗体断片が、GFTFSSFAMS (SEQ ID NO: 2)、TISSGSIIYYTDGVKG (SEQ ID NO: 3)、RGIYYGYDGYAMDY (SEQ ID NO: 4)、RSSQSLVHSGNTYLH (SEQ ID NO: 5)、KVSNRFS (SEQ ID NO: 6)、およびSQSTHIPLA (SEQ ID NO: 7)から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、請求項1~11のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 13】

前記抗体またはその抗原結合性断片の重鎖領域が、SEQ ID NO: 8に対して少なくとも90%の配列同一性を有し、かつ前記抗体またはその抗原結合性断片の軽鎖領域が、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項1~12のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記抗体がハイブリドーママウス細胞株8G4-5-13-13F(PTA-120523)によって産生される、請求項1~13のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 15】

請求項1~14のいずれか一項に記載の抗体またはその抗体断片をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 16】

請求項15に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 17】

請求項16に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 18】

病的血管新生を治療するための、請求項1~17のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

前記病的血管新生が癌に関連する、請求項18に記載の組成物。

【請求項 20】

前記癌が、乳癌、卵巣癌、腎臓癌 (renal cancer)、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌、皮膚癌、食道癌、腎臓癌 (kidney cancer)、脳腫瘍、甲状腺癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、精巣癌、小腸癌、唾液腺癌、および副腎癌からなる群より選択される、請求項19に記載の組成物。

【請求項 21】

病的血管新生を治療するための医薬の製造のための、請求項1~20のいずれか一項記載の組成物の使用。

【請求項 22】

前記病的血管新生が癌に関連する、請求項21に記載の使用。

【請求項 23】

前記癌が、乳癌、卵巣癌、腎臓癌 (renal cancer)、結腸直腸癌、肝臓癌、胃癌、皮膚癌、食道癌、腎臓癌 (kidney cancer)、脳腫瘍、甲状腺癌、前立腺癌、膵臓癌、肺癌、精巣癌、小腸癌、唾液腺癌、および副腎癌からなる群より選択される、請求項22に記載の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 3/04 (2006.01)	A 6 1 P 3/04	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 K 38/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 38/02	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 51/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 K 49/14 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 49/16 (2006.01)	A 6 1 K 51/00	2 0 0
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 51/02	2 0 0
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 51/10	2 0 0
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 49/14	
	A 6 1 K 49/16	
	A 6 1 K 47/68	
	A 6 1 K 47/64	
	G 0 1 N 33/53	D

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ジャミネット ショウ - チン エス .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ ブロードウェイ 393 アpartment

1 5

(72)発明者 ドボラク ハロルド エフ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン センター メーソン ロード 27

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA01X AA90X AA92Y AB01 AB05 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C076 BB01 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 BB21 BB24 BB25 BB29

BB30 BB31 CC07 CC09 CC10 CC11 CC20 CC21 CC26 CC27

EE41 EE59 FF02 FF68

4C084 AA01 AA02 AA07 AA17 AA27 BA44 MA05 MA52 MA55 MA56

MA58 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362

ZA451 ZA452 ZA701 ZA702 ZA891 ZA892 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072

ZB151 ZB152 ZB211 ZB212 ZB261 ZB262

4C085 AA13 AA14 AA16 AA21 AA25 BB11 CC21 CC23 EE01 GG01

GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08 GG10 HH03 HH11 HH13

KA03 KA04 KA26 KA27 KA29

4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 EA50 FA72

专利名称(译)	tm4sf1结合蛋白及其使用方法		
公开(公告)号	JP2019205430A	公开(公告)日	2019-12-05
申请号	JP2019100296	申请日	2019-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	贝丝以色列去赤穗内斯医学中心股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	贝斯以色列Deakonesu医疗中心股份有限公司		
[标]发明人	ジャミネットショウチンエス ドボラクハロルドエフ		
发明人	ジャミネット ショウ-チン エス. ドボラク ハロルド エフ.		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/28 C07K16/46 C12N15/62 C12N15/63 C12N5/10 C12N1/21 C12P21/08 A61P9/00 A61P35/00 A61P3/04 A61P27/02 A61P9/10 A61P17/06 A61P29/00 A61P19/02 A61P37/02 A61P43/00 A61P17/00 A61K38/02 A61K39/395 A61K45/00 A61K51/00 A61K51/02 A61K51/10 A61K49/14 A61K49/ /16 A61K47/68 A61K47/64 G01N33/53		
CPC分类号	A61K2039/505 A61P3/04 A61P9/00 A61P9/10 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P27/02 A61P29/ /00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 A61K47/6849 C07K16/28 C07K16/30 C07K2317/34 C07K2317/ /77 G01N33/574 C07K2317/14 C07K2317/51 C07K2317/515 C07K2317/92 G01N33/6893 G01N2333/ /705 G01N2800/7014		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/28 C07K16/46 C12N15/62.Z C12N15/63.Z C12N5/10 C12N1/21 C12P21/08 A61P9/00 A61P35/00 A61P3/04 A61P27/02 A61P9/10 A61P17/06 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P37/ /02 A61P43/00.105 A61P9/10.101 A61P17/00 A61K38/02 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K39/395. C A61K39/395.L A61K45/00 A61K51/00.200 A61K51/02.200 A61K51/10.200 A61K49/14 A61K49/16 A61K47/68 A61K47/64 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA90X 4B065/ /AA92Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB14 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB21 4C076/ /BB24 4C076/BB25 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC07 4C076/CC09 4C076/CC10 4C076/CC11 4C076/CC20 4C076/CC21 4C076/CC26 4C076/CC27 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/ /FF02 4C076/FF68 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/AA27 4C084/BA44 4C084/MA05 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/ /MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA331 4C084/ZA332 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ /ZA451 4C084/ZA452 4C084/ZA701 4C084/ZA702 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA961 4C084/ /ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ /ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/ /GG05 4C085/GG06 4C085/GG08 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH13 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA26 4C085/KA27 4C085/KA29 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/ /EA20 4H045/EA50 4H045/FA72		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/889340 2013-10-10 US		

摘要(译)

为提供包含靶向TM4SF1的结合域的化合物以治疗与病理性血管生成相关的疾病。解决方案：本发明公开了特异性结合多肽的抗原决定簇的化合物（例如TM4SF1结合蛋白，例如抗TM4SF1抗体）。TM4SF1的氨基酸序列，特别是与表位结合后能够被内在表达TM4SF1的细胞（例如肿瘤细胞或血管生成性血管内皮细胞）中的化合物。本发明还提供了治疗患有与病理性血管生成有关的病症的受试者的方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公開特許公報 (A)	(11) 特許出願公開番号 特開2019-205430 (P2019-205430A)
		(43) 公開日 令和1年12月5日 (2019.12.5)
(51) Int.-Cl. C12N 15/13 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)	F1 C12N 15/13 ZNA C07K 16/28 C07K 16/46 C12N 15/62 Z C12N 15/63 Z	ターマコード (参考) 4B064 4B065 4C076 4C084 4C085
(21) 出願番号 特願2019-100296 (P2019-100296)	(71) 出願人 505415019	審査請求 有 請求項の数 23 O L (全 58 頁) 最終頁に続く
(22) 出願日 令和1年5月29日 (2019.5.29)	ベス イスラエル デアコネス メディカル センター インコーポレイティッド	
(62) 分割の表示 特願2016-518089 (P2016-518089) の分割	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン ブルックリン アベニュー 330	
原出願日 平成26年10月8日 (2014.10.8)	(74) 代理人 100102978	
(31) 優先権主張番号 61/889,340	弁理士 清水 初志	
(32) 優先日 平成25年10月10日 (2013.10.10)	100102118	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	弁理士 春名 雅夫	
	100160923	
	弁理士 山口 裕孝	
	100119507	
	弁理士 刑部 俊	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 TM4SF1 結合性タンパク質およびそれを使用する方法		