

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6421371号
(P6421371)

(45) 発行日 平成30年11月14日(2018.11.14)

(24) 登録日 平成30年10月26日(2018.10.26)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	Z N A
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 5/12 (2006.01)	C 1 2 N 5/12	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

請求項の数 23 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-520078 (P2014-520078)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月10日 (2013.6.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2013/065996
 (87) 国際公開番号 W02013/183786
 (87) 国際公開日 平成25年12月12日 (2013.12.12)
 審査請求日 平成28年6月7日 (2016.6.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2012-131424 (P2012-131424)
 (32) 優先日 平成24年6月8日 (2012.6.8)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000125347
 学校法人近畿大学
 大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号
 (73) 特許権者 502019933
 リンク・ジェノミクス株式会社
 東京都中央区日本橋堀留町2丁目1番8号
 神野ビル4階
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74) 代理人 100126354
 弁理士 藤田 尚
 (74) 代理人 100104282
 弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスポーターに対する抗体およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

L A T 1 / C D 9 8 を発現する細胞の L A T 1 / C D 9 8 複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片であって、

(1) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)、および

配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、

(2) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)、および

配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、

(3) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)、および

配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、または (4) 配列番号 3 7 10
 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L)、および

配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H)、を含有する、抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項2】

L A T 1 / C D 9 8 を発現する細胞に対する細胞障害活性および/またはインターナリゼーション活性を有する、請求項1に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

サブクラスが I g G である、請求項1または2に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

前記 I g G が、 I g G _{2 a} または I g G ₁ である、請求項3に記載の抗体またはその抗 20

原結合断片。

【請求項 5】

前記抗原結合断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、それらのダイマー、ミニボディ(minobodies)、ダイアボディ(diabodies)、およびマルチマー、または二重特異性抗体断片である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

モノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

ラット、マウス、霊長類、またはヒト抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

キメラ抗体またはヒト化抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片と少なくとも 1 つの細胞毒性薬、抗腫瘍剤または放射性同位体を含んでなるイムノコンジュゲート。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の核酸分子を含むかまたは該核酸分子を導入した、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞または遺伝子導入細胞。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の細胞を培養し、得られる培養物から LAT1 / CD98 複合体に特異的に結合する抗体を採取することを含む、LAT1 / CD98 複合体の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 14】

請求項 12 に記載の細胞から抗 LAT1 / CD98 モノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を含む発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主(ヒトを除く)に導入して前記モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清または宿主の分泌物から LAT1 / CD98 の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体を採取することを含む、LAT1 / CD98 の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項 15】

前記宿主が、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物(ヒトを除く)細胞、植物細胞、または哺乳動物(ヒトを除く)である、請求項 14 に記載の製造方法。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する組成物であって、LAT1 / CD98 を発現する細胞に適用して該細胞のアポトーシスを誘導するために使用する、組成物。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する、LAT1 / CD98 をその細胞表面に発現する腫瘍細胞によって特徴付けられる腫瘍の予防または治療のための医薬。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジ

10

20

30

40

50

ユゲートを含有する組成物であって、LAT1/CD98を発現する細胞を検出するために使用する、組成物。

【請求項19】

請求項18の組成物と、生体から採取された試料とを反応させ、反応したシグナルを検出することを特徴とする、腫瘍の検出方法。

【請求項20】

請求項18の組成物を癌細胞と接触する工程を含む試験管内の腫瘍の免疫検出方法。

【請求項21】

請求項18の組成物を投与された個体において、近赤外光イメージング、PET、MRIまたは超音波イメージングによって得られる検出映像を得る工程を含む生体内で腫瘍の映像化方法。

10

【請求項22】

請求項1～9のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する、LAT1/CD98をその細胞表面に発現する腫瘍細胞によって特徴付けられる腫瘍の診断のための医薬。

【請求項23】

前記腫瘍が、大腸癌、肺癌、または子宮頸癌である、請求項17または請求項22に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、LAT1/CD98複合体の細胞外領域に特異的に結合し、直接的にアミノ酸輸送活性を阻害、あるいはリンパ球と共同して間接的に細胞障害性因子を誘導することで腫瘍細胞を細胞死へと導く抗LAT1/CD98モノクローナル抗体に関する。本発明はさらに抗体および/もしくはイムノコンジュゲート組成物ならびに腫瘍を治療すること、予防することおよび/もしくは診断することにおけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

生物は生命の維持活動に必要な栄養素やシグナル伝達物質等を取得するために種々の機構を有しており、個々の細胞膜上に多様に存在する輸送体や受容体はその一例である。中でも生体を構成する主要要素であるアミノ酸の輸送については、1960年代から研究がなされてきた。1990年に入ってからアミノ酸輸送を担う分子が同定され始め、現在ではおよそ30種類ほど支配遺伝子が同定されている。これら輸送体は輸送するアミノ酸の性質によって、塩基性アミノ酸輸送体、中性アミノ酸輸送体、酸性アミノ酸輸送体の3種に大別されるが、CD98とのヘテロ二量体型アミノ酸輸送体は以下で述べるLAT1を含め6種類である。

30

【0003】

LAT1は他の輸送体に対し比較的広い基質選択性を持つ、ナトリウム非依存的な中性アミノ酸輸送体である。1998年にクローニングされた12回膜貫通型のタンパク質で、細胞膜表面に存在する。6種類のCD98lcのうちの一つであり、1回膜貫通タンパク質の4F2hc(CD98)とジスルフィド結合することでヘテロ二量体を形成し、アミノ酸輸送の活性を示す。4F2hcは特定の輸送体に連結して細胞膜まで移行させるシャペロン様分子である(例えば、金井好克, 蛋白質 核酸 酵素 Vol. 46, No. 5, pp. 629-637, 2001(非特許文献1))。

40

【0004】

現在までにLAT1/CD98複合体が腫瘍細胞において高発現しているという事例が多数報告されている(Yanagida et al., Biochimica et Biophysica Acta Vol. 1514, pp. 291-302, 2001(非特許文献2)、Ohno et al., Cancer Sci. Vol. 99, No. 5, pp. 1000-1007, 2008(非特許文献3)、K

50

aira et al., Cancer Sci. Vol. 99, No. 12, pp. 2380 - 2386, 2008 (非特許文献4)、Kaira et al., Cancer Sci. Vol. 100, No. 2, pp. 249 - 254, 2009 (非特許文献5)。アミノ酸は細胞増殖において不可欠な物質であり、無秩序に増殖を繰り返す腫瘍細胞は通常より多くのアミノ酸を必要とすると考えられる。そのため、正常細胞よりも腫瘍細胞においてアミノ酸輸送体の発現量が増加しているものと推測される。従ってLAT1/CD98複合体は腫瘍の治療における標的分子として有用であることが示唆される。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0005】

【特許文献1】特開2011-24537

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】金井好克, 蛋白質 核酸 酵素 Vol. 46, No. 5, pp. 629 - 637, 2001

【非特許文献2】Yanagida et al., Biochimica et Biophysica Acta Vol. 1514, pp. 291 - 302, 2001

【非特許文献3】Ohno et al., Cancer Sci. Vol. 99, No. 5, pp. 1000 - 1007, 2008

20

【非特許文献4】Kaira et al., Cancer Sci. Vol. 99, No. 12, pp. 2380 - 2386, 2008

【非特許文献5】Kaira et al., Cancer Sci. Vol. 100, No. 2, pp. 249 - 254, 2009

【非特許文献6】Haynes et al., J Immunol. 1981 Apr; 126(4): 1409 - 14.

【非特許文献7】Masuko et al., Jpn J Cancer Res. 1985 May; 76(5): 386 - 94.

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

LAT1/CD98複合体に対し特異的に結合し活性を阻害する、あるいは細胞障害を誘導するモノクローナル抗体は分子標的薬として有望であると考えられるが、抗体医薬の性質上、LAT1/CD98複合体の細胞外領域を認識する抗体である必要がある。これまでのところ、CD98を特異的に認識する抗体はいくつか報告されているが(Haynes et al., J Immunol. 1981 Apr; 126(4): 1409 - 14. (非特許文献6); Masuko et al., Jpn J Cancer Res. 1985 May; 76(5): 386 - 94. (非特許文献7))、LAT1/CD98複合体の細胞外領域をエピトープとする抗体として唯一の報告があるのみである(特開2011-24537: 特許文献1)。しかし、特開2011-24537に開示される抗体はヒトを治療するためには抗体力価が十分でなく、抗腫瘍剤として実用に供するには不十分であった。

40

【0008】

したがって、LAT1/CD98複合体の細胞外領域をエピトープとして認識する抗体(「抗LAT1/CD98抗体」としてより優れたたものが求められている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

このような状況に鑑み、本発明は、腫瘍細胞特異的に高発現の見られるLAT1/CD98複合体の細胞外領域を認識し、その活性を阻害あるいは細胞障害性因子を誘導するこ

50

とで腫瘍細胞を細胞死へと導くモノクローナル抗体を提供する。さらに、本発明の抗体を産生するハイブリドーマ、本発明の抗体と殺細胞活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物あるいは放射性同位体との複合体(イムノコンジュゲート)を提供する。

【0010】

本発明者らは特開2011-24537に開示される抗LAT1/CD98抗体のCDRのアミノ酸配列とは異なるCDRアミノ酸配列を有し、LAT1/CD98複合体の細胞外領域に対する結合性の顕著により優れた抗LAT1/CD98抗体の作製に成功した。また該抗体が顕著な細胞障害誘導活性、およびインターナリゼーション活性を有することを確認した。

【0011】

したがって、本発明は、以下を提供する。

[1] LAT1/CD98を発現する細胞のLAT1/CD98複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(1) 軽鎖相補性決定領域1(CDR L1)、軽鎖相補性決定領域2(CDR L2)、および軽鎖相補性決定領域3(CDR L3)として、それぞれ、配列番号7、配列番号8、および配列番号9のアミノ酸配列、または配列番号7、配列番号8、および配列番号9のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

重鎖相補性決定領域1(CDR H1)、重鎖相補性決定領域2(CDR H2)、および重鎖相補性決定領域3(CDR H3)として、それぞれ、配列番号10、配列番号11、および配列番号12のアミノ酸配列、もしくは配列番号10、配列番号11、および配列番号12のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合断片、

(2) CDR L1、CDR L2、およびCDR L3として、それぞれ、配列番号13、配列番号14、および配列番号15のアミノ酸配列、もしくは配列番号13、配列番号14、および配列番号15のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

CDR H1、CDR H2、およびCDR H3として、それぞれ、配列番号16、配列番号17、配列番号18のアミノ酸配列、もしくは配列番号16、配列番号17、および配列番号18のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合断片、

(3) CDR L1、CDR L2、およびCDR L3として、それぞれ、配列番号19、配列番号20、および配列番号21、もしくは配列番号19、配列番号20、および配列番号21のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

CDR H1、CDR H2、およびCDR H3として、それぞれ、配列番号22、配列番号23、および配列番号24のアミノ酸配列、もしくは配列番号22、配列番号23、および配列番号24のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異を有する各アミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合断片、または

(4) CDR L1、CDR L2、およびCDR L3として、それぞれ、配列番号25、配列番号26、および配列番号27のアミノ酸配列、もしくは配列番号25、配列番号26、および配列番号27のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

CDR H1、CDR H2、およびCDR H3として、それぞれ、配列番号28、配列番号29、および配列番号30のアミノ酸配列、もしくは配列番号28、配列番号29、および配列番号30のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含む、抗体またはその抗原結合断片。

[2] LAT1/CD98を発現する細胞のLAT1/CD98複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片であって、

(1) X₁ASQX₂VGNNA(配列番号1)のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決

10

20

30

40

50

定領域 1 (CDRL1)、

(2) YASX₃RX₄T (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 2 (CDRL2)、

(3) QRX₅YKSPYT (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 3 (CDRL3)、

(4) GFSLPTSSVS (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 1 (CDRH1)、

(5) VIWSNGNTDYSSX₆X₇KS (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 2 (CDRH2)、および

(6) NFRNX₈PGVMDA (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 3 (CDRH3)

(但し、X₁ ~ X₈ は、任意の天然に存在するアミノ酸残基である)

を含む、抗体またはその抗原結合断片。

[3] X₁ が、R または K であり、

X₂ が、N または T であり、

X₃ が、S または N であり、

X₄ が、H または N であり、

X₅ が、V または I であり、

X₆ が、A または R であり、

X₇ が、I または F である、

X₈ が、D または N である、項 [2] に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[4] (1) X₁ が R、X₂ が N、X₃ が N、X₄ が N、X₅ が I、X₆ が A、X₇ が I、X₈ が D であるか、

(2) X₁ が K、X₂ が N、X₃ が S、X₄ が H、X₅ が V、X₆ が R、X₇ が F、X₈ が D であるか、

(3) X₁ が K、X₂ が T、X₃ が S、X₄ が H、X₅ が V、X₆ が R、X₇ が F、X₈ が D であるか、または

(4) X₁ が K、X₂ が N、X₃ が S、X₄ が H、X₅ が V、X₆ が R、X₇ が I、X₈ が N である、項 [2] に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[5] 項 [1] ~ [4] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片であって、(1) 配列番号 31 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LH)、および

配列番号 31 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VL)、

(2) 配列番号 33 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LH)、および

配列番号 34 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VL)、

(3) 配列番号 35 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LH)、および

配列番号 36 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VL)、または

(4) 配列番号 37 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (LH)、および

配列番号 38 のアミノ酸配列と 90% 以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VL)、

を含有する、抗体もしくはその抗原結合断片。

[6] 項 [1] ~ [5] のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片であって、

(1) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (VL)、および

10

20

30

40

50

配列番号 32 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VH)、
(2) 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (VL)、および
配列番号 34 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VH)、
(3) 配列番号 35 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (VL)、および
配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VH)、または
(4) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (VL)、および
配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (VH)、
を含有する、抗体もしくはその抗原結合断片。

[7] LAT1 / CD98 を発現する細胞に対する細胞障害活性および / またはインターナリゼーション活性を有する、項 [1] ~ [6] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

[8] サブクラスが IgG である、項 [1] ~ [7] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[9] 上記 IgG が、IgG_{2a} または IgG₁ である、項 [8] に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[10] 上記抗原結合断片が、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、ds-scFv、それらのダイマー、ミニボディ (minobodies)、ダイアボディ (diabodies)、およびマルチマー、または二重特異性抗体断片である、項 [1] ~ [9] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[11] モノクローナル抗体である、項 [1] ~ [10] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

20

[12] ラット、マウス、霊長類、またはヒト抗体である、項 [1] ~ [11] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[13] キメラ抗体またはヒト化抗体である、項 [1] ~ [11] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片。

[14] 項 [1] ~ [13] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片と少なくとも 1 つの細胞毒性薬、抗腫瘍剤または放射性同位体を含んでなるイムノコンジュゲート。

[15] 項 [1] ~ [14] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子。

30

[16] 項 [15] に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

[17] 項 [15] に記載の核酸分子を含むかまたは該核酸分子を導入した、項 [1] ~ [13] のいずれか一項に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞または遺伝子導入細胞。

[18] 項 [17] に記載の細胞を培養し、得られる培養物から LAT1 / CD98 複合体に特異的に結合する抗体を採取することを含む、LAT1 / CD98 複合体の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

[19] 項 [17] に記載の細胞から抗 LAT1 / CD98 モノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を含む発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して上記モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清または宿主の分泌物から LAT1 / CD98 の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体を採取することを含む、LAT1 / CD98 の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

40

[20] 上記宿主が、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、または哺乳動物である、項 [19] に記載の製造方法。

[21] 項 [1] ~ [14] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する組成物であって、LAT1 / CD98 を発現する細胞に適用して該細胞のアポトーシスを誘導するために使用する、組成物。

[22] 項 [1] ~ [14] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する、腫瘍の予防または治療のための医薬。

50

[2 3] 項 [1] ~ [1 4] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する組成物であって、L A T 1 / C D 9 8 を発現する細胞を検出するために使用する、組成物。

[2 4] 項 [2 3] の組成物と、生体から採取された試料とを反応させ、反応したシグナルを検出することを特徴とする、腫瘍の検出方法。

[2 5] 項 [2 3] の組成物を癌細胞と接触する工程を含む試験管内の腫瘍の免疫検出方法。

[2 6] 項 [2 3] の組成物を個体に投与する工程および近赤外光イメージング、P E T、M R I または超音波イメージングによって得られる検出映像を得る工程を含む生体内で腫瘍の映像化方法。

10

[2 7] 項 [1] ~ [1 4] のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片またはイムノコンジュゲートを含有する、腫瘍の診断のための医薬。

[2 8] 上記腫瘍が、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、膀胱癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、口腔癌、胆嚢癌、甲状腺癌、中皮腫、胸膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カボジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起膠腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、嚢芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺肉腫、およびウィルムス腫瘍からなる群から選択される少なくとも1つである、項 [2 2] または項 [2 7] に記載の医薬。

20

[2 9] 以下の (1) ~ (6) からなる群から選択される相補性決定領域 (C D R) :

(1) 配列番号 7、13、19、または 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 1 (C D R L 1)、

(2) 配列番号 8、14、20、または 26 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 2 (C D R L 2)、

(3) 配列番号 9、15、21、または 27 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 3 (C D R L 3)、

(4) 配列番号 10、16、22、または 28 のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 1 (C D R H 1)、

30

(5) 配列番号 11、17、23、または 29 のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 2 (C D R H 2)、および

(6) 配列番号 12、18、24、または 30 のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 3 (C D R H 3)。

【発明の効果】

【0012】

本発明の抗体またはその抗原結合断片は、L A T 1 / C D 9 8 複合体の細胞外領域を特異的に認識し、L A T 1 / C D 9 8 複合体の活性を阻害または L A T 1 / C D 9 8 複合体発現細胞において細胞障害性因子を誘導し、その細胞死を引き起こすことができる。また本発明の抗体またはその抗原結合断片に殺細胞活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物あるいは放射性同位体を結合させたイムノコンジュゲートにより、L A T 1 / C D 9 8 複合体発現細胞において、細胞死を引き起こすことができる。本発明の抗体またはその抗原結合断片は、L A T 1 / C D 9 8 複合体の細胞外領域を特異的に認識することができることから、抗癌抗体医薬として特に有用である。本発明は、これまで報告されている L A T 1 / C D 9 8 複合体の細胞外領域を特異的に認識する抗体と比較して格別顕著な効果を奏する。

40

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】(A) ヒト大腸癌細胞株 (H C T 1 1 6)、ヒト肺癌細胞株 (N C I - H 1 9 4 4、A 5 4 9)、ヒト子宮頸癌細胞株 (H e L a) に対する L G 9 1 1 1 モノクローナル

50

抗体、LG9112モノクローナル抗体、LG9113モノクローナル抗体、LG9114モノクローナル抗体、およびLGtra01-01モノクローナル抗体の結合性を示す図である。赤線は各モノクローナル抗体を反応させたときのヒストグラム、青線はControlとしてラットIgGを反応させたときのヒストグラムを示す。(B)(A)に記載のヒストグラムをグラフにより示す。値は、抗体反応時のMFI(mean fluorescence intensity)からControlのMFIを引いた値(MFI)を示す。

【図2】(A)LG9111ヒトキメラ抗体、LG9113ヒトキメラ抗体を用いたADCC活性を示す図である。各ヒトキメラ抗体をそれぞれ、1.25μg/mL、5μg/mL、20μg/mL加えた状態、およびControlとして抗体を含まずエフェクター細胞と標的細胞のみの状態における細胞障害率(%)を示す。(B)LG9111ヒトキメラ抗体、LG9113ヒトキメラ抗体のヒト大腸癌細胞株(HCT116)、ヒト肺癌細胞株(NCI-H1944)に対するADCC活性を示す図である。

10

【図3】(A)LG9111モノクローナル抗体、LG9112モノクローナル抗体、LG9113モノクローナル抗体、LG9114モノクローナル抗体のインターナリゼーション活性を示す図である。(B)(A)に示されるインターナリゼーション活性が、モノクローナル抗体が剥がれたことによる擬陽性ではないことを示す図である。値は37(インターナリゼーションが誘導される温度)および4(インターナリゼーションが誘導されない温度)の各条件下においてモノクローナル抗体を反応させたときのMFIからラットIgGを反応させたControlのMFIを引いた値(MFI)を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

1. LAT1/CD98複合体の細胞外領域を特異的に認識する抗体

本発明は、1つの実施形態において、LAT1/CD98複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体(本明細書中、「抗LAT1/CD98抗体」と呼ぶこともある。)およびその抗原結合断片を提供する。すなわち、本発明は、LAT1/CD98複合体の細胞外領域のアミノ酸配列の一部または全部をエピトープとする抗体およびその抗原結合断片を提供する。

【0015】

アミノ酸輸送系Lの第一のアイソフォームである「ヒトLAT1(L-type amino acid transporter 1)」は、507アミノ酸残基からなる12回膜貫通型の膜タンパク質である。ヒトLAT1のアミノ酸配列、mRNA配列等の情報は、それぞれAAD20464、AF104032等のアクセッション番号でGenBank等の公にアクセス可能なデータベースから入手することができる。また、マウスや他の哺乳動物(例えば、ラット、ウシなど)のLAT1も同様に、公にアクセス可能なデータベースから入手することができる。

30

ヒトLAT1と細胞膜上で複合体を形成する「ヒトCD98」は、630アミノ酸残基からなる1回膜貫通II型の膜タンパク質である。ヒトCD98のアミノ酸配列、mRNA配列等の情報は、それぞれNP_002385、NM_002394等のアクセッション番号でGenBank等の公にアクセス可能なデータベースから入手することができる。また、マウスや他の哺乳動物(例えば、ラット、ウシなど)のCD98も同様に、公にアクセス可能なデータベースから入手することができる。

40

【0016】

本明細書中、単に「LAT1/CD98」という場合、LAT1/CD98複合体タンパク質のことを指すものとする。場合によっては、LAT1タンパク質ならびにCD98タンパク質をコードするそれぞれの遺伝子(または単にLAT1遺伝子ならびにCD98遺伝子)を単にLAT1ならびにCD98と呼ぶ場合もありうるが、その場合には当業者にとっては文脈からLAT1遺伝子ならびにCD98遺伝子を指すことが明らかであろう。本明細書中、LAT1ならびにCD98は、典型的には、ヒトLAT1ならびにヒトCD98であるが、ヒト以外の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウシなど)のLAT1

50

ならびにCD98であってもよい。

【0017】

本明細書中、「LAT1/CD98の細胞外領域」とは、細胞表面にLAT1/CD98が発現された場合に、細胞膜の細胞質とは反対側（すなわち、細胞の外側）の細胞表面に露出するLAT1/CD98の領域をいう。本発明の抗体またはその抗原結合断片が、LAT1/CD98の細胞外領域に結合しているか否かは、例えば、本願明細書の実施例2に記載されるように、ヒト腫瘍細胞株を用いたFCM（Flow Cytometryの略）解析によって確認することができる。なお、LAT1の細胞外領域として、UniProt等の公にアクセス可能なデータベースでは、例えば、71位～83位のアミノ酸残基、141位～145位のアミノ酸残基、191位～198位のアミノ酸残基、264位～273位のアミノ酸残基、340位～395位のアミノ酸残基、452位～457位のアミノ酸残基にわたる領域がアミノ酸配列から予測されている。

10

【0018】

本明細書中、抗体またはその抗原結合断片が、LAT1/CD98の細胞外領域に「特異的に結合する」とは、その抗体または抗原結合断片が他のアミノ酸配列に対するその親和性よりも、これらの領域の特定のアミノ酸配列に対して実質的に高い親和性で結合することを意味する。ここで、「実質的に高い親和性」とは、所望の測定装置によって、その特定のアミノ酸配列を他のアミノ酸配列から区別して検出することが可能なほどに高い親和性を意味し、典型的には、結合定数（ K_a ）が少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは、少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、より好ましくは、 $10^9 M^{-1}$ 、さらにより好ましくは、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 、 $10^{12} M^{-1}$ またはそれより高い、例えば、最高で $10^{13} M^{-1}$ またはそれより高いものであるような結合親和性を意味する。

20

【0019】

本明細書中、「抗体」は、インタクトな免疫グロブリンの全てのクラスおよびサブクラスを含むものとする。好ましくは、本発明の抗体は、IgGサブクラスのものであり、より好ましくは、ヒトIgG₁サブクラスのものである。「抗体」は、特に、モノクローナル抗体を含む。

【0020】

本明細書中、「抗原結合断片」は、インタクトな、および/またはヒト化された、および/またはキメラな抗体の抗原結合領域または可変領域を有するフラグメント、たとえば、上記抗体のFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、ScFvフラグメントを含む。従来、こうしたフラグメントは、インタクトな抗体のタンパク質分解によって、たとえばパパイン分解によって（たとえば、国際公開WO94/29348を参照）作製されているが、遺伝子組換えによる形質転換宿主細胞から直接産生させることもできる。ScFvの作製については、Birdら、(1988) Science, 242, 423-426に記載の方法が使用できる。さらに、抗体フラグメントは、下記のさまざまな遺伝子工学技術を用いて作製することができる。

30

【0021】

Fvフラグメントは、その2つの鎖の相互作用エネルギーがFabフラグメントより低いと思われる。VHおよびVLドメインの結合を安定化するために、これらのドメインは、ペプチド（Birdら、(1988) Science 242, 423-426、Houstonら、PNAS, 85, 5879-5883）、ジスルフィド架橋（Glockshuberら、(1990) Biochemistry, 29, 1362-1367）、および「knob in hole」変異（Zhuら、(1997), Protein Sci., 6, 781-788）によって連結されている。ScFvフラグメントは、当業者によく知られている方法によって作製することができる（Whitlowら、(1991) Methods companion Methods Enzymol, 2, 97-105およびHoustonら、(1993) Int. Rev. Immunol 10, 195-217を参照）。ScFvは、大腸菌（E. coli）などの細菌細胞内で産生させることができるが、真核細胞内で産生させる方

40

50

が好ましい。ScFvの不利な点は、産物が一価であること、そのために多価結合による結合力の増加が不可能になること、ならびに半減期が短いことである。こうした問題を克服するための試みには、二価($ScFv'$)₂があるが、これは、追加のC末端システインを含有するScFvから、化学的カップリングによって(Adamsら、(1993) *Can. Res.* 53, 4026-4034、およびMcCartneyら、(1995) *Protein Eng.* 8, 301-314)、または不對C末端システイン残基を含有するScFvの、自然発生的な部位特異的二量体化によって(Kipriyanovら、(1995) *Cell. Biophys.* 26, 187-204を参照)作製される。あるいはまた、ペプチドリンカーを3~12残基に短縮して「ダイアボディ(diabody)」を形成することによって、ScFvに多量体を形成させることができる。Holligerら、PNAS (1993), 90, 6444-6448を参照。リンカーをさらに小さくすることで、ScFv三量体(「トリアボディ」、Korttら、(1997) *Protein Eng.* 10, 423-433を参照)および四量体(「テトラボディ」、Le Gallら、(1999) *FEBS Lett.* 453, 164-168を参照)をもたらすことができる。二価ScFv分子の構築は、「ミニ抗体(miniantibody)」(Packら、(1992) *Biochemistry* 31, 1579-1584を参照)および「ミニボディ」(Huら、(1996), *Cancer Res.* 56, 3055-3061を参照)を形成することができるタンパク質二量体化モチーフとの遺伝子融合によっても、達成することができる。ScFv-ScFvタンデム($(ScFv)_2$)は、第3のペプチドリンカーによって2つのScFv単位を連結することによって作製することもできる(Kuruczら、(1995) *J. Immunol.* 154, 4576-4582を参照)。二重特異性ダイアボディは、ある抗体のVLドメインに短いリンカーで連結された、別の抗体由来のVHドメインからなる、2つの一本鎖融合産物の非共有結合によって作製することができる(Kipriyanovら、(1998), *Int. J. Cancer* 77, 763-772を参照)。このような二重特異性ダイアボディの安定性は、ジスルフィド架橋、もしくは上記の「knob in hole」変異を導入することによって、または2つのハイブリッドScFvフラグメントがペプチドリンカーを介して連結される、一本鎖ダイアボディ(ScDb)を形成することによって、高めることができる(Kontermannら、(1999) *J. Immunol. Methods* 226, 179-188を参照)。四価の二重特異性分子は、たとえば、ScFvフラグメントを、IgG分子のCH3ドメインに、またはヒンジ領域を介してFabフラグメントに、融合することによって得られる(Colomaら、(1997) *Nature Biotechnol.* 15, 159-163を参照)。あるいはまた、四価の二重特異性分子は、二重特異性一本鎖ダイアボディの融合によって作製されている(Altら、(1999) *FEBS Lett.* 454, 90-94を参照)。より小さい四価の二重特異性分子は、ヘリックス-ループ-ヘリックスモチーフ含有リンカーによるScFv-ScFvタンデムの二量体化(DiBiミニ抗体、Mullerら、(1998) *FEBS Lett.* 432, 45-49を参照)、または分子内対合を妨げる配向で4つの抗体可変領域(VHおよびVL)を含む一本鎖分子の二量体化(タンデムダイアボディ、Kipriyanovら、(1999) *J. Mol. Biol.* 293, 41-56を参照)のいずれかによって、作製することもできる。二重特異性F(ab')₂フラグメントは、Fab'フラグメントの化学的カップリングによって、またはロイシンジッパーによるヘテロ二量体化によって作製することができる(Shalabyら、(1992) *J. Exp. Med.* 175, 217-225、およびKostelnnyら、(1992), *J. Immunol.* 148, 1547-1553を参照)。また、単離されたVHおよびVLドメイン(Domantis plc)も利用できる。

【0022】

本明細書中、「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体

10

20

30

40

50

(または抗体断片)を意味する、すなわち、集団を構成する個々の抗体が、少量存在しうる自然に生じる可能な突然変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。概して異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。それらの特異性の他に、ハイブリドーマ培養によって合成され、他の免疫グロブリンによる混入がないという点で、モノクローナル抗体は有利である。「モノクローナル」という修飾語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示すものであって、ある特定の方法による抗体の産生を必要とすることを意味するためのものではない。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、Kohler等, Nature, 256: 495 [1975]に最初に記載されたハイブリドーマ法によって作成してもよいし、組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号参照)によって作成してもよい。また「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson等, Nature, 352: 624-628 [1991]およびMarks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)に記載された技術を用いて、ファージ抗体ライブラリから単離した抗体断片(Fvクローン)を含む抗原認識および結合部位のクローンを含む。

10

【0023】

「モノクローナル抗体」は、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)を含み、それは、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種から誘導されたまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りの部分は他の種から誘導されたまたは他の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、並びにそれらが所望の生物学的活性を示す限りにおいて、それらの抗体の断片の対応する配列と同一または相同である(Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 [1984])。

20

【0024】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンから誘導された最小配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはそれらの断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂あるいは抗体の他の抗原結合性配列)である。大部分において、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)であって、そのレシピエントCDR由来の残基が、マウス、ラット、ウサギ、霊長類(例えば、サル)などのヒト以外の種のCDR(ドナー抗体)に由来する所望の特異性、親和性および容量を持つ残基で置換されている。ある場合は、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移植されるCDRまたはフレームワーク配列にも見られない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体の性能をさらに精密かつ最適化するために施される。一般にヒト化抗体は、CDR領域の全てまたは実質上全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全てまたは実質上全てがヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含有しうる。また、最適なヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含有しうる。

30

40

【0025】

本明細書中、「LAT1/CD98の活性」とは、中性アミノ酸輸送活性、アミノ酸類似薬物輸送活性等を意味する。LAT1/CD98のアミノ酸輸送活性は、例えば、標識アミノ酸の細胞内取り込みによって測定することができる。「LAT1/CD98の活性を阻害する」とは、上記のLAT1/CD98の活性を顕著に低下させるかまたは除くことを意味する。「LAT1/CD98の活性を顕著に低下させるかまたは除く」とは、LAT1/CD98の生物学的活性の少なくとも5%またはそれ以上低下させることを意味する。

【0026】

本明細書中、「細胞障害活性」とは、細胞に対して細胞障害を引き起こす能力を意味し

50

、本発明の場合、LAT1/CD98発現細胞に本発明の抗体またはその抗原結合断片が特異的に結合して、該細胞に細胞障害性因子を誘導して、該細胞を細胞死またはアポトーシスに至らしめる能力をいうものとする。細胞障害活性は、例えば、本発明の実施例2に記載される方法で測定し、細胞障害率として評価することができる。

【0027】

本明細書中、「細胞死」は「アポトーシス」を意味する。「アポトーシス」は、個体発生のプログラム、デス因子刺激、放射線などによる染色体DNAの重度の損傷、異常タンパク質の蓄積などによる重度の処方体ストレスなどさまざまな生理的、病理的要因により誘導される機能的、能動的な細胞死の典型であり、細胞体や核の膨潤を伴う壊死（ネクローシス）とは逆に、細胞体や核の収縮や断片化が起こる。

10

【0028】

本発明の抗体またはその抗原結合断片の例としては、

- (1) 配列番号：1のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1(CDR L1)、
- (2) 配列番号：2のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2(CDR L2)、
- (3) 配列番号：3のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3(CDR L3)、
- (4) 配列番号：4のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1(CDR H1)、
- (5) 配列番号：5のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2(CDR H2)、および

(6) 配列番号：6のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3(CDR H3)、
 のうちの少なくとも1つを含む、LAT1/CD98を発現する細胞のLAT1/CD98複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

20

【0029】

本明細書中、「1個または数個のアミノ酸残基の変異」とは、元となるアミノ酸配列中の1個または数個(例えば、2個、3個、4個、5個)のアミノ酸残基が、欠失、置換、挿入、または付加されていることを意味する。このような変異の存在により、対象アミノ酸配列は、元となるアミノ酸配列に対して、例えば、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の同一性(%)を有することができる。本明細書中、そのような変異を元となるアミノ酸配列中の対応する位置に有するアミノ酸配列を有する抗体またはその抗原結合断片は、元となるアミノ酸配列を有する抗体またはその抗原結合断片と同等の生物学的活性を有する。ここで、「同等の生物学的活性」としては、(i)元となるアミノ酸配列を有する抗体またはその抗原結合断片が特異的に結合する抗原に対して特異性をもって結合する能力、(ii)LAT1/CD98のアミノ酸輸送活性に対する阻害能力、(iii)LAT1/CD98発現細胞上のLAT1/CD98に結合した場合における、該細胞に対する細胞障害活性、または(iv)これらのいずれか2つ以上もしくは全てが挙げられる。最も好ましくは、「同等の生物学的活性」とは、上記(iv)を意味する。また、上記の「1個または数個のアミノ酸残基の変異」における変異したアミノ酸残基の数の上限は、このような同等の特異性を保持することができるか否かという基準(criteria)によって制限される。

30

【0030】

一般的には、天然に存在するタンパク質を構成しているアミノ酸は、それらの側鎖の特性によって群分け可能であり、例えば、同様な特性を有するアミノ酸群としては、芳香族アミノ酸(チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン)、塩基性アミノ酸(リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)、中性アミノ酸(セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン)、炭化水素鎖を有するアミノ酸(アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン)、およびその他(グリシン、メチオニン、システイン)の群などに分類できる。

40

【0031】

非天然型のアミノ酸も含めた相互に置換可能なアミノ酸残基の例としては、下記の様な群わけもあり、同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。A群：ロイシン

50

、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、o-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン； B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸； C群：アスパラギン、グルタミン； D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸； E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン； F群：セリン、スレオニン、ホモセリン； G群：フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン。

【 0 0 3 2 】

なお、アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズム B L A S T (PNAS, 1990 (vol.87) p2264 ; PNAS, 1993 (vol.90) p5873) を用いて決定できる。 B L A S T のアルゴリズムに基づいた B L A S T N や B L A S T X と呼ばれるプログラムが開発されている (J Mol Biol , 1990 (vol.215) p403) 。 B L A S T N を用いて塩基配列を解析する場合は、パラメーターは、例えば $score = 100$ 、 $wordlength = 12$ とする。また、 B L A S T X を用いてアミノ酸配列を解析する場合は、パラメーターは、例えば $score = 50$ 、 $wordlength = 3$ とする。 B L A S T と G a p p e d B L A S T プログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。もしくは、タンパク質のアミノ酸配列の同一性を求める際、比較する2種類のタンパク質のアミノ酸配列を並べ、目視で同じアミノ酸残基である部分の数を数えることにより「(同一なアミノ酸残基数 / タンパク質全長のアミノ酸残基数) × 100 (%)」により求めることもできる。

【 0 0 3 3 】

本発明の抗体またはその抗原結合断片の好ましい例としては、

(1) 軽鎖相補性決定領域1 (C D R L 1)、軽鎖相補性決定領域2 (C D R L 2)、および軽鎖相補性決定領域3 (C D R L 3) として、それぞれ、配列番号7、配列番号8、および配列番号9のアミノ酸配列、または配列番号7、配列番号8、および配列番号9のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

重鎖相補性決定領域1 (C D R H 1)、重鎖相補性決定領域2 (C D R H 2)、および重鎖相補性決定領域3 (C D R H 3) として、それぞれ、配列番号10、配列番号11、および配列番号12のアミノ酸配列、もしくは配列番号10、配列番号11、および配列番号12のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含む、L A T 1 / C D 9 8 を発現する細胞の L A T 1 / C D 9 8 複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、

(2) C D R L 1、C D R L 2、およびC D R L 3 として、それぞれ、配列番号13、配列番号14、および配列番号15のアミノ酸配列、もしくは配列番号13、配列番号14、および配列番号15のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

C D R H 1、C D R H 2、およびC D R H 3 として、それぞれ、配列番号16、配列番号17、配列番号18のアミノ酸配列、もしくは配列番号16、配列番号17、および配列番号18のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含む、L A T 1 / C D 9 8 を発現する細胞の L A T 1 / C D 9 8 複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、

(3) C D R L 1、C D R L 2、およびC D R L 3 として、それぞれ、配列番号19、配列番号20、および配列番号21、もしくは配列番号19、配列番号20、および配列番号21のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

C D R H 1、C D R H 2、およびC D R H 3 として、それぞれ、配列番号22、配列番号23、および配列番号24のアミノ酸配列、もしくは配列番号22、配列番号23、および配列番号24のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異を有する各アミノ酸配列を含む、L A T 1 / C D 9 8 を発現する細胞の L A T 1 / C D 9 8 複合体の細

10

20

30

40

50

胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、または

(4) CDR L 1、CDR L 2、およびCDR L 3として、それぞれ、配列番号25、配列番号26、および配列番号27のアミノ酸配列、もしくは配列番号25、配列番号26、および配列番号27のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含み、

CDR H 1、CDR H 2、およびCDR H 3として、それぞれ、配列番号28、配列番号29、および配列番号30のアミノ酸配列、もしくは配列番号28、配列番号29、および配列番号30のアミノ酸配列に1個もしくは数個のアミノ酸残基の変異をそれぞれ有するアミノ酸配列を含む、LAT 1 / CD 9 8を発現する細胞のLAT 1 / CD 9 8複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片が挙げられる。

10

【0034】

あるいは、本発明の抗体またはその抗原結合断片の好ましい例としては、

(1) 配列番号31のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LH)、および

配列番号31のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VL)、

(2) 配列番号33のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LH)、および

配列番号34のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VL)、

20

(3) 配列番号35のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LH)、および

配列番号36のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VL)、または

(4) 配列番号37のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(LH)、および

配列番号38のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VL)、

を含有する、LAT 1 / CD 9 8を発現する細胞のLAT 1 / CD 9 8複合体の細胞外領域に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片が挙げられる。

30

【0035】

なお、上記同一性のパーセンテージは、具体的には、例えば、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であり得る。

【0036】

2. 本発明の抗体をコードする核酸

本発明は、別の実施形態において、LAT 1 / CD 9 8の細胞外領域に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片をコードする単離された核酸分子を提供する。核酸分子は、RNAまたはDNAである。本発明の核酸分子は、本発明の抗体またはその抗原結合断片を作製するために使用することができる。

40

【0037】

したがって、これに関連する本発明の別の実施形態では、本発明のハイブリドーマ細胞から抗LAT 1 / CD 9 8モノクローナル抗体をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を含む発現ベクターを構築し、該発現ベクターを宿主に導入して前記モノクローナル抗体を発現せしめ、得られる宿主、宿主の培養上清または宿主の分泌物からLAT 1 / CD 9 8の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体を採取することを含む、LAT 1 / CD 9 8の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0038】

本発明の抗体またはその抗原結合断片をコードするDNAは、常法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレ

50

オチドプローブを用いることによって)容易に分離されて、配列決定される。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい供給源となる。一旦分離されると、組換え宿主細胞でモノクローナル抗体を合成するために、このDNAを発現ベクターへ挿入し、それをこの状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、ヒトHEK293胎児腎由来細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞のような宿主細胞へトランスフェクトしうる。例えば、相同的なマウス配列をヒト重鎖および軽鎖定常ドメインの配列で置換することによって(Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6851[1984])、または免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部または一部を共有結合させることによって、このDNAを修飾しうる。本発明の抗LAT1/CD98モノクローナル抗体の結合特異性を有するように、「キメラ」または「ハイブリッド」抗体は調製される。

10

【0039】

3. 本発明の抗体を産生するハイブリドーマ細胞

本発明はさらに別の実施形態において、LAT1/CD98の細胞外領域に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片を産生するハイブリドーマ細胞を提供する。本発明はまた、LAT1/CD98の細胞外領域に特異的に結合する抗体およびその抗原結合断片をコードする核酸分子を含有するハイブリドーマを提供する。

【0040】

本発明のハイブリドーマ細胞の調製は、具体的には、以下のように行うことができるが、この方法に限定されるわけではない。

20

【0041】

(1) 抗原の調製

抗LAT1/CD98モノクローナル抗体を作製するために必要な抗原としては、LAT1/CD98を産生する細胞あるいはその細胞画分等を用いることができる。

【0042】

(2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

6~24週令のマウスまたはラットに、(1)に示した方法で作製された抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下あるいは静脈内あるいは腹腔内に、適当なアジュバント〔例えば、フロイドの完全アジュバントまたは、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなど〕とともに抗原を投与することにより行う。抗原の投与は、1回目の投与の後2~3週間おきに3~7回行う。各投与後5~10日目に眼底静脈叢より採血し、その血清が抗原と反応することを酵素免疫測定法〔酵素免疫測定法(ELISA法):医学書院刊 1976年〕などで調べる。抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源として供する。脾細胞を骨髓腫細胞との融合に供するにあたって、抗原物質の最終投与後3~4日目に、免疫したマウスまたはラットより脾臓を摘出し、脾細胞を採取する。脾臓を血清無添加の基礎培地(以下洗浄用培地という。)中で細断し、遠心分離して細胞を回収後、トリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で2~3分間処理し赤血球の除去を行い、洗浄用培地で洗浄した後に融合用脾細胞として提供する。

30

40

【0043】

(3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を使用する。たとえば、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c由来)骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1(P3-U1)[Current Topics in Microbiology and Immunology-1, European J. Immunology, 6, 511-519(1976)]、SP2/O-Ag14(SP-2)[Nature 276, 269-270(1978)]、P3-X63-Ag8653(653)[J. Immunology 123, 1548-1550(1979)]、P3-X63-Ag8(X63)[Nature 256, 495-497(1975)]などが

50

用いられる。これらの細胞株は、8 - アザグアニン培地〔RPMI - 1640培地にグルタミン(1.5 mM)、2 - メルカプトエタノール(5 × 10⁻⁵ M)、ジェンタマイシン(10 μg/ml)および牛胎児血清(FCS)を10%加えた培地(以下、正常培地という。)に、さらに8 - アザグアニン(15 μg/ml)を加えた培地〕で継代するが、細胞融合の3~4日前に正常培地に継代し、融合当日2 × 10⁷個以上の細胞数を確保する。

【0044】

(4) 細胞融合

(2)で免疫した抗体産生細胞と(3)で得られた骨髓腫細胞を洗浄用培地またはPBS(リン酸ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2)でよく洗浄し、細胞数が、抗体産生細胞：骨髓腫細胞 = 5~10:1になるよう混合させる。細胞回収後、細胞をよくほぐし、攪拌しながら、37で、ポリエチレングライコール-1,500(PEG-1,500)2g、洗浄用培地2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlの混液0.2~1ml/108抗体産生細胞を加え、1~2分間毎に洗浄用培地1~2mlを数回加え、全量が50mlになるまで洗浄する。細胞回収後、ゆるやかに細胞をほぐしながら、HAT培地〔正常培地にヒポキサンチン(10⁻⁴M)、チミジン(1.5 × 10⁻⁵M)およびアミノプテリン(4 × 10⁻⁷M)を加えた培地〕100ml中に懸濁する。この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 μl/ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37で7~14日間培養する。培養後、培養上清の一部をとり、例えばFACS(Fluorescence-Activated Cell Sortingの略)などを用いて、LAT1/CD98タンパク質に特異的に反応する抗体を選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返す〔1回目は、HT培地(HAT培地からアミノプテリンを除いた培地)、2回目は、正常培地を使用する〕、安定して強い抗体価の認められたものを抗LAT1/CD98モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

【0045】

したがって、これに関連する本発明の別の実施形態では、ハイブリドーマ細胞を培養し、得られる培養物からLAT1/CD98に特異的に結合する抗体を採取することを含む、LAT1/CD98の細胞外領域に特異的に結合するモノクローナル抗体の製造方法が提供される。

【0046】

4. 本発明の抗体のイムノコンジュゲート

本発明はまた、別の実施形態において、本発明の抗体およびその抗原結合断片に殺細胞活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物あるいは放射性同位体を結合させたイムノコンジュゲートを提供する。

【0047】

本発明の抗体は、LAT1/CD98を発現する標的腫瘍細胞内へのインターナリゼーション活性に優れたものである。そのため、殺細胞活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物を結合させたイムノコンジュゲートは、これら化合物を腫瘍細胞に直接かつ選択的に作用させることができる。

【0048】

5. 医薬組成物

本発明はまた、さらに別の実施形態において、本発明の抗体またはその抗原結合断片またはそれらとのイムノコンジュゲートを有効成分として含有する、腫瘍の予防または治療または診断のための医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、さらに薬学的に許容し得る担体を含有する。

【0049】

後述の実施例に示されるように、本発明の抗体またはその抗原結合断片は、LAT1/CD98を発現する細胞(例：腫瘍細胞)のLAT1/CD98の細胞外領域に特異的に結合して、LAT1/CD98の活性を阻害するか、または細胞障害因子を誘導し、該細

10

20

30

40

50

胞を細胞死に至らしめることができる。さらに、インターナリゼーション活性を有するため、殺細胞活性および/または抗腫瘍活性を有する化合物を結合させたイムノコンジュゲートは、これら化合物を腫瘍細胞に直接かつ選択的に作用させることができる。そのような化合物としては、例えば、細胞毒性薬、抗腫瘍剤、または放射性同位体が挙げられる。したがって、本発明の医薬組成物は、L A T 1 / C D 9 8 を細胞表面に発現する腫瘍細胞を死滅させるため、またはそのような細胞で特徴付けられる腫瘍および、同様の機序により生ずる疾患の予防または治療のために使用することができる。

【 0 0 5 0 】

上記「腫瘍」の例としては、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、黒色腫、腎細胞癌、膀胱癌、白血病、リンパ腫、T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌、食道癌、肝臓癌、頭頸部扁平上皮癌、皮膚癌、尿路癌、前立腺癌、絨毛癌、咽頭癌、喉頭癌、舌癌、口腔癌、胆嚢癌、甲状腺癌、中皮腫、胸膜腫、男性胚腫、子宮内膜過形成、子宮内膜症、胚芽腫、線維肉腫、カポジ肉腫、血管腫、海綿状血管腫、血管芽腫、網膜芽腫、星状細胞腫、神経線維腫、稀突起膠腫、髓芽腫、神経芽腫、神経膠腫、横紋筋肉腫、膠芽腫、骨原性肉腫、平滑筋肉腫、甲状腺肉腫、およびウィルムス腫瘍等が挙げられる。より好ましくは、大腸癌、結腸直腸癌、肺癌、乳癌、脳腫瘍、膀胱癌、リンパ腫、胃癌、膵臓癌、肝臓癌、および前立腺癌が挙げられる。本発明の抗体またはその抗原結合断片を医薬として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。例えば、該抗体またはその抗原結合断片は、水溶液もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用でき、また、該抗体をI g A化し、分泌成分を結合した後に必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に例えば、該抗体またはその抗原結合断片を生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

【 0 0 5 1 】

「薬学的に許容し得る」という用語は、正常な医学的判断の範囲内で、合理的な利益/リスク比を有し、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、またはその他の問題もしくは合併症を示すことのない、ヒトおよび動物の組織と接触させて使用するのに適した、化合物、材料、組成物、および/または剤形を指すために、本明細書において利用される。

【 0 0 5 2 】

本発明の腫瘍の予防または治療のための医薬組成物の投与経路は、周知の方法、例えば、静脈内、腹膜内、脳内、皮下、筋肉内、眼内、動脈内、脳内脊髄、または病巣内経路での注射または注入、または徐放系による。またさらに、該抗体またはその抗原結合断片を直接腫瘍部位へ投与する手段として、カテーテル等による投与等も可能である。

【 0 0 5 3 】

また、本発明の腫瘍の予防または治療のための医薬は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、ヒトを含む哺乳動物に対して投与することができる。該抗体またはその抗原結合断片またはその塩の投与量は、投与対象、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、子宮内膜症患者または子宮腺筋症患者（60 kg として）においては、一日につき約0.1 ~ 100 mg、好ましくは約1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その投与量は投与対象、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば60 kg の患者に対して、一日につき約0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射

10

20

30

40

50

により投与することができる。

【0054】

6. 本発明の腫瘍の診断方法

本発明はまた、さらに別の実施形態において、上記の本発明の抗体またはその抗原結合断片に少なくとも1つの診断または検出剤を結合した診断用イムノコンジュゲートにより、腫瘍を検出することを特徴とする。好ましくは、診断または検出剤は、放射性核種、造影剤、蛍光剤、化学発光剤、生物発光剤、常磁性イオン、酵素、および光活性診断剤からなる群から選択される。1つの実施形態では、診断用イムノコンジュゲートと生体から採取された試料、例えば組織片または血液等と反応させ、シグナルを検出することにより、腫瘍を検出することができる。測定法としては、例えばELISA法、EII法、RIA法、

10

【0055】

以下、実施例により本発明をより具体的に記載するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されない。

【実施例】

【0056】

[実施例1]

(1) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

抗LAT1/CD98モノクローナル抗体を作製するために、ラットに、LAT1/CD98を高発現している細胞株(例えば、ヒト大腸癌細胞株(HCT116))を免疫して、その脾臓より抗体産生細胞を採取した。免疫は、ラットの皮下、腹腔、または静脈内に抗原として細胞 3×10^6 個を投与することにより行った。抗原の投与は、1回目の投与の3週間後および6週間後に2回行った。脾細胞を骨髄腫細胞との融合に供するにあたって、抗原の最終投与後3日後に、免疫したラットより脾臓を摘出し脾細胞を採取した。脾臓を血清無添加の基礎培地(以下洗浄用培地という。)中で細断し、遠心分離して細胞を回収後、トリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で2~3分間処理し赤血球の除去を行い、洗浄用培地で洗浄した後に融合用脾細胞として用いた。

20

【0057】

(2) ハイブリドーマの作製

実施例1(2)で得られたマウスまたはラット脾細胞とマウス骨髄腫細胞株X63とを4:1の比率で混合し、1,200rpmで5分間遠心した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37°Cで、ポリエチレングライコール-1500(PEG-1500)2g、DMEM培地2mlおよびジメチルスルホキシド0.7mlの混液を0.2~1ml/ 10^8 個マウス脾細胞の割合で加え、さらに1~2分間毎にDMEM培地1~2mlを数回加えた後、DMEM培地を加えて全量が50mlになるようにした。900rpmで5分間遠心し、上清を捨てHAT培地100ml中に細胞をゆるやかに懸濁した。この懸濁液を96ウェル培養用プレートに100 μ l/ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37°Cで10~14日間培養した。

30

【0058】

(3) 抗体スクリーニング

実施例1(3)で得られたハイブリドーマ培養上清をLAT1/CD98を高発現し、かつ抗原に用いた細胞株とは異なる細胞株(例えば、ヒト肺癌細胞株(NCI-H1944))と反応させ、FCM解析を行うことによりLAT1/CD98特異的抗体を産生しているかの1次スクリーニングを行った。

FCMの反応は96ウェルプレートにて行った。LAT1/CD98高発現細胞株をPBSにて $2.5 \times 10^5 \sim 3 \times 10^6$ 個/ウェルになるように50 μ lずつチューブに分注した。この細胞浮遊液にハイブリドーマの培養上清50 μ lを加え、4°Cで45分反応させた。0.1%BSA-PBS100 μ lを加え、500gで3分間、4°Cで遠心する洗

40

50

浄を3回洗い、細胞ペレットに200倍希釈したPE-labeled anti Rat IgG (Jackson Immuno Research) を50 μ L加え、遮光状態で4 \times 45分間反応させた。0.1% BSA-PBS 100 μ Lを加え、500gで3分間、4 \times で遠心する洗浄を3回洗い、PBS 500 μ Lに懸濁し、FCMチューブに移した。死細胞を除くため測定直前にPI 100 μ Lを添加し、FACSCalibur (Becton Dickinson) にて測定した。陽性反応が得られたクローンを選別し、4種の抗LAT1/CD98抗体産生ハイブリドーマ株 (LG9111、LG9112、LG9113およびLG9114) を樹立した。

【0059】

(4) モノクローナル抗体の精製

プリスタン処理した8週令ヌード雄マウス (KSN) に実施例1(4) で得られたハイブリドーマ株を 1×10^7 細胞/匹それぞれ腹腔内注射した。10~15日後に、ハイブリドーマは腹水産化した。腹水のたまったマウスから腹水を採取し、2000rpmで5分間、4 \times で遠心し、50%飽和硫酸アンモニウムにて塩析し、沈渣を溶かして1000gで10分間、4 \times でした。プレフィルター、メンブランフィルター (0.22 μ m) を通過させた後、Protein G Sepharose (GEヘルスケア バイオサイエンス) を用いて精製した後、PBSで透析(3時間以上 \times 4回)を行った。その結果得られた4種の抗LAT1/CD98モノクローナル抗体をLG9111モノクローナル抗体、LG9112モノクローナル抗体、LG9113モノクローナル抗体及びLG9114モノクローナル抗体とした。

【0060】

[実施例2]

腫瘍細胞株に対するモノクローナル抗体の結合性の検討

ヒト腫瘍細胞株4種を用いて抗LAT1/CD98モノクローナル抗体の結合性をFCM解析により測定した。ヒト腫瘍細胞株をPBSにて 1×10^5 cells/well になるように調整し、50 μ Lずつチューブに分注した。この細胞浮遊液に40 μ g/mLに調製した各モノクローナル抗体50 μ Lを加え、4 \times で45分反応させた。0.1% BSA-PBS 100 μ Lを加え、500gで3分間、4 \times で遠心する洗浄を3回洗い、細胞ペレットに200倍希釈したPE-labeled anti Rat IgG (Jackson Immuno Research) を50 μ L加え、遮光状態で4 \times で45分間反応させた。0.1% BSA-PBS 100 μ Lを加え、500gで3分間、4 \times で遠心する洗浄を3回洗い、PBS 500 μ Lに懸濁し、FCMチューブに移した。死細胞を除くため測定直前にPI 100 μ Lを添加し、FACSCalibur (Becton Dickinson) にて測定した。図1に示すように、取得した4種のモノクローナル抗体は種々の癌細胞株に対して結合活性を示し、特に大腸癌細胞株HCT116に対してより高い結合活性が認められた。また、LGtra01-01モノクローナル抗体(特開2011-24537に開示された抗体)に比べて、10倍以上高い結合活性が認められた。

【0061】

[実施例3]

ヒトキメラ抗体の作製

樹立した抗LAT1/CD98抗体産生ハイブリドーマ株からtotal RNAを分離し、SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (クオンテック) を使ってcDNAを合成した。得られたcDNAよりpolymerase chain reaction (PCR) 法により重鎖および軽鎖可変領域をコードするcDNAを増幅し、クローニングベクターにサブクローニングした。得られたcDNAの塩基配列を解析し、常法 (<<http://www.bioinf.org.uk/abs/>>に記載) により各抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のアミノ酸配列(配列番号31~38)及びcomplementarity determining region (CDR) のアミノ酸配列(配列番号7~30)を決定した。CDR配列特異的プライマーを合成し、それを用い

10

20

30

40

50

て、抽出したプラスミドDNAからCDRを増幅し、ヒトキメラ抗体重鎖発現ベクターもしくはヒトキメラ抗体軽鎖発現ベクターに組み込んだ。得られたプラスミドはLigaseを用いて結合し、ヒトキメラ抗体産生プラスミドを作製した。FreeStyleTM MAX Reagent (インビトロジェン)を用いて、ヒトキメラ抗体産生プラスミドをFreeStyle 293F細胞 (インビトロジェン)に遺伝子導入し、96時間巡回培養 (FreeStyleTM 293培地, 37 °C, 8%CO₂, 135rpm)後の培養上清を取得した。培養上清はProtein G Sepharose (GEヘルスケア バイオサイエンス)を用いて精製した後、PBSで透析(3時間以上x4回)を行い、ヒトキメラLAT1/CD98抗体を取得した。

【0062】

[実施例4]

ヒトキメラ抗体による抗体依存性細胞障害活性の検討

ヒトより血液をヘパリン採血管(テルモ VP-H100K)に採取した。PBSを加え2倍に希釈し、希釈したヘパリン血18mLをリンフォセパール1 (IBL 23010) 12mLに対し静かに重層した。400gで30分間遠心後、上層の血漿層を静かに除去し、中間層の単核球画分を分取した。PBSを加え2倍に希釈し、200gで10分間遠心し、上清を除去した。PBS10mLを加え、200gで10分間遠心する洗浄を2回を行い、5%FBS-RPMI1640に懸濁した細胞をエフェクター細胞懸濁液とした。一方、標的細胞としてヒト腫瘍細胞を 2×10^5 cells/mLとなるように5%FBS-RPMI1640で懸濁し、U底96well plateに 1×10^4 cells/wellになるように50μLずつ分注した。ヒトキメラ抗体50μL加え、4°Cで15分間インキュベート後、遠心し上清を捨てた。エフェクター細胞懸濁液100μLを加え(同時にコントロールとして、エフェクター細胞のみのwell (Effector Spontaneous)、標的細胞のみのwell (Target Spontaneous)を作製)、37 °C、5%CO₂で4時間インキュベート(同時にコントロールとして、終了の45分前に標的細胞に10xLysis bufferを加えたwell (Target Max)を作製)した。インキュベート後、軽くシェイクし、200gで5分間遠心し、上清50μLを平底96well plateに移した。Cytotoxicity assay (Promega G1780)を用い、キットに添付のプロトコールに従って反応させ、プレートリーダー(TECAN Infinite M200)を用いて490nm蛍光波長を測定し、次の式で細胞障害率を算出した。細胞障害率(%) = $(\text{Experimental} - \text{Effector Spontaneous} - \text{Target Spontaneous}) / (\text{Target Max} - \text{Target Spontaneous}) \times 100$ 。図2に示すようにLG9111ヒトキメラ抗体及びLG9113ヒトキメラ抗体において、抗体濃度依存的なADCC活性が検出され、ヒト大腸癌細胞株(HCT116)に対し抗体濃度20μg/mLでそれぞれ79%、46%の細胞障害率が認められた。また、ヒト肺癌細胞株(NCI-H1944)に対し35%以上の細胞障害率が認められた。

【0063】

[実施例5]

モノクローナル抗体のインターナリゼーション活性の検討

ヒト腫瘍細胞株を用いて抗LAT1/CD98モノクローナル抗体のインターナリゼーション活性をFCM解析により測定した。ヒト大腸癌細胞株HCT116を0.1%BSA-PBSで懸濁し、U底96well plateに 1×10^5 cells/wellになるように50μLずつ分注した。この細胞浮遊液に20μg/mLに調製した各モノクローナル抗体50μLを加え、4°Cで45分反応させた。0.1%BSA-PBS150μLを加え、500gで3分間、4°Cで遠心する洗浄を3回を行い、モノクローナル抗体を結合させた細胞ペレットを得た。この細胞ペレットに0.1%BSA-PBS100μLを加え、37 °C(インターナリゼーションが誘導される温度)または4°C(インターナ

10

20

30

40

50

リゼーションが誘導されない温度)で、それぞれ1時間インキュベートした。0.1% BSA - PBS 150 μ Lを加え、500gで3分間、4 で遠心する洗浄を3回行った。200倍希釈したPE-labeled anti Rat IgG (Jackson Immuno Research)を50 μ L加え、遮光状態で4 で30分間反応させた。0.1% BSA - PBS 150 μ Lを加え、500gで3分間、4 で遠心する洗浄を3回行い、PBS 500 μ Lに懸濁し、FCMチューブに移した。死細胞を除くため測定直前にPI 100 μ Lを添加し、FACSCalibur (Becton Dickinson)にて測定した。図3(A)に示すように、4 でインキュベートした場合に比べ、37 でインキュベートした場合においてモノクローナル抗体の結合による蛍光強度の減少が認められた。

10

【0064】

また、蛍光強度の減少の要因が、インキュベート間に抗原と結合したモノクローナル抗体が抗原から剥がれたことではないことを確認するために、上記細胞ペレットに同様の方法でPE-labeled anti Rat IgGを反応させ、洗浄後、37 (インターナリゼーションが誘導される温度)または4 (インターナリゼーションが誘導されない温度)で、それぞれ1時間インキュベートした。洗浄後、同様にFACSCaliburにて測定した。図3(B)に示すように、4 でインキュベートした場合と37 でインキュベートした場合とで蛍光強度の差は認められなかった。

【0065】

これらの結果から、モノクローナル抗体が抗原に結合することによって、細胞表面上の抗原-抗体複合体が減少、即ちインターナリゼーションが生じたことが示された。

20

【0066】

実施例2~4に示されるように、本発明の抗LAT1/CD98抗体は、これまでに報告されている抗LAT1/CD98抗体と比較してLAT1/CD98複合体の細胞外領域に対する顕著により優れた結合性を有し、LAT1/CD98複合体を発現する細胞に対する細胞障害活性も優れている。

【産業上の利用分野】

【0067】

本発明は、LAT1/CD98を高発現する腫瘍細胞のアポトーシス誘導、またはLAT1/CD98を高発現する腫瘍細胞で特徴付けられる腫瘍の病態解析、予防、治療等に有用である。

30

【配列表フリーテキスト】

【0068】

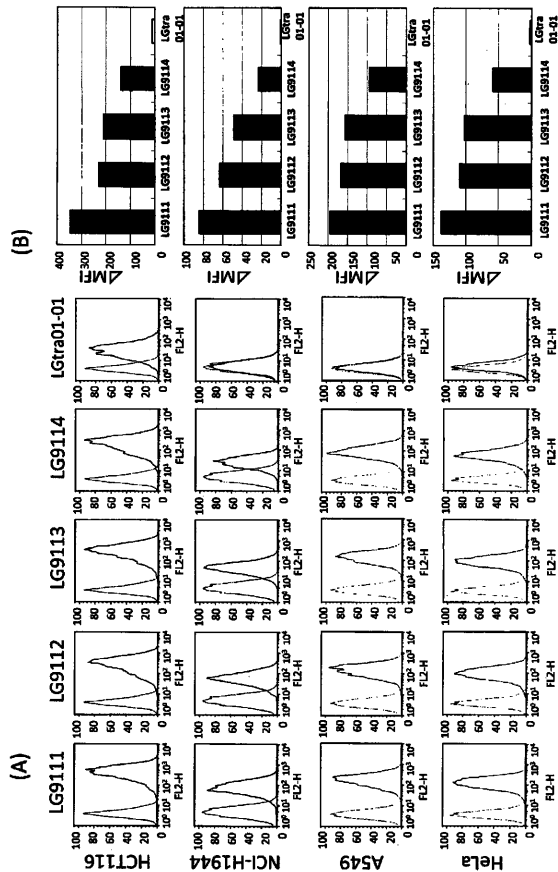
配列番号：7 LG9111 軽鎖相補性決定領域1 (CDRL1)
 配列番号：8 LG9111 軽鎖相補性決定領域2 (CDRL2)
 配列番号：9 LG9111 軽鎖相補性決定領域3 (CDRL3)
 配列番号：10 LG9111 重鎖相補性決定領域1 (CDRH1)
 配列番号：11 LG9111 重鎖相補性決定領域2 (CDRH2)
 配列番号：12 LG9111 重鎖相補性決定領域3 (CDRH3)
 配列番号：13 LG9112 軽鎖相補性決定領域1 (CDRL1)
 配列番号：14 LG9112 軽鎖相補性決定領域2 (CDRL2)
 配列番号：15 LG9112 軽鎖相補性決定領域3 (CDRL3)
 配列番号：16 LG9112 重鎖相補性決定領域1 (CDRH1)
 配列番号：17 LG9112 重鎖相補性決定領域2 (CDRH2)
 配列番号：18 LG9112 重鎖相補性決定領域3 (CDRH3)
 配列番号：19 LG9113 軽鎖相補性決定領域1 (CDRL1)
 配列番号：20 LG9113 軽鎖相補性決定領域2 (CDRL2)
 配列番号：21 LG9113 軽鎖相補性決定領域3 (CDRL3)
 配列番号：22 LG9113 重鎖相補性決定領域1 (CDRH1)
 配列番号：23 LG9113 重鎖相補性決定領域2 (CDRH2)

40

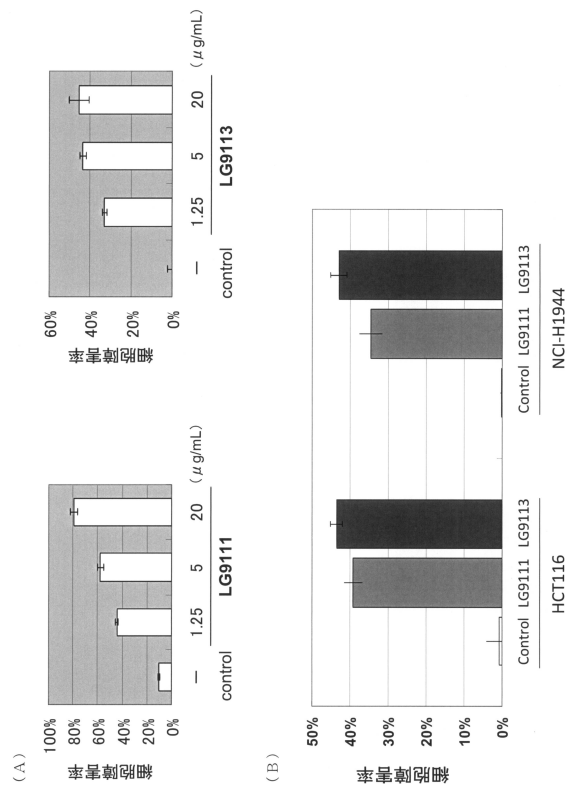
50

- 配列番号：24 LG9113 重鎖相補性決定領域3 (CDRH3)
- 配列番号：25 LG9114 軽鎖相補性決定領域1 (CDRL1)
- 配列番号：26 LG9114 軽鎖相補性決定領域2 (CDRL2)
- 配列番号：27 LG9114 軽鎖相補性決定領域3 (CDRL3)
- 配列番号：28 LG9114 重鎖相補性決定領域1 (CDRH1)
- 配列番号：29 LG9114 重鎖相補性決定領域2 (CDRH2)
- 配列番号：30 LG9114 重鎖相補性決定領域3 (CDRH3)
- 配列番号：31 LG9111 軽鎖可変領域
- 配列番号：32 LG9111 重鎖可変領域
- 配列番号：33 LG9112 軽鎖可変領域
- 配列番号：34 LG9112 重鎖可変領域
- 配列番号：35 LG9113 軽鎖可変領域
- 配列番号：36 LG9113 重鎖可変領域
- 配列番号：37 LG9114 軽鎖可変領域
- 配列番号：38 LG9114 重鎖可変領域

【図1】

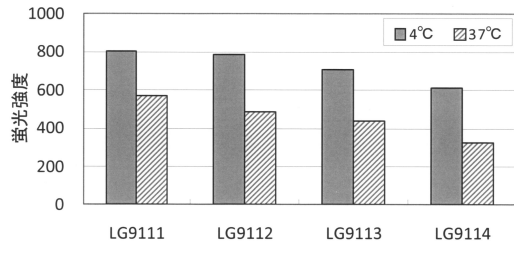


【図2】

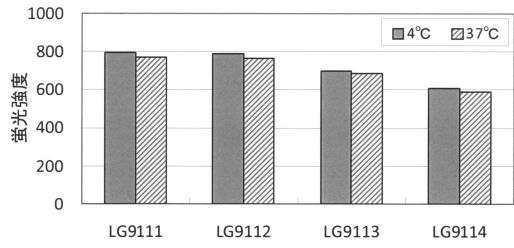


【 図 3 】

(A)



(B)



【 配列表 】

0006421371000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68
A 6 1 K	51/10 (2006.01)	A 6 1 K	51/10 1 0 0
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	51/10 2 0 0
		G 0 1 N	33/53 Y

- (72)発明者 益子 高
大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号 学校法人近畿大学内
- (72)発明者 丹羽 眞一郎
東京都中央区日本橋堀留町2丁目1番8号 リンク・ジェノミクス株式会社内
- (72)発明者 林 秀美
東京都中央区日本橋堀留町2丁目1番8号 リンク・ジェノミクス株式会社内
- (72)発明者 小倉 大
東京都中央区日本橋堀留町2丁目1番8号 リンク・ジェノミクス株式会社内
- (72)発明者 進藤 孝之
東京都中央区日本橋堀留町2丁目1番8号 リンク・ジェノミクス株式会社内

審査官 川合 理恵

- (56)参考文献 国際公開第2007/114496(WO, A1)
特開2011-024537(JP, A)
Biochem.Biophys.Res.Commun.,2011,Vol.406,p.649-655
Cancer Sci.,2008,Vol.99,No.5,p.1000-1007

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S
(S T N)

专利名称(译)	针对转运蛋白的抗体及其用途		
公开(公告)号	JP6421371B2	公开(公告)日	2018-11-14
申请号	JP2014520078	申请日	2013-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人近畿大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人近畿大学 链接基因组公司		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人近畿大学 链接基因组公司		
[标]发明人	益子高 丹羽真一郎 林秀美 小倉大 進藤孝之		
发明人	益子 高 丹羽 真一郎 林 秀美 小倉 大 進藤 孝之		
IPC分类号	C07K16/30 C12N15/13 C12N5/12 C07K16/46 C12P21/08 C12Q1/02 A61K39/395 A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K47/68 A61K51/10 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/30 A61K35/17 A61K47/6851 A61K51/1045 C07K16/2896 C07K16/3015 C07K16/3023 C07K16/303 C07K16/3038 C07K16/3046 C07K16/3053 C07K16/3061 C07K16/3069 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/32 C07K2317/54 C07K2317/55 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/622 C07K2317/624 C07K2317/626 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/77 G01N33/57492 G01N2333/70596		
FI分类号	C07K16/30.ZNA C12N15/13 C12N5/12 C07K16/46 C12P21/08 C12Q1/02 A61K39/395.T A61P35/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K47/68 A61K51/10.100 A61K51/10.200 G01N33/53.Y		
代理人(译)	小林 浩 藤田 尚 铃木康仁		
优先权	2012131424 2012-06-08 JP		
其他公开文献	JPWO2013183786A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了多种恶性肿瘤，包括目前难以治疗的实体瘤，其含有能够结合人LAT1 / CD98并且特异性地诱导抗体依赖性细胞损伤的新抗体作为活性成分。提供肿瘤的预防或治疗剂。

(45) 発行日 平成30年11月14日 (2018. 11. 14)

(24) 登録日 平成30年10月26日 (2018. 10. 26)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 16/30 (2006. 01)	C O 7 K 16/30 Z N A
C 1 2 N 15/13 (2006. 01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 5/12 (2006. 01)	C 1 2 N 5/12
C O 7 K 16/46 (2006. 01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 P 21/08 (2006. 01)	C 1 2 P 21/08

請求項の数 23 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-520078 (P2014-520078)	(73) 特許権者	000125347
(86) (22) 出願日	平成25年6月10日 (2013. 6. 10)		学校法人近畿大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/065996		大阪府東大阪市小若江3丁目4番1号
(87) 国際公開番号	W02013/183786	(73) 特許権者	502019933
(87) 国際公開日	平成25年12月12日 (2013. 12. 12)		リンク・ジェノミクス株式会社
審査請求日	平成28年6月7日 (2016. 6. 7)		東京都中央区日本橋蛸留町2丁目1番8号
(31) 優先権主張番号	特願2012-131424 (P2012-131424)		神野ビル4階
(32) 優先日	平成24年6月8日 (2012. 6. 8)	(74) 代理人	100092783
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100126354
			弁理士 藤田 尚
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 トランスポーターに対する抗体およびその用途