

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-515924  
(P2007-515924A)

(43) 公表日 平成19年6月21日(2007.6.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04 ZNA	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	4C076
A61K 38/00 (2006.01)	A61K 37/02	4C084
A61K 31/704 (2006.01)	A61K 31/704	4C085
A61K 9/127 (2006.01)	A61K 9/127	4C086

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-512304 (P2005-512304)  
 (86) (22) 出願日 平成15年12月15日 (2003.12.15)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年7月22日 (2005.7.22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2003/006427  
 (87) 国際公開番号 W02005/062058  
 (87) 国際公開日 平成17年7月7日 (2005.7.7)

(71) 出願人 505219978  
 アウレリウム バイオファーマ インク.  
 カナダ国 ケベック シティー エイチ2  
 エム 2エヌ9, モントリオール, スイ  
 ト 1000, クリストフーコロンブ ア  
 ベニュー 8475  
 (74) 代理人 100083932  
 弁理士 廣江 武典  
 (74) 代理人 100129698  
 弁理士 武川 隆宣  
 (74) 代理人 100129676  
 弁理士 ▲高▼荒 新一  
 (74) 代理人 100130074  
 弁理士 中村 繁元

最終頁に続く

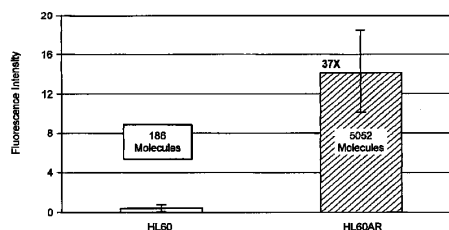
(54) 【発明の名称】 ビメンチン指向性診断法、および、多剤耐性を示す腫瘍性疾患の治療法

(57) 【要約】

【課題】 腫瘍性または損傷細胞、または多剤耐性 (MDR) 腫瘍性または損傷細胞において多剤耐性を検出すること。

【解決手段】 正常細胞または非MDR新生細胞におけるビメンチンタンパクの細胞表面発現レベルと比べ、上記細胞においてビメンチンタンパクの細胞表面発現の増加を検出すること。

【選択図】 なし



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試験新生細胞において多剤耐性、または多剤耐性の可能性を検出する方法であって、

a)任意の起源または細胞タイプの試験新生細胞における細胞表面発現ピメンチンタンパクのレベルを測定すること、および、

b)試験新生細胞の細胞表面発現のピメンチンタンパクのレベルを、同じ起源または細胞タイプの非耐性の新生細胞における細胞表面発現のピメンチンレベルと比較することを含み、

試験新生細胞の細胞表面発現ピメンチンのレベルが、同じ任意の起源または細胞タイプの非耐性新生細胞の細胞表面発現のピメンチンレベルよりも高い場合、その試験新生細胞は多剤耐性を有する、または、多剤耐性となる可能性を有するとすることを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

前記試験新生細胞における細胞表面発現のピメンチンレベルを測定することは、細胞から原形質膜画分を単離すること、および、その原形質膜画分におけるピメンチンレベルを測定することを含むことを特徴とする、請求項1の方法。

**【請求項 3】**

前記試験新生細胞における細胞表面発現のピメンチンレベルを測定することは、前記細胞を、抗ピメンチン抗体に接触させること、および、細胞表面ピメンチンに結合した抗体のレベルを測定することを含むことを特徴とする、請求項1の方法。

20

**【請求項 4】**

前記細胞表面ピメンチンに結合した抗体のレベルを測定することは免疫蛍光放射によることを特徴とする、請求項3の方法。

**【請求項 5】**

前記細胞表面ピメンチンに結合した抗体のレベルを測定することは放射性ラベルによることを特徴とする、請求項3の方法。

**【請求項 6】**

前記試験新生細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、および、卵巣細胞から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項1の方法。

**【請求項 7】**

前記非耐性新生細胞は、HL60、NB4、CEM、HSB2、Molt4、MCF-7、MDA、SKOV-3、および2008から成るグループから選ばれる薬剤感受性細胞系統由来であることを特徴とする、請求項1の方法。

30

**【請求項 8】**

前記試験新生細胞は、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、骨髄腫細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、および、上皮ガン細胞から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項1の方法である。

**【請求項 9】**

前記試験新生細胞は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項1の方法。

40

**【請求項 10】**

患者において多剤耐性細胞を検出する方法であって、

(a)患者に対して、検出可能なラベルに動作的に連結されたピメンチン結合剤を投与すること、および、

(b)ピメンチン結合剤に動作的に連結したラベルを検出することを含み

ピメンチン結合剤は、患者の多剤耐性細胞上に存在する細胞表面発現ピメンチンに特異的に結合することを特徴とする方法。

**【請求項 11】**

前記ピメンチン結合剤は抗体またはその断片であることを特徴とする、請求項10の方法

50

。

【請求項12】

前記ビメンチン結合剤は、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンプリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項10の方法。

【請求項13】

前記ビメンチン結合剤は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、および、抗体から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項10の方法。

【請求項14】

前記検出可能なラベルは、蛍光色素、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、有色産物を生成する酵素、化学発光産物を生成する酵素、および磁性産物を生成する酵素から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項10の方法。

【請求項15】

前記多剤耐性細胞は新生細胞であることを特徴とする、請求項14の方法。

【請求項16】

前記新生細胞は、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、および、上皮ガン細胞から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項15の方法。

【請求項17】

前記新生細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、および、卵巣細胞から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項15の方法。

【請求項18】

前記患者はヒトであることを特徴とする、請求項10の方法。

【請求項19】

前記患者は、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っていることを特徴とする、請求項18の方法。

【請求項20】

試験新生細胞において多剤耐性を診断または検出するためのキットであって、  
a) ビメンチンの検出のための第1プローブ、および、  
b) ヌクレオフォスミンおよびHSC70から成るグループから選ばれる多剤耐性マーカー検出のための第2プローブ  
を含むキット。

【請求項21】

試験新生細胞において多剤耐性を診断または検出するためのキットであって、  
a) ビメンチンの検出のための第1プローブ、および、  
b) MDR1、MDR3、MRP1、MRP5、およびLRPから成るグループから選ばれるマーカー検出のための第2プローブ  
を含むキット。

【請求項22】

前記ビメンチン検出用プローブは抗ビメンチン抗体であることを特徴とする、請求項20または21のキット。

【請求項23】

前記ビメンチンを検出するためのプローブは、LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンプリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aから成るグループから選ばれるビメンチンリガンドであることを特徴とする、請求項20または21のキット。

【請求項24】

10

20

30

40

50

前記第2プローブはヌクレオフォスミン抗体およびHSC70抗体から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項20のキット。

【請求項25】

前記第2プローブはヌクレオフォスミンリガンドおよびHSC70リガンドから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項20のキット。

【請求項26】

前記第1プローブは、試験新生細胞の表面に存在するビメンチンを検出することを特徴とする、請求項20または21のキット。

【請求項27】

前記第2プローブは、試験新生細胞の表面に存在するマーカーを検出することを特徴とする、請求項20または21のキット。

10

【請求項28】

前記第2プローブは、MDR1抗体、MDR3抗体、MRP1抗体、MRP3抗体、およびLRP抗体から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項21のキット。

【請求項29】

患者において細胞表面ビメンチンを検出するための、細胞表面ビメンチン体内検出プローブであって、ビメンチン結合成分と、体内検出用の検出可能ラベルを含むプローブ。

【請求項30】

前記ビメンチン結合成分は抗体であることを特徴とする、請求項29の細胞表面ビメンチン体内検出プローブ。

20

【請求項31】

前記検出可能なラベルはテクネチウムであることを特徴とする、請求項29の細胞表面ビメンチン体内検出プローブ。

【請求項32】

多剤耐性新生物を治療または予防するための細胞表面ビメンチン標的剤であって、ビメンチン結合成分および治療成分を含み、ビメンチン結合成分は、治療成分を、多剤耐性新生物に向けて狙い撃ちし、それによって多剤耐性新生物を治療することを特徴とするビメンチン標的剤。

【請求項33】

前記ビメンチン結合成分は抗ビメンチン抗体であることを特徴とする、請求項32の薬剤。

30

【請求項34】

前記ビメンチン結合成分は、LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパク、ペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項32の薬剤。

【請求項35】

前記ビメンチン結合成分は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、抗体、および、そのビメンチン結合断片から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項32の薬剤。

40

【請求項36】

前記治療成分は、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、ブスルファン、カベシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロフォスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドセタキセル、ドキソルピシン、エポエチン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イフォスファミド、イマチニブ、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトテイン、ミトキサントロン、パクリタクセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タキソール、テニポシド、トポテカン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、および、ビノレル

50

ピンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項32の薬剤。

【請求項37】

前記治療成分はリポソーム処方として存在することを特徴とする、請求項32の薬剤。

【請求項38】

前記治療成分は放射性同位元素であることを特徴とする、請求項32の薬剤。

【請求項39】

前記放射性同位元素は、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、および $^{213}\text{Bi}$ から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項38の薬剤。

【請求項40】

前記治療成分は、標的多剤耐性新生細胞を殺すことが可能な、または、殺作用を誘発することが可能な毒素であることを特徴とする、請求項32の薬剤。 10

【請求項41】

前記毒素は、シュドモナス体外毒素、ジフテリア毒素、植物リシン毒素、植物アブリン毒素、植物サポニン毒素、植物ゲロニン毒素、および、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパクから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項40の薬剤。

【請求項42】

前記ビメンチン結合成分は標的細胞表面に結合し、前記治療要素は取り込まれて細胞の成長を阻止し、細胞の生存を危うくし、または、細胞を殺すことを特徴とする、請求項32から41のいずれかの薬剤。

【請求項43】

多剤耐性新生物を治療または予防するためのワクチンであって、ビメンチンポリペプチド、またはそのビメンチンポリペプチドの部分配列、および、少なくとも一つの製薬学的に受容可能なワクチン成分を含むワクチン。 20

【請求項44】

前記ビメンチンポリペプチドまたはポリペプチド部分配列は、配列識別番号1のヒトビメンチンポリペプチド配列であることを特徴とする、請求項43のワクチン。

【請求項45】

前記ビメンチンポリペプチド部分配列は少なくとも8アミノ酸長であることを特徴とする、請求項43のワクチン。

【請求項46】

前記ビメンチンポリペプチド部分配列はハプテンを含むことを特徴とする、請求項45のワクチン。 30

【請求項47】

前記製薬学的に受容可能なワクチン成分はアジュバントであることを特徴とする、請求項43のワクチン。

【請求項48】

前記アジュバントは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、油懸濁液、細菌産物、不活性化細菌全体、内部毒素、コレステロール、脂肪酸、脂肪族アミン、パラフィン様化合物、植物油、モノフォスホリル脂質A、サポニン、および、スクアレンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項47のワクチン。 40

【請求項49】

被験体の多剤耐性新生物を治療または予防する方法であって、請求項32から41のいずれか1項による細胞表面ビメンチン標的治療剤を投与することを含む方法。

【請求項50】

前記新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、および、上皮ガンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項49の方法。

【請求項51】

前記被験体がヒト患者であることを特徴とする、請求項49の方法。

【請求項52】

前記ヒト患者は、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っていることを特徴とする、請求項51の方法。

【請求項53】

前記新生物は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項49の方法。

【請求項54】

被験体の多剤耐性新生物を治療または予防する方法であって、請求項43から48のいずれか1項によるビメンチンワクチンを投与することを含む方法。

【請求項55】

前記新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、および、上皮ガンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項54の方法。

【請求項56】

前記被験体がヒト患者であることを特徴とする、請求項54の方法。

【請求項57】

前記ヒト患者は、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っていることを特徴とする、請求項56の方法。

【請求項58】

前記新生物は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項54の方法。

【請求項59】

試験細胞が新生物であるかどうかを検出する方法であって、

a) 任意の起源または細胞タイプの試験細胞における細胞表面発現ビメンチンタンパクのレベルを測定すること、および、

b) 試験細胞の細胞表面発現のビメンチンタンパクのレベルを、同じ起源または細胞タイプの非新生細胞における細胞表面発現のビメンチンレベルと比較することを含み、

試験細胞の細胞表面発現ビメンチンのレベルが、同じ起源または細胞タイプの非新生細胞の細胞表面発現のビメンチンレベルよりも高い場合、その試験細胞は新生物であることを特徴とする方法。

【請求項60】

前記試験細胞における細胞表面発現のビメンチンレベルを測定することは、細胞から原形質膜画分を単離すること、および、その原形質膜画分におけるビメンチンレベルを測定することを含むことを特徴とする、請求項59の方法。

【請求項61】

前記試験細胞における細胞表面発現のビメンチンレベルを測定することは、前記細胞を、抗ビメンチン抗体に接触させること、および、細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルを測定することを含むことを特徴とする、請求項59の方法。

【請求項62】

前記細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルを測定することは免疫蛍光放射によることを特徴とする、請求項61の方法。

【請求項63】

前記細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルを測定することは放射性ラベルによることを特徴とする、請求項61の方法。

【請求項64】

前記試験細胞は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項59の方法。

【請求項65】

10

20

30

40

50

前記非新生細胞は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項59の方法。

【請求項66】

患者において新生細胞を検出する方法であって、

(a)患者に対して、検出可能なラベルに動作的に連結されたビメンチン結合剤を投与すること、および、

(b)ビメンチン結合剤に動作的に連結したラベルを検出することを含み

ビメンチン結合剤は、患者の新生細胞上に存在する細胞表面発現ビメンチンに特異的に結合することを特徴とする方法。

10

【請求項67】

前記ビメンチン結合剤は抗体またはその断片であることを特徴とする、請求項66の方法。

【請求項68】

前記ビメンチン結合剤は、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項66の方法。

【請求項69】

前記ビメンチン結合剤は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、抗体、および、その断片から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項66の方法。

20

【請求項70】

前記検出可能なラベルは、蛍光色素、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、有色産物を生成する酵素、化学発光産物を生成する酵素、または磁性産物を生成する酵素から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項66の方法。

【請求項71】

前記新生細胞は、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、および、上皮ガン細胞から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項66の方法。

30

【請求項72】

前記新生細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、および、卵巣細胞から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項66の方法。

【請求項73】

前記患者はヒトであることを特徴とする、請求項66の方法。

【請求項74】

前記患者は、新生細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っていることを特徴とする、請求項73の方法。

40

【請求項75】

新生組織形成を診断または検出するためのキットであって、

a)ビメンチンの検出のための第1プローブ、および、

b)ヌクレオフォスミンおよびHSC70から成るグループから選ばれる新生物マーカー検出のための第2プローブ

を含むキット。

【請求項76】

前記ビメンチンを検出するためのプローブは、抗ビメンチン抗体、またはその結合断片であることを特徴とする、請求項75のキット。

【請求項77】

50

前記ビメンチンを検出するためのプローブは、LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aから成るグループから選ばれるビメンチンリガンドであることを特徴とする、請求項75のキット。

【請求項78】

前記第2プローブはヌクレオフォスミン抗体およびHSC70抗体から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項75のキット。

【請求項79】

前記第2プローブはヌクレオフォスミンリガンドおよびHSC70リガンドから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項75のキット。

10

【請求項80】

前記第1プローブは、試験細胞が新生物である場合、その表面に存在するビメンチンを検出することを特徴とする、請求項75のキット。

【請求項81】

前記第2プローブは、試験細胞が新生物である場合、その表面に存在するマーカーを検出することを特徴とする、請求項75のキット。

【請求項82】

ガン性新生細胞増殖を治療するための細胞表面ビメンチン標的剤であって、ビメンチン結合成分および治療成分を含み、ビメンチン結合成分は、治療成分を、新生細胞増殖に向けて狙い撃ちし、それによってそのガンを治療することを特徴とするビメンチン標的剤。

20

【請求項83】

前記ビメンチン結合成分は抗ビメンチン抗体であることを特徴とする、請求項82の薬剤。

【請求項84】

前記ビメンチン結合成分は、LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項82の薬剤。

【請求項85】

前記ビメンチン結合成分は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、抗体、および、そのビメンチン結合断片から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項82の薬剤。

30

【請求項86】

前記治療成分は、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、プスルファン、カベシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロフォスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エボエチン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イフォスファミド、イマチニブ、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトテイン、ミトキサントロン、パクリタクセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タキソール、テニポシド、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、および、ピノレルピンおよび、その組み合わせ、から成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項82の薬剤。

40

【請求項87】

前記治療成分はリポソーム処方として存在することを特徴とする、請求項82の薬剤。

【請求項88】

前記治療成分は放射性同位元素であることを特徴とする、請求項82の薬剤。

【請求項89】

前記放射性同位元素は、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、および $^{213}\text{Bi}$ から成るグループ

50

ブから選ばれることを特徴とする、請求項88の薬剤。

【請求項90】

前記治療成分は、標識新生細胞を殺すことが可能な、または、殺作用を誘発することが可能な毒素であることを特徴とする、請求項82の薬剤。

【請求項91】

前記毒素は、シュードモナス体外毒素、ジフテリア毒素、植物リシン毒素、植物アブリン毒素、植物サポニン毒素、植物ゲロニン毒素、および、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパクから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項90の薬剤。

【請求項92】

前記ビメンチン結合成分は標的細胞表面に結合し、治療要素は取り込まれて細胞の成長を阻止し、細胞の生存を危うくし、または、細胞を殺すことを特徴とする、請求項82から91のいずれかの薬剤。

10

【請求項93】

新生物を治療または予防するためのワクチンであって、ビメンチンポリペプチド、またはそのビメンチンポリペプチドの部分配列、および、少なくとも一つの製薬学的に受容可能なワクチン成分を含むワクチン。

【請求項94】

前記ビメンチンポリペプチドまたはポリペプチド部分配列は、配列識別番号1のヒトビメンチンポリペプチド配列であることを特徴とする、請求項93のワクチン。

【請求項95】

前記ビメンチンポリペプチド部分配列は少なくとも8アミノ酸長であることを特徴とする、請求項93のワクチン。

20

【請求項96】

前記ビメンチンポリペプチド部分配列はハプテンを含むことを特徴とする、請求項95のワクチン。

【請求項97】

前記製薬学的に受容可能なワクチン成分はアジュバントであることを特徴とする、請求項93のワクチン。

【請求項98】

前記アジュバントは、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、油懸濁液、細菌産物、不活性化細菌全体、内部毒素、コレステロール、脂肪酸、脂肪族アミン、パラフィン様化合物、植物油、モノフォスホリル脂質A、サポニン、および、スクアレンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項97のワクチン。

30

【請求項99】

被験体の新生物を治療または予防する方法であって、請求項82から91のいずれか1項による細胞表面ビメンチン標的治療剤を投与することを含む方法。

【請求項100】

前記新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、および、上皮ガンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項99の方法。

40

【請求項101】

前記被験体がヒト患者であることを特徴とする、請求項99の方法。

【請求項102】

前記ヒト患者は、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っていることを特徴とする、請求項101の方法。

【請求項103】

前記新生物は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項99の方法。

【請求項104】

50

被験体の新生物を治療または予防する方法であって、請求項93から98のいずれか1項によるビメンチンワクチンを投与することを含む方法。

【請求項105】

前記新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、および、上皮ガンから成るグループから選ばれることを特徴とする、請求項104の方法。

【請求項106】

前記被験体がヒト患者であることを特徴とする、請求項104の方法。

【請求項107】

前記ヒト患者は、新生細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っていることを特徴とする、請求項106の方法。 10

【請求項108】

前記新生物は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織由来であることを特徴とする、請求項104の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、診断法および治療法の分野に関する。特に、本発明は、腫瘍性および/または損傷細胞の検出と治療、さらには、多剤耐性を示す腫瘍性および/または損傷細胞の検出と治療に関する。 20

【背景技術】

【0002】

ガンのような病気、または病原体感染によって引き起こされる病気は薬剤（例えば、化学療法剤および抗生物質）で治療されることが多い。ガンまたは病気の細胞を殺すために、薬剤（単数または複数）は、細胞に侵入し、必須の生化学的経路を妨げるために有効用量を届けなければならない。しかしながら、細胞のあるものは、薬剤にたいする耐性を発達させることによって（「薬剤耐性」と呼ばれる）殺作用を回避することがある。さらに、ある場合、ガン細胞（また腫瘍細胞または新生細胞(neoplastic cell)とも呼ばれる）や、損傷細胞（例えば、病原体感染細胞）、あるいは病原体自身が、元々治療には含まれていなかった薬剤も含めた、広範な薬剤スペクトラムに対して耐性を発達させることがある。この現象は、「多剤耐性」(MDR)と呼ばれる。MDRには、それぞれが異なる生物学的機構と関連する、様々なタイプがあり、また、様々なタイプのMDRに対してそれぞれに特異的な生物学的「マーカー」があり、これらは、各タイプのMDRを検出及び診断するに当たって臨床的に有用である。 30

【0003】

MDRは、ガン細胞、または、ウイルス、細菌、寄生虫、および、細胞や体液中に存在する可能性のあるその他の微生物のような感染原と関係する可能性がある。MDR表現型の出現は、感染症治療における主要な失敗原因となっている（非特許文献1、2参照）。構造的にも機能的にも別物である、各種抗菌剤および抗ガン剤に対する患者の交差耐性は、病原体感染患者にとっては重大な問題となる可能性がある。同様に、多剤耐性を持つガン細胞の発達は、ガン患者の治療不調の主要理由である（非特許文献3参照）。 40

【0004】

多剤耐性は多因子性である。古典的MDR機構は、進化的に高度に保存される細胞膜タンパク（P-糖タンパクまたはMDR1）の遺伝子変化に関わる。このタンパクは、薬剤を、細胞または微生物の外部に能動的に輸送する、または、汲みだす（非特許文献4、5参照）。ヒトガン細胞と、感染性細菌病原の両方とも、P-糖タンパクをコードする遺伝子の増幅によるP-糖タンパクの過剰発現を含む機構を介して古典的なMDRを発達させるようである。MDRガン細胞または病原感染細胞におけるP-糖タンパクmRNAまたはタンパクの過剰発現は、MDRの生物学的マーカーである。MDRガンおよび病原体感染 50

症を診断及び治療するために、P-糖タンパクの過剰発現を利用する診断試験および治療法が従来から開発されている（非特許文献6）。しかしながら、各種正常組織も様々な量のP-糖タンパクを発現しているのであるから、MDRガン細胞の表面上のP-糖タンパクを標的とする治療法が仮にできたとしても、それがどのようなものであれ、それは、比較的高濃度のP-糖タンパク発現を呈する正常な組織、例えば、肝臓、腎臓、幹細胞、および、血液脳関門上皮のような組織をも冒す可能性がある。

#### 【0005】

「非定型MDR」とは、多剤耐性の機構が未知であるか、新規であるか、又は、P-糖タンパクに関わる古典的機構とは異なる、MDRガン細胞または病原体を記述するのに使用される用語である。例えば、ヒトの肺腫瘍は、多剤耐性を有するが、P-糖タンパクには変化を示さない（非特許文献7を参照）。むしろ問題の腫瘍は別の薬剤輸送因子（多剤耐性関連タンパクまたは「MRP1」）を発現する。肺耐性関連タンパクを含む、新しいMDR機構が最近記述された。このタンパクは、このタイプの非定型MDRのマーカーとなる（特許文献1）。MDRの非定型マーカーのその他の例としてはMRP5が挙げられる。これは、ヌクレオシド様薬剤（特許文献2）、および、ある種のスフィンゴ糖脂質（特許文献3参照）に対する、新規の、哺乳類の流出ポンプである。注意しなければならないことは、MDR細胞は、同じ細胞に1種を越えるMDRマーカー（古典的P-糖タンパクマーカーと非定型マーカー）を同時に発現する可能性のあること、および、複数のマーカーは独立に発現されることである（非特許文献8）。従って、1種を越える細胞表面MDRマーカーに向けられた、可能性として、1種を越えるMDR機構を阻止する複数の治療法を組み合わせることが可能である。

10

20

#### 【0006】

中間径フィラメントは、高等な真核細胞の細胞骨格の主要成分である。中間径フィラメントは、いくつかの、別々の構造的に関連するタンパクから構成され、各種中間径フィラメントタンパク遺伝子が様々な組織で発現される。中間径フィラメント遺伝子において自発的に、実験的に誘発した突然変異に関わる研究によって、中間径フィラメントは、上皮および筋細胞の機械的安定性を強化するために働くことが示された（非特許文献9）。ビメンチン（gi/4507895）は、間葉性およびその他の非上皮細胞、および、骨格筋および心筋細胞のZ円板における、クラスIII中間径フィラメントに見られる、細胞内ホモ二量体タンパクである（例えば、非特許文献9、10、11参照）。ビメンチンは、細胞分裂時にそのリン酸化が強化されるリンタンパクである。ヒトおよびげっ歯類両方のビメンチン遺伝子が解明されている（例えば、非特許文献12、13参照）。精製された真核細胞ビメンチンは、54 kDaの分子量を持ち、天然形では可溶であるが、変性されると不溶になる。ビメンチン遺伝子の制御は、ウィルス感染のいくつかの工程に参加しているらしい（非特許文献12）。

30

#### 【0007】

各種細胞骨格修飾は、悪性の細胞変形と関連するので、予後診断要因として用いられる。ビメンチン発現は間葉性起源の細胞の特徴である体内状況とは対照的に、ビメンチン合成は、間葉性起源の如何によらず、インビトロの全ての増殖細胞に特徴的であり、ある前駆細胞に分化した途端にスイッチが切れる。ビメンチン遺伝子発現は、ある転移性腫瘍細胞では上向調整されるから、腫瘍形成進行過程のマーカーとなる（非特許文献12、14参照）。

40

#### 【0008】

ヒト腫瘍の組織学的分類においてビメンチンと、他のIFタンパクが従来から使用されている（総覧については、非特許文献15、16参照）。特に、ビメンチンは、いくつかのタイプの腫瘍における脱分化のマーカーとして用いられている。

#### 【0009】

ビメンチンと他の中間径フィラメントと共存する腫瘍マーカーのことが記載されている。例えば、De BernardとMarina（特許文献4）は、VIP54と呼ばれる、新規の神経芽細胞腫マーカーで、ビメンチンおよびデスミンフィラメントと緊密に関連するタンパクについて

50

、また、腫瘍の発達および/または進行のマーカーとして、中間径フィラメント(特に、クラスIIIのビメンチン、またはデスミンフィラメント)の検出と細胞画像撮影のための内部マーカーとしての使用について記述する。

【0010】

最後に、各種タイプのヒト固形腫瘍および固形腫瘍細胞系統には、ビメンチンの発現レベルと細胞内分布において、しばしば多剤耐性の出現と関連する変化が示されるいくつかの例がある(非特許文献17、18)。

【0011】

ヒトにおいても動物においても、MDR発生の機構を問わず(例えば、天然に起ころうが、薬剤で誘発されたものであろうが)、ガン細胞や、ガンではない損傷細胞における古典的および非定型的MDR表現型の発達を検出し、治療し、予防し、および/または、逆転する手段に対する需要が依然としてある。さらに、多剤耐性細胞を特定することを可能とする能力、および、特定する試薬を利用する能力は、多剤耐性ガン、および多剤耐性損傷細胞の治療、監視、診断、および医療用画像撮影に改良をもたらす臨床的可能性を有する。

【特許文献1】Rome L.H. et al., PCT公報W09962547

【特許文献2】Friedland and Schutz, PCT公報W00058471

【特許文献3】米国特許第6,090,565号

【特許文献4】PCT公報W00127269

【非特許文献1】Davis J., Science 264:375-382, 1994

【非特許文献2】Poole, K., Cur. Opin. Microbiol. 4:500-5008, 2001

【非特許文献3】Gottesman, M.M., Ann. Rev. Med. 53:615-627, 2000

【非特許文献4】Volm M., et al., Cancer 71:3981-3987, 1993

【非特許文献5】Bradley and Ling, Cancer Metastasis Rev. 13:223-233, 1994

【非特許文献6】Szakacs G. et al., Pathol. Oncol. Res. 4:251-257, 1998

【非特許文献7】Cole S.P. et al., Science 258:1650-1654, 1992

【非特許文献8】Grandjean F. et al., Anticancer Drugs, 12:247-258, 2001

【非特許文献9】Evans R.M., BioEssays, 20:79-86, 1998

【非特許文献10】Hermann, H., Aebi, U. (2000) Curr. Opin. Cell Biol. 12:79-90

【非特許文献11】ibid. (1998) Subcell Biochem. 31:319-62

【非特許文献12】Kryszke et al. (1998) Pathol. Biol. 46:39-45

【非特許文献13】Paulin, D. (1989) Pathol. Biol. 37:277-82

【非特許文献14】Osborn et al. (1989) Curr. Comm. in Mol. Biol., Cold Spring Harbor Press

【非特許文献15】Ramaekers et al. (1982) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 46:331-339

【非特許文献16】Thomas et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:2698-2703

【非特許文献17】Conforti G., et al., Br. J. Cancer, 3:505-511, 1995

【非特許文献18】Moran E. et al., Eur. J. Cancer, 33:652-660, 1997

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は、一部は、下記の発見に基づく。すなわち、普通には細胞内タンパクであるビメンチンの完全長が、その完全長のまま、新生細胞および損傷細胞表面に発現され、しかも、多剤耐性(MDR)新生細胞およびMDR損傷細胞により多量に発現されるという発見である。他の細胞表面MDRマーカー(例えばP-糖タンパク)とは対照的に、薬剤感受性新生細胞表面に発現されるビメンチンは低レベルであるが、一方、ビメンチンは、生体の正常細胞表面には無視できるほどの僅かな量しか発現されない。「無視できるほどの量」とは、細胞表面のビメンチンが100分子よりも少ないことを意味する。従って、本発明は、毒素、または、その他の治療薬剤または診断薬剤が結合される結合薬剤の使用を可能とする。この薬剤は、有害な副作用無くビメンチンに特異的に結合する。なぜなら、殺される非ビ

10

20

30

40

50

メンチン細胞は、薬剤感受性新生細胞または損傷細胞であって、正常細胞は無傷のままだからである。

【0013】

一つの局面において、本発明は、試験新生細胞において、多剤耐性、または多剤耐性への潜在能力を検出する方法であって、任意の起源または細胞タイプの試験新生細胞において細胞表面に発現されたビメンチンタンパクのレベルを測定すること、および、その結果を、同じ起源または細胞タイプの、非耐性の新生細胞において細胞表面に発現されたビメンチンのレベルと比較することによって行う検出法を提供する。もしも、試験新生細胞の細胞表面で発現されたビメンチンレベルが、同じ起源または細胞型の非耐性新生細胞における細胞表面で発現されたビメンチンレベルよりも高いのであれば、その試験新生細胞は、多剤耐性を持つか、または多剤耐性への潜在能力を持つ。いくつかの実施態様では、試験新生細胞の細胞表面発現性ビメンチンのレベルを、細胞から原形質膜画分を単離すること、および、その原形質膜画分中のビメンチンレベルを測定することによって測定する。別の実施態様では、試験新生細胞における細胞表面発現性ビメンチンのレベルを、その細胞を抗ビメンチン抗体に接触させること、および、細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルを測定することによって測定する。例えば、細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルは、免疫蛍光放射または放射標識によって測定してもよい。

10

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明のこの局面におけるある実施態様では、試験新生細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、または卵巣細胞である。別の実施態様では、試験新生細胞は、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、骨髄腫細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞である。本発明のさらに別の実施態様では、試験新生細胞は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。さらに別の実施態様では、非耐性新生（コントロール）細胞は、薬剤感受性新生細胞系統、例えば、HL60、NB4、CEM、HSB2、Molt4、MCF-7、MDA、SKOV-3、または2008である。

20

【0015】

別の局面で、本発明は、患者において、一つの、または複数の多剤耐性細胞を検出する方法であって、患者に対して、検出可能なラベルと動作的に連結した、ビメンチン結合性薬剤を投与することによって行う検出法を提供する。ラベルは、患者の多剤耐性細胞（単数または複数）の細胞表面に発現されるビメンチンに特異的に結合する、ビメンチン結合性薬剤と動作的に連結されるので、次にラベルが検出されると、その患者における多剤耐性細胞（単複）の存在が（もしあれば）位置づけられることになる。ある実施態様では、使用するビメンチン結合薬剤は、抗体、またはその断片である。別の実施態様では、ビメンチン結合薬剤は、ビメンチンリガンド、例えば、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクまたはペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aである。特定の実施態様では、ビメンチン結合薬剤は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、または、抗体である。別の実施態様では、検出可能なラベルは、蛍光色素、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、有色産物を生成する酵素、化学発光産物を生成する酵素、または磁性産物を生成する酵素である。

30

40

【0016】

この局面のある実施態様では、多剤耐性細胞は新生細胞である。特定の実施態様では、新生細胞は、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞である。ある実施態様では、新生細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、または卵巣細胞である。特定の実施態様では、患者はヒト、例えば、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っている

50

ヒト患者である。

【0017】

別の局面で、本発明は、試験新生細胞の多剤耐性を診断する、または検出するためのキットを提供する。このキットは、ピメンチン検出用のプローブ、および、別の多剤耐性マーカー、例えば、ヌクレオフォスミンまたはHSC70検出用のもう一つのプローブを含む。ある実施態様では、本発明のこのキットは、ピメンチン検出用の第1プローブと、もう一つの多剤耐性マーカー、例えば、MDR1、MDR3、MRP1、MRP5、またはLRP検出用の第2プローブを含む。特定の実施態様では、キットは、ピメンチン検出用プローブとして抗ピメンチン抗体を含む。別の実施態様では、キットは、ピメンチンリガンド、例えば、LDL、NLK1タンパク、ピメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aを含む。さらに別の実施態様では、キットは、第2の、非ピメンチン多剤耐性マーカー検出用プローブとして、ヌクレオフォスミン抗体またはHSC70抗体を含む。別の実施態様では、第2プローブは、ヌクレオフォスミンリガンド（例えば、タンパクキナーゼR（PKR）、RNA、網膜芽腫タンパク、IRF-1、または、核局在シグナル（NLS）例えば、RexタンパクのN-末端核局在シグナル）、または、HSC70リガンド（例えば、アルツハイマーのタウタンパク、BAG-1、小型グルタミン富裕テトラトリコペプチド反復配列含有タンパク（SGT）、ロタウイルスVP5タンパクの(aa642-658)、オーキシリン、または、免疫抑制剤5-デオキシスベルグアリン（DSG））であってもよい。

10

【0018】

本発明のこの局面の別の実施態様では、キットは、試験新生細胞表面に存在するピメンチンを検出するプローブを含む。別の実施態様では、キットは、試験MDR新生細胞表面に存在する別の（非ピメンチン）マーカーを検出する第2プローブを含む。ある実施態様では、キットは、MDR1抗体、MDR3抗体、MRP1抗体、MRP3抗体、または、LRP抗体である第2プローブを含む。

20

【0019】

別の局面で、本発明は、患者の細胞表面ピメンチン検出用の、細胞表面ピメンチン体内検出プローブを提供する。この細胞表面ピメンチンプローブは、ピメンチン結合成分と、体内検出用の検出可能なラベル（例えば、テクネチウムラベル）とを有する。ある実施態様では、ピメンチン結合成分は抗体である。

30

【0020】

さらに別の局面で、本発明は、多剤耐性新生物を治療する、または予防するための細胞表面ピメンチン標的剤を提供する。このピメンチン標的剤は、ピメンチン結合成分と治療成分の両成分であって、二つは、ピメンチン結合成分が、治療成分を、その多剤耐性新生物に向かって狙い撃ちし、そうすることによってその多剤耐性新生物を治療するよう互いに協力し合う二つの成分を含む。ある実施態様では、ピメンチン結合成分は抗ピメンチン抗体である。別の実施態様では、ピメンチン結合成分は、ピメンチンリガンド、例えば、LDL、NLK1タンパク、ピメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパク、ペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aである。特定の実施態様では、ピメンチン結合成分は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、またはタンパクである。

40

【0021】

本発明のこの局面のある有用な実施態様では、治療成分は、化学療法剤、例えば、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、ブレオマイシン、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロフォスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エポエチン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イフォスファミド、イマチニブ、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトテイン、ミトキサント

50

ロン、パクリタクセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タキソール、テニポシド、トポテカン、ビンブラスチン、ビクリスチン、または、ビノレルピンのような化学療法剤である。特定の実施態様では、治療成分はリポソーム処方として存在する。

【0022】

別の実施態様では、治療成分は、放射性同位元素、例えば、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、または $^{213}\text{Bi}$ である。

【0023】

さらに別の実施態様では、治療成分は、標的とする多剤耐性新生細胞を殺す、または殺作用を誘発することが可能な毒素である。本発明において使用されるこのような毒素としては、シュドモナス体外毒素、ジフテリア毒素、植物リシン毒素、植物アブリン毒素、植物サポニン毒素、植物ゲロニン毒素、および、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパクが挙げられる。

10

【0024】

特定の有用な実施態様では、細胞表面ビメンチン標的治療剤のビメンチン結合成分は、標的細胞表面に結合し、治療要素は内部に取り込まれ、細胞の成長を阻止し、細胞の生存性を危うくする、または、細胞を殺す。

【0025】

別の局面では、本発明は、被験体における多剤耐性新生物を治療する、または予防する方法であって、前述の細胞表面ビメンチン標的治療剤を投与することによって行う方法を提供する。この局面のある実施態様では、治療される新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、または、上皮ガンである。さらに別の実施態様では、新生物は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。特定の実施態様では、被験体はヒトの患者、例えば、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒトの患者である。

20

【0026】

さらに別の局面では、本発明は、多剤耐性新生物を治療または予防するためのワクチンを提供する。本発明のこのワクチンは、ビメンチンポリペプチド、またはビメンチンポリペプチドの部分配列、および、少なくとも一つの製薬学的に受容可能なワクチン成分を含む。ある実施態様では、ビメンチンポリペプチド、またはポリペプチド部分配列は、配列識別番号1のアミノ酸配列を有する、ヒトビメンチンポリペプチド配列である。特定の実施態様では、ビメンチンポリペプチド部分配列は少なくとも8アミノ酸長であり、ある実施態様ではハプテンとして機能する。

30

【0027】

ある実施態様では、ワクチン処方は、アジュバント、またはその他の製薬学的に受容可能なワクチン成分を含む。特定の実施態様では、アジュバントは水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、油懸濁液、細菌産物、不活性化細菌全体、内部毒素、コレステロール、脂肪酸、脂肪族アミン、パラフィン様化合物、植物油、モノフォスフォリル脂質A、サポニン、またはスクアレンである。

40

【0028】

別の局面で、本発明は、被験体における多剤耐性新生物を治療する、または予防する方法であって、前述のビメンチンワクチンから任意に選ばれるものを投与することによって行う方法を提供する。この局面のある実施態様では、治療される新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、または、上皮ガンである。さらに別の実施態様では、新生物は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。特定の実施態様では、被験体はヒトの患者、例えば、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒトの患者である。

50

## 【0029】

さらに別の局面では、本発明は、新生物であるかどうかを検出する方法であって、任意の起源または細胞タイプの試験細胞において細胞表面に発現されたビメンチンタンパクのレベルを測定すること、および、その結果を、同じ起源または細胞タイプの、非新生物細胞において細胞表面に発現されたビメンチンのレベルと比較することによって行う検出法を提供する。もしも、試験細胞の細胞表面で発現されたビメンチンレベルが、同じ起源または細胞型の非新生物細胞の細胞表面で発現されたビメンチンレベルよりも高いのであれば、その試験細胞は新生物である。

## 【0030】

ある実施態様では、試験細胞の細胞表面発現性ビメンチンのレベルを、細胞から原形質膜画分を単離すること、および、その原形質膜画分中のビメンチンレベルを測定することによって測定する。別の実施態様では、試験細胞における細胞表面発現性ビメンチンのレベルを、その細胞を抗ビメンチン抗体に接触させること、および、細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルを測定することによって測定する。例えば、細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルは、免疫蛍光放射または放射標識によって測定してもよい。

## 【0031】

本発明のこの局面のある実施態様では、試験細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、または卵巣細胞である。別の実施態様では、試験細胞は、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、骨髄腫細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞である。本発明のさらに別の実施態様では、試験細胞は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。

## 【0032】

別の局面で、本発明は、患者において、一つの、または複数の新生細胞を検出する方法であって、患者に対して、検出可能なラベルと動作的に連結した、ビメンチン結合性薬剤を投与することによって行う検出法を提供する。ラベルは、患者の新生細胞（単複）の細胞表面に発現されるビメンチンに特異的に結合する、ビメンチン結合薬剤と動作的に連結されるので、次にラベルが検出されると、その患者における新生細胞（単複）の存在が（もしあれば）位置づけられることになる。ある実施態様では、使用するビメンチン結合薬剤は、抗体、またはその断片である。別の実施態様では、ビメンチン結合薬剤は、ビメンチンリガンド、例えば、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクまたはペリフェリン、フィンプリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aである。特定の実施態様では、ビメンチン結合薬剤は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、または抗体である。別の実施態様では、検出可能なラベルは、蛍光色素、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、有色産物を生成する酵素、化学発光産物を生成する酵素、または磁性産物を生成する酵素である。

## 【0033】

この局面のある実施態様では、新生細胞は、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞である。ある実施態様では、新生細胞は、前骨髄性白血病細胞、Tリンパ芽球様細胞、乳房上皮細胞、または卵巣細胞である。特定の実施態様では、患者はヒト、例えば、新生細胞（単複）の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒト患者である。

## 【0034】

別の局面で、本発明は、新生物を診断する、または検出するためのキットを提供する。このキットは、ビメンチン検出用の少なくとも1本のプローブ、および、別の新生物マーカー、例えば、ヌクレオフォスミンまたはHSC70検出用の少なくとももう1本のプローブを含む。一つの実施態様では、ビメンチン検出用プローブは、抗ビメンチン抗体、または

その断片である。別の実施態様では、ビメンチン検出用プローブは、ビメンチンリガンド、例えば、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aを含む。

【0035】

ある実施態様では、非ビメンチン新生物マーカー検出用第2プローブは、ヌクレオフォスミン抗体またはHSC70抗体である。別の実施態様では、非ビメンチン新生物マーカー検出用第2プローブは、ヌクレオフォスミンリガンド、例えば、タンパクキナーゼR (PKR)、RNA、網膜芽腫タンパク、IRF-1、または、核局在シグナル (NLS) 例えば、RexタンパクのN-末端核局在シグナル、および、HSC70リガンドである。さらに別の実施態様では、非

10

【0036】

特に有用な実施態様では、キットは、試験細胞が腫瘍性であれば、その表面に存在するビメンチンを検出する第1プローブと、試験細胞が腫瘍性であれば、その表面にもう一つの (非ビメンチン) マーカーを検出する第2プローブとを含む。

【0037】

さらに別の局面では、本発明は、ガン性の新生細胞成長を治療する、細胞表面ビメンチン標的剤を提供する。この細胞表面ビメンチン標的剤は、一般に、ビメンチン結合成分と治療成分とを含む。このビメンチン結合成分は、治療成分を、新生細胞成長に向けて狙い撃ちし、そうすることによってガンを治療する。従って、ビメンチン結合成分と治療成分は互いに協力し合って、ビメンチン結合成分が、新生物に向かって治療成分を狙い撃ちして、その新生物を治療する。

20

【0038】

ある実施態様では、ビメンチン結合成分は抗ビメンチン抗体である。別の実施態様では、ビメンチン結合成分は、ビメンチンリガンド、例えば、LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパク、ペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aである。特定の実施態様では、

30

【0039】

本発明のこの局面のある有用な実施態様では、治療成分は、化学療法剤、例えば、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロフォスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エポエチン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イフォスファミド、イマチニブ、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトテイン、ミトキサントロン、パクリタクセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タキソール、テニポシド、トポテカン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、または、ビノレルピンのような化学療法剤である。特定の実施態様では、治療成分はリポソーム処方として存在する。

40

【0040】

別の実施態様では、治療成分は、放射性同位元素、例えば、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、または $^{213}\text{Bi}$ である。

【0041】

さらに別の実施態様では、治療成分は、標的とする多剤耐性新生細胞を殺す、または殺作用を誘発することが可能な毒素である。本発明において使用されるこのような毒素とし

50

ては、シュードモナス体外毒素、ジフテリア毒素、植物リシン毒素、植物アブリン毒素、植物サポニン毒素、植物ゲロニン毒素、および、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパクが挙げられる。

【0042】

特定の有用な実施態様では、細胞表面ビメンチン標的治療剤のビメンチン結合成分は、標的細胞表面に結合し、治療要素は内部に取り込まれ、細胞の成長を阻止し、細胞の生存性を危うくする、または、細胞を殺す。

【0043】

別の局面で、本発明は、前述の細胞表面ビメンチン標的治療薬剤の内から任意に選ばれるものを投与することによって被験体の新生物を治療する方法を提供する。この局面のある実施態様では、新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、または、上皮ガンである。さらに別の実施態様では、新生物は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。特定の実施態様では、被験体はヒトの患者、例えば、新生物の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒトの患者である。

10

【0044】

さらに別の局面では、本発明は、新生物を治療または予防するためのワクチンを提供する。本発明のこのワクチンは、ビメンチンポリペプチド、またはビメンチンポリペプチドの部分配列、および、少なくとも一つの製薬学的に受容可能なワクチン成分を含む。ある実施態様では、ビメンチンポリペプチド、またはポリペプチド部分配列は、配列識別番号1のアミノ酸配列を有する、ヒトビメンチンポリペプチド配列である。特定の実施態様では、ビメンチンポリペプチド部分配列は少なくとも8アミノ酸長であり、ある実施態様ではハプテンとして機能する。

20

【0045】

ある実施態様では、ワクチン処方は、アジュバント、またはその他の製薬学的に受容可能なワクチン成分を含む。特定の実施態様では、アジュバントは水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、油懸濁液、細菌産物、不活性化細菌全体、内部毒素、コレステロール、脂肪酸、脂肪族アミン、パラフィン様化合物、植物油、モノフォスフォリル脂質A、サポニン、またはスクアレンである。

30

【0046】

別の局面で、本発明は、被験体における新生物を治療する、または予防する方法であって、前述のビメンチンワクチンから任意に選ばれるものを投与することによって行う方法を提供する。この局面のある実施態様では、治療される新生物は、乳ガン、卵巣ガン、骨髄腫、リンパ腫、メラノーマ、肉腫、白血病、網膜芽腫、ヘパトーマ、グリオーマ、中皮腫、または、上皮ガンである。さらに別の実施態様では、新生物は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。特定の実施態様では、被験体はヒトの患者、例えば、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒトの患者である。

40

【0047】

さらに別の局面では、本発明は、試験細胞における損傷（例えば、病原体感染）を検出する方法であって、任意の起源または細胞タイプの試験細胞において細胞表面に発現されたビメンチンタンパクのレベルを測定すること、および、その結果を、同じ起源または細胞タイプの、非損傷細胞において細胞表面に発現されたビメンチンのレベルと比較することによって行う検出法を提供する。もしも、試験細胞の細胞表面で発現されたビメンチンレベルが、同じ起源または細胞型の非損傷細胞の細胞表面で発現されたビメンチンレベルよりも高いのであれば、その試験細胞は損傷されている（例えば、感染している）。

【0048】

ある実施態様では、損傷細胞は病原体に感染されている。特定の実施態様では、試験細

50

胞の細胞表面発現性ビメンチンのレベルを、細胞から原形質膜画分を単離すること、および、その原形質膜画分中のビメンチンレベルを測定することによって測定する。ある実施態様では、試験細胞における細胞表面発現性ビメンチンのレベルを抗ビメンチン抗体によって測定する。特定の実施態様では、抗ビメンチン抗体は、無傷の試験細胞に存在する細胞表面ビメンチンのレベルを測定する。例えば、細胞表面ビメンチンに結合した抗体のレベルは、免疫蛍光放射または放射標識によって測定してもよい。

【0049】

特定の実施態様では、損傷細胞は、ウイルス、細菌、または寄生生物である病原体によって感染される。ある実施態様では、病原体はウイルス、例えば、HIV、ウェストナイルウイルス、またはデングウイルスである。別の実施態様では、病原体は細菌、例えば、ミ

10

【0050】

他のある実施態様では、試験細胞は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織から得られる。特定の実施態様では、試験細胞はヒト由来のものである。特定の実施態様では、ヒト患者は、病原体感染細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っている。

【0051】

別の局面で、本発明は、患者において、一つの、または複数の損傷（例えば、病原体感染）細胞を検出する方法であって、患者に対して、検出可能なラベルと動作的に連結した、ビメンチン結合性薬剤を投与することによって行う検出法を提供する。ラベルは、患者の損傷（例えば、病原体感染）細胞（単複）の細胞表面に発現されるビメンチンに特異的に結合する、ビメンチン結合薬剤と動作的に連結されるので、次にラベルが検出されると、その患者における損傷（例えば、病原体感染）細胞の存在が（もしあれば）位置づけられることになる。ある実施態様では、使用するビメンチン結合薬剤は、抗体、またはその断片である。別の実施態様では、ビメンチン結合薬剤は、ビメンチンリガンド、例えば、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクまたはペリフェリン、フィンプリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォス

20

30

【0052】

別の局面で、本発明は、試験細胞において病原体感染を診断する、または検出するためのキットを提供する。このキットは、ビメンチン検出用の1本のプローブ、および、損傷（例えば、病原体感染）用の別マーカー、例えば、ヌクレオフォスミンまたはHSC70検出用の第2プローブを含む。特定実施態様では、キットは、ビメンチンを検出するためのプローブとして抗ビメンチン抗体を含む。別の実施態様では、キットは、ビメンチンリガンド、例えば、LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンプリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aを含む。さらに別の実施態様では、キットは、非ビメンチン損傷（例えば、病原体感染）検出用の第2のマーカーとして、ヌクレオフォスミン抗体、または、HSC70抗体を含む。別の実施態様では、第2プローブは、ヌクレオフォスミンリガンド（例えば、タンパクキナーゼR（PKR）、RNA、網膜芽腫タンパク、IRF-1、または、核局在シグナル（NLS）例えば、RexタンパクのN-末端核局在シグナル）、または、HSC70リガンド（例えば、アルツハイマーのタウタンパク、BAG-1、小型グルタミン富裕テトラトリコペプチド反復配列含有タンパク（SGT）、ロタウイルスVP5タンパクの(aa642-658)、オーキシリ

40

50

ン、または、免疫抑制剤5-デオキシスベルグアリン(DSG))である。ある実施態様では、ビメンチン結合成分は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、または、抗体またはその断片である。

【0053】

さらに別の局面では、本発明は、病原体による感染を治療する、細胞表面ビメンチン標的剤を提供する。このビメンチン標的剤は、ビメンチン結合成分と治療成分とを含む。このビメンチン結合成分は、治療成分を、病原体感染細胞に向けて狙い撃ちし、そうすることによって感染を治療する。ある実施態様では、ビメンチン結合剤は抗ビメンチン抗体である。別の実施態様では、ビメンチン結合成分は、ビメンチンリガンド、例えば、修飾型LDL、NLK1タンパク、ビメンチン、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンプリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、または、タンパクフォスファターゼ2Aである。ある実施態様では、ビメンチン結合成分は、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、または、抗体またはその断片である。

10

【0054】

特定の実施態様では、治療成分は、抗菌剤、抗ウィルス剤、または抗寄生虫剤である。ある実施態様では、ビメンチン結合剤は標的細胞表面に結合し、治療要素は内部に取り込まれ、病原体の成長を阻止し、病原体の生存性を危うくする、または、病原体感染細胞を殺す。

【0055】

さらに別の局面では、本発明は、病原体による感染を治療または予防するためのワクチンを提供する。このワクチンは、ビメンチンポリペプチド、またはビメンチンポリペプチドの部分配列、および、少なくとも一つの製薬学的に受容可能なワクチン成分を含む。ある実施態様では、ビメンチンポリペプチド、またはポリペプチド部分配列は、配列識別番号1のアミノ酸配列を有する、ヒトビメンチンポリペプチド配列である。特定の実施態様では、ビメンチンポリペプチド部分配列は少なくとも8アミノ酸長であり、ある実施態様ではハプテンとして機能する。

20

【0056】

ある実施態様では、ワクチン処方は、アジュバント、またはその他の製薬学的に受容可能なワクチン成分を含む。特定の実施態様では、アジュバントは水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、油懸濁液、細菌産物、不活性化細菌全体、内部毒素、コレステロール、脂肪酸、脂肪族アミン、パラフィン様化合物、植物油、モノフォスフォリル脂質A、サポニン、またはスクアレンである。

30

【0057】

別の局面で、本発明は、被験体における感染を治療する、または予防する方法であって、前述のビメンチンワクチンから任意に選ばれるものを投与することによって行う方法を提供する。本局面のある実施態様では、被験体はヒトの患者である。特定の実施態様では、ヒト患者は、感染の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っている。ある実施態様では、感染は、組織、例えば、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、または、卵巣のような組織に起こる。

【発明を実施するための最良の形態】

40

【0058】

本明細書に引用される特許および科学的文献は、当業者にとって利用可能な知識を確実なものとする。本明細書に引用された、公刊された米国特許、許可された出願、発表された外国出願、および、GenBankデータベース配列を含めた参考資料は、それぞれが、特異的に、個別的に参照によって援用されることを意図された場合と同程度に、引用によって本明細書に援用される。

【0059】

特に、本出願は、下記の特許出願を、参照することによってその全体を含める。その出願とは、2002年12月13日提出、名称「損傷細胞、新生細胞および多剤耐性をビメンチン検出に基づいて診断及び治療するための方法」の米国出願第60/433,480号；2002年12月13日

50

提出、名称「損傷細胞、新生細胞および多剤耐性をヌクレオフォスミン検出に基づいて診断及び治療するための方法」の米国出願第60/433,351号を始めとして、2003年12月15日提出、名称「多剤耐性新生物疾患の、ヌクレオフォスミン指向性診断法および治療法」の米国出願第YY/XXXXX号；2003年1月1日提出、名称「損傷細胞、新生細胞および多剤耐性をHSC70検出に基づいて診断及び治療するための方法」の米国出願第60/438,012号；および、2003年12月15日提出、名称「多剤耐性新生物疾患の、HSC70指向性治療法及び診断法」の米国出願第YY/XXXXX号である。

#### 概説

本発明は、ガンを診断、予防、および/または、治療するための、および、非ガン細胞およびガン細胞両方の、天然に起こるMDR表現型、薬剤で誘発されたMDR表現型両方の発達を診断、予防、および/または、治療するための方法および試薬を提供する。本発明は、多剤耐性腫瘍および病原体感染の臨床管理の改善を可能とする。さらに、本発明は、MDR細胞を含めた新生細胞または損傷細胞を有する患者の特定を可能とし、従って、多剤耐性ガン、および病原体感染の治療、監視、診断、および医療用画像撮影に改良をもたらすことを可能とする試薬を提供する。

#### 【0060】

従って、本発明のある実施態様は、試験損傷細胞において多剤耐性を検出する方法を提供する。この方法は、特定の細胞型の損傷細胞のピメンチンタンパクの細胞表面発現レベルを測定すること；同じ細胞型の薬剤感受性損傷細胞における細胞表面で発現されたピメンチンタンパクのレベルを測定すること；および、もしも、薬剤感受性損傷細胞の細胞表面発現性ピメンチンのレベルに比べて、細胞表面発現性ピメンチンのレベルに上昇があるならば、試験損傷細胞は多剤耐性を有すると判定することを含む。特定の実施態様では、細胞表面発現性ピメンチンのレベルは、試験損傷細胞と、薬剤感受性損傷細胞の細胞成分を画分に分離すること、および、それらの細胞の原形質膜または細胞膜を含む、細胞成分画分におけるピメンチンレベルを測定することによって測定される。

#### 【0061】

ある実施態様では、試験損傷細胞は病原体によって感染される。特定の実施態様では、病原体はウイルス、細菌、または寄生生物である。例示のウイルスとしては、HIV、西ナイルウイルス、およびデングウイルスであるが、ただしこれらに限定されない。例示の細菌としてはミコプラズマ、リケッチア、およびクラミジアが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。例示の寄生生物としてはプラスモディウム、リーシュマニア、およびタキソプラズマが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、試験損傷細胞は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および卵巣から成るグループから選ばれる組織由来のものである。ある実施態様では、試験損傷細胞はヒト由来のものである。

#### 【0062】

本発明はまた、試験新生細胞において多剤耐性を検出する方法を提供する。この方法は、特定の細胞型の試験新生細胞のピメンチンタンパクの細胞表面発現レベルを測定すること；同じ細胞型の薬剤感受性新生細胞における細胞表面で発現されたピメンチンタンパクのレベルを測定すること；および、もしも、薬剤感受性新生細胞の細胞表面発現性レベルに比べて、ピメンチンの細胞表面発現性レベルに上昇があるならば、試験新生細胞は多剤耐性を有すると判定することを含む。特定の実施態様では、ピメンチンの細胞表面発現性レベルは、試験新生細胞と、薬剤感受性新生細胞の細胞成分を画分に分離すること、および、それらの細胞の原形質膜または細胞膜を含む、細胞成分画分におけるピメンチンレベルを測定することによって測定される。

#### 【0063】

例示の新生細胞としては、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、骨髄腫細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、および、上皮ガン細胞が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、試験新生細胞は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、

前立腺、および、卵巣から成るグループから選ばれる組織から得られる。ある実施態様では、試験新生細胞はヒトから得られたものである。

【0064】

本発明は、患者において多剤耐性細胞を検出する方法を提供する。この方法は、検出可能なラベルと動作的に連結したビメンチンタンパクに特異的に結合する結合剤を投与すること、および、患者の多剤耐性細胞表面のビメンチンタンパクに特異的に結合する結合剤が、薬剤感受性細胞表面のビメンチンタンパクに結合する結合剤に比べて、上昇していることを検出することを含む。本発明のある実施態様では、医用画像装置またはシステムが、患者の多剤耐性細胞の表面に特異的に結合した結合剤を検出する。例示の結合剤としては、天然リガンド、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、タンパク、抗体またはその断片が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、結合剤は抗体である。

10

【0065】

例示の検出可能なラベルとしては、蛍光色素、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、有色産物を生成する酵素、化学発光産物を生成する酵素、および磁性産物を生成する酵素が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、患者はヒトである。ある実施態様では、多剤耐性細胞は、損傷細胞または新生細胞である。ある実施態様では、損傷細胞は病原体によって感染される。例示の病原体としては、ウイルス、細菌、および寄生生物が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。例示のウイルスとしては、HIV、西ナイルウイルス、およびデングウイルスが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。例示の細菌としてはミコバクテリア、リケッチア、およびクラミジアが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。例示の寄生生物としてはプラスモディウム、リーシュマニア、およびタキソプラズマが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。特定の実施態様では、新生細胞は、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞から成るグループから選ばれる。特定の実施態様では、患者はヒトである。ある実施態様では、患者は、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っている。

20

【0066】

本発明はまた、新生細胞を検出する方法を提供する。この方法は、疑わしい新生細胞の細胞表面発現性ビメンチンタンパクを測定すること、および、同じ細胞型の正常細胞における細胞表面発現性ビメンチンのレベルに比べて、細胞表面発現性ビメンチンタンパクのレベルに上昇があるならば、その細胞は新生物であると判定することを含む。ある実施態様では、細胞表面発現性ビメンチンは、疑わしい試験細胞と、正常細胞の細胞成分を画分に分離すること、および、それらの細胞の原形質膜または細胞膜を含む、細胞成分画分におけるビメンチンレベルを測定することによって測定される。ある実施態様では、試験および正常細胞の細胞成分は、検出可能な結合剤に接触させられ、次に、その結合剤を検出して、各細胞における細胞表面発現性ビメンチンタンパクのレベルを定量する。別の実施態様では、細胞表面発現性ビメンチンは、ある特定の細胞タイプの、無処理で、新生物疑惑細胞と、同じ細胞タイプの無処理の正常細胞を、ビメンチンタンパクに特異的に結合する検出可能な結合剤と接触させること、および、その薬剤の結合を検出して、それら無処理細胞における細胞表面発現性ビメンチンタンパクのレベルを定量することによって測定される。

30

40

【0067】

ある実施態様では、試験細胞は、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および卵巣から成るグループから選ばれる組織由来のものである。ある特定の実施態様では、新生物疑惑細胞はヒト由来のものである。一つの実施態様では、そのヒトは、新生細胞の存在によって引き起こされたガンを患っている。

【0068】

50

本明細書で用いる場合、「新生細胞」とは、異常な細胞成長、例えば、増殖細胞成長を示す細胞である。新生細胞とは、過形成細胞、インビトロで接触成長抑制の欠如を示す細胞、インビボで転移不能の腫瘍細胞、または、インビボで転移可能なガン細胞である。新生細胞の非限定的例としては、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、前立腺ガン細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、骨髄腫細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、および、上皮ガン細胞が挙げられる。

【0069】

本発明に従って用いられる場合、「損傷細胞」とは、非新生物ではあるが、別の意味で損傷されている細胞を意味する。例えば、非新生物損傷細胞は、病原体、例えば、ウイルス、細菌、または寄生生物によって感染されている細胞であってもよい。一つの非限定的例では、細胞は、多細胞性寄生生物によって損傷されてもよいし、あるいは、寄生生物による感染の作用で損傷されてもよい。このような非限定性寄生生物としては、シストソーム類、プラスモディウム類、トリパノソーマ類、リーシュマニア、およびタキソプラズマが挙げられる。

10

【0070】

本明細書で用いる場合、「多剤耐性を持つ」および「多剤耐性」という用語は、新生細胞または損傷細胞において、その新生細胞または損傷細胞が全く暴露されたことが無い薬剤を含めて、いくつかの異なる薬剤に対して耐性を養成することを指す。例えば、もしも、ピンクリスチンによる治療を受けている、白血病患者が、ピンクリスチンを始め、その患者が過去に一度も服用したことがない他の化学療法剤（例えば、メトトレキセートまたはメルカプトプリン）に対する耐性までも持つ白血病患者を養成した場合、その患者の白血病患者は多剤耐性を有する。同様に、もしも、ペニシリンによる治療を受けている結核患者が、ペニシリンを始めとして、その患者が過去に一度も服用したことがない他の薬剤（例えば、エリスロマイシン）に対しても耐性を持つ結核感染細胞を養成した場合、その患者の結核感染細胞は、多剤耐性を有する。注目すべきことは、多剤耐性（MDR）は、元の薬剤（単複）に対して、ほとんど構造的類似性を、または機能的類似性すら持たない広い薬剤スペクトラムに対して獲得される同時的耐性であって、関係する全ての薬剤の効力の低下をもたらす耐性を含むことがあることである。

20

【0071】

「多剤耐性を持つ」および「多剤耐性」という用語は、従来の機構（すなわち、P-糖タンパク、またはその他のMDRタンパクを含む）によって、または、P-糖タンパクを含まない非典型的機構（非従来型機構）（例えば、MRP1多剤耐性マーカーを含む非典型的機構）によって多剤耐性を有する新生細胞または損傷細胞を記述するのに使用されることに注意されたい。

30

【0072】

本明細書で用いる場合、「MDRタンパク」とは、（多数）薬剤耐性に関わる、ABC型の、いくつかの膜貫通統合糖タンパクの内から選ばれる任意のものを含む。そのようなものとして、MDR1（P-糖タンパクまたはP-糖タンパク1）、すなわち多剤耐性細胞における薬剤貯留減少に与るエネルギー依存性汲み出しポンプが挙げられる。MDR1の例としては、ヒトMDR1（例えば、データベースコードMDR1\_HUMAN、GenBankアクセス番号P08183、1280アミノ酸（141.34kDa）を参照）が挙げられる。その他のMDRタンパクとしては、MDR3（またはP-糖タンパク3）が挙げられる。これは、薬剤の貯留を減少させるが、それ自体は薬剤耐性を付与することができない、エネルギー依存性汲み出しポンプである。MDR3の例としては、MDR3（例えば、データベースコードMDR3\_HUMAN、GenBankアクセス番号P21439、1279アミノ酸（140.52kDa）が挙げられる。その他のMDR関連タンパクは、薬剤の、細胞内小器官に対する能動輸送に参加する。ヒトから得られる例としては、MRP1、すなわち多剤耐性関連タンパク1、データベースコードMRP\_HUMAN、GenBankアクセス番号P33527、1531アミノ酸（171.49kDa）が挙げられる。

40

【0073】

本発明によれば、多剤耐性を帯びる細胞（例えば、腫瘍性または損傷細胞）は、薬剤（

50

例えば、化学療法剤または抗生物質)に暴露されることによって、または、自然にそのようなMDRを発達させることによって(すなわち、細胞が、それに対して耐性を発達させるような薬剤に暴露されることも無く)、MDR状態を発達させることが可能である。この点で、本発明は、新生物が治療される前でも、新生物の潜在的多剤耐性の検出を可能とする。同様に、本発明は、例えば、潜在的多剤耐性の新生物を、その新生物が治療され、薬剤耐性であることが明らかにされる前でも、効果的に治療することを可能とする。

【0074】

本発明はまた、そのようなMDR腫瘍性または損傷細胞を持つ患者の早期の特定を可能にする。例えば、そのような細胞を持つことが特定された患者が、感染症で治療を受けている、あるいは、かつて感染症(例えば、B型肝炎)で治療を受けたことがある無症状患者である場合、本発明は、症状の復帰前にこれらの患者の特定を可能とするばかりでなく、薬剤による治療の間これらの患者の監視を可能とし、そのために、そのようなMDR細胞が検出された場合、治療スケジュールを変更することが可能になる。同様に、そのような細胞を持つと特定された患者がガンの寛解期にある患者である、あるいは、ガンの治療を受けている患者(例えば、乳ガン、卵巣ガン、前立腺ガン、白血病等を患っている患者)である場合、本発明は、そのガンの復帰および/または進行前にそうした患者の特定を可能とするばかりでなく、薬剤による治療の間そうした患者の監視を可能とするので、治療スケジュールの変更が可能となる。

10

【0075】

本発明は、細胞表面で発現されるピメンチンは、多剤耐性細胞の表面において、他の細胞の上に認められるものに比べてはっきりと高いレベルで発現される、従って、細胞の多剤耐性のマーカーとして部分的に有用であるという発見に端を発する。ピメンチンタンパク細胞表面マーカーの重要な利点は、ピメンチンは生体の正常細胞の表面には無視できるレベルでしか存在しないということである。この発現は、他の既知のMDRマーカー、例えば、P-糖タンパクや多剤耐性タンパク(MRP)で見られる状況とは対照的である。後者の場合、様々の正常組織の細胞表面で、肝臓、腎臓、幹細胞、および血液脳関門上皮細胞の表面では高レベルであることを含めて、レベルが変動する(Cordon-Cardo C. et al., J. Histochem. Cytochem., 38:1277-1287, 1990; Nakamura T. et al., Drug Metabolism & Disposition, 30:4-6, 2002)。従って、P-糖タンパクおよびMRPのようなMDRガン細胞マーカーに向けて発せられる薬剤の使用は、同様に高レベルの細胞表面P-糖タンパクおよびMRPを発現する正常細胞を殺すことによってもたらされる副作用のために制限を受ける(例えば、FitzGerald, D.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:4288-4292, 1987参照)。本発明は、この有害な副作用を克服する。なぜなら、ピメンチンMDRマーカーは、薬剤感受性ガン細胞の表面にも中等レベルで発現されるが(薬剤感受性の、非ガン正常細胞における、ごく低レベルから無視できるほどのレベルと比べた場合)、MDRガン細胞、およびMDR非ガンの損傷細胞(例えば、ウィルス感染細胞)ではより高レベルで発現されるからである。従って、本発明は、細胞表面発現性のピメンチンに向けて発せられる薬剤で、MDR-損傷またはMDR-新生細胞を始め、薬剤感受性新生細胞を殺すが、一方、正常細胞は無傷のまま放置する薬剤を提供する。

20

30

【0076】

なお、同じMDR腫瘍性または損傷細胞が、1種以上のマーカー(例えば、P-糖タンパクとピメンチンの両方)を同時に発現する可能性のあること、または、これらのMDRマーカーを独立に発現する可能性のあることに注意しなければならない。同じMDR細胞におけるこの共同発現は、1種以上の細胞表面MDRマーカーに向けて発せられる結合剤を併合する可能性を提供する。例えば、ピメンチンに特異的に結合する、致死量未満の結合剤を、P-糖タンパクに特異的に結合する、致死量未満の結合剤と組み合わせることが可能である。正常細胞は、その表面にピメンチンを発現しないのであるから、ピメンチンに特異的に結合する結合剤によって損傷されることはない。むしろ、その細胞表面にP-糖タンパクとピメンチンの両方を発現するMDR細胞のみがこの併用治療によって殺されることになる。

40

【0077】

50

従って、細胞表面で発現されるピメンチンは、その細胞表面にピメンチンマーカを帯同するMDR新生細胞およびMDR損傷細胞を殺戮する療法（例えば、免疫毒素療法）に使用される優れたマーカとなる。なぜなら、正常な細胞は、細胞殺作用から免れるので、治療の有害な副作用が低減ないし除去されるからである。同様に、細胞表面ピメンチンマーカによるMDR腫瘍性または損傷細胞の診断および画像撮影は、正常組織においても発現される他のMDRマーカ、例えば、P-糖タンパクまたはMRPを用いてMDR新生細胞および損傷細胞を診断および画像撮影する場合に比べて、より感度が高く、正確で、かつ、提示する擬似陽性の数が少ない。さらに、細胞表面ピメンチンは、細胞表面にピメンチンを発現するガンまたは損傷細胞組織に対して患者に免疫付与するに当たり、抗MDRガンワクチン抗原として、または、抗-MDR損傷細胞ワクチン抗原として有用である。

10

## 【0078】

本発明はまた、損傷細胞または新生細胞が多剤耐性を獲得するに至った患者の特定を可能とする。ある状況では、治療で用いられる薬剤にもはや反応しなくなった時点の患者が特定される。例えば、化学療法剤（例えば、ビンクリスチン）によって治療される寛解期の乳ガン患者が、その化学療法剤によって定常的に治療されているにも拘わらず、突然寛解から脱け出すことがある。残念ながら、そのような患者は、今まで一度も暴露されたことのないものも含めて他の化学療法剤にも反応しないことが多い。もちろん、このような患者が多剤耐性を持つようになってからでは、このような患者を治療して、現在復帰したガン、または損傷細胞による疾患をコントロールするのは難しく、もっと過激な療法、例えば、放射線療法、または外科手術（例えば、骨髄移植または壊死組織の切除）が必要と

20

## 【0079】

本発明は、患者の腫瘍性または損傷細胞における、ピメンチンの細胞表面発現量の上昇を検出することによって、多剤耐性の早期診断を可能とする。このような早期診断によって、初期には薬剤治療反応者であり、薬剤治療に感受性を持っていた患者を、最初から薬剤治療非反応者である患者と区別することが可能となる。さらに、ピメンチン細胞表面発現による診断過程も、薬剤治療に対する耐性を持ち、かつ、薬剤治療の進行中に現れるMDR損傷または新生細胞の発達・出現を追跡するのに使用することが可能である。例えば、このような過程は、先ずAZTによる治療を受け、その後、広範なスペクトラムの抗ウィルス剤、抗菌剤、および抗ガン剤に対して多剤耐性を発達させると報告されているAIDS患者

30

を治療するのに有用である（Gollapudi et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 171:1002-1007, 1990; Antonelli et al., AIDS Research and Human Retroviruses 8:1839-1844, 1992参照）。

## 【0080】

さらに、ピメンチン細胞表面発現の診断アッセイは、損傷または腫瘍性細胞の治療法に関わる臨床実験において患者を選択するのに有用である。患者の細胞表面におけるピメンチンの存在によって、患者が、任意の臨床実験に含められる資格があるかないかが決められる。

## 【0081】

従って、一つの局面において、本発明は、多剤耐性を持つことが疑われる試験損傷細胞において多剤耐性を検出する方法を提供する。この方法は、ある特定の細胞タイプの試験損傷細胞において細胞表面に発現されたピメンチンタンパクのレベルを測定すること；同じ細胞タイプの、薬剤感受性損傷細胞において細胞表面に発現されたピメンチンタンパクのレベルを測定すること、および、もしも、非MDR損傷細胞（例えば、薬剤に感受性を持つ損傷細胞）の細胞表面発現性ピメンチンタンパクのレベルに比べて、ピメンチンタンパクの細胞表面発現性レベルに上昇があるならば、試験損傷細胞は多剤耐性を有すると判定することを含む。

40

## 【0082】

もう一つの局面では、本発明は、多剤耐性を持つことが疑われる試験新生細胞において多剤耐性を検出する方法を提供する。この方法は、ある特定の細胞タイプの試験新生細胞

50

において細胞表面に発現されたピメンチンタンパクのレベルを測定すること；同じ細胞タイプの、薬剤感受性新生細胞において細胞表面に発現されたピメンチンのレベルを測定すること、および、もしも、薬剤感受性新生細胞の細胞表面発現性ピメンチンタンパクのレベルに比べて、ピメンチンタンパクの細胞表面発現性レベルに上昇があるならば、試験細胞は多剤耐性を有すると判定することを含む。

【0083】

ある実施態様では、試験新生細胞または試験損傷細胞は、それぞれ、正常細胞または非MDR新生細胞または非MDR損傷細胞におけるピメンチンタンパクの細胞表面発現レベルよりも、少なくとも2倍量のピメンチンをその細胞表面に発現する。細胞表面発現性ピメンチンレベルのこのような定量は、後述の方法を含めた（ただしそれらに限定されない）既知の方法から選ばれる任意の数のものによって実行が可能である。

10

【0084】

後述するように、全ての正常細胞はピメンチンタンパクを細胞内において発現するけれども、新生細胞および損傷細胞は、その細胞表面に完全長のピメンチンタンパクを発現することが思いがけず発見された。さらに、これらの腫瘍性または損傷細胞が多剤耐性を帯びるにつれて、それらの細胞は、その細胞表面の完全長ピメンチンタンパクの発現量を増加させる。薬剤感受性の正常細胞は、ピメンチンタンパクを、主に、核、核小体、および原形質に含む。また、中等量のピメンチンタンパクが、薬剤感受性新生細胞の表面に発現される。ピメンチンをその細胞表面に発現しない（または、少量のピメンチンを細胞表面に発現する）薬剤感受性細胞は薬剤による治療によって殺戮される。それとは対照的に、多剤耐性を、それが自然に生じたものであれ、薬剤による治療後に生じたものであれ、獲得した腫瘍性または損傷細胞は認識可能である。なぜならば、そのような細胞では、その表面においてピメンチンタンパクの発現量が上昇しているからである。従って、細胞表面ピメンチンタンパクに特異的に結合する抗体、またはその他の結合剤は、ピメンチンを表面に発現するMDR損傷細胞およびMDR新生細胞の診断、治療、スクリーニング、および、画像撮影法を開発するのに有用である。

20

【0085】

ある実施態様では、試験損傷細胞は、組織から、例えば、損傷組織（例えば、壊死組織）のバイオプシーから、あるいは、病原体に感染された細胞タイプから得られる。例えば、B型肝炎ウイルスは通常は肝臓細胞にしか感染しない。従って、損傷細胞（例えば、B型肝炎ウイルスによって感染された肝臓細胞）は、一つの組織（例えば、肝臓）から得られる。同様にして、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、通常、CD4+ T細胞およびマクロファージにしか感染しない。従って、損傷細胞（例えば、HIVに感染されたCD4+ T細胞）は一つの組織（すなわち、血液または骨髄）から得られる。

30

【0086】

ある制限された状況では、ウイルスによる感染は、細胞を新生物にすることがあることに注意されたい。例えば、B細胞の内のあるものは、エプスタインバーウイルス（EBV）に感染すると、新生物となる。このような腫瘍性B細胞は、ウイルスによる感染によって損傷されるのではあるが、本明細書では、損傷細胞ではなく、「新生細胞」として含まれる。

40

【0087】

ある実施態様では、試験新生細胞は、組織、例えば、過形成組織（例えば、乳房のしこり）のバイオプシーから得られる。試験新生細胞が得られる組織の非限定的例としては、血液、骨髄、脾臓、リンパ節、肝臓、胸腺、腎臓、脳、皮膚、消化管、眼、乳房、前立腺、および卵巣が挙げられる。

【0088】

本発明によれば、新生細胞は、患者、例えば、新生細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒトから得られてもよい。例えば、新生細胞が腫瘍性メラノーマ細胞である場合、病気はメラノーマ細胞のガンである（すなわち、細胞増殖と新生細胞の転移によって引き起こされるガンはメラノーマである）。

50

## 【0089】

本発明によれば、損傷細胞は、患者、例えば、損傷細胞の存在によって引き起こされる疾患または障害を患っているヒトから得られてもよい。例えば、損傷細胞が病原体に感染している場合、病気は、病原体に感染したその損傷細胞の存在によって、または、欠如によって引き起こされた感染症である（例えば、HIVウイルスによって感染されたCD4+ T細胞の欠如によってAIDSが引き起こされる）。

## 【0090】

本明細書で用いる「疾患または障害を患う患者」とは、疾患または障害の臨床的兆候および/または症状を呈する患者を意味する。ある状況では、疾患または障害を抱える患者は、無症状ではあるが、疾患または障害の臨床兆候を呈することがある。例えば、白血病を患う患者は無症状であるかも知れないが（例えば、やつれたり、弱ったりしない）、同じ年齢・体重の健康な個人と比べてより多くの白血球を有するという点で臨床的兆候を示す。別の非限定的例では、ウイルス（例えば、HIV）による感染にかかった患者は無症状であるかも知れないが（例えば、CD4+ T細胞数の減少を示さないかも知れないが）、患者は、抗HIV抗体を有するという点で臨床兆候を呈する。

10

## 【0091】

本発明によれば、多剤耐性を持つ損傷細胞または新生細胞は、多剤耐性を持たない細胞と、多剤耐性細胞の表面には完全長ビメンチンタンパクの発現が増大することによって区別が可能である。ビメンチンの代表的ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は図12に記載されている。従って、細胞成分を画分に分離した場合、多剤耐性を有する細胞は、ビメンチン

20

## 【0092】

ある実施態様では、試験損傷細胞または試験新生細胞表面におけるビメンチンタンパク発現レベルの測定は、試験細胞の細胞成分を画分に分離すること、次に原形質膜または細胞膜を含む画分をビメンチンについて調べることを含む。

## 【0093】

別に、測定工程は、細胞表面発現ビメンチンタンパクの酵素消化産物を、試験細胞から分離することを含む。消化された表面露出タンパクから得られたペプチドは、細胞を急速に回転させ、消化されたペプチドを上清に残すことで単離される。次に、この消化されたペプチドを、各種の方法（例えば、免疫学的方法または質量分析法）で分析して、それらがビメンチンペプチドかどうか判定する。

30

## 【0094】

細胞成分の分離は、任意の標準的分離過程、すなわち薄層クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、超臨界流クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および、下記の実施例セクションに記載される過程を含めた（ただしそれらに限定されない）過程によって実行することが可能である。分離過程は一般に知られる（例えば、Scopes and Scopes、「タンパク生成-原理と実技（"Protein Purification: Principles and Practice"）」、Springer Verlag, 1994を参照）。

40

## 【0095】

ある実施態様では、試験損傷細胞表面におけるビメンチンタンパク発現レベルの測定は、無処置の試験損傷細胞または試験新生細胞を、ビメンチンタンパクに特異的に結合する検出可能な結合剤と接触させることを含む。ある実施態様では、次に細胞を画分に分離し、原形質または原形質膜を含む画分における標識ビメンチンの量を測定する。

## 【0096】

本発明において有用な結合剤は、ビメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合するものであればどのようなものであってもよい。結合剤は、ビメンチンタンパクの任意の

50

部分に特異的に結合する。なぜなら、タンパク全体が、多剤耐性の損傷または新生細胞の表面に発現されているからである。本発明の結合剤は、薬剤感受性腫瘍性または薬剤感受性損傷細胞の表面に発現される量と比べてより高いレベルでピメンチンを発現する腫瘍性または損傷細胞に対して特異的に結合し、そうすることによってその細胞が多剤耐性であることを特定する。

【0097】

もちろん、ピメンチンは、正常細胞、薬剤感受性新生細胞、および薬剤感受性損傷細胞の内部でも発現されるから、もしも正常細胞や、薬剤感受性腫瘍性または損傷細胞が先ず分解されたならば、または、もしもその膜が結合剤添加前に浸透可能とされたならば、結合剤は、正常細胞、および薬剤感受性腫瘍性または損傷細胞中の細胞内ピメンチンにも結合することになる。

10

【0098】

ある実施態様では、ピメンチンをその細胞表面に発現するMDR新生細胞またはMDR損傷細胞は、他のタイプの細胞とは次の点で区別が可能である。すなわち、MDR腫瘍性または損傷細胞は、その表面に、ピメンチンを、その腫瘍性または損傷細胞と同じ起源の組織から得た正常細胞よりも少なくとも2倍高いレベルで、あるいは、同じ起源の組織から得た薬剤感受性腫瘍性または損傷細胞よりも少なくとも2倍高いレベルで発現するという点である。例えば、白血病T細胞は、その表面に、正常細胞よりも多くのピメンチンを発現する。さらに、後述するように、MDR白血病T細胞は、その表面に、多剤耐性を持たない白血病T細胞のものに対して少なくとも2倍量のピメンチンを発現する。同様に、実施例において後述するように、MDR乳ガン細胞は、薬剤感受性乳ガン細胞と比べて少なくとも2倍のピメンチンをその細胞表面に発現する（すなわち、薬剤感受性乳ガン細胞は多剤耐性を持たない）。従って、細胞成分を分離した場合（例えば、原形質膜画分と細胞質ゾル画分）、ピメンチンをその細胞表面に発現するMDR腫瘍性または損傷細胞は、同じ組織から得られ、多剤耐性を持たない他の細胞に比べて、その多剤耐性を持たない細胞が正常であれ、新生物であれ、または、損傷したものであれ、その原形質膜画分に2倍以上のレベルでピメンチンを含む。

20

【0099】

別の局面で、本発明は、ピメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する結合剤を提供する。本明細書で用いる「特異的に結合する」とは、その結合剤は、ピメンチンタンパクまたはその断片を認識し、結合するが、サンプル中の他の分子は実質的に認識せず、結合しないことを意味する。従って、本発明の結合剤は、その細胞表面にピメンチンを発現するMDR細胞の表面に特異的に結合する。有用な結合剤は、水、生理的条件下、または、イオン強度に関して生理的条件と相似る条件、例えば、140mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>において、少なくとも10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>、または少なくとも10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>、または少なくとも10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>、または少なくとも10<sup>9</sup>M<sup>-1</sup>の親和度でピメンチンタンパクと会合を形成する。

30

【0100】

本明細書で用いる「結合剤」とは、ピメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合または付着する分子である。結合剤は、それがピメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する限り、何か特定のサイズ、または何か特定の構造を持つ必要はない。従って、「結合剤」とは、ピメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する限り、どれか任意の領域（例えば、3次元構造、アミノ酸配列、または特定の小型化学基）に特異的に結合または付着する分子である。結合剤の非限定的例としては、天然リガンド（例えば、ホルモンまたはGTP）を始めとして、合成小分子、薬品、核酸、ペプチド、およびホルモンのようなタンパク、抗体またはその一部が挙げられる。通常、結合剤の、エピトープに特異的に結合する能力は、極めて相補性の高い構造である。すなわち、結合剤の構造は、結合剤が特異的に結合する抗原部分に対して相補的な構造を含む。抗体が結合する、抗原部分は「エピトープ」と呼ばれる。

40

【0101】

ある実施態様では、結合剤は抗体である。ピメンチンタンパクに特異的に結合する結合

50

剤が抗体である場合、その抗体は、限定する意図は無いが、ポリクロナール抗体、モノクロナール抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、遺伝子工学的に加工された抗体、二重特異性抗体（二重特異性抗体の特異体の一方は、ビメンチンタンパクに特異的に結合する）、抗体断片（"Fv," "F(ab')<sub>2</sub>," "F(ab)," および "Dab" を含むがそれらに限定されない）、および、抗体の反応部分を代表する1本鎖（"SC-Mab"）であってもよい。抗体および、その他の結合剤を製造する方法はよく知られている（例えば、Coligan et al., 「免疫学における最新プロトコール（"Current Protocols in Immunology"）」、John Wiley and Sons、ニューヨーク、ニューヨーク州、1991; Jones et al., Nature 321:522-525, 1986; Marx, Science 229:455-456, 1985; Rodwell, Nature 342:99-100, 1989; Clackson, Br. J. Rheumatol., 3052:36-39, 1991; Reichman et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen, et al., Science 239:1534-1536, 1988）。 10

#### 【0102】

本明細書で用いる「検出可能に標識される」とは、本発明の結合剤は、検出可能な機能基に動作的に連結されることを意味する。「動作的に連結される」とは、機能基が、共有結合か、非共有結合（例えば、イオン結合）によって結合剤に付着されることを意味する。共有結合を形成する方法は既知である（例えば、Wong, S.S., 「タンパク接合と架橋反応の化学（"Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking"）」、CRC Press, 1991; Burkhardt et al., 「アミノ架橋剤、アミノプラストの化学と応用（"The Chemistry and Application of Amino Crosslinking Agents or Aminoplasts"）」、John Wiley & Sons Inc., ニューヨーク、ニューヨーク州、1999における全体プロトコールを参照されたい）。 20

#### 【0103】

本発明によれば、本発明の検出可能に標識された結合剤としては、検出可能な機能基に接合される結合剤が挙げられる。本発明の、別の検出可能に標識された結合剤は融合タンパクである。この場合、結合相手の一方は結合剤であり、他方は検出可能なラベルである。検出可能に標識される結合剤のさらに別の非限定的例は、結合剤と、第2機能基に対して高い親和度を持つ第1機能基を含む第1融合タンパク、および、第2機能基と検出可能なラベルを含む第2融合タンパクである。例えば、ビメンチンタンパクに対して特異的に結合する結合剤は、ストレプトアビジン機能基に動作的に連結してもよい。フルオレセイン機能基に動作的に連結するビオチン機能基を含む第2融合タンパクは、結合剤-ストレプトアビジン融合タンパクに添加してよい。その場合、第2融合タンパクの、結合剤-ストレプトアビジン融合タンパクに対する結合は、検出可能に標識された結合剤を生ずることになる（すなわち、検出可能な標識に動作的に連結された結合剤）。 30

#### 【0104】

本発明によれば、検出可能なラベルは、追跡が可能な機能基であり、限定する意図はないが、蛍光色素（例えば、フルオレセイン（FITC）、フィコエリスリン、ローダミン）、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、または、有色産物、化学発光産物、または磁性産物を生成する酵素を含む。特定の実施態様では、検出可能なラベルは、医用画像装置またはシステムにとって検出可能である。例えば、医用画像システムがX線装置である場合、X線装置によって検出される検出可能ラベルは放射能ラベル（例えば、<sup>32</sup>P）である。結合剤は、検出可能な機能基に直接接合される必要はないことに注意されたい。例えば、それ自体が、第2の検出可能な結合剤（例えば、FITC標識ヤギ抗マウス二次抗体）によって特異的に結合される結合剤（例えば、マウス抗ヒトビメンチン抗体）は、検出可能な機能基（すなわち、FITC機能基）に動作的に連結される。 40

#### 【0105】

ある実施態様では、試験損傷細胞表面のビメンチンタンパクの発現レベルを測定することは、無処置の試験損傷細胞を、ビメンチンタンパクに特異的に結合する検出可能な結合剤と接触させることを含む。例えば、検出可能な結合剤が、蛍光色素に動作的に連結されることによって検出可能に標識されている場合、その蛍光色素で染まっている細胞（すな 50

わち、その結合剤によって特異的に結合されている細胞)は、蛍光活性化細胞ソーター分析(実施例参照)、または、スライドに調製した臨床標本の通例の蛍光顕微鏡検査によって特定が可能である。

【0106】

検出可能な機能基に加えて、本発明の結合剤に動作的に連結されてよいその他の非限定的機能基としては、限定を意図することなく、毒素(例えば、放射性同位元素)、酵素、抗体(またはその一部)、細胞傷害性薬剤、またはそれらの接合体が挙げられる。毒素が、本発明の結合剤に動作的に連結される場合、本発明の結合剤に動作的に連結される毒素の非限定的例としては、放射性同位元素、ジフテリア毒素、ヌクレアーゼ(例えば、DNAアーゼ、またはRNAアーゼ)、プロテアーゼ、分解酵素、シュードモナス体外毒素(PE)、リシンAまたはB鎖、および、リボヌクレアーゼA(Fitzgerald D., Semin. Cancer Biol., 7: 87-95, 1996)が挙げられる。

10

【0107】

ある実施態様では、結合剤は免疫毒素である(例えば、抗体-毒素接合体、または抗体-薬剤接合体)。免疫毒素の非限定的例としては、抗体-アントラサイクリン接合体(Braslawsky G.R. et al., 欧州特許第EP0398305号)、抗体-サイトカイン接合体(Gilles S.D., PCT公報W09953958)、および、モノクロナール抗体-PE接合体(Roffler S.R. et al., Cancer Res. 51:4001-4007, 1991)が挙げられる。

【0108】

さらに別の局面で、本発明は、細胞傷害性薬剤、ビメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する結合剤、および、製薬学的受容可能な担体を含む治療組成物を提供する。このような製薬学的に受容可能な担体の非限定的例が、さらに詳細に標準的教科書、Remington「製薬科学と実技("The Science and Practice of Pharmacy")」、Gennaro et al.(編)、20版、Lippincott Williams & Wilkins、フィラデルフィア、ペンシルバニア州、2001(ISBN 0-683-306472)に記載されている。ある実施態様では、結合剤の結合は、損傷細胞に対して、その細胞が薬剤感受性であると、多剤耐性を持つものであるとを問わず、有毒である。ある実施態様では、結合剤の結合は、新生細胞に対して、その細胞が薬剤感受性であると、多剤耐性を持つものであるとを問わず、有毒である。ある実施態様では、組成物の結合剤は動作的に毒素に連結される。

20

【0109】

治療組成物を調製するための実際法は、当業者には既知であるか明白であり、また、Remingtonの「製薬科学と実技」2001(上記)および「剤形と薬剤搬送システム("Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems")」、6版、Williams & Wilkins(1995)にさらに詳細に記載されている。本発明の治療組成物は、限定を意図することなく、錠剤、カプセル、散剤、水剤、またはエリキシル剤を含む、投与に好適な任意の剤形として存在してよい。

30

【0110】

本発明の治療組成物の細胞傷害性薬剤は、全ての細胞に対して傷害性を持つ必要はないことに注意されたい。ある実施態様では、治療組成物が、損傷細胞の存在によって引き起こされる病気を患う患者に対して投与されている場合、治療組成物の細胞傷害性薬剤は、抗病的、または抗菌的薬剤である。ある実施態様では、損傷細胞が病原体(例えば、ウイルス、細菌、または多細胞寄生生物)に感染しており、その感染によって病気が生じている場合、治療組成物の細胞傷害性薬剤は抗病的剤である。損傷細胞が病原体に感染している場合、感染病原体に依存して異なる薬剤の非限定的例としては、アシクロビル、アンフォテリシン、アンピシリン、アントラサイクリン、b-ラクタム抗生物質、セファロチン、クロラムフェニコール、クロロキン(CQ)、シドフォビル(CDV)、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、フルコナゾール、5フルシトシン、フルオロキノロン、フォスカルネット、ガンシクロビル、ハロファントリン、イトラコナゾール、ラミブジン、マクロライド類、メフロキン、メシシリン、メトロニダゾール、ミコナゾール、ネルフィナビル、オフロキサシン、ペニシリン、プリマキン、キノリン、ストレプトマイシン、スルフ

40

50

オナミド類、テイコブラニン、テルピナフィン、テトラサイクリン、バンコマイシン、ボリコナゾールが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。このような薬剤の治療有効量は、通常の練度を持つ医師および薬剤師には既知である。さらに、このような情報は、薬剤のメーカー、または、「医師の机上参考書（"Physician's Desk Reference"）」、Medical Economics Co.（毎年出版される）から入手することが可能である。

【0111】

ある実施態様では、治療組成物が、新生細胞の存在によって引き起こされるガンを患う患者に投与されている場合、治療組成物の細胞傷害性薬剤は抗ガン剤である。そのような抗ガン剤としては、限定を意図することなく、化学療法剤および放射治療剤が挙げられる。このような抗ガン剤の非限定的例としては、アクチノマイシン、アドリアマイシン（AR）、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、プスルファン、カペシタピン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロフォスファミド、シタラピン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドセタキセル、ドキシソルピシン（DOX）、エポエチン、エトポシド、フルダラピン、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イダルピシン、イフォスファミド、イマチニブ、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン（MITO）、ミトテイン、ミトキサントロン、パクリタクセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タキソール、テニポシド、トポテカン、ビンブラスチン（VLB）、ピンクリスチン、および、ビノレルピンが挙げられる。このような薬剤の治療有効量は、通常の練度を持つ医師および薬剤師には既知である。さらに、このような情報は、薬剤のメーカー、または、「医師の机上参考書（"Physician's Desk Reference"）」、Medical Economics Co.（毎年出版される）から入手することが可能である。

10

20

【0112】

別の局面で、本発明は、損傷細胞の存在によって引き起こされる疾患を患う患者を治療する方法を提供する。この方法は、患者に対して、治療的有效量の薬剤および、ビメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する結合剤の治療的有效量を投与することを含む。ある実施態様では、結合剤は、多剤耐性を有する損傷細胞を殺戮するが、一方、薬剤は、薬剤感受性を持つ損傷細胞を殺戮する。もちろん、ビメンチンタンパクは、薬剤感受性損傷細胞でも中等レベルで発現されているから、ある実施態様では薬剤と異なる結合剤は、薬剤感受性損傷細胞をも殺す。この方法によれば、未処置の患者に比べて、病気における患者の予後は改善される。ある実施態様では、未処置患者は結合剤を服用しないが、薬剤は服用する。「未処置患者」または「コントロール患者」とは、結合剤は服用しないが、薬剤は服用する患者、あるいは、治療を全く受けない（すなわち、結合剤も薬剤も服用しない）患者である。薬剤と結合剤とは、異なる時点で別々に任意の順序で投与されてもよいし、あるいは、一緒に投与されてもよい。ある実施態様では、患者はヒトである。

30

【0113】

ある実施態様では、患者の損傷細胞は病原体に感染される。特定の実施態様では、病原体はウイルス、細菌、または寄生生物（HIV、西ナイルウイルス、およびデングウイルス；ミコバクテリア、リケッチア、およびクラミジア；プラスモディウム、リーシュマニア、およびタキソプラズマ）である。

40

【0114】

別の局面では、本発明は、新生細胞の存在によって引き起こされる疾患（例えば、ガン）を患う患者を治療する方法を提供する。この方法は、患者に対して、治療的有效量の薬剤および、ビメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する結合剤の治療的有效量を投与することを含む。ある実施態様では、結合剤は、多剤耐性を有する新生細胞を殺戮するが、一方、薬剤は、薬剤感受性を持つ新生細胞を殺戮する。ビメンチンタンパクは、薬剤感受性新生細胞でも中等レベルで発現されているから、ある実施態様では薬剤と異なる結合剤は、薬剤感受性新生細胞をも殺す。この方法によれば、未処置の患者に比べて、病気における患者の予後は改善される。ある実施態様では、未処置患者は治療を全く受けない（すなわち、結合剤も薬剤も服用しない）。薬剤と結合剤（例えば、抗体）とは、異

50

なる時点に別々に任意の順序で投与されてもよいし、あるいは、一緒に投与されてもよい。ある実施態様では、患者はヒトである。

【0115】

ある実施態様では、患者の新生細胞は、乳ガン細胞、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞である。

【0116】

ある実施態様では、結合剤は毒素に動作的に連結される。このような毒素の非限定的例は前述した通りである。

【0117】

本明細書で用いる「治療的有効量」とは、損傷細胞を殺戮するのに有効な用量と期間において行われる、薬剤の既知の治療法を表すのに用いられる。投与は、限定を意図することなく、静脈内、非経口的、経口的、舌下、経皮、局所、鼻腔内、眼球内、腔内、直腸内、動脈内、筋肉内、皮下、および、腹腔内を含めた任意のルートを通じて行われてよい。

【0118】

結合剤、薬剤、および/または、本発明による治療組成物の用量および投与スケジュールは、病気またはガンの症状の程度、使用される薬剤のタイプ（例えば、化学療法剤、放射療法剤、または抗生物質）、患者（例えば、患者の性別、年齢、および/または、体重）、患者の既往歴、および、治療に対する患者の反応に主に依存する。結合剤、薬剤、および/または治療組成物の用量は、単一用量または複数用量であってもよい。複数用量を用いる場合は、投与の頻度（スケジュール）は、例えば、患者、反応のタイプ、および、使用する薬剤のタイプに依存する。週に1度の投与が効果的である患者もいるし、毎日の投与、1日置きに投与、3日に1度の投与が効果的である患者もいる。専門の実務家であれば、通例の実験で、ある特定の場において、どの投与ルートが、どの投与頻度がもっとも効果的であるかを確かめることが可能であろう。

【0119】

さらに別の局面では、本発明は、患者における多剤耐性を検出する方法を提供することを特徴とする。この方法は、多剤耐性細胞を有することが疑われる患者に対し、ピメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する結合剤であって、医用画像装置によって検出可能なラベルに動作的に連結している結合剤を投与すること、および、患者をその医用画像装置またはシステムで検査することを含む。この方法によれば、医用画像装置またはシステムは、患者の多剤耐性細胞の表面に特異的に結合した結合剤（例えば、抗体）を検出する。

【0120】

医用画像装置およびシステムは、そのようなシステムによって検出可能なラベル同様、既知である。前述したように、そのようなシステムおよびラベルの一つの非限定的例は、放射標識された結合剤を検出することが可能なX線装置である。医用画像システムの他の非限定的例としては、(a)X線によるコンピュータ断層撮影装置（CT）、ポジトロン放射断層撮影装置（PET）、および、これらの技術に基づく新しい併合および改良装置[(PET+CT、スパイラルCT、単一フォトン放射CT（SPECT）、高解像度PET（マイクロPET）、および、免疫シンチグラフィ（放射標識抗体を使用（Czernin, J. and M.E. Phelps, *Ann. Rev. Med.* 53:89-112, 2002; Goldenberg, D.M., *Cancer* 80(12):2431-2435, 1997; Langer, S.G. et al. (2001) *World J. Surg.* 25:1428-1437; Middleton, M.L., Shell E.G., *Postgrad Med.* 111(5):89-90, 93-6, 2002); (b)磁気共鳴画像装置(MRI)(Helbich, T.H., *J. Radiol.*, 34:208-219, 2000; Langer, S.G. et al., *World Journal of Surgery* 25:1428-1437, 2001; Nabi, H.A. and Zubeldia, J.M., *Oncology J. Nuclear Med. Technol.*, 30(1):3-9, 2002); 超音波画像装置（US）(Harvey, C.J., et al. *Advances in Ultrasound and Clin. Radiol.*, 57:157-177, 2002; Langer, S.G. et al., *W.J. Surg.* 25:1428-1437, 2001); (c)光ファイバー内視鏡（Shelbase DE, *Curr. Opin. Pediatr.* 14:327-33, 2002); (d)ガンマシンチレーション検出装置（ガンマ放射体を検出する、例えば、192-Ir

10

20

30

40

50

)、および、ベータシンチレーション検出装置(ベータ放射体を検出する、例えば、90-Sr/Y)(Hanefeld C, Amirie, S. et al., Circulation 105:2493-6, 2002)が挙げられる。

【0121】

ある実施態様では、患者は哺乳動物、例えば、ヒトである。患者は、例えば、多剤耐性細胞の存在によって引き起こされた疾患を患っているヒトであってもよい。例えば、患者は、多剤耐性新生細胞によって引き起こされるガンを患っているヒトであってもよい。このような多剤耐性新生細胞としては、限定する意図なしに、卵巣ガン細胞、骨髄腫細胞、リンパ腫細胞、メラノーマ細胞、肉腫細胞、白血病細胞、網膜芽腫細胞、ヘパトーマ細胞、グリオーマ細胞、中皮腫細胞、または、上皮ガン細胞が挙げられる。

【0122】

ある実施態様では、多剤耐性細胞は損傷細胞であり、患者は、そのような多剤耐性損傷細胞の存在によって引き起こされる疾患を患っている。細胞が損傷される非限定的例としては、病原体(例えば、ウイルス、細菌、または寄生生物)による感染が挙げられるが、あるいは、細胞は、壊死によって損傷を被ることがある。特定の実施態様では、損傷細胞は、病原体(例えば、ウイルス、寄生生物、または細菌)によって感染される。例えば、患者は、ミコバクテリウム・ツベルクローシス(Mycobacterium tuberculosis)の多剤耐性株によって引き起こされる結核を患っているヒトであってもよい。

【0123】

本発明の実施では、別様に指示しない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組み換えDNA、および免疫学の通例の、従来技術の錬度に含まれる技術が用いられる。このような技術は文献において十分に説明されている。例えば、「分子クローニング-実験室マニュアル(“Molecular Cloning A Laboratory Manual”)」、第2版、Sambrook, Fritsch and Maniatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989);「DNAクローニング(“DNA Cloning”)」、IおよびII巻(D.N. Glover編、1985);「オリゴヌクレオチド合成(“Oligonucleotide Synthesis”)」、(M.J. Gait編、1984);Mullis et al. 米国特許第4,683,195号;「核酸ハイブリダイゼーション(“Nucleic Acid Hybridization”)」、(B.D. Hames & S.J. Higgins編、1984);「転写と翻訳(“Transcription and Translation”)」、(B.D. Hames & S.J. Higgins編、1984);「動物細胞の培養(“Culture Of Animal Cells”)」、(R.L. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987);「不活化細胞と酵素(“Immobilized Cells and Enzymes”)」、(IRL Press, 1986);B. Perbel,「分子クローニングの実技ガイド(“A Practical Guide to Molecular Cloning”)」(1984);論文「酵素学の方法(“Methods In Enzymology”)」(Academic Press, Inc., ニューヨーク);「哺乳類細胞用遺伝子転送ベクター(“Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells”)」、(J.H. Miller and M.P. Calos編、1987, Cold Spring Harbor Laboratory);「酵素学の方法(“Methods In Enzymology”)」、154および155巻(Wu et al.編);「細胞および分子生物学における免疫化学的方法(“Immunochemical Methods In Cell and Molecular Biology”)」、(Mayer and Walker編、Academic Press, ロンドン、1987);「実験免疫学ハンドブック(“Handbook Of Experimental Immunology”)」、I-IV巻(D.M. Weir and C.C. Blackwell編、1986);「マウス胚の操作(“Manipulating the Mouse Embryo”)」、(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, ニューヨーク、1986)を参照されたい。

4.2 ビメンチン抗体

本発明は、ガンおよび損傷(例えば、病原体感染)細胞の検出、画像化、および治療に使用される、ビメンチンに向けられた抗体を提供する。本発明で使用される抗ビメンチン抗体は、いくつかの販売業者から入手が可能である。例えば、CHEMICON(Temecula、カリフォルニア)、および、ABR-Affinity BioReagents(Golden、コロラド州)は両方とも、抗ヒトビメンチンマウスモノクローナル、および/または、ウサギポリクローナル抗体を生産する。

【0124】

「抗体」という用語はもっとも広い意味で使用され、単一の抗ビメンチンモノクローナル

10

20

30

40

50

ルおよびポリクロナール抗体を始めとして、抗ビメンチン抗体断片（例えば、Fab、F(ab)2、およびFv）、および、ポリエピトープ特異性を有する抗ビメンチン抗体組成物（結合性および非結合性抗体を含む）を特異的にカバーする。本明細書で用いる「モノクロナール抗体」とは、実質的に均一な抗体集団、すなわち、その集団を含む個々の抗体は、少量存在するかも知れない、天然に生じる可能性のある突然変異を除いては、同一である抗体を指す。モノクロナール抗体は極めて特異的で、単一の抗原部位に向けられる。さらに、通常、様々な抗原決定基（エピトープ）に向けられた様々な抗体を含む、通例の（ポリクロナール）抗体標本と違って、各モノクロナール抗体は、抗原上の単一決定基に対して向けられる。新規のモノクロナール抗体またはその断片は、原理的には、免疫グロブリンの全クラス、例えば、IgM、IgG、IgD、IgE、IgA、または、それらのサブクラス、例えば、IgGサブクラス、あるいは、それらの混合物を意味する。IgGおよびそのサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG2b、IgG3、またはIgGMも含まれる。IgGサブタイプ、IgG1/カップおよびIgG2b/カップも実施態様として含まれる。

#### 【0125】

本明細書のモノクロナール抗体は、定常ドメインと一緒に抗ビメンチン抗体（例えば、ヒト化抗体）、重鎖と一緒に軽鎖、起源の生物種、免疫グロブリンクラス、またはサブクラス表示の如何によらず、ある生物種の鎖で、別の生物種の鎖と一緒に鎖、あるいは、異種タンパクとの融合体を始めとして、抗体断片（例えば、Fab、F(ab)2、およびFv）等の可変（超可変を含む）ドメインをスプライスすることによって生産されるハイブリッドおよび組み換え抗体を、それらが所望の生物学的活性を示す限り、含む（例えば、米国特許第4,816,567号、および、Mage & Lamoyi, 「モノクロナール抗体生産技術および応用（"Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications"）」、79-97ページ（Marcel Dekker, Inc.）、ニューヨーク（1987）を参照）。従って、修正型「モノクロナール」は、抗体の特質を、実質的に均一な抗体集団から得られるものと表示しており、何かの特定の方法による抗体の生産を要求するものと考えてはならない。例えば、本発明に従って用いられるモノクロナール抗体は、KohlerとMilstein、Nature 265:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって製造されてもよいし、あるいは、組み換えDNA法（米国特許第4,816,567号）によって製造されてもよい。「モノクロナール抗体」はまた、例えば、McCafferty等、Nature 348:552-554(1990)に記載される技術を用いて生成されるファージライブラリーから単離されてもよい。

#### 【0126】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒト免疫グロブリンから得られた配列を最小限含む、特異的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、または、その他の、抗体の、抗原結合配列）である。ヒト化抗体は、大部分は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であるが、そのレシピエント抗体の相補性決定領域（CDR）の残基が、所望の特異性、アフィニティー、および容量を持つ、非ヒト生物種、例えば、マウス、ラット、またはウサギのCDRの残基（ドナー抗体）によって置換される。ある場合、ヒト免疫グロブリンのFv枠組み領域（FR）残基は、対応する非ヒトFR残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、輸入されたCDRまたはFR配列にも認められない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体パフォーマンスをさらに微調整し、最適化するために実行される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1個の、典型的には2個の可変ドメインの、実質的には全てを含み、その際、CDR領域の全て、または実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、FR残基の全て、または実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンの共通配列の残基となる。ヒト化抗体はまた、要すれば随意に、免疫グロブリンの定常域（Fc）の、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常域の少なくとも一部を含む。

#### 【0127】

ビメンチン、あるいは、抗ビメンチンモノクロナール抗体またはその断片は、原理的には、全ての免疫グロブリンクラス、例えば、IgM、IgG、IgD、IgE、IgA、またはそのサブクラス、例えば、IgGサブクラス、または、それらの混合物を意味する。IgGおよびそのサ

ブクラスとは、例えば、IgG1、IgG2、IgG2a、IgG3、またはIgGMである。IgGサブタイプ、IgG1/カッパおよびIgG2b/カッパも実施態様として含まれる。言及されてもよい断片は皆、1個または2個の抗原相補性結合部位を備えた、切断された、または、修飾された抗体断片である。この相補性決定部位は、抗体に対応し、軽鎖および重鎖によって形成される結合部位を有する抗体部分、例えば、Fv、Fab、またはF(ab')<sub>2</sub>断片、または、1本鎖断片のように、哺乳類ビメンチンに対して高い結合度および結合活性を示す。切断された2本鎖断片とは例えば、Fv、Fab、またはF(ab')<sub>2</sub>である。これらの断片は、例えば、酵素手段によって、パインまたはペプシンのような酵素によって抗体のFc部分を除去することによって、化学的酸化によって、または、抗体遺伝子の遺伝的操作によって入手することが可能である。また、遺伝子操作による、切断されていない断片を使用することも可能であるし、有利である。抗ビメンチン抗体またはその断片は、単独で用いてもよいし、混合して用いてもよい。

10

**【0128】**

好都合にも、新規抗体、抗体断片、その混合物または誘導体は、解離定数値が約 $1 \times 10^{-11}$  M (0.01nM) から約 $1 \times 10^{-8}$  M (10nM)、または約 $1 \times 10^{-10}$  M (0.1nM) から約 $3 \times 10^{-9}$  M (3nM) の長い範囲に渡るビメンチンに対する結合アフィニティーを持つ。

**【0129】**

遺伝子操作用抗体遺伝子は、例えば、ハイブリドーマ細胞から、熟練した研究者には既知のやり方で単離が可能である。この目的のために、抗体生産細胞を培養し、細胞の光学的密度が十分になったら、mRNAを既知のやり方で細胞から分離する、すなわち、細胞をグアニジニウムチオシアネートによって分解し、酢酸ナトリウムで酸性化し、フェノール、クロロフォルム/イソアミルアルコールで抽出し、イソプロパノールで沈殿させ、かつ、エタノールで洗浄することによって分離する。次に、このmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。合成されたcDNAは、適当な動物、真菌、細菌、またはウィルスベクターの中に、直接または、遺伝操作の後に、例えば、部位指向性突然変異、挿入、逆転、欠失、または塩基交換の導入の後に挿入し、適当な宿主生物において発現させることが可能である。好ましいものは、遺伝子のクローニングのためには、細菌または酵母ベクター、例えば、pBR322、pUC18/19、pACYC184、ラムダ、または、酵母ミューベクターで、発現のためには、大腸菌のような細菌、または、サッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のような酵母である。

20

30

**【0130】**

本発明はさらに、ビメンチン抗体を合成する細胞に関する。そのようなものとして、前述のような形質変換後の、動物細胞、真菌細胞、細菌細胞、または酵母細胞が挙げられる。ハイブリドーマ細胞またはトリオーマ細胞が有利であるが、ハイブリドーマ細胞が好適である。このハイブリドーマ細胞は、例えば、既知のやり方で生産が可能である。すなわち、動物をビメンチンで免疫化し、抗体生産B細胞を単離し、これらの細胞の中からビメンチン結合性抗体を選択し、その後これらの細胞を、例えば、ヒト、または動物の、例えば、マウス骨髄腫細胞、ヒトリンパ腫様細胞またはヘテロハイブリドーマ細胞 (例えば、Koeler et al., (1975) Nature 256:496を参照) と融合させ、あるいは、これらの細胞に適当なウィルスを感染させて、恒久細胞系統を生産する。融合によって生産されたハイブリドーマ細胞系統は特に有用であり、マウスハイブリドーマ細胞系統は極めて有用である。本発明のハイブリドーマ細胞系統は、IgGタイプの抗体を分泌する。本発明のmAb抗体の結合は、高い親和度をもってビメンチンに結合する。

40

**【0131】**

本発明はさらにこれらの抗ビメンチンの誘導体も含む。それらの誘導体は、製剤としての使用に関連する1種以上の性質、例えば、血清安定性または生産効率を変化させながら、そのビメンチン結合活性は維持していることが好ましい。このような抗ビメンチン抗体誘導体の例として、抗体の抗原結合領域から得られたペプチドや、ペプチド様物質；固相または液相担体、例えば、ポリエチレングリコール、ガラス、合成ポリマー例えばポリアクリルアミド、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、または天然ポリマー例え

50

ばセルロース、セファロースまたはアガロースのような担体に結合される抗体、断片またはペプチド；または、酵素、毒素、あるいは放射性または非放射性マーカー、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{55}\text{Fe}$ 、 $^{59}\text{Fe}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ （テクネチウムの転移可能な同位元素）、 $^{75}\text{Se}$ を含む接合体；または、蛍光/化学発光ラベル、例えば、ローダミン、フルオレセイン、イソチオシアネート、フィコエリスリン、フィコシアニン、フルオレスカミン、金属キレート剤、アビジン、ストレプトアビジン、またはビオチンのようなラベルに共有的に結合した抗体、断片またはペプチドがある。

#### 【0132】

新規抗体、抗体断片、その混合物および誘導体は、直接に使用が可能である、あるいは、乾燥後、例えば、凍結乾燥後、前述の担体に付着後、または、製剤生産に必要な、他の製薬活性および補助物質との処方後に使用が可能である。言及してもよい活性および補助物質の例としては、他の抗体、抗微生物または静微生物作用を持つ抗菌活性物質、例えば、抗生物質全般またはスルフォナミド類、抗腫瘍剤、水、バッファー、生食液、アルコール、油脂、ワックス、不活性ベヒクル、または、非経口製剤につきもののその他の物質、例えば、アミノ酸、増粘剤、または糖類が挙げられる。これらの製剤は、病気のコントロール、好ましくは関節障害、好適には関節軟骨の障害をコントロールするために使用される。

10

#### 【0133】

本発明の抗ビメンチン抗体は、経口的に、または、非経口的に、皮下に、筋肉内に、静脈内に、または、腹腔内に投与することが可能である。

20

#### 【0134】

抗体、抗体断片、それらの混合物または誘導体は、直接、または、固相または液相担体、酵素、毒素、放射性または非放射性ラベルとの結合後、あるいは、前述のような蛍光/化学的発光ラベルとの結合後に使用することが可能である。ビメンチンは、広範な細胞タイプにおいて、特に新生細胞において検出することが可能である。本発明のヒトビメンチンモノクローナル抗体は下記のようにして獲得してもよい。当業者であれば、ビメンチンを入手するには他の等価的な過程も利用が可能であり、それらも本発明に含められることを認識するであろう。

#### 【0135】

先ず、哺乳動物をヒトビメンチンで免疫化する。精製されたヒトビメンチンは、Sigma（セントルイス、ミズーリ州、カタログA6152）を始め、他の販売業者から購入することが可能である。ヒトビメンチンは、ヒト胎盤組織から簡単に精製することが可能である。さらに、高純度ビメンチン免疫原物質を入手するための免疫アフィニティー精製法が知られる（例えば、Vladutiu et al., (1975)5:147-59 Prep. Biochem.を参照）。抗ヒトビメンチン抗体を生産するのに使用される哺乳動物は限定されないが、霊長類、げっ歯類例えばマウス、ラット、またはウサギ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、またはイヌであってもよい。

30

#### 【0136】

次に、脾臓細胞のような抗体産生細胞を免疫化された動物から取り出し、骨髄腫細胞と融合する。この骨髄腫細胞は従来技術で既知である（例えば、p3x63-Ag8-653, NS-0, NS-1 またはP3U1細胞を使用してもよい）。細胞融合操作は、良く知られた従来法で実施してもよい。

40

#### 【0137】

細胞は、細胞融合操作を実施された後、HAT選択培地で培養されて、ハイブリドーマが選択される。次に、抗ヒトモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマについてスクリーニングが行われる。このスクリーニングは、例えば、サンドイッチELISA（酵素免疫定量法）等によって実施することが可能である。この時、生産されたモノクローナル抗体は、ヒトビメンチンが不動化されたウェルに結合される。この場合、二次抗体として、免疫化された動物の免疫グロブリンに対して特異的な抗体で、酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ等で標識された抗体を用いてもよい。このラベルは、標識酵素をその基質と反応させて、

50

発色を測定することによって検出してもよい。基質として、3,3-ジアミノベンジジン、2,2-ジアミノビス-*o*-ジアニシド、4-クロロナフトール、4-アミノアンチピリン、*o*-フェニレンジアミン等が生産されてもよい。

【0138】

前述の操作により、抗ヒトビメンチン抗体を生産するハイブリドーマを選択することが可能である。次に、この選択されたハイブリドーマを、従来の制限希釈法または軟寒天法によってクローンする。要すれば、このクローンしたハイブリドーマを、血清含有または血清無添加培養液を用いて大規模に培養してもよいし、あるいは、マウスの腹腔に接種して、腹水から回収して、多数のクローンハイブリドーマを得るようにしてもよい。

【0139】

次に、この選択された抗ヒトビメンチンモノクロナール抗体の中から、細胞表面ビメンチンに結合する能力を持つものを選び、その後の分析と操作に用いる。

【0140】

ここで得られたモノクロナール抗体は、定常ドメインと一緒の抗ビメンチン抗体（例えば、ヒト化抗体）、重鎖と一緒の軽鎖、起源の生物種、免疫グロブリンクラス、またはサブクラス表示の如何によらず、ある生物種の鎖で、別の生物種の鎖と一緒の鎖、あるいは、異種タンパクとの融合体を始めとして、抗体断片（例えば、Fab、F(ab)<sub>2</sub>、およびFv）等の可変（超可変を含む）ドメインをスプライスすることによって生産されるハイブリッドおよび組み換え抗体を、それらが所望の生物学的活性を示す限り、含む（例えば、米国特許第4,816,567号、および、Mage & Lamoyi, 「モノクロナール抗体生産技術および応用（" Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications"）」、79-97ページ（Marcel Dekker, Inc.）、ニューヨーク（1987）を参照）。

【0141】

従って、「モノクロナール」という用語は、抗体の特質が、実質的に均一な抗体集団から得られることを示しており、何かの特定の方法による抗体の生産を要求するものと考えてはならない。例えば、本発明に従って用いられるモノクロナール抗体は、KohlerとMilstein、Nature 265:495(1975)によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって製造されてもよいし、あるいは、組み換えDNA法（米国特許第4,816,567号）によって製造されてもよい。「モノクロナール抗体」はまた、例えば、McCafferty等、Nature 348:552-554(1990)に記載される技術を用いて生成されるファージライブラリーから単離されてもよい。

【0142】

非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の「ヒト化」形態とは、非ヒト免疫グロブリンから得られた配列を最小限含む、特異的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)<sub>2</sub>、または、その他の、抗体の、抗原結合部分配列）である。ヒト化抗体は、大部分は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であるが、そのレシピエント抗体の相補性決定領域（CDR）の残基が、所望の特異性、アフィニティー、および容量を持つ、非ヒト生物種、例えば、マウス、ラット、またはウサギのCDRの残基（ドナー抗体）によって置換される。ある場合、ヒト免疫グロブリンのFv枠組み領域（FR）残基は、対応する非ヒトFR残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、輸入されたCDRまたはFR配列にも認められない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体パフォーマンスをさらに微調整し、最適化するために実行される。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1個の、典型的には2個の可変ドメインの、実質的には全てを含み、その際、CDR領域の全て、または実質的には全ては、非ヒト免疫グロブリンのものに一致し、FR残基の全て、または実質的には全ては、ヒト免疫グロブリンの共通配列の残基となる。ヒト化抗体はまた、要すれば随意に、免疫グロブリンの定常域（Fc）の、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常域の少なくとも一部を含む。

【0143】

非ヒト抗体をヒト化する方法は従来技術でよく知られる。一般に、ヒト化抗体には、非ヒト起源から、1個以上のアミノ酸残基が導入される。この非ヒトアミノ酸残基は、よく「輸入」残基とも呼ばれる。この残基は、通常、「輸入元」可変ドメインから取り出され

10

20

30

40

50

る。ヒト化は、事実上、Winterおよび共同研究者達の方法に従って ( Jones et al., (1986) Nature 321:522-525; Riechmann et al., (1988) Nature, 332:323-327; および Verhoeyen et al., (1988) Science 239:1534-1536)、げっ歯類のCDRまたはCDR配列によって、ヒト抗体の対応配列を置換することによって実行される。従って、このような「ヒト化」抗体は、実質的に元のヒト可変ドメイン未満のものが、非ヒト動物種由来の対応配列によって置換されたキメラ抗体である。実際上は、ヒト化抗体は、通常、いくつかのCDR残基と恐らくいくつかのFR残基とが、げっ歯類抗体の類似部位由来の残基によって置換されたヒト抗体である。

#### 【0144】

軽鎖のものにしる重鎖のものにしる、ヒト化抗体製造に使用されるヒト可変ドメインの選択は、抗原性を低減させるに当たって極めて重要である。所謂「最適適合」法では、げっ歯類抗体の可変ドメインの配列が、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングされる。次に、げっ歯類のものにもっとも近似するヒト配列が、ヒト化抗体のヒトの枠組み (FR) として受容される (Sims et al., (1993) J. Immunol., 151:2296; および Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol., 196:901)。もう一つの方法は、軽鎖または重鎖のある特定のサブグループの全ヒト抗体の共通配列から得た特定の枠組みを用いる。同じ枠組みをいくつかの別々のヒト化抗体に使用することも可能である (Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 89:4285; および Presta et al., (1993) J. Immunol., 151:2623)。

#### 【0145】

さらに、抗体は、抗原に対する高い親和性、およびその他の好ましい生物学的性質を保持したままヒト化されることが重要である。この目的を達成するために、ある方法によれば、親配列とヒト化配列の3次元モデルを用いて、親配列と、様々の概念的ヒト化生産物とを分析するという工程によってヒト化抗体が調製される。3次元免疫グロブリンモデルは普通に入手可能で、当業者には馴染みである。選択された候補の免疫グロブリン配列の、予想される3次元立体構造を図示・表示するコンピュータプログラムも利用可能である。これらのディスプレイを精査することによって、候補の免疫グロブリン配列の機能における残基の予想される役割に関する分析、すなわち、候補の免疫グロブリンの、抗原に対する結合能に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、FR残基を選択し、共通・輸入配列から取り出して、所望の抗体特性、例えば、標的抗原 (単複) に対する親和度の増大が実現されるように結合することが可能となる。一般に、CDR残基が、抗原結合に対して直接に、もっとも実質的に関与する。

#### 【0146】

ビメンチンに向けられたヒト抗体も本発明に含まれる。このような抗体は、例えば、ハイブリドーマ法によって製造することが可能である。ヒトモノクローナル抗体生産のための、ヒト骨髓腫細胞、およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞系統については、例えば、Kozbor (1984) J. Immunol., 133, 3001; Brodeur et al., 「モノクローナル抗体の生産技術と応用 (" Monoclonal Antibody Production Technique and Applications ")」、51-63ページ、(Marcel Dekker, Inc., ニューヨーク、1987); および Boemer et al., (1991) J. Immunol., 147:86-95に記載されている。このようなヒト抗体製造のための特定方法、例えば、ファージディスプレイ、トランスジェニックマウス工法、および/または、インビトロディスプレイ法、例えばリボソームディスプレイまたは共有結合ディスプレイについても記載されている (Osbourn et al. (2003) Drug Discov. Today 8:845-51; Maynard and Georgiou (2000) Ann. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76; および、米国特許第4,833,077、5,811,524、5,958,765、6,413,771、および、6,537,809号を参照)。

#### 【0147】

現在では、免疫化によって、内因性免疫グロブリン生産欠如のまま、ヒト抗体の全レパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物 (例えば、マウス) を生産することが可能である。例えば、キメラの、生殖系列突然変異マウスにおいて、抗体重鎖連結領域 (JH) 遺伝子のホモ欠失により、内因性抗体生産の完全抑制がもたらされることが記

10

20

30

40

50

載されている。このような生殖系列突然変異マウスに、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを転送することによって、抗原チャレンジに対してヒト抗体の生産がもたらされる（例えば、Jakobovits et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90:2551; Jakobovits et al., (1993) Nature, 362:255-258; およびBruggermann et al., (1993) Year in Immuno., 7:33を参照）。

#### 【0148】

別に、ファージディスプレイ法（McCafferty et al., (1990) Nature, 348:552-553）を用いて、免疫化されていないドナー由来の免疫グロブリン可変（V）ドメインの遺伝子レパートリーから得られた、ヒト抗体および抗体断片をインビトロで生産することが可能である。この方法によれば、抗体Vドメイン遺伝子レパートリーは、繊維状バクテリオファージ、例えば、M13またはfdの大または小コートタンパク遺伝子に読み枠が合致するようにクローンされ、ファージ粒子の表面に機能的抗体断片としてディスプレイされる。繊維状粒子は、ファージゲノムの1本鎖DNAコピーを含んでいるので、抗体の機能的性質に基づく選択によって、その性質を示す抗体をコードする遺伝子の選択が実現される。従って、ファージは、B細胞の性質のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、様々な方式で実行が可能である（総覧については、例えば、Johnson et al., (1993) Curr. Opin. in Struct. Bio., 3:564-571を参照）。V遺伝子セグメントのいくつかの供給試料がファージディスプレイに使用が可能である。例えば、Clackson等((1991) Nature, 352:624-628)は、免疫化したマウスの脾臓から得られたV遺伝子のランダムな組み合わせによる小規模ライブラリーから、抗オキサゾロン抗体から成る多様なアレイを単離した。免疫化されていないヒトドナーからV遺伝子のレパートリーを構築すること、および、多様な抗原アレイ（自己抗原を含む）に対する抗体を単離することも、Marks等((1991) J. Mol. Biol., 222:581-597, またはGriffith et al., (1993) EMBO J., 12:725-734)によって記載される技術に事実上従って実行することが可能である。

10

20

#### 【0149】

天然の免疫反応では、抗体遺伝子は、高速で（体細胞性高速突然変異）突然変異を蓄積する。導入された変化のいくつかはより高い親和度を与え、高親和度の表面免疫グロブリンを提示するB細胞は好んで複製され、その後の抗原チャレンジの際に分化する。この自然の過程は、「チェーンシャッフリング」という名で知られる技術を用いて模倣することができる（Marks et al., (1992) Bio/Technol., 10:779-783参照）。この方法では、ファージディスプレイで得られた「一次」ヒト抗体の親和度を、重鎖・軽鎖のV領域遺伝子を、非免疫化ドナーから得られたVドメイン遺伝子の天然に見られる変異種のレパートリー（レパートリー）で順次置換することによって向上させることが可能である。この技術によって、nMの範囲の親和度を持つ抗体および抗体断片の生産が可能になる。大規模なファージ抗体レパートリーを製造するための戦略がWaterhouse等((1993) Nucl. Acids Res., 21:2265-2266)によって記載されている。

30

#### 【0150】

遺伝子シャッフリングは、げっ歯類抗体からヒト抗体を誘導するのに用いることも可能であり、その場合、ヒト抗体は、開始のげっ歯類抗体と相似の親和度と特異性を有する。別名「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法によれば、ファージディスプレイ法によって得られたげっ歯類抗体の、重鎖または軽鎖Vドメイン遺伝子は、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーによって置換されて、げっ歯類-ヒトキメラを形成する。抗原に基づいて選択することにより、機能的抗原結合部位を回復可能とするヒト可変域が単離される、すなわち、エピトープが結合相手の選択を支配する。この過程を繰り返して残存するげっ歯類Vドメインを置換していくと、ヒト抗体が得られる（1993年4月1日公刊のPCT W093/06213参照）。従来の、CDR移植によるげっ歯類抗体のヒト化と違って、この技術によって、げっ歯類起源の枠組みまたはCDR残基を全く持たない、完全にヒト的な抗体が得られる。

40

#### 【0151】

本発明の前述のモノクローナル抗体を用いることによって、サンプル中のヒトビメンチ

50

ンを検出・定量することが可能である。サンプル中のヒトビメンチンの検出または定量は、本発明のモノクロナール抗体とヒトビメンチンとの間の特異的結合反応を利用したイムノアッセイによって実行が可能である。従来技術において各種イムノアッセイがよく知られているが、その内から任意に選ばれたものの使用が可能である。イムノアッセイの例としては、モノクロナール抗体と別のモノクロナール抗体を、それぞれ、一次および二次抗体として用いるサンドイッチ法、モノクロナール抗体とポリクロナール抗体を一次および二次抗体として用いるサンドイッチ法、金コロイドを用いる染色法、凝集法、ラテックス法、および、化学的発光が挙げられる。これらの内、特に好ましいのはサンドイッチELISAである。よく知られているように、この方法では、一次抗体は、例えば、ウェルの内壁に不動化され、次にサンプルがこの不動化一次抗体と反応させられる。洗浄後、二次抗体が、ウェル中に不動化された抗原抗体複合体と反応させられる。洗浄後、不動化された二次抗体が定量される。一次抗体としては、ヒトビメンチンと特異的に反応する抗体が好んで用いられる。

10

#### 【0152】

二次抗体の定量は、それから二次抗体が得られた動物の免疫グロブリンに対して特異的な標識抗体（例えば、酵素標識抗体）を、その二次抗体と反応させ、次に、ラベルを測定することによって実行される。別に、標識（例えば、酵素標識）抗体を二次抗体として用い、二次抗体の定量は、二次抗体上のラベルを測定することによって実行してもよい。

#### 4.3 ビメンチン結合剤

別の局面で、本発明は、ビメンチンタンパクまたはその断片に対して特異的に結合する結合剤を提供する。本明細書で用いる「特異的に結合する」とは、結合剤が、ビメンチンタンパクまたはその断片を認識し、結合するが、サンプル中の他の分子は実質的に認識せず結合しないことを意味する。従って、本発明の結合剤は、その表面にビメンチンを発現するMDR細胞の表面には特異的に結合する。有用な結合剤は、水、生理的条件下で、または、イオン強度に関して生理的条件下と近似する条件下で、例えば、140 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>において、少なくとも約10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>、または少なくとも約10<sup>7</sup>M<sup>-1</sup>、または少なくとも約10<sup>8</sup>M<sup>-1</sup>、または少なくとも約10<sup>9</sup>M<sup>-1</sup>の親和度で、ビメンチンタンパクと会合を形成する。本明細書で用いる「結合剤」は、ビメンチンタンパクまたはその断片と特異的に結合する、または付着する分子である。

20

#### 【0153】

結合剤は、それがビメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する限り、何か特定のサイズである必要はないし、何か特定の構造を持つ必要もない。従って、「結合剤」とは、それがビメンチンタンパクまたはその断片に特異的に結合する限り、任意の領域（例えば、3次元構造、アミノ酸配列、または特定の小型化学基）に特異的に結合または付着する分子である。結合剤の非限定的例としては、天然のリガンド（例えば、ホルモンまたはGTP）を始め、合成の小分子、薬品、核酸、ペプチド、および、ホルモン・抗体のようなタンパク、およびそれらの部分が挙げられる。

30

#### 【0154】

従来技術で、非抗体ビメンチン結合剤の例がいくつか知られている。例えば、修飾されたLDLは、Kdが約1.7 × 10<sup>-7</sup>Mの親和度（Kaが約5.9 × 10<sup>6</sup>M<sup>-1</sup>に一致）でビメンチンに対して特異的に結合することが示されている(Heidenthal et al., (2000) Biochem. Biophys. Res. Comm. 267:49-53を参照)。修飾されたLDLは、要すれば随意に、酸化・アセチル化LDLであってもよい。このような修飾型LDLの生産法は従来技術で既知である。例えば、酸化LDLは、EDTA無添加、O<sub>2</sub>-飽和PBSに溶解した5 μM CuSO<sub>4</sub>とLDLをインキュベートすることによって調製が可能である(Hrboticky et al., (1999) Arterioscler. Throm. Basc Biol. 19:1267-75)。酸化LDLのアセチル化およびヨード化は、従来技術で既知の方法によって実行が可能である(Basu et al. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3178-82) (アセチル化) およびBilheimer et al. (Biochem. Biophys. Acta 260:212-21 (ヨード化)を参照)。非抗体ビメンチン結合剤の他の例としては、NIK1タンパク(米国特許第6,476,193号) およびSNAP23タンパク(Faigle et al. (2000) Mol. Biol. Cell. 11:3485-3494を

40

50

参照)を始め、デスミン、グリア繊維性酸性タンパクおよびペリフェリン、フィンブリン、RhoA-結合性キナーゼアルファ、および、タンパクフォスファターゼ2Aが挙げられる。ビメンチンそのものも、自己会合によってマルチマーとなることが知られており、従って、これも非抗体ビメンチン結合剤となる。

#### 4.4 ビメンチン標的診断法

本発明はさらに、MDR腫瘍性または損傷細胞を持つ患者の早期特定を可能とする。例えば、そのような細胞を持つと特定された患者が、ガンの寛解期の患者である場合、あるいは、ガン(例えば、乳ガン、卵巣ガン、前立腺ガン、白血病等)を現に治療されている場合、本発明は、そのガンの復帰および/または進行の前にこれらの患者の特定を可能とするばかりでなく、薬剤による治療中これらの患者を監視し、そうすることによって治療スケジュールの変更を可能とする。同様に、このような細胞を持つと特定された患者が、感染症で治療されている、または、かつて感染症(例えば、B型肝炎)で治療を受けた無症状患者である場合、本発明は、症状の復帰の前にこれらの患者の特定を可能とするばかりでなく、もしもそのようなMDR細胞が検出された場合、治療スケジュールの変更を可能とする。さらに、本発明の診断応用によって、細胞表面ビメンチンマーカを用いることにより、腫瘍性、MDR腫瘍性または損傷(例えば、病原体感染)細胞の診断および画像化が可能となる。

##### 【0155】

本発明の診断応用としては、ビメンチン結合剤、例えば、抗ビメンチン抗体に接合させたプローブ、および他の検出剤が挙げられる。本明細書で用いる「検出可能な標識」とは、本発明の結合剤が、検出可能な機能基に動作的に連結することを意味する。「動作的に連結する」とは、機能基が、共有か、または、非共有(例えば、イオン)結合によって結合剤に付着されることを意味する。共有結合を造る方法は既知である(例えば、Wong, S. S., 「タンパク共役接合と架橋の化学( " Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking " )」、CRC Press 1991; Burkhardt et al., 「アミノ架橋剤、アミノプラストの化学と応用( " The Chemistry and Application of Amino Crosslinking Agents or Aminoplasts " )」、John Wiley & Sons Inc., ニューヨーク、ニューヨーク州、1999における一般的プロトコル参照)。

##### 【0156】

本発明によれば、本発明の検出可能となるように標識された結合剤は、検出可能な機能基と共役結合した結合剤を含む。本発明の、別の検出可能となるように標識された結合剤は融合タンパクであり、その場合一方は結合剤で、他方は検出可能なラベルである。検出可能標識結合剤のさらに別の非限定的例は、結合剤と、第2機能基に対して高い親和度を持つ第1機能基を含む第1融合タンパク、および、第2機能基と検出可能なラベルを含む第2融合タンパクである。例えば、ビメンチンタンパクに特異的に結合する結合剤は、ストレプトアビジン機能基に動作的に連結されてもよい。フルオレセイン機能基に動作的に連結されるピオチン機能基を含む第2融合タンパクを結合剤-ストレプトアビジン融合タンパクに添加してもよい。その場合、第2融合タンパクが、結合剤-ストレプトアビジン融合タンパクに結合することによって、検出可能に標識された結合剤(すなわち、検出可能なラベルに動作的に連結された結合剤)がもたらされる。

##### 【0157】

本発明の検出可能なラベルは、追跡が可能な機能基であり、限定を意図することなく、蛍光色素(例えば、フルオレセイン(FITC)、フィコエリスリン、ローダミン)、化学染料、放射性化合物、化学発光化合物、磁性化合物、常磁性化合物、親磁性化合物、または、有色産物、化学発光産物、または磁性産物を生成する酵素を含む。特定の実施態様では、検出可能なラベルは、医用画像装置またはシステムにとって検出可能である。例えば、医用画像システムがX線装置である場合、X線装置によって検出される検出可能なラベルは放射能ラベル(例えば、 $^{32}\text{P}$ )である。結合剤は、検出可能な機能基に直接共役結合される必要はないことに注意されたい。例えば、それ自体が、第2の検出可能な結合剤(例えば、FITC標識ヤギ抗マウス二次抗体)によって特異的に結合される結合剤(例えば、マウス

10

20

30

40

50

抗ヒトビメンチン抗体)は、検出可能な機能基(すなわち、FITC機能基)に動作的に連結される。

【0158】

ある実施態様では、試験損傷細胞表面のビメンチンタンパクの発現レベルを測定することは、無処置の試験損傷細胞を、ビメンチンタンパクに特異的に結合する検出可能な結合剤と接触させることを含む。例えば、検出可能な結合剤が、蛍光色素に動作的に連結されることによって検出可能に標識されている場合、その蛍光色素で染まっている細胞(すなわち、その結合剤によって特異的に結合されている細胞)は、蛍光活性化細胞ソーター分析(実施例参照)、または、スライドに調製した臨床標本の通例の蛍光顕微鏡検査によって特定が可能である。

10

【0159】

医用画像装置およびシステムは、そのようなシステムによって検出可能なラベル同様、既知である。前述したように、そのようなシステムおよびラベルの一つの非限定的例は、放射標識された結合剤を検出することが可能なX線装置である。医用画像システムの他の非限定的例としては、(a)X線によるコンピュータ断層撮影装置(CT)、ポジトロン放射断層撮影装置(PET)、および、これらの技術に基づく新しい併合および改良装置[(PET+CT、スパイラルCT、単一フォトン放射CT(SPECT)、高解像度PET(マイクロPET)、および、免疫シンチグラフィ(放射標識抗体を使用(Czernin, J. and M.E. Phelps (2002), Annual Reviews of. Medicine 53:89-112, 2002; Goldenberg, D.M. (1997), Cancer 80(12):2431-2435; Langer, S.G. et al. (2001) World Journal of Surgery 25:1428-1437; Middleton, ML. and Shell EG. (2002) Postgrad Med. 111(5):89-90, 93-6,; (b)磁気共鳴画像装置(MRI)(Helbich, T.H. (2002) Journal of Radiology, 34:208-219; Langer, S.G. et al. (2001) World Journal of Surgery 25:1428-1437; Nabi, H.A. and Zubeldia, J.M. (2002) Oncology Journal of Nuclear Medicine Technology, 30(1):3-9; 超音波画像装置(US)(Harvey, C.J., et al. (2002) Advances in Ultrasound Clinical Radiology, 57:157-177; Langer, S.G. et al. (2001) World Journal of Surgery 25:1428-1437); (c)光ファイバー内視鏡(Shelbase DE (2002), Curr. Opin. Pediatr. 14:327-33); (d)ガンマシンチレーション検出装置(ガンマ放射体を検出する、例えば、192-Ir)、および、ベータシンチレーション検出装置(ベータ放射体を検出する、例えば、90-Sr/Y)(Hanefeld C, Amirie, S. et al. (2002) Circulation 105:2493-6)が挙げられる。

20

30

【0160】

ビメンチンポリペプチドに特異的に結合する標識抗体、およびその誘導体および類縁体は、細胞表面ビメンチンの異常な発現に関連する疾患および/または障害を検出、診断、または監視する診断目的のために使用が可能である。本発明は、細胞表面ビメンチンの異常発現を検出する方法であって、(a)ビメンチンに対して特異的な1種以上の抗体を用いて、個体の細胞、または細胞表面膜画分における興味のあるポリペプチドの発現をアッセイすること、および、(b)その遺伝子発現レベルを、標準遺伝子発現レベルと比較することを含み、標準発現レベルと比べた場合の、定量された細胞表面ビメンチン発現レベルの上昇または低下は異常発現を示すものとする方法を提供する。例えば、新生細胞において多剤耐性が検出されるべき場合として、比較されるべき「標準発現レベル」は、同じまたは類似の起源または細胞タイプの、非多剤耐性新生細胞である。同様に、試験細胞の新生物性が検出されるべき場合として、比較されるべき「標準発現レベル」は、同じまたは類似の起源または細胞タイプの、非新生細胞である。さらに、試験細胞(例えば、病原体感染)における「損傷」が検出されるべき場合として、比較されるべき「標準発現レベル」は、同じまたは類似の起源または細胞タイプの、非損傷細胞(例えば、未感染細胞)である。

40

【0161】

ガンに関して言うと、個体から得た生検組織または試験細胞において比較的高い量の細胞表面ビメンチンが存在することは、その病気の発達し易い性向を示すものかも知れないし、あるいは、実際の臨床症状の出現前に、その病気を検出する手段を提供する可能性がある。このタイプの比較的明瞭度の高い診断が得られると、保健専門家は、より早く予防

50

措置または思い切った処置を取ることができるから、ガンの発達またはそれ以上の進行が阻止される。

#### 【0162】

本発明の抗体は、当業者には既知の、古典的な免疫組織学的方法を用いて生物サンプルにおけるタンパクレベルを定量するのに使用が可能である（例えば、Jalkanen, M., et al. (1985) *J. Cell Biol.* 101:976-985; Jalkanen, M., et al., (1987) *J. Cell Biol.* 105:3087-3096を参照）。ビメンチンタンパクの発現を検出するのに有用な、その他の抗体法としては、イムノアッセイ、例えば、酵素免疫測定法（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）が挙げられる。適当な抗体アッセイレベルは従来技術で既知であり、酵素、例えば、グルコースオキシダーゼ；放射性同位元素、例えば、ヨウ素（ $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、硫黄（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{112}\text{I}$ ）、および、テクネチウム（ $^{99}\text{Tc}$ ）；発光ラベル、例えば、ルミノール；および、蛍光ラベル、例えば、フルオレセインとローダミン、およびビオチンが挙げられる。

10

#### 【0163】

本発明の一つの局面は、動物、例えば、哺乳類、例えば、ヒトにおける細胞表面ビメンチンの異常発現に関連する疾患または障害の検出および診断である。一つの実施態様では、診断は、a)動物の細胞表面ビメンチンに対して特異的に結合する、標識抗ビメンチン抗体、または、その他のビメンチン結合剤の有効量を、被験体に投与すること（例えば、非経口的に、皮下、または、腹腔内）；b)投与後、標識分子が、被験体の、そのポリペプチドが発現される部位に好んで集中することができるほど（かつ、未結合の標識分子が排除されて背景レベルまで降下できるほど）十分な時間待つこと；c)背景レベルを決定すること；および、d)被験体における標識分子を検出することを含み、背景レベルを上回る標識分子の検出は、その被験体が、興味のあるポリペプチドの異常な発現と関連する特定の疾患または障害を有することを示すものとする。背景レベルは、検出された標識分子の量を、特定のシステムで以前に求めた標準値と比較することを含めた種々の方法で定量することが可能である。

20

#### 【0164】

適当な検出可能な画像化機能基、例えば、放射性同位元素（例えば、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過物質、または、核磁気共鳴で検出可能な物質で標識された、ビメンチン特異的抗体または抗体部分が、障害の有無に関して検査される哺乳動物の中に導入される（例えば、非経口的に、皮下、または腹腔内）。一般に、画像化・検出用に好適な放射性同位元素としては、アルファ、ベータ、または、ガンマ放射を放射する放射性同位元素が挙げられる。ガンマ放射は現在の技術を用いて特に画像化が容易である。例は、ガリウム、インジウム、テクネチウム、イットリウム、イッテルビウム、レニウム、白金、タリウム、およびアスタチン、例えば、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{195\text{m}}\text{Pt}$ 、 $^{201}\text{Ti}$ 、および $^{211}\text{At}$ である。被験体のサイズおよび使用される画像化システムが、診断画像を生成するのに必要な画像化機能基の量を定めることが従来技術では理解されている。放射性同位元素機能基の場合、ヒト被験者には、注入される放射エネルギーは、通常、 $99\text{mTc}$ の約5から20ミリキュリーの範囲である。次に、標識抗体または抗体断片は、細胞表面ビメンチンタンパクを発現する細胞部位に好んで蓄積する。インビボ（すなわち、インサイチュ（体内））における腫瘍画像化のための試薬および方法は従来技術で既知であり、例えば、S.W. Burchiel et al. (1982)「放射標識抗体およびその断片の免疫薬理動態学（"Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments"）」、「腫瘍画像化法、ガンの放射化学的検出（"Tumor Imaging. The Radiochemical Detection of Cancer"）」、13章、S.W. Burchiel and B.A. Rhodes編、Masson Publishing Inc.)に記載されている。例えば、エンドカインアルファタンパクのインビボ画像用抗体ラベルまたはマーカーストしては、X線放射線検査、NMR、またはESRによって検出可能なものが挙げられる。X線放射線検査の場合、好適なラベルとしては、検出可能な放射線を発するが、被験体に対しては明白に有害ではない、バリウムまたはセシウムのような放射性同位元素が挙げられる。NMRおよびESR用に好適なマーカーストしては、関係のハイブリド

30

40

50

ーマの栄養素を標識することによって抗体に取り込むことが可能で、検出可能な特徴的なスピンを持つもの、例えば、重水素が挙げられる。

【0165】

使用するラベルのタイプ、および投与方式を含め、慣行を用いて最適化することが可能なくつかの変数に応じて、投与後標識分子が被験体の部位に好んで集中するのに十分な、かつ、未結合標識分子が排除されて背景レベルに降下するのに十分な時間間隔は、6から48時間、あるいは、6から24時間、あるいは、6から12時間である。別の実施態様では、投与後の時間間隔は5から20日、あるいは、5から10日である。

【0166】

ある実施態様では、病気または障害の監視は、病気または障害の診断法を繰り返すこと  
10  
によって、例えば、初回診断後1月、初回診断後6ヶ月、初回診断後1年等に行うことによ  
って実行する。

【0167】

重要なことは、標識抗ビメンチン抗体、またはその他のビメンチン結合剤は、インビボ  
走査用の既知の方法を用いて患者において検出される。これらの方法は、使用されるラベ  
ルに依存する。熟練した技術者ならば、特定のラベルを検出するのに適当な方法を判断す  
ることが可能である。本発明の診断法において使用してもよい方法と装置は、コンピュー  
タ断層撮影法（CT）、全身スキャン、例えば、ポジトロン放射断層撮影法（PET）、磁気  
共鳴画像法（MRI）、および超音波画像法が挙げられる。

【0168】

例えば、ある特定の実施態様では、抗ビメンチン抗体は放射性同位元素によって標識さ  
れ、放射線反応性外科装置によって患者の中で検出される（Thurston等、米国特許第5,44  
1,050号）。別の実施態様では、抗ビメンチン抗体は蛍光化合物で標識され、蛍光反応性  
走査装置によって患者の中で検出される。別の実施態様では、抗ビメンチン抗体はポジト  
ロン放射金属によって標識され、ポジトロン放射断層撮影法によって患者の中で検出され  
る。さらに別の実施態様では、抗ビメンチン抗体は、常磁性体ラベルによって標識され、  
磁気共鳴画像法（MRI）によって患者の中で検出される。

#### 4.5 ビメンチン標的治療法

本発明は、ビメンチンタンパクの表面マーカーは、生体の正常細胞表面には無視できる  
レベルでしか存在しないのに、新生細胞の表面には、特に、多剤耐性新生細胞では出現す  
るという事実を利用する。それと対照的に、他のマーカー、特に、P-糖タンパクや、多  
剤耐性タンパク（MRP）のようなMDRマーカーは、多種多様な正常細胞・組織の表面に、肝  
臓、腎臓、幹細胞、および、血液脳関門上皮細胞上の高レベルも含めて、様々なレベルで  
存在する。従って、本発明は、細胞表面ビメンチンに結合する結合剤による、新生細胞、  
特に、多剤耐性新生細胞に対する治療薬剤を標的狙撃する高度に特異的な方法を提供する  
。

【0169】

本発明の方法によってビメンチンに向けて狙い撃ちされる治療薬剤としては、抗代謝剤  
（例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フル  
40  
オロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロールエタミン、チオエパ  
・クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）とロムスチン（CCNU）、シクロ  
フォスファミド、ブスルファン、ジプロモマニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイ  
シンC、および、シス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイ  
クリン類（例えば、ダウノルピシン（以前のダウノマイシン）およびドキソルピシン）、  
抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミ  
トラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および、抗体細胞分裂剤（例えば、  
ピンクリスチンおよびピンブラスチン）が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。  
抗ビメンチン抗体

一つの方法では、損傷（例えば、病原体感染）、腫瘍性、および、MDR新生細胞上に発  
50

現される細胞表面発現性ビメンチンに特異的な抗ビメンチン抗体が、ガン患者の全身に投与される。抗体が腫瘍細胞に接着することによって、補体系の活性化（補体介在細胞傷害性）によって、あるいは、T細胞の活性化（抗体依存性細胞性細胞毒性）によって腫瘍細胞死がもたらされる。その他の、抗体誘発性抗腫瘍作用としては、アポトーシスの誘発、第二薬剤（例えば、抗ガン化学療法剤）の細胞傷害作用の強化、および、抗イディオタイプネットワーク反応の誘発が挙げられる。ある実施態様では、ヒト化抗ビメンチン抗体が利用される。ヒト化抗体は、ヒト患者が、抗動物（例えば、抗マウスまたは抗ラット）抗体を産生させるといふ、予想される問題点を回避する。ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来の相補性決定域を含むヒト抗体から成る。

#### 【0170】

抗体による治療法は、いくつかの症例で成功裡に使用されている。例えば、リツクシマブは、非ホジキンリンパ腫（NHL）--これは、若年および高齢集団を冒す比較的一般的な悪性腫瘍であるが--を治療するために用いられる遺伝工学的に加工されたモノクロナール抗CD20抗体である。B細胞リンパ腫の表面に通常存在するCD20抗原は、理想的標的抗原となる。なぜなら、これは、プラズマ細胞、B細胞前駆細胞、幹細胞、または樹状（抗原提示）細胞上には存在しないからである。リツクシマブ抗体（または、リツキサン）は、NHL細胞によって放出されも、取り込まれもしない、また、抗原結合後修飾を受けない。リツクシマブは、再発性、または難治性CD20陽性B細胞NHLの治療、および、低級または濾胞性リンパ腫用として、1997年FDAによって認可された（Abou-Jawde et al. (2003) Clin. Therap. 25:2121-37; およびKim (2003) Am. J. Surg. 186:264-68を参照）。この薬剤は、抗体依存性細胞傷害性を仲介することによって機能し、細胞成長を阻害し、化学的耐性細胞を毒素や化学療法に対して敏感にし、用量依存的にアポトーシスを誘発する（White et al. (2001) Annu. Rev. Med. 52:125-45; Press (1999) Semin. Oncol. 26(Suppl. 14):58-65）。

10

20

30

40

#### 【0171】

抗腫瘍抗原抗体治療法の別の例はアレムツズマブである。アレムツズマブは、成人悪性腫瘍のもっとも高頻度形であるB細胞慢性リンパ球白血病（CLL）の患者の治療のために2001年にFDAによって承認された、ヒト化抗CD52モノクロナール抗体である（Abou-Jawde et al. (2003) Clin. Therap. 25:2121-37を参照）。CD52の機能は十分に特定されていないけれども、アレムツズマブは、広範な病気の下においても腫瘍反応を引き起こすことが示されている（Ferrajoli et al. (2001) Expert Opin. Biol. Ther. 1:1059-1065）。

#### 【0172】

抗腫瘍抗原抗体治療法のさらに別の例はトラスツズマブ（ヘルセプチンとも呼ばれる）である。これは、転移性乳ガンの治療のために1998年にFDAによって承認された、ヒト化、抗HER2組み換えモノクロナール抗体である（Abou-Jawde et al. (2003) Clin. Therap. 25:2121-37; およびKim (2003) Am. J. Surg. 186:264-68を参照）。HER2は、多くの乳ガン腫瘍によって発現される、上皮成長因子受容体（EGFR）族の一つのメンバーであり、従って、この抗体療法は、固体腫瘍に対して効果的である。いくつかのランダム化、コントロール設定実験が行われ、HER2陽性乳ガン患者において、トラスツズマブで治療した場合、効力とクオリティオブライフ（人生の質）の改善が示された（Vogel et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20:719-26）。

#### 【0173】

最後に、セツキシマブは、結腸・直腸、膵臓、非小細胞肺ガン（NSCLC）、および、頭部および頸部ガンを含む、いくつかのHER1/erb-B1発現固体腫瘍を治療するのに効果的な抗HER1キメラモノクロナール抗体である（例えば、O'dwyer et al. (2002) Semin. Oncol. 29(Suppl. 14):10-17を参照）。セツキシマブは、EGFRの結合について競合し、細胞内導入を刺激することによって細胞膜から受容体を取り除き、そうすることによって増殖や転移をもたらす細胞過程を破壊する（Abou-Jawde et al. (2003) Clin. Therap. 25:2121-37参照）。

ビメンチン標的抗体およびリガンド共役複合体

50

前述の「裸の」抗体法に加えて、抗体は、生物学的な、または化学的な毒素、または放射性同位元素に共役接合、または他のやり方で「動作的に連結する」ことが可能である。抗ビメンチン抗体、またはその抗体断片は、治療的機能基、例えば、細胞毒素、例えば、静細胞的、または、殺細胞的薬剤、治療薬剤または放射性金属イオンに対して共役接合しても、またはその他のやり方で動作的に連結させてもよい。「動作的に連結される」とは、治療性機能基が、結合剤に対して、共有結合または非共有（例えば、疎水性、またはイオン）結合によって付着されることを意味する。共有結合を造る方法は既知であり（例えば、Wong, S.S., 「タンパク共役接合と架橋の化学（"Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking"）」、CRC Press 1991; Burkhardt et al., 「アミノ架橋剤、アミノプラストの化学と応用（"The Chemistry and Application of Amino Crosslinking Agents or Aminoplasts"）」、John Wiley & Sons Inc., ニューヨーク、ニューヨーク州、1999における一般的プロトコール参照）。全身投与の後、治療は、抗体によってガン細胞（またはMDRガン細胞または損傷（例えば、病原体感染）細胞）に向けられる。

#### 【0174】

本発明はさらに、ビメンチン標的要素、および有毒剤、例えば、生物学的毒素、化学的毒素、または放射性同位元素とから構成されるビメンチン標的剤を含む。細胞毒素、または細胞有毒剤は、細胞にとって有毒な全ての薬剤を含む。実例としては、パクリタクセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトプシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノール、および、プロマイシンおよびその類縁体および相同体が挙げられる。生物学的毒素は、抗体に、および、その他の腫瘍マーカー剤に共役接合される、または、遺伝学的に読み枠を合わせて融合された。このような生物学的毒素としては、リシン、ジフテリア毒素、および、シュードモナス体外毒素が挙げられる。細胞表面ビメンチンに結合後、毒素は一般に細胞膜を横断し、次に、標的細胞を殺す前に処理される。毒作用は、典型的には、活動的な生物学的毒素によるタンパク合成の抑制による。

#### 【0175】

例えば、一つの実施態様では、抗ビメンチン抗体は、コブラ毒因子に共役接合される。本発明によれば、コブラ毒因子に共役接合されたビメンチン特異的抗体を用いて、ガン、特に、ヒトの多剤耐性ガンを含むガンを治療する。抗体をコブラ毒因子に共役接合する方法は、米国特許第5,773,243号に教示されている。ある実施態様では、結合剤は免疫毒素（例えば、抗体毒素複合体または抗体薬剤複合体）である。

#### 【0176】

免疫毒素の非限定的例としては、抗体-アントラサイクリン複合体（Braslowsky G.R. et al., 欧州特許EP0398305号）、抗体サイトカイン複合体（Gilles S.D., PCT公報W09953958）、および、モノクロナール抗体-PE複合体（Roffler S.R. et al., Cancer Res. 51: 4001-4007, 1991）が挙げられる。

#### 【0177】

抗体に、他の治療機能基を共役接合する技術はよく知られる。例えば、Arnon等、「ガン治療における薬剤の免疫狙撃用モノクロナール抗体（"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy"）」、「モノクロナール抗体とガン治療（"Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy"）」における、Reisfeld等（編）、243-56ページ、(Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., 「薬剤搬送用抗体（"Antibodies For Drug Delivery"）」、「調節的薬剤搬送（"Controlled Drug Delivery"）」における、(2版)、Robinson等（編）、623-53ページ(Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, 「ガン治療における細胞傷害剤の抗体キャリアー-総覧（"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review"）」、「モノクロナール抗体'84: 生物学的・臨床的応用（"Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical A

pplications” )」、Pinchera等(編)、475-506ページ(1985);「ガン治療における放射標識抗体の治療用使用に関する分析、結果および将来性(“ Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy” )」、「ガン検出および治療のためのモノクローナル抗体(“ Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy” )」、Baldwin等(編)、303-16ページ(Academic Press 1985)、および、Thorpe等、「抗体-毒素複合体の調製と細胞毒性(“ The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates” )」、Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。これらをそれぞれ引用することにより本明細書に含める。別に、抗体は、第二抗体に共役接合し、Segalが、米国特許第4,676,980号に記載したように抗体ヘテロ接合体を形成することも可能である。なお、この特許を引用することにより本明細書に含める。

10

#### 薬剤付着

薬剤および治療剤付着・放出を実行するための方法がいくつか文献に記載されているが、可溶性ポリマー-薬剤複合体に用いられる戦略が最近総覧された(Soyez, et al. (1966) Adv. Drug Del. Rev. 21:81-106)。これら共役接合法の多くの化学が教科書に記載されている(例えば、Ref. Wong (1991) CRC Press, Boca Raton, フロリダ州)、抗体に対する付着部位。

#### 【0178】

もっとも使用されている部位は、リシン残基の  $\epsilon$ -アミノ基部位である。なぜなら、この部位は、カルボジイミドのようなアミド結合形成試薬による場合でも、反応性の高いチオール基を導入できるN-スクシニミジル-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネート(SPDP)(Carlson, et al., (1978) Biochem J. 173:723-737)のようなヘテロ二重官能基薬剤による場合でも、使用に化学的に好都合だからである。抗体は、種々の数のリシン残基を有し、これらの残基は、抗体全体に渡って分散しているので、比較的反応性の高いサブセットがあるという証拠はない。従って、活性部位のリシン残基が修飾される確率はその他の残基と同じであり、しかも修飾されれば抗体活性の喪失を招く。修飾されるリシン残基の数が多ければ多いほど、結合性喪失の確率は高まる。リシン  $\epsilon$ -アミノ基に対する結合はまた他の作用ももたらす。先ず、タンパクの正電荷を中和することは構造的作用をもたらすことがあり得るし、あるいは、抗体の可溶性にも影響する(Hudecz, et al., (1990) Biocombin. Chem. 1:197-204)。ただしこの欠点は、チオールの官能性は与えるが、電荷は変えない2-イミノチオレンのような試薬を用いることによって克服可能である(Jue, et al., (1978) Biochemistry 17:5399-5406)。最後に、修飾されるリシン残基の数は統計的であり、従って、ある範囲の数の修飾残基が、抗体分子の集団内に供給されることになり、単一標本の中に、様々な量の薬剤が付着され、結合活性の損失が生じることになる(Firestone, et al., (1996) BR96-Dox. J. Control. 39:251-259)。

20

30

#### 【0179】

修飾のための第2部位は、抗体のヒンジ領域に付着する糖残基である。これは、抗体の結合部位から離れた独特の化学的反応性を持つ部位であるから、付着には有用な領域である。この部位は、いくつかの研究グループによって、糖を過ヨウ素酸酸化してアルデヒド基を供給するのに利用されている(0' Shanessy, et al., (1984) Immunol. Lett. 8:273-277; 0' Shanessy, et al., (1987) J. Immunol. Methods 99:153-161; およびRodwell, et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2632-2636)。このアルデヒド基はいくつかの結合過程において使用することが可能である。アルデヒド基はまた、ニューラミニダーゼとグルコースオキシダーゼを含む酵素反応によって免疫グロブリンの上に生成させることも可能である(Rodwell, et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2632-2636およびStan, et al., (1999) Cancer Res. 59:115-121)。抗体はまた、新規のオリゴ糖部位を生ずるよう遺伝子工学によって修飾することも可能である。そのオリゴ糖部位は、報告では、担体-薬剤分子の付着により好都合な位置を占めるという(Qu, et al., (1998) J. Immunol. Methods 213:131-144)。

40

#### 【0180】

50

付着のための、第3の大きな可能性は、抗体内部のジスルフィド結合を介するものである。ジスルフィドリンクは、鎖内部の、また鎖同士のリンクを提供することによって抗体構造において大きな役割を果たす。抗体のドメイン構造を安定化させる鎖内リンクは、抗体鎖をまとめる鎖間ジスルフィド結合に影響を及ぼすことなく、ジチオスレイトールによって選択的に分断される。この過程は、より高い結合活性を持ち、抗体分子当たり定義された数の薬剤分子を持つ、より溶解度の高い複合体を生成するために (Willner et al., (1993) *Bioconjug. Chem.* 4:521-527) によって利用された。驚くべきことに、この過程は、抗体の安定性と免疫反応性に検出可能な影響をもたらさなかった。抗体サブクラスに依りて、利用可能な鎖内ジスルフィド部位の数には限界がある。化学的に付着される薬剤分子の数を倍増することによって、この結合部位をさらに利用するための分枝鎖ヒドラゾンリンカーの導入も報告されていない (King, et al., (1999) *Bioconjug. Chem.* 10:279-288)。

10

## 【0181】

いくつかの薬剤標的実験において抗体断片も使用されている。共役接合の観点からは、Fab'断片が、薬剤またはその他の巨大分子を付着させるために簡単に利用が可能な、単一の遊離スルフィドヒドロキシル基を抱えているという点で、特に好都合である (Hashida, et al., (1984) *J. Appl. Biochem.* 6:56-63)。

## 【0182】

もっとも単純な付着法の一つは、カルボジイミドまたは活動的エステルのようなペプチド結合形成試薬の利用である。これらは、従来からメトトレキセート (MTX) のようなカルボキシ含有薬剤を付着するのに使用されている。ポリリシン複合体に関する初期の研究から、生物分解性MTX-ポリ(-L-リシン)はやや細胞毒性を示したが、MTX-ポリ(-D-リシン)は非毒性であることが示された。これは、遊離薬剤が、ポリマーを分断することによって放出されることを示唆する (Ryser, et al., (1980) *Cancer* 45:1207-1211)。この場合、我々は、アルブミンや免疫グロブリンのような生物分子が分断されて遊離薬剤を放出するのを期待したくなる。この原理を使って、MTX-免疫グロブリン (Kanellos, et al., (1985) *J. Natl. Cancer Inst.* 75:319-332) およびMTX-HSA-免疫グロブリン (Garnett, et al., (1983) *Int. J. Cancer* 31:661-670) の両複合体が報告されている。これらの反応は明瞭な単一産物を生成せず、不安定なエステルと安定なアミド結合の混合物が形成された (Endo, et al., (1988) *Cancer Res.* 48:3330-3335 および Hudecz, et al., (1992) *Biomed. Chromatogr.* 6:128-132)。このエステル結合物質は、共役接合薬剤の最大24%を形成することが可能であり、4で20日間保存中に加水分解により徐々に複合体から放出される (Hudecz, et al., (1992) *Biomed. Chromatogr.* 6:128-132)。塩化アンモニウム、および、リソソームプロテアーゼ阻害剤ロイペプチンおよびE64によって複合体細胞傷害性が抑制されること (Garnett, et al., (1985) *Anti-Cancer Drug Design* 1:3-12) は、遊離薬剤は、リソソーム区画における変性によって放出されることを示唆した。しかしながら、HSA-MTX複合体からのMTXの放出を詳細に調べたところ (Fitzpatrick et al., (1995) *Anti-Cancer Drug Design* 10:11-24)、ラット肝臓トリトソームから放出される低分子量薬剤の量は極めて低い (55時間で5.6%) が判明した。さらに、放出物質の僅かに約10%が遊離MTXであり、残りは、薬剤から簡単に酵素的に分断されなかったアミノ酸であり、未修飾のメトトレキセートよりも細胞傷害性が有意に低かった (Rosowsky, et al., (1984) *J. Med. Chem.* 27:888-893)。これらMTXのアミノ酸誘導体を放出するように設計された複合体も、遊離MTXを放出する複合体よりも、その細胞傷害性は低かった。抗体-MTX複合体からのMTXおよびMTX誘導体の放出ははるかに低く、同じ期間で<0.05%であると推定されており、その原因は、メトトレキセートに対する低い置換比 (Rokowsky, et al., (1984) *J. Med. Chem.* 27:888-893)、および、トリトソームによる、抗体のFab領域の弱い変性 (Schneider, et al., (1981) *J. Cell Biol.*, 88:380-387) によるとされている。従って、複合体から薬剤を特異的に放出するリンカーは、標的薬剤複合体の最重要成分である。

20

30

40

## 【0183】

50

治療薬剤を抗体、またはその他の局在因子に結合させるためには、アルデヒド/シッフ塩基結合も使用が可能である。ピシナルヒドロキシル基を持つ糖残基は、過ヨウ素酸による酸化によってアルデヒド基に変換することが可能である (O' Shanessy et al., (1984) Immunol. Lett. 8:273-277)。これによって、多糖類における糖残基、例えば、デキストラン、または薬剤中の糖機能基、例えば、フルオロウリジン中のヌクレオシド糖基、または、ダウノマイシン中のアミノ糖に、より有用なアルデヒド基を挿入することが可能になる。アルデヒドは、ヒドラジドと簡単に反応してヒドラゾンを形成し、または、アミンと反応してシッフ塩基を形成する。このシッフ塩基自体は比較的不安定であるが (Cordes, et al., (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2843-2848)、開始物質を再形成することが可能であり、例えば、通常、水素化ホウ素ナトリウムまたは水素化シアンホウ素ナトリウムのような試薬によって還元されて結合を安定化させる。グルタルアルデヒドのようなジアルデヒドも、薬剤と巨大分子、または、巨大分子同士の間を架橋するのに用いられるが、この場合、産物間の結合は通常は非可逆的である (Wong, (1991) CRC Press Boca Raton, FL 101-102)。グルタルアルデヒドを架橋剤として使用することは、それがホモの二重機能性試薬であるために、好ましくない架橋産物や凝集体がすぐに形成されるという欠点を有する。

10

## 【0184】

治療薬剤を、抗体またはその他の局在因子に結合させるためには、スルフヒドリル結合も使用が可能である。ジスルフィド結合は、植物毒素の鎖を結合していることが認められ、その毒素の活性にとって必須である (Masuho, et al., (1982) J. Biochem. 91:1583-1591)。すなわち、それによって、酵素A鎖は結合鎖から解離して、原形質に入ることが可能になる。この結合の必要から、これが、細胞内区画における抗体またはポリマー分子から薬剤を放出するための可能な方法となることが示唆された。ジスルフィド結合による、メトトレキサートのポリ(-D-リシン)に対する共役接合は、細胞傷害性を有することが示された (Shen, et al., (1985) J. Biol. Chem. 260:10905-10908)。これら複合体の分断は、最初細胞表面で起こることが示されたが、エンドソームまたはリソソーム区画では起こらなかった (Freener, et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:18780-18785)。ゴルジ器官が、この分断の行われるもっとも可能性の高い部位であることが示唆された。細胞内でも分断可能ではあるが、この結合は、循環において不安定であることが示され、従って、阻害されたジスルフィド結合が生じこの問題を緩和した (Thorpe, et al., (1987) Cancer Res. 47:5924-5931; および Worrell, et al., (1986) Anti-Cancer Drug Design 1:179-188)。スルフヒドリル基による、安定で、化学的に便利な結合が要求される複合体の場合、チオエーテル結合の方がより安定で、マレイミドカップリング剤を (Hashida, et al., (1984) J. Appl. Biochem. 6:56-63 および Lau et al., (1995) Bioorg. Med. Chem. 3:1299-1304)、あるいは、イオドアセテートカップリング剤を用いることによって (Rector, et al., (1978) J. Immunol. Methods 24:321-336) 生成することが可能である。

20

30

## 【0185】

酸脆弱結合も、治療薬剤を、抗体またはその他の局在因子に結合させるために使用することが可能である。化学的に不安定な結合は、さらに酸性な条件の存在下で薬剤を放出するのに使用することが可能である。これらの条件は、健康な組織や血液より0.5-1pH単位さらに酸性であると報告されている腫瘍環境で (Lavie, et al., (1991) Cancer Immunol. Immunother. 33:223-230 および Ashby (1966) Lancet ii:312-315)、または、それぞれ6-6.8 および 4.5-5.5のpHが認められているエンドソーム/リソソーム区画を通過する際に、起こりえる。酸脆弱結合使用の大きな欠点は、これは速度依存性の現象であるのに、分断速度はpHに比例することで、pH単位の減少毎に速度における10倍差が予想される。このことは、加水分解は、常に、細胞内区画の低pHにおける高速と、血清安定のための低速の間の妥協結果であることを意味する。

40

## 【0186】

最初に記述された酸感受性結合は、ShenおよびRyser (Shen, et al., (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 102:1048-1054)によって記載されたシス-アコニチル結合であっ

50

た。まず、ダウノマイシンを無水シス-アコニチンと反応させ、次に、これを、水溶性カルボジイミドを用いてポリリシンに結合させた。この結合は、pH4で3時間未満の半減期、pH6で96時間を越える半減期を有すると報告された。しかしながら、薬剤の僅かに約50%が、アフィゲル基質から放出されたただけであった。これは、ゲル基質の、このリンカーからの酸感受性放出の原因となる、残余のシス-カルボキシル基に対する結合が不適切であるためと考えられる。この試薬使用のための最適条件が、(Hudecz, et al., (1990) *Bioconjug. Chem.* 1:197-204)によって詳細に記述されている。この放出機構の改良版も(Blaettler et al., (1985) *Biochemistry* 24:1517-1524)によって記載されている。これは毒素分子を結合するためのヘテロ二重機能因子である。この方法では、シス-アコニチンの第3カルボキシルによる共役接合が、特定のマレイミド基によって置換される。これは、シス-カルボニル基の酸放出不活性化の可能性を排除する。

10

## 【0187】

もともと毒素免疫複合体の酸感受性放出を実行するために調製された、ある範囲の酸感受性ホモ-およびヘテロ-二重機能性因子が、オルトエステル、アセタールおよびケタールとしてSrinivasacharによって記述されている(Srinivasachar, et al., (1989) *Biochemistry* 28:2501-2509)。これらは、化学免疫複合体を構築するのに有用である可能性を持つ。これらの試薬は、細胞内区画で見られるpHにおいてその加水分解速度が変動する。ヒドラゾン結合も、治療薬剤を、抗体またはその他の局在因子に結合させるために使用することが可能である。

## 【0188】

ヒドラジド誘導体も酸脆弱であり、従来からビンデシンおよびアドリアマイシン複合体を生成するのに使用されている(Laguzza, et al., (1989) *J. Med. Chem.* 32:548-555およびGreenfield, et al., (1990) *Cancer Res.* 50:6600-6607)。前者では、(Laguzza, et al., (1989) *J. Med. Chem.* 32:548-555)、まずビンデシンをヒドラジンと反応させ、次にこのヒドラジン誘導体を、抗体の酸化糖残基と反応させた。アドリアマイシン複合体では(Greenfield, et al., (1990) *Cancer Res.* 50:6600-6607)、SPDPヒドラジン誘導体を調製し、チオール化抗体と反応させた。これらの複合体のいずれにおいても、低分子量薬剤は酸性条件下で放出された。前者の場合では、最大約30%のピンカヒドラジドが、37 °C pH5.3で7日間放出され、後者の場合では、未修飾のアドリアマイシンが、pH4.0-5.5で複合体から急速に放出された。アドリアマイシンの各種ヒドラゾン誘導体の研究が報告されている(Kaneko, et al., (1991) *Bioconjug. Chem.* 2:133-141)。これによって、各種リンカーの酸不安定度は、アシルヒドラジド > セミカルバジド > カルボン酸ジヒドラジド > チオセミカルバジド > ヒドラジンカルボキシレート = アリルヒドラジドであることが示された。これらの化合物は全てアドリアマイシンを唯一の産物として放出した。アリルヒドラジドを例外として、これらの化合物は全てpH7.4では安定であった。アシルヒドラジンは、pH5.0、37 °C で、3時間で薬剤の理論的量の85%を放出し、抗トランスフェリン受容体抗体に接合された場合、その細胞傷害性は遊離アドリアマイシンとほぼ同じであった。マレイミドカプロイルヒドラゾン誘導体も合成されてチオエーテル結合複合体を生成するが、これは、血清中でより安定で、また、抗体の、鎖内還元ジスルフィド基と簡単に結合が可能である(Firestone, et al., (1996) *BR96-Dox, J. Control.* 39:251-259)。

20

30

40

## 【0189】

治療薬剤を、抗体またはその他の局在因子に結合させるためには、酵素的に変性可能な結合も使用が可能である。薬剤を、巨大分子に付着させ、放出するための鍵となる基準は、血清中では安定で、細胞内では特異的酵素によって分断が可能なリンカーである。様々なアミノ酸を含むこのタイプのリンカーが記載されている。これらの内のあるものは、抗体と接合させた薬剤複合体の中で用いられているが、別のものはポリマー薬剤複合体のみで用いられている。ダウノマイシン(Dau)の分断可能アミノ酸薬剤前駆物質は最初にLevinとStellaによって製造された(Levin, et al., (1979) *FEBS Lett.* 98:119-122)。た

50

だし、これらは低分子量薬剤前駆物質と表示された。リソソーム消化における、アミノ酸配列と長さに関する最初の系統的な研究は (Masquelier, et al., (1980) J. Med. Chem. 23:1166-1170) によって報告された。これらの研究により、Ala-Leu-Dau誘導体が、リソソームのヒドロラーゼによって2時間で遊離薬剤への復帰が可能であることが明らかにされた。この活性は、リソソームのジペプチジルアミノペプチダーゼであるとされた。このジペプチド誘導体は、インビトロではDauよりもその活性はるかに低いが、インビボでは大きな活性を示した (Baurain, et al., (1980) J. Med. Chem. 23:1171-1174)。このグループによって報告されたその後の研究によって (Trouet, et al., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:626-629)、ダウノルピシンが、1から4個のアミノ酸から成るスペーサーアームによって、スクシニル化血清アルブミンに連結された複合体がもたらされた。薬剤の順調な放出のためには、最低3個の、または、ペプチドのスペーサーが必須であることが判明した。Ala-Leu-Ala-Leu-Dau結合を含むアルブミン複合体の場合、8時間で75%の遊離薬剤の放出が達成され、この複合体は、血清の存在下では安定であった (24時間で僅か2.5%の薬剤放出)。ペプチドスペーサーが無い場合、スクシニル化血清アルブミンに接合したDauからは、リソソーム酵素によっては全く薬剤が放出されなかった。

10

20

30

40

50

#### 【0190】

もう一つのテトラペプチドスペーサーが、DuncanとKopecekの長い共同作業から得られた。この作業では、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド]コポリマーからの、モデル薬としてのp-ニトロアニリンの放出が研究された (Duncanに記載されている (Duncan (1986) CRC Crit. Rev. Bicompat. 2:127-145))。これらの研究によって、リソソーム酵素の特異性、および、Gly-Phe-Leu-Gly-Dauリンカーの開発に関して大きな理解がもたらされた。後者の場合、50時間のインキュベーション期間に結合p-ニトロアニリンの80%が放出された。次に、ダウノマイシンを、抗体・担体・薬剤複合体としてポリマー搬送システムに結合させた (Duncan, et al., (1987) Br. J. Cancer 55:165-174)。

#### 【0191】

テトラペプチドスペーサーが、モノクロナール抗体-メトトレキセート複合体の中に、(Umamoto, et al., (1989) Int. J. Cancer 43:677-684) によって組み込まれた。これは、Trouetによって記述されたテトラペプチドに基づくMTX-Leu-Ala-Leu-Ala-ヒドラジドリンカーである。しかしながら、Trouetの研究では、Dauは、ペプチドのC-末端に付着されていたが、この複合体では、MTXはペプチドのN末端に付着された。さらに、結合帯の中にはヒドラジドも取り込まれているので、複合体の薬剤リンカー部に、若干の酸感受性放出性が付与されている可能性がある。このリンカーに対するリソソーム酵素の作用、どのような産物が放出されるのか、また、産物の放出速度についても研究は報告されていない。しかしながら、これらのリンカーは、直接結合MTXに比べて、複合体の効率に実質的な上昇をもたらし、また、放出は、リソソームを介在することが、ロイペプチンのような阻害剤によって明らかにされた。

#### 【0192】

HAS担体分子として、さらに別のテトラペプチドスペーサーの開発が (Fitzpatrick, et al., (1995) Anti-Cancer Drug Design 10:1-9) によって記載されている。適当なスペーサーが、リソソーム酵素変性システムを用いて開発された。このシステムでは、-アミノリシン残基に対するペプチド鎖の末端残基の付着を、タンパクに対する接合モデルとして用いた。このシステムを用いて、MTXのカルボキシル基に結合される様々なアミノ酸が遊離薬剤を放出することが可能であること、遊離薬剤の放出速度は、スペーサーの長さに依存し、テトラペプチドスペーサーは約90%の遊離薬剤を放出することが示された。MTXテトラペプチドをHASに接合することによって、遊離薬剤の放出速度はさらに、48時間で約30%に低下した。これらの実験から、テトラペプチドスペーサーは、単にポリマー分子の立体配置上の制限を克服するばかりでなく、分断部を酵素の活性部に結合させる効率にも関連することが示された。

#### 【0193】

オキシム結合によってアントラサイクリンをペプチドに連結するための効率的・一般的

方法が、(Ingallinella, et al., (2001) Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:1343-1346) によって記載されているが、この結合を用いた免疫複合体は報告されていない。

【0194】

一般に、免疫複合体を生成するもっとも単純な方法は、薬剤を直接抗体に結合することである。これは、薬剤の官能基と、抗体上の官能基の一つとの間に直接結合を形成すること、あるいは、別に、複合体の二つの部分の間に、リンカーまたはスペーサーグループを挿入することを含む。リンカーグループは、単に、結合の化学を可能とするために使用されてもよいが、特定のタイプの薬剤放出を可能とするという第二の機能を持ってよい。もしも放出が、細胞内、または、細胞外に局在する酵素によって仲介されるならば、このグループはスペーサーグループと呼ばれ、その目的は、十分な空間を与え、または、立体配置上の制限を緩和して、酵素が関係結合に十分接近することができるようにすることとなる。

10

【0195】

メトトレキセートは、抗体に連結された最初の細胞傷害性薬剤の内の一つである。免疫血清 (Marthe, et al., (1958) C.R. Acad. Sci. 246:1626-1628およびBurststein, et al., (1977) J. Med. Chem. 20:950-952) を用いたこれらの初期の研究では、結合は、ジアゾ化によるか、混合無水物過程によるかのどちらかであった。これらの過程のいずれから、マウスモデルにおいて治療的に有効な複合体が得られた。

【0196】

それ以後生産された複合体は多くの総覧論文に記録されている (例えば、Magerstaedt (1991) CRC Press Boca Raton FL 77-215; Dubowchik, et al., (1999) Pharmacol. Ther. 83:67-123; およびPietersz, et al., (1994) Adv. Immunol. 56:301-387)。ピンブラスチン-抗体複合体に関する初期の研究では、薬剤を抗体に接合するのに種々の方法が用いられ、ある報告では、遊離薬剤に比べて複合体の方が細胞傷害性が上昇することが示された (Johnson, et al., (1981) Br. J. Cancer 44:372)。ピンブラスチン複合体に関する臨床研究が報告されている。これらの研究の最初のもは、最適化DAVLBHYではなく、DAVLBの半スクシネート誘導体による、げっ歯類モノクローナル抗体KS1/4との複合体に関するものであった (Schneck, et al., (1990) Clin. Pharmacol. Exp. 47:36-41)。

20

【0197】

抗体複合体で用いられる二つの主なアントラサイクリンは、ダウノマイシン (ダウノルピシンと同意) とアドリアマイシン (ドキソルピシンと同意) である。これは、側鎖の末端C14においてのみ異なり、これが前者ではメチル基であり、後者ではより疎水性の低いメトキシ基である。ダウノマイシン (Dau) は、ダウノルピシン (Dox) よりも細胞傷害性が高いことが報告されている。イダルピシンとエピルピシンとは、それよりもやや細胞傷害性が高い誘導体であり、DauまたはDoxと比べて毒性プロフィールが改善されている (Arcamone, (1985) Cain Memorial Aware Lecture, Cancer Res. 45:5995-5999)。モルフォリノドキソルピシンとシアノモルフォリノドキソルピシンとは、極めて高い細胞傷害性を持つ誘導体であることが報告されている (Newman, et al., (1985) Science 228:1544-1546)。

30

【0198】

免疫グロブリンに対するアントラサイクリン (DauとDox) の免疫複合体製剤が評価された (Hurwitz, et al., (1975) Cancer Res. 35:1175-1181)。(1)薬剤の糖機能基の過ヨウ素酸酸化、抗体のリシル基に対する接合、シッフ塩基還元によるその後の還元、および、(2)抗体の糖アミノ基とリシル基の間のグルタルアルデヒド結合である。薬剤活性は、グルタルアルデヒド活性と共にもっともよく保存されたが、過ヨウ素酸酸化複合体、および、グルタルアルデヒド連結複合体の両方とも、標的細胞に対して良好な活性を示した。過ヨウ素酸酸化複合体はさらに精しく評価され (Levy, et al., (1975) Cancer Res. 35:1182-1186)、遊離薬剤の活性の約50%を保持し、免疫複合体にたいする短時間暴露を含めた細胞傷害性アッセイにおいて特異性を持つことが示された。この複合体の、PC5 B細胞白血病に対する抗腫瘍作用は、遊離薬剤よりも優れていた。

40

50

## 【0199】

イダルビシン(Ida)免疫複合体が、14-プロモ-イダルビシンと、抗Iy2.1抗体と、1-5のMRによって調製された(Pietersz, et al., (1988) Cancer Res. 48:926-931)。

## 【0200】

複合体は選択的細胞傷害性を示したが、E3標的細胞に対して遊離薬剤よりも活性は低かった(それぞれ、 $IC_{50} = 430$ と $120$  nM)。E3胸腺腫瘍異種移植片に対する抗腫瘍活性を腫瘍成長速度の減少によって評価したところ、Ida単独によって得られるものよりも大きかった。抗CD19抗体から調製したIDA免疫複合体を用いたその後の研究によって、遊離Idaの $12$  nMに比べて、免疫複合体では $240$  nMの活性が得られた(Rowland, et al., (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:195-202)。

10

## 【0201】

アントラサイクリンは、標的輸送用薬剤として好まれる選択である。モルフォリノ基は、通常共役接合に使用される糖アミノ基を利用できなくしてしまうので、側鎖のC13によるリンカーが使用された。

## 【0202】

5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(FUDR)との免疫複合体が、スクシニル化FUDRの活動的なエステル誘導体を、抗Iy1.2モノクローナル抗体と反応させて、薬剤対抗体7-9MRの複合体を形成することによって構築された(Krauer, et al., (1992) Cancer Res. 52:132-137)。抗原陽性E3細胞系統に対して、スクシニル化FUDRと免疫複合体の両方とも類似の細胞傷害性を示したが(それぞれ $IC_{50} = 5$ および $3$  nM)、遊離薬剤( $0.4$  nM)よりも約10倍低かった。インビボでは、免疫複合体の方に、当量の遊離薬剤よりも、E3胸腺腫瘍成長のさらに大きな抑制が見られた。

20

## 【0203】

タキソール免疫複合体が、GuillemardとSaragoviによって報告されている(Guillemard, et al., (2001) Cancer Res. 61:694-699)。タキソールは先ず無水グルタルで修飾されて、薬剤に分断可能なエステル結合を与え、次に、カルボジイミドによって直接抗体に接合された。抗マウスおよび抗ラットIgGに対する免疫複合体は、薬剤のMRに対して抗体1として製造された。細胞傷害性試験は、複合体の方が遊離薬剤より高い細胞傷害性を持つことを示しているようであった。インビボでは、免疫複合体は、神経芽細胞腫異種移植片に対し腫瘍成長を僅かではあるが、有意に低下させた。

30

## 【0204】

抗体濃度は、薬剤摂取速度を決める重大な因子である。従って、抗体分子当たりより多くの薬剤分子の接合を可能とするならば、細胞傷害性は上昇する筈である。一方、抗体の結合活性の喪失は、薬剤分子の数の制限因子となるが、標的薬剤複合体用に搬送分子を用いることはこの問題にたいする解決を与える。いくつかのタイプの複合体が、多くはデキストラン、ヒト血清アルブミン、または、ヒドロキシプロピルメタクリルアミド(HPMA)を搬送分子として、また、薬剤ドキシソルピシンまたはメトトレキセートを用いて調べられている。もっとも初期の搬送複合体は、ポリグルタミン酸搬送剤を介して抗体にフェニレンジアミンマスタードを接合したもので、45:1のモル置換比を示す(Rowland, et al., (1975) Nature 255:487-488)。

40

## 【0205】

ガン細胞を殺すのに十分な薬剤分子を搬送するという困難に向けたもう一つの解決策は、より強力な薬剤を使用することである。なぜなら、このような薬剤では、細胞を殺すのにより少ない薬剤分子しか必要とされないからである。いくつかのこうした分子が発見され、抗腫瘍剤候補として調べられた。そのようなものとして、CC-1065様アルキル化剤、例えば、ドゥオカルマイシン；ジネミシンを含むエネジイン；カリケアミシン/エスペラミシン、色素タンパク(Borders, et al., (1994) Marcel Dekker New York) (例えば、ネオカルジノスタチン、およびカリケアミシン)；および、マクロライド抗生物質、例えば、ゲルダナマイシンおよびマイタンシンが挙げられる。

## 【0206】

50

腫瘍標的細胞傷害性治療法の応用は、多くの腫瘍抗原については好成績を挙げた。例えば、急性の、骨髄腫瘍起源白血病（AML）を治療するために用いられたゲムツズマブオゾガミシンは、抗腫瘍化学療法剤であるカリケアミシンに付着させた抗CD-33抗体から構成される。CD33抗原は、骨髄前駆細胞には存在するが、造血幹細胞には存在しないので、CD33標的治療薬は、AML細胞に対しては選択的であるが、重要な正常細胞タイプは残す。この薬剤をAML細胞に存在するCD33抗原に結合することは、細胞内に取り込まれる複合体の形成を実現する。細胞内取り込み後、この薬剤の抗腫瘍機能基が骨髄細胞に放出され、細胞死をもたらす（Naito, et al., (2000) Leukemia 14:14636-43）。この薬は、60歳を越える患者の、再発または難治AMLの治療のためにFDAによって承認された（Abou-Jawde et al., (2003) Clin. Therap. 25:2121-37）。さらに、ゲムツズマブオゾガミシンは、再発AMSを治療するのに有効であることが判明し、そのために多くの患者を救済する可能性がある。

10

20

30

40

50

#### 【0207】

##### 免疫毒素

治療薬剤、または薬剤成分は、古典的な化学的または放射線的治療剤に限定されると考えるべきではない。例えば、薬剤成分は、所望の生物学的活性を有するタンパクまたはポリペプチドであってもよい。そのようなタンパクとして、例えば、毒素、例えば、アブリン、リシンA、シュードモナス体外毒素、またはジフテリア毒素の他に、生物活性を持つ他のタンパク、例えば、腫瘍壊死因子、アルファ-インターフェロン、ベータ-インターフェロン、神経成長因子、血小板成長因子、組織プラスモゲン活性化因子、血栓因子または抗血管形成因子、例えば、アンジオスタチンまたはエンドスタチン、または、生物反応修飾因子、例えば、リンフォカイン、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-15、顆粒球巨大相コロニー刺激因子（"GM-CSF"）、顆粒球コロニー刺激因子（"G-CSF"）、またはその他の成長因子が挙げられる。

#### 【0208】

免疫毒素は、タンパク毒素に接続される、成長因子、モノクロナール抗体または抗体断片のようなリガンドを含む。リガンドサブユニットが標的細胞の表面に結合した後、分子が侵入し、毒素が細胞を殺す。ガン細胞に向けられた細菌毒素としては、シュードモナス体外毒素およびジフテリア毒素が挙げられるが、これらは、1本鎖または2本鎖の組み換え融合毒素を形成するのに好適である。植物毒素としては、リシン、アブリン、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパク、サポニン、および、ゲロニンが挙げられ、これらは一般に、ジスルフィド結合化学によってリガンドに接続される。免疫毒素は、血液学的悪性腫瘍と固体腫瘍を、多様な成長因子受容体および抗原を介して標的するために生産されている。

#### 【0209】

免疫毒素療法の実施の目的は、細胞傷害性薬剤を、細胞表面の分子に向けて発射することであり、分子はその細胞傷害性薬剤を取り込み、細胞死をもたらす。免疫毒素は、作用形式および毒性プロファイルにおいて化学療法と大きく異なるので、免疫毒素によって腫瘍の全身治療において改善が得られる。

#### 【0210】

免疫毒素とは、単純に、抗体と毒素を含むタンパクと定義される。本明細書で論じる毒素としては、標的細胞を殺す、植物または細菌によって生産される触媒タンパクが挙げられる。「免疫毒素」という用語は一般に、無処置のIgG、Fab断片、またはFv断片が標的とする毒素を指すが、成長因子、またはその他のリガンドが標的とする毒素もまた「キメラ毒素」と呼ばれる。ある免疫毒素またはキメラ毒素では、リガンドと毒素の間の結合は化学的に為されるが、そのタンパクは「化学的共役接合体」と呼んでもよい。別に、結合が、遺伝子工学によって製造されたペプチド結合である場合、そのタンパクは「組み換え毒素」または「融合毒素」と呼ばれる。最後に、免疫毒素のある選択された基が、毒素と融合したFv配列を含む場合、免疫毒素でもあり組み換え毒素でもあるこれらのタンパクはよく「組み換え免疫毒素」と呼ばれる。

#### 【0211】

タンパク毒素は、極端に活性が強大であるので好適である。タンパク毒素の1個または数分子が、原形質に注入されると細胞を殺すことが可能であることが示されている (Yamaizumi, et al., (1978) Cell 15:245-250およびEiklid, et al., (1980) Exp. Cell Res. 126:321-326を参照)。

#### 【0212】

植物毒素は、天然では、ホロ毒素およびヘミ毒素として存在する。ホロ毒素(活性化タンパクにおけるクラスIIリボソームとも呼ばれる)は、リシン、アブリン、ヤドリギ・レクチンとモデクシンを含み、これらは、酵素ドメインにジスルフィド結合した結合ドメインを含む。ヘミ毒素、例えば、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパク(PAP)、サポニン、およびゲロニンは、酵素ドメインを含むが、結合ドメインを含まない。

10

#### 【0213】

免疫毒素を製造するには、一般に、植物毒素がリガンドに化学的に接合される(例えば、Kreitman, et al., (1998) Adv. Drug Del. Rev., 31:53-88を参照)。

#### 【0214】

免疫毒素を製造するために一般的に使用される二つの細菌毒素として、シュードモナスアエルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)によって生産されるシュードモナス体外毒素(PE)、および、コリネバクテリウムジフテラエ(*Corynebacterium diphtheriae*)によって生産されるジフテリア毒素(DT)が挙げられる。PEとDT両方とも、細胞質ゾルのEF-2のADPリボシル化を触媒する(Carroll, et al., (1987) J. Biol. Chem. 262:8707-8711; Uchida, et al., (1972) Science 175:901-903;およびUchida, et al., (1973) J. Biol. Chem. 248:3838-3844を参照)。

20

#### 【0215】

DTおよびPEの突然変異形および切断形も使用が可能である(Kreitman, et al., (1998) Adv. Drug Del. Rev., 31:53-88を参照)。例えば、毒素の結合ドメインが欠失された、または、突然変異によって無機能性とされた突然変異毒素が設計される。DTの場合、これは化学的に、毒素をトリプシンで処理し、A鎖を精製することによって実行が可能である(Masuh, et al., (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90:320-326を参照)。完全長を持ち、突然変異結合ドメインを有する組み換え毒素としては、PE<sup>4E</sup>、これはPEの57、246、247および249位置において塩基残基をグルタメートで置換させたもの、および、CRM107、これはDTの390位置のロイシンと、525位置のセリンをフェニルアラニンで置換させたものが挙げられる(Greenfield, et al., (1987) Science 238:536-539およびChaudhary, et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:16306-16310を参照)。

30

#### 【0216】

多種多様な痕跡免疫毒素と組み換え毒素が製造され、悪性標的細胞に対して試験されてきた(Kreitman, et al., (1998) Adv. Drug Del. Rev., 31:53-88を参照)。

#### 【0217】

次世代免疫毒素は組み換え毒素を含む。毒素に対し化学的に接合された抗体、またはFab'のような抗体断片を含む免疫毒素は、いくつかの欠点を有する。まず、大きなサイズ(100-200kDa)であるために腫瘍浸透が低減される。第二に、抗体に対する接合のためには、リシン残基を修飾する試薬によってPE40およびPE38のような毒素の誘導体を形成しなければならず、しかもリシンの多くはカルボキシル末端近くにある。同様に、抗体は、抗原結合部位内部のリシン残基の誘導体形成も要求する。従って、得られた免疫毒素は、抗体および毒素の付着部位に関してばかりでなく、免疫毒素分子当たりの毒素と抗体成分の数に関しても異種混合物となる。最後に、化学的複合体は製造が難しい。なぜならば毒素と抗体は別々に精製して、接合しなければならず、次に、産物を再度精製しなければならないからである。

40

#### 【0218】

毒素は、リガンドと毒素を化学的に接合することをせずとも、もしも両者が一つのポリペプチド単位として接続されているならば、細胞を標的とすることが可能である。

#### 【0219】

50

細菌毒素PEとDTとはこれら融合毒素を製造するには最適である。なぜなら、各毒素は、ジスルフィドリングの中にタンパク分解工程部位を含んでおり、これが、触媒ドメインが、細胞内侵入後毒素の残りの部分から分離することを可能とし、細胞質ゾルへの効率的移動を可能とするからである (Chiron, et al., (1994) J. Biol. Chem. 269:18167-18176; Frying, et al., (1992) Infect. Immun. 60:497-502; Ogata, et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:25396-25401; および Williams, et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:20673-20677を参照)。

#### 【0220】

1981年、Mab B3/25が、断端を丸めたDTまたはRTAに接合され、ヌードマウスにおけるヒトメラノーマの成長抑制に使用されたことが報告された (Trowbridge, et al., (1981) Nature 294:171-173を参照)。上記および類似の免疫毒素は、消化管腺ガン、中皮腫、頸部ガン、およびグリオ芽細胞腫を含む各種固体腫瘍に対して抗ガン活性を示した (Griffin, et al., (1998) J. Biol. Response Mod. 7:559-567; Griffin et al., (1987) Cancer Res. 47:4266-4270; および Martell, et al., (1993) Cancer Res. 53:1348-1353を参照)。Mab HB21は完全長PEに接合され、腹腔内に搬送され、ヒト卵巣ガンを抱えていたマウスの生存率を上昇させた (FitzGerald, et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6627-6630を参照)。HB21を始め、そのFab'、(Fab')<sub>2</sub>およびFv断片も、切断されたPEまたはDTに接合または融合されたが、各種のモデルにおいて抗腫瘍活性を起こすことが示された (Batra, et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8545-8549; Debinski, et al., (1991) Cancer Res. 52:5379-5385; および Batra, et al., (1991) Mol. Cell Biol. 11:2200-2205を参照)。

#### 【0221】

各種抗原を標的とする免疫毒素の標的と成る細胞系統の多くは比較的化学療法に対して抵抗性を示す。免疫毒素はまた、細胞からの化学療法剤の排出増進を担当するp-糖タンパクを標的することによって、多数の化学療法剤に対して耐性を示す細胞を特異的に標的とすることも可能である。PEに対して接合されたMab MRK16は、p-糖タンパクの発現によって化学療法に対して極めて高い耐性を持つ細胞系統に対して非常に高い細胞傷害性を示した (FitzGerald, et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4288-4292を参照)。この免疫毒素はまた、MDRトランスジェニックマウスにおいて多剤耐性上皮ガン細胞を殺した (Mickisch, et al., (1993) J. Urol. 149:174-178)。この抗体はまた、サポニンにも接合されて、多剤耐性細胞を骨髄から追放することが可能な免疫毒素を形成した (Dinota, et al., (1990) Cancer Res. 50:291-294を参照)。

#### 【0222】

##### 標的放射線療法

ビメンチン標的療法には、放射線同位元素を細胞傷害性薬剤として使用してもよい。本発明の抗ビメンチン抗体は、1種以上の治療薬剤と結合してもよい。この点で好適な薬剤として放射性核種が挙げられる。適当な放射性核種としては、<sup>90</sup>Y、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>186</sup>Re、<sup>188</sup>Re、<sup>211</sup>At、および<sup>212</sup>Biが挙げられる。ビメンチン標的剤への付着を促進するための放射性核種薬剤に対する特異的な担体としては、放射性ハロゲン化小分子、およびキレート化合物が挙げられる。例えば、米国特許第4,735,792号は、代表的な放射ハロゲン化小分子、およびその合成法を開示する。放射性核種キレートは、金属または金属酸化物、放射性核種を結合するためのドナー原子として窒素および硫黄原子を含むものを含めたキレート化合物から形成することが可能である。例えば、Davison等に交付された米国特許第4,673,562号は、代表的なキレート化合物と、その合成法を開示する。

#### 【0223】

理想的放射性リガンド治療剤は標的細胞に選択的に蓄積する。放射線治療の効果は、細胞DNAに対する放射線誘発性の損傷によってもたらされる分裂細胞の破壊による (例えば、W.D. Bloomer et al., (1977) 「早期腹水腫瘍モデルにおけるヨウ素125標識ヨードデオキシウリジンの治療応用 ( " Therapeutic Application of Iodine-125 Labeled Iododeoxyuridine in an Early Ascites Tumor Model " )」、Current Topics in Radiation Rese

arch Quarterly 12:513-25を参照)。治療的・画像的応用の両方において、未結合で循環する放射性リガンドが仮にあっても、それらは排泄系によって速やかに排除されるので、正常な器官・組織を保護するのに役立つ。放射性リガンドは、生体の過程によっても変性され、これが、遊離放射性同位元素の排泄を促進する(Wiseman et al., (1995)「放射性標識MIBGおよびソマトスタチン類縁体による神経内分泌腫瘍の治療(“Therapy of Neuroendocrine Tumors with Radiolabelled MIBG and Somatostatin Analogues”)」、Seminars in Nuclear Medicine, XXV巻、3号、272-278ページを参照)。

#### 【0224】

治療処置にもっとも好適な放射性同位元素としては、アウガー電子放射放射性同位元素、例えば、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{129}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、および、その他の放射標識ハロゲンが挙げられる。好適な放射性同位元素の選択は、放射される放射線のタイプ、放射エネルギー、エネルギーが蓄積される距離、および、その放射性同位元素の物理的半減期を含む種々の要因に基づいて最適化される。ある例では、使用される放射性同位元素は、ピメンチン標的治療剤の生物学的半減期と一致する、または、それよりも長い放射性半減期を有するものである。例えば、ある実施態様では、放射性同位元素は約1時間から60日までの半減期、好ましくは5時間から60日までの、さらに好ましくは12時間から60日までの半減期を有する。 $^{125}\text{I}$ は、入院と隔離を必要とする高エネルギーガンマー線を発生する他の放射元素(すなわち、 $^{111}\text{In}$ および $^{131}\text{I}$ )に優る利点を有する。 $^{125}\text{I}$ は、体の外に逃げる放射線量が限定されるために通院治療の開発を可能とする。

#### 【0225】

放射標識治療剤は、静脈内ボラス注入によって投与される(例えば、H.P. Kalofonos, et al., (1989)「上皮成長因子受容体および胎盤アルカリフォスファターゼに向けた放射性標識モノクロナール抗体による脳グリオーマの、抗体誘導性診断・治療(“Antibody Guided Diagnosis and Therapy of Brain Gliomas using Radiolabeled Monoclonal Antibodies Against Epidermal Growth Factor Receptor and Placental Alkaline Phosphatase”)」、The Journal of Nuclear Medicine, 30巻、163-645ページ; L. Virgolini et al., (1994)、「腸管腺ガンおよび内分泌腫瘍の位置決定のための、血管活動性腸管ペプチド受容体画像法(“Vasoactive Intestinal Peptide-Receptor Imaging for the Localization of Intestinal Adenocarcinomas and Endocrine Tumors”)」、The New England Journal of Medicine, 331巻、1116-21ページ; G.A. Wiseman et al., (1995)「放射線標識MIBGおよびソマトスタチン類縁体による神経内分泌腫瘍の治療(“Therapy of Neuroendocrine Tumors with Radiolabelled MIBG and Somatostatin Analogues”)」、Seminars in Nuclear Medicine, XXV巻、3号、272-78ページ; S.W.J. Lamberts et al., (1990)「内分泌腫瘍の局在化におけるソマトスタチン受容体画像法(“Somatostatin-Receptor Imaging in the Localization of Endocrine Tumors”)」、The New England Journal of Medicine, 323巻、126-49ページ; E.P. Krenning et al., (1992)「ヒトにおけるインジウム111-DTPA-D-Phe-1-オクトレオチドによるソマトスタチン受容体シンチグラフィ：代謝、容量測定、イオジン-123-Tyr-3-オクトレオチドとの比較(“Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-123-Tyr-3-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry, and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide”)」、The Journal of Nuclear Medicine, 33巻、652-58ページ; E.P. Krenning et al., (1989)「ソマトスタチンの放射性ヨード化類縁体による内分泌関連腫瘍の局在化(“Localization of Endocrine-Related Tumours with Radioiodinated Analogue of Somatostatin”)」、The Lancet, 1989巻、1号、242-244ページを参照されたい)。

#### 【0226】

##### 標的遺伝子療法

ピメンチン標的療法の細胞傷害剤として遺伝子ベクターを用いることも可能である。例えば、抗体遺伝子(またはその断片)をコードする遺伝子ベクターを腫瘍細胞内に導入する。トランス遺伝子発現産物は細胞内タンパク、例えば、発ガン遺伝子由来のものに結合し、そうすることによって発ガン遺伝子のタンパク発現を下向調整する。標識遺伝子療法

10

20

30

40

50

は、アデノウイルスおよびレトロウイルスベクターを標的とする二重機能性クロスリンカーを使用することによって、いくつかの異なるウイルスベクターのコートタンパクに、短い標的ペプチドと、より大きいポリペプチド結合性ドメインを挿入することによって、また、複製能を有するベクターを用いることによって促進される (Wang and Liu (2003) *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 35(4):311-6を参照)。その他、DNA複合体および細菌ベヒクルを含めた非ウイルス性治療剤も開発されている。ピメンチン標的組成物のための遺伝子療法、および本発明の方法は、従来技術で既知の遺伝子療法から引用したものでよいし、あるいは、米国特許第5,871,726、5,885,806、5,888,767、5,981,274、6,207,426、6,210,708、6,232,120、6,498,033、6,537,805、6,555,107および6,569,426号から引用されてもよい。

10

**【0227】**

一つの方法では、遺伝子治療剤を搬送するのに、標的複製または非複製ウイルスベクターを用いてもよい。例えば、アデノウイルス遺伝子療法ベクターは、新生細胞標的様に改変されている (Rots, et al., (2003) *Journal of Controlled Release* 87:159-165を参照)。アデノウイルスベクターの選択的標的は、ウイルスベクターに向けた炎症・免疫反応を制限し、治療毒性を低下させる。なぜなら低用量のウイルスの使用が可能となるからである。アデノウイルス感染は通常、knowと呼ばれるアデノウイルス線維タンパクのC-末端部分による標的細胞、および一次細胞受容体、コクサッキーBウイルスおよびアデノウイルス受容体 (CAR) への結合によって起動される。この段階の後、ウイルスのペントン基底タンパクのRGD (arg-gly-asg) 配列と細胞インテグリンとの相互作用によりウイルスの細胞への侵入が起こる。アデノウイルスベクターの選択的標的は実現可能である。ピメンチン特異的抗体のアデノウイルスベクターへの連結 (例えば、共役接合) は、得られた構築体を、ピメンチン発現腫瘍性、MDR腫瘍性、および、損傷 (例えば、病原体感染) 細胞に向けて標的する。例えば、この戦略は、アデノウイルスを、腫瘍細胞上に存在するEGP-2抗原に向けられるように改変されて好成績を挙げた (Heiderman et al., (2001) *Cancer Gene Ther.* 8:342-51)。改変は、中和化抗線維タンパクを、上皮細胞接着分子 (EGP-2) に対する抗体に接合することによって実現した。得られたEGP-2アデノウイルスは、EGP-2を発現するガン細胞に向けて発射されたが、感染はCARとは独立していることが示された。もう一つの戦略は、細胞表面ピメンチンを、治療遺伝子搬送ベクター (例えば、アデノウイルスベクター) に橋渡しするために二重特異性抗体を用いることである (例えば、

20

30

**【0228】**

一般に、「ウイルスベクター」および「ウイルス」という用語は、本明細書では、タンパク合成またはエネルギー生産機構を全く持たない、任意の真正の細胞内規制物を指すために相互交換的に用いられる。ウイルスゲノムは、脂質膜のタンパクから成る被覆構造によって包まれたRNAまたはDNAである。本明細書では、ウイルス (単複) およびウイルスベクター (単複) という用語は相互交換的に用いられる。本発明を実行するのに有用なウイルスとしては、組み換え修飾型被覆または非被覆DNAおよびRNAウイルス、好ましくはバキュロウイルス属、パルボウイルス属、ピコルノウイルス属、ヘルペスウイルス属、ポックスウイルス属、またはアデノウイルス属から選ばれたものである。ウイルスは天然に生じたウイルスであってもよいし、あるいは、そのウイルスゲノムは、外来性のトランスジーンの発現を含むように組み換えDNA法によって修飾されてもよいし、また、複製不能、条件付複製有り、または複製能有りのように加工されてもよい。親ベクターの性質それぞれの利点を利用するキメラウイルスベクター (例えば、Feng, et al., (1997) *Nature Biotechnology* 15:866-870を参照) も、本発明の実施に有用である可能性がある。ウイルスパッケージングに必要な配列だけを含み、かつ、要すれば随意にトランスジーン発現カセットを含む最小限ベクターシステムも、本発明の実施に従って製造されてもよい。一般に、治療される種から得られたウイルスを用いるのが好

40

50

ましいが、ある場合には、好ましい病原性を持つ別の種から得られたベクターを用いる方が有利である。例えば、ヒト遺伝子治療用としてウマヘルペスウイルスが、1998年8月5日公刊のW098/27216に記載されている。このベクターは、ウマウイルスはヒトに対して病原性を持たないために、ヒトの治療に有用であると記載されている。同様に、ヒツジアデノウイルスは、ヒト遺伝子治療に有用である可能性がある。なぜなら、このウイルスは、ヒトアデノウイルスベクターに対する抗体を回避すると言われているからである。このようなベクターは、1997年4月10日公刊のW097/06826に記載されている。

#### 【0229】

「複製不能」という用語は、野生型哺乳類細胞において複製不能なベクターを指す。このようなベクターを大量に生産するためには、生産細胞系統をヘルパーウイルスによって同時トランスフェクトさせるか、あるいは、失われた機能を補償するように修飾しなければならない。例えば、293個の細胞が、アデノウイルスE1欠失を補償するように加工され、293個の細胞においてE1欠失複製不能アデノウイルスベクターの継代が可能となった。

「複製能を持つウイルスベクター」という用語は、感染、DNA複製、パッケージング、および、感染細胞の分解が可能なウイルスベクターを指す。「条件付複製能を持つウイルスベクター」という用語は、特定の細胞タイプにおいて選択的発現を実現するが、一方、好ましくない広範な感染スペクトラムを回避するように設計された複製能を持つベクターを指す。このような条件付複製は、組織特異的、腫瘍特異的、または細胞タイプ特異的、または、選択的に誘発された制御配列を早期遺伝子（例えば、アデノウイルスのE1遺伝子）に動作的に連結することによって実現が可能である。

#### 【0230】

標的狙撃性に加えて、ウイルスベクターによる細胞タイプ特異性が、ウイルス複製のレプレッサーを駆動する経路反応性プロモーターを用いることによって改善される。「経路反応性プロモーター」という用語は、あるタンパクに結合するが、正常細胞においてそのタンパクの結合に対して近隣の遺伝子を転写的に反応させるDNA配列を指す。このようなプロモーターは、転写因子が結合する配列である反応要素を取り込むことによって生成される。このような反応は一般に誘導的である。ただし、タンパクレベルを増やすことが転写を下げる場合もいくつかある。経路反応性プロモーターは天然に生じることもあるし、合成の場合もある。経路反応性プロモーターは、経路、すなわち、標的される機能的タンパクに基づいて構築される。例えば、天然に生じるp53経路反応プロモーターは、p21またはbaxプロモーターのような機能的p53の存在によって活性化される転写制御要素を含むことが考えられる。別に、最小限プロモーター（例えば、SV40 TATAボックス領域）上流のp53結合部位を含む合成プロモーターを用いて、合成経路反応性プロモーターを生成してもよい。合成経路反応性プロモーターは、一般に、共通結合モチーフに適合する配列の1個以上のコピーから構築される。このような共通DNA結合モチーフは簡単に確定が可能である。このような共通配列は、一般に、数塩基ペアで隔てられた、直列、または、頭から尾への繰り返し列として並べられる。

#### 【0231】

本発明の実施に有用な経路反応性プロモーターの例としては、共通インスリン結合配列を含む合成インスリン経路反応性プロモーター（Jacob, et al., (1995) J. Biol. Chem. 270:27773-27779）、サイトカイン経路反応性プロモーター、グルココルチコイド経路反応性プロモーター（Lange, et al., (1992) J. Biol. Chem. 267:15673-80）、IL-1およびIL-6経路反応性プロモーター（Won K-A and Baumann H. (1990) Mol. Cell Biol. 10:3965-3978）、T3経路反応性プロモーター、共通モチーフを含む甲状腺ホルモン経路プロモーター、TPA経路反応性プロモーター（TRE）、TGF-ベータ経路反応性プロモーター（Grotendorst, et al., (1996) Cell Growth and Differentiation 7:469-480に記載されている通りの）が挙げられる。さらに、天然の、または、合成のE2F経路反応性プロモーターを用いてもよい。E2F経路反応性プロモーターの一つの例がParr等（1997）Nature Medicine 3:1145-1149に記載されている。この論文は4 E2F結合部位を含むE2F-1プロモーターを記載するが、これは、報告では、腫瘍細胞では活発で、速やかに細胞周期を繰り返す。そ

の他の経路反応性プロモーターの例は、従来技術でよく知られており、インターネットのを通じてアクセス可能な真核細胞ゲノムの転写調整領域データベースの中で特定が可能である。

#### 【0232】

本発明のある実施態様では、ウィルスベクターはアデノウィルスである。「アデノウィルス」という用語は、「アデノウィルスベクター」という用語と同義であり、アデノウィルス属のウィルスを指す。アデノウィルス属という用語はまとめて、マストアデノウィルス属の動物アデノウィルス類、すなわち、ヒト、ウシ、ヒツジ、ウマ、イヌ、ブタ、げっ歯類、および、サルアデノウィルス亜属を含むアデノウィルス類を指すが、ただしそれらに限定されない。特に、ヒトアデノウィルスとしては、A - F 亜属を始め、その個別の血清タイプ、個別の血清タイプおよび A - F 亜属であって、ヒトアデノウィルスタイプ 1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 (Ad11A および Ad 11P), 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 19a, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 34a, 35, 35p, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, および 91 が挙げられるがただしそれらに限定されない。ウシアデノウィルスという用語は、ウシアデノウィルスタイプ 1, 2, 3, 4, 7, および 10 を含むがただしそれらに限定されない。イヌアデノウィルスという用語は、イヌタイプ 1 (CLL, Glaxo, R126, Utrecht, Toronto 26-61 株) および 2 を含むがただしそれらに限定されない。ウマアデノウィルスという用語は、ウマタイプ 1 および 2 を含むがただしそれらに限定されない。ブタアデノウィルスという用語は、ブタタイプ 3 および 4 を含むがただしそれらに限定されない。ウィルスベクターという用語は、複製不能、複製能有り、および、条件付複製有りウィルスベクターを含む。

#### 【0233】

特に有用なのは、ヒトアデノウィルスタイプ 2 および 5 から得られたベクターである。これらのベクターは、その治療能力を強化するために特定の修飾を組み込んでもよい。例えば、それらのベクターは、E1a および E1b 遺伝子の欠失を含んでもよい。その他ある領域を、特定の特質を実現するために強調したり、欠失させたりしてもよい。例えば、ヒト被験体に投与されるヒトアデノウィルスベクターと関連する免疫原性を下げるための E3 領域の上向調整が記載されている。E4 領域は、CMV プロモーターによるトランスジーンの発現にとって重要なものと考えられているが、一方、E4orf 6 タンパクは、E1b 大タンパクの存在下では標的細胞の p53 の変性に至るものと記載されている (Steegenga, et al. (1998) *Oncogene* 16:345-347)。

#### 【0234】

搬送される治療遺伝子は一般に、細胞傷害性遺伝子、腫瘍抑制遺伝子、毒素遺伝子、アポトーシス前駆遺伝子、薬剤活性化前駆遺伝子、または、サイトカイン遺伝子である。「細胞傷害性トランスジーン」という用語は、ヌクレオチド配列であって、標的細胞におけるその発現が細胞のアポトーシスを誘発するヌクレオチド配列である。この細胞傷害性トランスジーンという用語は、腫瘍抑制遺伝子、毒素遺伝子、静細胞遺伝子、薬剤活性化前駆遺伝子、またはアポトーシス遺伝子を含むが、ただしそれらに限定されない。本発明のベクターは、1 種以上の治療用トランスジーンを、IRES 要素を用いることによって直列に、または、独立に調整されるプロモーターを通じて生成されるように使用されてもよい。

#### 【0235】

「腫瘍抑制遺伝子」という用語は、ヌクレオチド配列であって、標的細胞におけるその発現が、腫瘍性表現型を抑制するおよび / またはアポトーシスを誘発することが可能なヌクレオチド配列である。本発明の実施に当たって有用な腫瘍抑制遺伝子の例としては、p53 遺伝子、APC 遺伝子、DPC-4 遺伝子、BRCA-1 遺伝子、BRCA-2 遺伝子、WT-1 遺伝子、網膜芽細胞種遺伝子 (Lee, et al., (1987) *Nature* 329:642)、MMAC-1 遺伝子、腺癌結腸ポリポーシスタンパク (米国特許第 5,783,666 号)、結腸ガン欠失遺伝子 (DCC)、MMSC-2 遺伝子、NF-1 遺伝子、染色体 3p21.3 にマップされる鼻咽頭上皮腫瘍抑制遺伝子 (Cheng, et al. (1998) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 95:3042-3047)、MTS1 遺伝子、CDK4 遺伝子、NF-1 遺伝子、NF2 遺伝子、および、VHL 遺伝子が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0236】

「毒素遺伝子」という用語は、ヌクレオチド配列であって、標的細胞におけるその発現が、毒性作用を起こすヌクレオチド配列である。このような毒素遺伝子の例としては、シュードモナス体外毒素、リシン毒素、ジフテリア毒素等をコードするヌクレオチド配列が挙げられる。

## 【0237】

「アポトーシス前駆遺伝子」という用語は、ヌクレオチド配列であって、標的細胞におけるその発現が、細胞に、プログラムされた細胞死をもたらすヌクレオチド配列である。アポトーシス前駆配列の例としては、p53、アデノウィルスE3-11.6K、アデノウィルスE4orf4遺伝子、p53経路遺伝子、および、カスパーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

10

## 【0238】

「薬剤活性化前駆遺伝子」という用語は、ヌクレオチド配列であって、その発現が、非治療化合物を治療化合物に変換することが可能なタンパクの生産をもたらすヌクレオチド配列であり、これによって、細胞は、外来因子による殺作用に感受性を持つようになる、または、細胞に有毒条件が誘発される。薬剤活性化前駆遺伝子の一つの例は、シトシンデアミナーゼ遺伝子である。シトシンデアミナーゼは、5-フルオロシトシンを、強力な抗腫瘍剤である5-フルオロウラシルに変換する。腫瘍細胞の溶解は、腫瘍の局所点において5FCを5FUに変換することを可能とするシトシンデアミナーゼの局所的暴発をもたらすので周囲の多くの腫瘍細胞の死を招く。これは、多数の腫瘍細胞を、これらの細胞をアデノウィルスで感染させることを要せずに、殺すことになる（所謂、「巻き添え作用」）。さらに

20

## 【0239】

「サイトカイン遺伝子」という用語は、ヌクレオチド配列であって、標的細胞におけるその発現がサイトカインを生産するヌクレオチド配列である。そのようなサイトカインの例としては、GM-CSF、インターロイキン、特に、IL-1、IL-2、IL-4、IL-12、IL-10、IL-19、IL-20、アルファ、ベータ、およびガンマサブタイプのインターフェロン、特にインターフェロンアルファ-2b、および、融合体、例えば、インターフェロンアルファ-2-アルファ-1が挙げられる。

30

## 【0240】

前述の遺伝子に対して修飾および/または欠失を施して野生型タンパクの機能的サブフラグメントをコードするように変更することは、本発明の実施において簡単に使用に合わせることが可能である。例えば、p53遺伝子に対する言及は、野生型タンパクばかりでなく修飾されたp53遺伝子をも含む。このような修飾されたp53タンパクの例としては、核維持を増すためのp53に対する修飾、カルパイン共通分断部位を除去するためのデルタ13-19アミノ酸の欠失、オリゴマー化ドメインの修飾（Bracco, et al., PCT公報W097/0492、または米国特許第5,573,925号に記述される通りの）が挙げられる。

## 【0241】

本発明はさらに、遺伝子標的非ウィルスベクターの使用も含む。本発明のこの局面で使用される「非ウィルスベクター」は、自律的に複製する、染色体外円形DNA分子であって、正常ゲノムとは別で、標的細胞のDNA配列の発現に影響する非選択的条件下では細胞の生存にとって必須ではないDNA分子を含む。プラスミドは細菌の中で自律的に複製し、細菌生産を助長する。組み換えベクターの存在を選択する、または、スクリーニングすることを可能とするために、薬剤耐性をコードする遺伝子のような添加遺伝子を含めてもよい。このような添加遺伝子は、例えば、ネオマイシン耐性、多剤耐性、チミジンキナーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）、および、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を含むことも可能である。

40

## 【0242】

治療遺伝子を、腫瘍性、MDR腫瘍性、および損傷（例えば、病原体感染）細胞を標的と

50

して向けるためには、ある場合には、細胞標的を促進する追加要素を、非ウイルス遺伝子搬送システムの中に組み込むと有利である。例えば、脂質被覆発現プラスミドは、標的狙撃を促進するビメンチン抗体またはリガンドを取り込んでもよい。単純なりポソーム処方を投与してもよいが、本発明の所望の組成物を充填した、または、飾りつきたりポソームを、全身的に搬送する、または、所望の組織に向けて送ることが可能であり、次にその組織において、リポソームは選択された治療/免疫原性ペプチド組成物を搬送する。本出願で使用されるビメンチン抗体とリガンドとしては、抗体、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、単一鎖抗体、キメラ抗体、または、その機能的断片(Fv、Fab、Fab')が挙げられる。別に、非ウイルスベクターは、Wu等、米国特許第5,166,320および5,635,383号に記載されているように、ポリリシン成分を介して標的成分に連結させることも可能である。

10

## 【0243】

## リポソーム処方

治療薬剤のビメンチン標的搬送のために用いてもよいもう一つの戦略は、免疫リポソームの使用である。免疫リポソームは、腫瘍関連抗原に対する抗体をリポソームの中に取り込む。リポソームは、治療薬剤、または、もし活性化しなければ不活性なままの薬剤前駆物質を活性化する酵素を運ぶ(例えば、Lasic et al., (1995) Science 267:1275-76を参照)。いくつかの臨床前報告によって、免疫リポソーム薬剤によって標的狙撃が成功し、抗ガン効力が強化されたことが報告されている(Maruyama et al., (1990) J. Pharm. Sci. 74:978-84; Maruyama et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta 1234:74-80; Otsubo et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:40-44; Lopes de Menezes et al., (1998) Cancer Res. 58:3320-30)。

20

## 【0244】

別に、非抗体ビメンチン結合剤、例えば、修飾型LDLを、治療剤のリポソーム処方の標的狙撃における腫瘍特異的リガンドとして使用することも可能である。例えば、葉酸結合リポソームを用いて、治療剤を、葉酸受容体を過剰に発現する腫瘍に向けて発射することも可能である。葉酸結合リポソームは、インビトロを始めインビボにおいても、葉酸受容体を過剰発現するガン細胞に対して好適に搬送されている(Lee and Low (1994) J. Biol. Chem. 269:3198-204; Lee and Low (1995) Biochim. Biophys. Acta 1233:134-144; Rui et al., (1998) J. Am. Chem. Soc. 120:11213-18; および Gabizon et al., (1999) Bioconj. Chem. 10:289-98)。実際、いくつかの臨床前報告書に、このようなりガンドと結合されたりポソーム薬剤の標的狙撃の成功したことが記載されている(Ichinose et al., (1998) Anticancer Res. 18:401-4; Yamamoto et al., (2000) Oncol. Rep. 7:107-11; Rui et al., (1998) J. Am. Chem. Soc. 120:11213-18; および Gabizon et al., (1999) Bioconj. Chem. 10:289-98)。インビボで各種ガン細胞にリポソーム薬剤を指向させるために、トランスフェリンが標的リガンドとして使用されている(Ishida and Maruyama (1998) Nippon Rinsho 56:657-62; Kirpotin et al. (1997) Biochem. 36:66-75)。PEGの遠位端に抗トランスフェリン抗体を結合させたPEG-免疫リポソームは、インビトロでC6グリオーマ細胞と好適に会合し、ドキソルビシンを含む、腫瘍特異的長期循環性リポソームによる治療後、グリオーマのドキソルビシン接種を有意に増加させた(Eavarone et al., (2000) J. Biomed. Mater. Res. 51:10-14)。

30

40

## 【0245】

リポソームミセル/薬剤処方の形成法は従来技術で既知である。例えば、治療薬剤ミセルは、治療薬剤とフォスファチジルグリセロール脂質誘導体(PGL誘導体)を混合することによって形成が可能である。簡単に言うと、治療薬剤とPGL誘導体を1:1から1:2.1の範囲で混合し、治療薬剤混合物を形成する。別に、治療薬剤のPGL誘導体に対する比は、1:1.2、または1:1.4、または1:1.5、または1:1.6、または1:1.8、または1:1.9、または1:2.0、または1:2.1の範囲にある。次に、この混合物を、少なくとも20%の有機溶媒、例えば、エタノール液と混ぜて、治療薬剤を含むミセルを形成する。抗体または腫瘍標的リガンドをミセル処方に封入して免疫リポソームを製造する方法は従来技術で既知であるが、下記に述べる。例えば、免疫リポソームの調製・使用法は、米国特許第4,957,735、5,248,590

50

、5,464,630、5,527,528、5,620,689、5,618,916、5,977,861、6,004,534、6,027,726、6,056,973、6,060,082、6,316,024、6,379,699、6,387,397、6,511,676、および、6,593,308号に記載されている。

#### 【0246】

本明細書で用いる「フォスファチジルグリセロール脂質誘導体 (PGL誘導体)」という用語は、ミセルを形成する能力を持ち、ネットで負電荷を持つ頭部グループを持つ任意の脂質誘導体である。そのようなものとしては、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール (DPPG)、ジミリストイルフォスファチジルグリセロール、および、ジカプリルフォスファチジルグリセロールが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。一つの局面で、10から28個の炭素原子から成る炭素鎖を持ち、不飽和脂肪族側鎖を有するフォスファチジル誘導体は本発明の範囲に含まれる。治療薬剤と、負電荷フォスファチジルグリセロール脂質とを、分子比に変動を持たせて複合体形成をすると、ネットで正電荷 (1:1)、中性 (1:2)、または、やや負電荷 (1:2.1) の粒子が得られるが、これは、投与後、生体の様々な組織に対する標的狙撃を可能とする。一方、治療薬剤を、負電荷PGLと複合体形成させると、多くの場合、治療薬剤の可溶性が強化されることが示されており、このために、効果的抗新生物治療に必要な薬剤の容量が低減される。さらに、治療薬剤と負電荷PGLとの複合体形成は、カプセル形成効率を極めて高くするので、製造過程における薬剤損失が極小化される。これらの複合体は安定であり、沈殿を形成せず、4ヶ月で保存後少なくとも4ヶ月間治療効力を保持する。網内皮系 (RES) によって血液循環から急速に排除されることを回避することによって最大の治療効果を発揮するために、免疫リポソーム薬剤処方方は、ポリエチレングリコール (PEG) のような成分を含んでもよい (Klibanov et al., (1990) FEBS Lett. 268:235-7; Maruyama et al., (1992) Biochim. Biophys. Acta 1128:44-49; Allen et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1066:29-36を参照)。免疫リポソームに対するPEGの接合は、血液におけるリポソーム循環を長引かせるばかりでなく、リポソーム製剤の治療効果を強化することが示されている (Daemen et al., (1997) J. Control. Rel. 44:1-9; Storm et al. (1998) Clin. Cancer Res. 4:111-115; Vaage et al., (1997) Br. J. Cancer 75:482-6; Gabizon et al., (1994) Cancer Res. 54:987-92)。長時間循環免疫リポソームは二つのタイプに分類される。脂質頭部突起に結合した抗体を持つもの (Maruyama et al., (1990) J. Pharm. Sci. 74:978-84)、および、PEGの遠位端に結合する抗体を持つもの (Maruyama et al., (1997) Adv. Drug Del. Rev. 24:235-42) である。ある場合には、腫瘍特異的抗体をPEGポリマーの遠位端に配置し、PEG鎖の立体配置による妨害を回避することによって効率的な標的結合を実現できるようにするのが有利である。このタイプの免疫リポソーム処方方は、肺 (Maruyama et al., (1995) Biochim. Biophys. Acta 1234:74-80)、脳 (Huwyler et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:14164-69) および腫瘍 (Allen et al., (1995) Biochem. Soc. Transact. 23:1073-79) に対しインボ標的では成功裡に使用されている。

#### 【0247】

免疫リポソーム処方による薬剤の効果的搬送は、一般に、結合免疫リポソームのエンドサイトーシスによる活発な摂取によって強化される。ヒトscFv抗体は、ファージディスプレイライブラリーから、腫瘍細胞への取り込みが最適化するように選択し、それが取り込まれている免疫リポソームの最適狙撃と搬送を確実なものとするのが可能である (Poul et al., (2000) J. Mol. Biol. 301:1149-61; Schier et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:551-67参照)。

#### 【0248】

抗体仲介性腫瘍標的に関連するもう一つの戦略は、抗体指向酵素薬剤前駆体 (ADEPT) である。これは、腫瘍細胞膜近辺に高濃度の抗ガン剤を形成するように設計された2ステップ治療法である (Springer et al., (1996) Adv. Drug Deliv. Rev. 22:351-64)。この戦略を用いると、好ましくは任意の腫瘍関連抗原に結合する酵素-抗体複合体が先ず投与され、次に、非毒性の薬剤前駆物質が注入される。これは、標的酵素の作用によって活性化される。酵素-抗体複合の代わりに、薬剤前駆物質活性化酵素に対する標的担体とし

て免疫リポソームを用いる改良型ADEPTが開発され試験されている (Storm et al., (1997) Adv. Deliv. Rev. 24:225-31; Vingerhoeds et al., (1993) FEBS Lett. 336:485-90)。

#### 【0249】

##### 治療法

本発明は、ガン、すなわち、新生物、腫瘍、転移物、または、調節されない細胞成長によって特徴付けられる疾患または障害、および、特に、その、多剤耐性形を含む - ただしそれらに限定されない - ガンの治療または予防であって、抗ビメンチン抗体、または、前記抗体をコードする核酸分子の、治療的または予防的有効量の投与によって実行する治療と予防を提供する。本発明のビメンチン標的治療によって治療されるガンおよび増殖性障害のタイプの例としては、白血病（例えば、骨髄芽細胞性、前骨髄芽細胞性、骨髄単球性、単球性白血病、赤白血病、慢性骨髄性（顆粒球）白血病、および、慢性リンパ球白血病）、リンパ腫（例えば、ホジキン病および非ホジキン病）、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、血管肉腫、内皮肉腫、ユーイング腫瘍、結腸ガン、膵臓ガン、乳ガン、卵巣ガン、前立腺ガン、扁平上皮ガン、基底細胞ガン、腺ガン、腎細胞ガン、ヘパトーマ、ウィルムス腫瘍、頸部ガン、子宮ガン、睾丸腫瘍、肺ガン、小細胞肺ガン、膀胱ガン、上皮ガン、グリオーマ、星状細胞腫、オリゴデンドログリオーマ、メラノーマ、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、異形成、および、過形成が挙げられる。ある特定の実施態様では、本発明の治療化合物は、前立腺ガン（例えば、前立腺炎、良性前立腺肥大、良性前立腺過形成（BPH）、前立腺パラングリオーマ、前立腺ガン、前立腺上皮内腫瘍性、前立腺・直腸ろう孔、および、非典型的な前立腺基質病巣）の男性に投与される。ガンの治療および/または予防は、ガンに関連する症状を緩和すること、ガンの進行の抑制、および、免疫反応の増進を含むが、ただしそれらに限定されない。一つの実施態様では、市販の、または、天然に生じた抗ビメンチン抗体、その、機能的に活発な断片または誘導体が本発明において使用される。

10

20

#### 【0250】

ビメンチン治療剤は、単独で、あるいは、他のタイプのガン治療（例えば、放射線治療、化学療法、ホルモン療法、免疫療法、および、抗腫瘍剤）と組み合わせて投与されてよい。抗腫瘍剤の例としては、シスプラチン、イフォスファミド、パクリタクセル、タクセン、トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211）、ゲムシタピン、ピノレルピン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコポリン、ピノレルピン、テモダール、および、タキソールが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。一つの実施態様では、1種以上の抗ビメンチン抗体が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ガンの外科的切除の後に投与される。別の実施態様では、1種以上の抗ビメンチン抗体が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、化学療法または放射線治療と共に投与される。別の実施態様では、1種以上の抗ビメンチン抗体が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ガンの予防または治療のために、血漿を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、または、投与と同時に投与される。

30

40

#### 【0251】

本明細書に記述される抗ビメンチン抗体、およびその他のビメンチン標的治療剤は、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ガンの予防または治療のために、IgG抗体、IgM抗体、および/または、1種以上の補体成分を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、または、投与と同時に投与される。別の実施態様では、1種以上の抗ビメンチン抗体、およびその他のビメンチン標的治療剤が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ガンの予

50

防または治療のために、1種以上のガン細胞抗原に対して免疫特異的抗体を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、または、投与と同時に投与される。さらに別の実施態様では、1種以上の抗ビメンチン抗体、およびその他のビメンチン標的治療剤が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ガンの予防または治療のために、ガンの治療に最近使用されている抗体を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、また

10

### 【0252】

本発明はさらに、動物における、好ましくは哺乳動物における、もっとも好ましくはヒトにおけるウィルスおよびその他の病原体感染の治療または予防法であって、抗ビメンチン抗体、または、前記抗体をコードする核酸分子、または、その他の、本明細書に記載されるビメンチン標的治療剤の治療的または予防的有効量を投与することを含む方法を提供する。本発明に従って治療または予防が可能なウィルス感染の例としては、レトロウィルス（例えば、ヒトT-細胞向性ウィルス（HTLV））のタイプIとII、ヒト免疫不全ウィルス（HIV）、ヘルペスウィルス（例えば、単純疱疹ウィルス（HSV）のタイプIとII、エプスタインバーウィルスおよびサイトメガロウィルス）、アレナウィルス（例えば、ラッサ熱ウィルス）、パラミクソウィルス（例えば、モルビリウィルス、ウィルス、ヒト呼吸器合胞体ウィルス、および、肺ウィルス）、アデノウィルス、ブニヤウィルス（例えば、ハンタウィルス）、コルナウィルス、フィロウィルス（例えば、エボラウィルス）、フラビウィルス（例えば、C型肝炎ウィルス（HCV））、黄熱病ウィルス、および、日本脳炎ウィルス）、ヘパドナウィルス（例えば、B型肝炎ウィルス（HBV））、オルトミオウィルス（例えば、センダイウィルス、および、インフルエンザウィルスA、BおよびC）、パポバウィルス（例えば、パピローマウィルス）、ピコマウィルス（例えば、ライノウィルス、エン

20

30

### 【0253】

本明細書に記載されるビメンチン標的治療剤は、単独で、あるいは、抗ウィルス剤、またはその他の抗病原体剤と組み合わせて投与してもよい。抗ウィルス剤の例としては、サイトカイン（例えば、IFN-アルファ、IFN-ベータ、およびIFN-ガンマ）；逆転写酵素阻害剤（例えば、AZT、3TC、D4T、ddC、ddI、d4T、3TC、アデフォビル、エファビレンツ、デラビルジン、ネビラピン、アパカビル、および、他のジデオキシヌクレオシドまたはジデオキシフルオロヌクレオシド）；ウィルスmRNAキャッピングの阻害剤、例えば、リバビリン；プロテアーゼ阻害剤、例えば、HIVプロテアーゼ阻害剤（例えば、アムプレナビル、インジナビル、ネルフィナビル、リトナビル、および、サキナビル）；アンフォテリシンB；糖タンパク処理の阻害剤としてのカタノスペルミン；ニューラミニダーゼ阻害剤、例えば、インフルエンザウィルスニューラミニダーゼ阻害剤（例えば、ザナミビルおよびオセルタミビル）；トポイソメラーゼI阻害剤（例えば、カンプトテシンおよびその類縁体）；アマンタジンおよびリマナタジンが挙げられるが、ただしそれらに限定されない。例えば、1種以上の抗ビメンチン抗体-薬剤複合体が、動物に、好ましくは哺乳動物に、も

40

50

っとも好ましくはヒトに、ウィルス感染の予防または治療のために、血漿を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、または、投与と同時に投与される。

#### 【0254】

別の例では、1種以上のピメンチン標的治療剤が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ウィルス感染の予防または治療のために、IgG抗体、IgM抗体、および/または、1種以上の補体成分を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、または、投与と同時に投与される。別の好ましい実施態様では、抗ピメンチン抗体は、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、ウィルス感染の予防または治療のために、1種以上のウィルス抗原に対して免疫特異的抗体を動物に投与する前に（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前）、投与後（例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後）に、または、投与と同時に投与される。ウィルス抗原にたいして免疫特異的な抗体の例としては、シナジス、RTM、PR0542、オスタビル、および、プロトビルが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0255】

本発明はさらに、動物における、好ましくは哺乳動物における、もっとも好ましくはヒトにおける微生物感染の治療または予防法であって、抗ピメンチン標的治療剤の治療的または予防的有効量を投与することを含む方法を提供する。本発明に従って治療または予防が可能な微生物感染の例としては、酵母感染、真菌感染、原虫感染、および、細菌感染が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。微生物感染の原因となる細菌としては、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*)、ストレプトコッカス・ニューモニアエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ナイセリア・ゴノロエア (*Neisseria gonorrhoea*)、ナイセリア・メニンギチジス (*Neisseria meningitidis*)、コリネバクテリウム・ジフテリアエ (*Corynebacterium diphtheriae*)、クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・ペルフリンゲンス (*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・テタニ (*Clostridium tetani*)、ヘモフィルス・インフルエンザエ (*Haemophilus influenzae*)、クレブシエラ・ニューモニアエ (*Klebsiella pneumoniae*)、クレブシエラ・オザエナエ (*Klebsiella ozaenae*)、クレブシエラ・リノスクレロモチス (*Klebsiella rhinoscleromatis*)、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ビブリオ・コレラエ (*Vibrio cholerae*)、エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*)、シュードモナス・アエルギノーサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、カンピロバクター (*Campylobacter*) (Vibrioビブリオ) フェトウス (fetus)、カンピロバクター・イエユニ (*Campylobacter jejuni*)、アエロモナス・ヒドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、エドワードシエラ・タルダ (*Edwardsiella tarda*)、イエルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、イエルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis*)、イエルシニア・シュードツベルクローシス (*Yersinia pseudotuberculosis*)、シゲラ・ジスエンテリアエ (*Shigella dysenteriae*)、シゲラ・フレキシネリ (*Shigella flexneri*)、シゲラ・ソンネイ (*Shigella sonnei*)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*)、トレポネーマ・パリヅム (*Treponema pallidum*)、トロポネーマ・ペルツヌエ (*Troponema pertense*)、トレポネーマ・カラテネウム (*Treponema caratense*)、ボレリア・ビンセンチ (*Borrelia vincentii*)、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、レプトスピラ・イクテロヘモラジエ (*Leptospira icterohemorrhagiae*)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、トキソプラズマ・ゴンジイ (*Toxoplasma gondii*)

)、ニューモシスチス・カリニイ (Pneumocystis carinii)、フランシセラ・ツラレンシス (Francisella tularensis)、ブルセラ・アボルツス (Brucella abortus)、ブルセラ・スイス (Brucella suis)、ブルセラ・メリテンシス (Brucella meritensis)、マイコプラズマ (Mycoplasma) 複数種、リケッチア・プロワゼキ (Rickettsia prowazeki)、リケッチア・ツツガムシ (Rickettsia tsutsugamushi)、クラミジア (Chlamydia) 複数種、および、ヘリコバクター・ピロリ (Helicobacter pylori) が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。微生物感染の治療および/または予防は、前記感染に関連する症状の緩和、複製の抑制または阻止、および、免疫反応の強化を含むが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0256】

ビメンチン標的治療剤は、単独で、または、他のタイプの抗微生物剤と組み合わせて投与されてもよい。抗微生物剤の例としては、抗生物質、例えば、ペニシリン、アモキシシリン、アンピシリン、カルベニシリン、チカルシリン、ピペラシリン、セファロsporin、バンコマイシン、テトラサイクリン、エリスロマイシン、アンフォテリシンB、ニスタチン、メトロイダゾール、ケトコナゾール、および、ペンタミジンが挙げられるが、ただしこれらに限定されない。一つの実施態様では、ビメンチン標的治療剤が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、微生物感染の予防または治療のために、血漿を動物に投与する前に (例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前)、投与後 (例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後) に、または、投与と同時に投与される。

#### 【0257】

ある例では、1種以上のビメンチン標的治療剤が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、微生物感染の予防または治療のために、IgG抗体、IgM抗体、および/または、1種以上の補体成分を動物に投与する前に (例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前)、投与後 (例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後) に、または、投与と同時に投与される。別の例では、1種以上のビメンチン標的治療剤が、動物に、好ましくは哺乳動物に、もっとも好ましくはヒトに、微生物感染の予防または治療のために、1種以上の微生物抗原に対して免疫特異的抗体を動物に投与する前に (例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間前)、投与後 (例えば、1分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、6時間、8時間、12時間、24時間、2日、または、1週間後) に、または、投与と同時に投与される。微生物抗原に対して免疫特異的な抗体の例としては、LPSおよびカプセル状ポリサッカライド5/8に対して免疫特異的な抗体が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。ある実施態様では、ウィルスまたは細菌感染に罹る危険度が増加している動物には本発明の組成物が投与される。そのような動物の例としては、ヒト火傷患者、乳児、免疫衰弱または免疫不全のヒト、および、老人が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。

#### 【0258】

#### 4.6 キット

本発明はさらに、新生物、および、多剤耐性新生物の診断法および予後判定法を始め、治療法のために使用されるキットを提供する。診断キットは、例えば、患者サンプルにおいて、または、患者の体内において、細胞表面ビメンチン発現新生物を検出し、かつ、多剤耐性の出現を監視するのに有用である。例えば、患者の化学治療の進行中に、細胞表面ビメンチン、および、本明細書で記述するその他のMDR関連マーカーを監視することによって、治療の効果や多剤耐性の発達の回避に関して貴重な情報が得られる。例えば、キットは、生物サンプルにおいて細胞表面ビメンチンタンパクを検出することが可能な標識化合物または薬剤を始め、サンプル中の細胞表面ビメンチンの量を測定する手段; および、サンプルのビメンチン量を標準 (例えば、正常な非新生細胞、または非MDR新生細胞) と

10

20

30

40

50

比較する手段を含むことが可能である。化合物または薬剤は、適当な容器にパックすることが可能である。このキットはさらに、細胞表面ビメンチンタンパクを始め、MDR-関連マーカーを検出するためのキットの使用に関する指令を含むことも可能である。このようなキットは、例えば、細胞表面ビメンチンタンパクの少なくとも一部に対して特異的に結合が可能な、1種以上の抗体を含むことが可能である。

【0259】

#### 4.7 ビメンチンワクチン

ワクチンを含む免疫学的組成物、および、ビメンチンタンパク、またはその一部を含むその他の製薬組成物は、本発明の範囲の中に含まれる。1種以上のビメンチンタンパク、または、活性を持つ、または抗原性のその断片、または、その融合タンパクは、従来技術に熟練した当業者に既知の方法と材料を用いて、ワクチンとなるよう、単独で、または、他の抗原と組み合わせて処方され、パックされることが可能である。免疫反応は、治療的に、または、予防的に使用することが可能であり、抗体免疫または、Tリンパ球によって生成されるものと同様の細胞性免疫を提供することが可能である。

10

【0260】

免疫原性を強調するために、タンパクは、担体分子に共役接合されてもよい。適当な免疫原担体としては、タンパク、ポリペプチドまたはペプチド、例えば、アルブミン、ヘモシアニン、サイログロブリンとその誘導体、特に、ウシ血清アルブミン(BSA)、および、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ポリサッカライド、炭水化物、ポリマー、および、固相体が挙げられる。その他のタンパク由来物質、または、非タンパク由来物質は当業者には既知である。免疫原担体は、通常、少なくとも1,000ダルトン、好ましくは10,000ダルトンを越える分子量を持つ。担体分子は、ハプテンに対する共有的接合を促進するために反応基を含むことが多い。アミノ酸のカルボキシル基またはアミノ基、あるいは、糖タンパクの糖基は、そんな風に使われることが多い。このような基を持たない担体は、適当な薬品と反応させて、そのような基を生産することが多い。好ましくは、免疫反応は、免疫原物質が、動物、例えば、マウス、ウサギ、ラット、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ニワトリ、およびその他の動物、もっとも好ましくはマウスおよびウサギに注入された場合に惹起される。別に、タンパクまたはポリペプチド、あるいは、抗原として、または免疫学的に等価的なポリペプチドの多数コピーを含む多数抗原ペプチドは、担体を使用せずとも、免疫原性を向上させるほど十分な抗原性を持つ可能性がある。

20

30

【0261】

ビメンチンタンパクまたはその一部、例えば、共通または変動配列アミノ酸モチーフ、または、タンパクの組み合わせは、その接合体に対する免疫反応を強化するのに十分効果的な量のアジュバントと共に投与されてもよい。ヒトにおいて広く使用されている一つのアジュバントはアラム(リン酸アルミニウムまたは水酸化アルミニウム)である。サポニンおよびその精製成分QuilA、フロイントの完全アジュバント、および、研究や獣医応用で使用されるその他のアジュバントも利用が可能である。化学的に定義された製剤、例えば、ムラミルジペプチド、モノフォスホリル脂質A、フォスホオリピド接合体、例えば、Goodman-Snitkoff et al. (1991) J. Immunol. 147:410-415(引用を通じて本明細書に取り込まれる)によって記載されもの、接合体のプロテオリポソームカプセルへの封入、例えばMiller et al. (1992) J. Exp. Med. 176:1739-1744(引用を通じて本明細書に取り込まれる)によって記載されもの、および、タンパクを、脂質粒子、例えば、Novasome(登録商標)(Micro Vascular Systems, Inc., ナシュア、ニューハンプシャー州)脂質粒子カプセルへの封入も利用が可能である。

40

【0262】

本発明は、図12A(配列識別番号1)に示した無処置のビメンチンポリペプチドの、断片、または、部分配列を含む。このビメンチンポリペプチド部分配列は、あるいは、DNAワクチンの場合はそれらをコードする対応核酸配列であるが、これらは免疫原性が高くなるように選ばれるのが好ましい。抗ビメンチンワクチン生産目的のための抗原性原理は、本明細書に記載されるビメンチンに基づく診断法と治療法に用いられる抗ビメンチンポリク

50

ロナールおよびモノクロナール抗体生産のために免疫原物質として使用されるビメンチンポリペプチド配列の使用にもあてはまる。

#### 【0263】

ポリペプチド部分配列の抗原性を予測するコンピュータ支援アルゴリズムが広く利用可能である。例えば、予想される抗原領域について「抗原性」外見を、Kolaskar法 (Kolaskar and Tongaonkar (1990) FEBS Letters 276:172-174「タンパク抗原の上に抗原決定基を予測するための半経験的方法 ("A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens")」を参照)。最初の実験で、KolaskarとTongaonkarは169個の抗原を実験的に試験した。決定基当たり20アミノ酸未満の156個を選んだ (合計2066残基)。f(Ag)を、抗原決定基における各残基の出現頻度として計算した [ $f(\text{Ag}) = \text{Epitope\_occurrence}/2066$ ]。疎水性、接触性、および、弾力性値は、Parker等 (Parker, et al., (1986) Biochemistry 25:5425-5432) から得た。任意のタンパクにおいて、各7マー毎の平均を計算し、数値を、その7マーの中心残基に割り当てた。この7マー内のどれかがタンパクの平均を上回った場合、残基は表面にあると考える。この結果を用いてf(s)をアミノ酸の表面出現頻度として得た。この予測アルゴリズムは次のステップを含む。すなわち、各重複7マーについて平均性を計算し、その結果を7マーの中心残基 (i+3) に割り当てる；全タンパクについて平均を計算する；全タンパクの平均が1.0を上回る場合、1.0を上回る全ての残基は抗原性を持つ可能性がある；もしも全タンパクの平均が1.0を下回る場合、全タンパクの平均 (注意：原著論文はここでぶつ切れの式を示す) を上回る残基は全て抗原性を持つ可能性がある；全ての残基がステップ3で選択される6マーを求める。

#### 【0264】

ポリペプチドの部分配列の抗原性を決めるもう一つの方法は、HoppとWoodsのアルゴリズムである (Hopp and Woods (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. 86:152-6)。ユーザー入力ポリペプチド配列に対するHoppとWoodsアルゴリズム分析と、分析結果の便利なグラフィック出力のためには一般大衆に利用が可能なウェブサイトがある (例えば、を参照)。図12Aに示すヒトビメンチン完全長配列を分析するのにこのアルゴリズムを用いると、免疫原性にとって十分な長さを持つ、高いHoppとWoodsの抗原性示数を持ついくつかの好適な配列が明らかにされた。これらは、ビメンチンアミノ酸残基：45-60 (すなわち、RPSTSRSLYASSPGGV)；295-315 (すなわち、FADLSEAANRNNDALRQAKQE)；および330-345 (すなわち、VDALKGTNESLERQMR) である。

#### 【0265】

さらに、本発明は、本発明のビメンチンタンパク、またはポリペプチド断片を、適当なアジュバントと一緒に含む組成物を提供する。この組成物は、本明細書に記載する通りに製薬学的に受容可能な担体において存在することが可能である。本明細書で用いる「アジュバント」または「適当なアジュバント」とは、ビメンチンタンパクまたはポリペプチドと混合されて、被験体に有毒な作用を及ぼすことなく被験体の免疫反応を強化することが可能な物質を記述する。適当なアジュバントとしては、例えば、免疫刺激性サイトカイン；5パーセント (重量/容量) のスクアレン (DASF, Parsippany, ニュージャージー州)；2.5パーセントブルロニック、L121ポリマー (Aldrich Chemical, ミルウォーキー) および0.2パーセントポリソルベート (Tween 80, Sigma) をリン酸バッファー生食液に溶解したものから構成されるSYNTEXアジュバント処方1 (SAF-1) が挙げられるが、ただしそれらに限定されない。その他の好適なアジュバントは従来技術でよく知られているが、QS-21、フロイントのアジュバント (完全および不完全)、アラム、リン酸アルミ、水酸化アルミ、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン (thr-MDP)、N-アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン (CGP11637, nor-MDPと呼ばれる)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシフォスフォリルオキシ)-エチルアミン (CGP 19835A, MTP-PEと呼ばれる)、および、RIBIであって、これは、細菌から抽出された3種の成分、モノフォスフォリル脂質A、トレハロースジミコレート、および、細胞壁骨格 (MPL+TDM+CWS) を

2%スクアレン/Tween80に溶かした懸濁液が挙げられる。アジュバント、例えば、免疫刺激性サイトカインは、ビメンチンタンパクまたはビメンチンコード核酸配列の投与前に、ビメンチンタンパクまたはビメンチンコード核酸配列の投与と同時に、または、ビメンチンタンパクまたはビメンチンコード核酸配列の投与最大5日後に、被験者に投与することが可能である。QS-21は、アラム、フロイントの完全アジュバント、SAF等と同様に、融合タンパクの投与数時間以内に投与することが可能である。

**【0266】**

本発明はまた、複数のアジュバントの混合物、例えば、ビメンチンタンパクまたはビメンチンをコードする核酸の投与前に、同時に、その後、併用投与される複数の免疫刺激性サイトカインを利用してよい。例えば、複数アジュバントの混合物、例えば、複数免疫刺激性サイトカインは、本発明の、2種以上の免疫刺激性サイトカイン、例えば、GM/CSF、インターロイキン-2、インターロイキン-12、インターフェロン-ガンマ、インターロイキン-4、腫瘍壊死因子-アルファ、インターロイキン-1、造血因子flt3L、CD40L、B7.1共同刺激分子、および、B7.2共同刺激分子から成っていてもよい。アジュバント、またはアジュバント混合物の効果は、本明細書に記載する標準工程を用いて、そのアジュバントまたはアジュバント混合物がある場合と、ない場合とでビメンチンポリペプチドに向けられる免疫反応を測定することによって定めることが可能である。

10

**【0267】**

さらに、本発明は、ビメンチンタンパクまたはビメンチンをコードする核酸、および、アジュバント、例えば免疫刺激性サイトカイン、または、アジュバント、例えば免疫刺激性サイトカインをコードする核酸を含む組成物を提供する。この組成物は、本明細書に記載する製薬学的に受容可能な担体において存在することが可能である。本発明で使用される免疫刺激性サイトカインは、GM/CSF、インターロイキン-2、インターロイキン-12、インターフェロン-ガンマ、インターロイキン-4、腫瘍壊死因子-アルファ、インターロイキン-1、造血因子flt3L、CD40L、B7.1共同刺激分子、および、B7.2共同刺激分子であってもよい。

20

**【0268】**

本明細書で用いる「ワクチン」という用語は、DNAワクチンであって、ビメンチンまたはその抗原部分をコードする核酸分子、例えば、共通または変動配列アミノ酸モチーフが製薬組成物として患者に投与されるDNAワクチンを含む。遺伝的免疫化のためには、当業者に既知の適当な搬送法として、プラスミドDNAの筋肉内への直接注入(Wolff et al. (1992) Hum. Mol. Genet. 1:363)、特定タンパク担体と複合体を形成したDNAの搬送(Wu et al., (1989) J. Biol. Chem. 264:16985)、DNAとリン酸カルシウムの共沈殿(Benvenisty and Reshef (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. 83:9551)、DNAのリポソームカプセルへの封入(Kaneda et al. (1989) Science 243:375)、粒子発射(Tang et al., (1992) Nature 356:152;およびEisenbraun et al. (1993) DNA Cell Biol. 12:791)、および、クローンされたレトロウイルスベクターによるインビボ感染(Seeger et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81:5849)が挙げられる。

30

**【0269】**

別の実施態様では、本発明は、ポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチドをインビボで真核細胞組織に導入すると、ビメンチンまたは免疫刺激性遺伝子産物を生産するように発現させることが可能な隣接核酸配列を含むポリヌクレオチドである。コードされる遺伝子産物は、免疫刺激物として、または、免疫反応を生成することが可能な抗原として作動するのが好ましい。従って、この実施態様における核酸配列は、免疫原性エピトープを、また、要すれば随意に、サイトカイン、または、T細胞共同刺激要素、例えば、B7族タンパクの一員をコードする。

40

**【0270】**

遺伝子産物ではなく、遺伝子で免疫化することの利点は下記を含む。まず、天然の、または、ほぼ天然の抗原を免疫系に提示することが可能という比較的単純なことである。細菌、酵母、または、哺乳類細胞においてさえ、組み換え的に発現された哺乳類タンパクは

50

、適当な抗原性を確保するには広範な処理を必要とする。DNA免疫化の第二の利点は、免疫原が、MHCクラスI経路に進入して、細胞傷害性T細胞反応を誘発する可能性である。インフルエンザA核タンパクをコードするDNAでマウスを免疫化すると、NPに対するCD8<sup>+</sup>反応が誘発され、これは、マウスを、インフルエンザの異種株によるチャレンジから保護した (Montgomery, D.L. et al. (1997) *Cell Mol. Biol.* 43(3):285-92; および Ulmer, J. et al. (1997) *Vaccine* 15(8):792-794)。細胞性免疫は感染のコントロールという点で重要である。DNA免疫化は、体液性および細胞性の両方の免疫反応を誘発することが可能なので、多数のビメンチン遺伝子および遺伝子断片についてそれらのワクチン使用の可能性を調査するのに比較的簡単な方法を提供することが最大の利点であろう。

#### 【0271】

本発明はまた、ガンの治療または予防に使用される腫瘍抗原ワクチンの、既知の調製または使用法も含む。例えば、米国特許第6,562,347号は、ケモカインと腫瘍抗原を含む融合ポリペプチドの用法であって、タンパクまたは核酸ワクチンとして投与されると、ガンを治療または予防するのに効果的な免疫反応を惹起するポリペプチドの用法を教示する。ケモカインとは、炎症刺激によって誘発される、1群の通常小型の分泌タンパク(7-15kDa)であり、炎症反応を仲介する血液遊走白血球の選択的移動、漏出、および活性化の指揮に関与する (Wallack (1993) *Annals New York Academy of Sciences* 178)。ケモカインは、特定の細胞表面受容体タンパクとの相互作用を通じてその機能を伝える(23)。システイン署名モチーフで定義すると、CC、CXC、CおよびCX<sub>3</sub>Cと呼ばれる、少なくとも4種のケモカインサブファミリーが特定された。この命名においてCはシステインであり、Xは任意のアミノ酸残基である。構造研究から、少なくともCXCとCCケモカインとは極めて近似した三次元構造を共有しているが(モノマー)、異なる四次元構造を持つ(ダイマー)。多くの場合、立体配置上の相違は、ループ部分またはN-末端に局在している。本発明では、例えば、ヒトビメンチンポリペプチド配列(図12Aに示したようなもの)、または、そのポリペプチド断片、および、ケモカイン配列は融合され、免疫ワクチンに使用される。融合体のケモカイン部分は、ヒト単球ケモ指向性タンパク-3、ヒトマクロファージ由来ケモカイン、または、ヒトSDF-1ケモカインであってもよい。融合体のビメンチン部分は、通常のスクリーニングで、強力な抗原性を持つと予想されることが好ましい。

#### 【0272】

#### 4.8 製薬処方および治療法

本発明は、腫瘍性疾患を持つ患者の予防法と治療法の両方を提供する。このような疾患に罹る危険性を持つ被験体は、例えば、本明細書に記載される診断または予後判定アッセイによって特性される。予防剤と投与は、新生物に特徴的な症状の出現前に、その新生物の発達が阻止される、または別に、進行を遅らせるように行うことが可能である。一般に、予防法または治療法は、新生細胞、特に、多剤耐性新生細胞の上に存在する細胞表面ビメンチンに結合することが可能なビメンチン標的成分を含み、かつ、治療成分と連結する化合物の治療有効量を被験者に投与することを含む。

#### 【0273】

ビメンチン標的化合物の例としては、モノクローナル抗ビメンチン抗体、および、その断片が挙げられる。適当な治療成分の例としては、従来化学療法剤、例えば、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、ブスルファン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリピン、シクロフォスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エポエチン、エトポシド、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イフォスファミド、イマチニブ、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、マイトマイシン、ミトテイン、ミトキサントロン、パクリタクセル、ペントスタチン、プロカルバジン、タキソール、テニポシド、トポテカン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、および、ピノレルピンが挙げられる。好適な治療成分の他の例としては、シュードモナス体外毒素、ジフテリア毒素、植物リシン毒素、

10

20

30

40

50

植物アブリン毒素、植物サポニン毒素、植物ゲロニン毒素、および、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパクが挙げられる。このような免疫毒素は、治療化合物のビメンチン標的成分によって、ビメンチン発現性新生細胞、または、多剤耐性新生細胞に向けて発射され、細胞表面ビメンチンに結合すると、捕捉されて細胞内に取り込まれ、その新生細胞を殺す、または、その成長を阻止する。

#### 【0274】

##### 4.8.1 有効用量

この化合物の毒性および治療効力は、細胞培養または実験動物における標準的製薬過程、例えば、LD<sub>50</sub>（集団の50%にたいして致命的となる用量）およびED<sub>50</sub>（集団の50%で治療的効力を持つ用量）定量のための過程によって定量が可能である。毒性作用と治療作用の間の用量比は治療示数であり、LD<sub>50</sub> / ED<sub>50</sub>比で表される。大きい治療示数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を用いてもよいが、そのような化合物を患部組織に向けた場合、未感染細胞に対する予想される傷害を極小とるようにして副作用を下げるような搬送システムを設計するように配慮しなければならない。

10

#### 【0275】

細胞培養アッセイと動物実験から得られたデータは、ヒトにおいて使用される用量範囲を処方するのに用いられる。この化合物の用量は、ほとんど、または、全く毒性を持たないED<sub>50</sub>を含む循環濃度範囲内にあることが好ましい。用量は、使用する剤形および利用する投与ルートに応じてこの範囲内で変動してよい。本発明の方法において使用される化合物は全て、先ず、治療的有效量は、細胞培養アッセイによって推定される。動物モデルでは、細胞培養で求めたIC<sub>50</sub>（すなわち、症状の最大の半分の抑制を実現する試験化合物の濃度を含む、循環血漿内濃度範囲を実現する用量が処方される。この情報を用いてさらに正確にヒトにおける有用用量を決定する。血漿レベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することが可能である。

20

#### 【0276】

##### 4.8.2 処方と用法

本発明に従って用いられる製薬組成物は、1種以上の生理的に受容可能な担体または賦形剤を用いて従来やり方で処方してよい。従って、化合物、および生理的に受容可能な塩および溶媒は、例えば、注入、吸入、または嚥下（口から、または鼻から）、または、経口的、頬内、非経口的、または、直腸投与によって投与されるように処方されてよい。

30

#### 【0277】

この治療法では、本発明の化合物は、様々な投与負荷、すなわち、全身および局所、または局在投与を含めた負荷のために処方することが可能である。一般的に、技術および処方法は、Remingtonの「製薬科学（"Pharmaceutical Sciences"）」、Meade Publishing Co., Easton、ペンシルバニア州に見出すことが可能である。全身投与のためには、筋肉内、静脈内、腹腔内、および皮下を含めた注入が好ましい。注入のためには、本発明の化合物は、溶液として処方され、好ましくは生理的に適合的なバッファー、例えば、ハंकス液またはリンゲル液に処方される。さらに、化合物は固体形として処方され、使用直前に再溶解または懸濁させてもよい。凍結乾燥した形も含まれる。

#### 【0278】

経口投与用として、製薬組成物は、下記のものと共に従来手段によって調製されて、例えば、錠剤またはカプセルの形を取ってもよい。すなわち、製薬的に受容可能な賦形剤、例えば、結合剤（例えば、あらかじめゼラチン化されたトウモロコシでん粉、ポリビニールピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微細結晶セルロース、またはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、またはシリカ）；崩壊剤（例えば、ジャガイモでん粉、または粉グリコール酸でんナトリウム）；または、湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウム）である。錠剤は、従来技術で既知の方法でコートしてもよい。経口投与用の液性製剤は、例えば、溶液、シロップ、または懸濁液の形を取ってもよいが、製剤は、使用前に、水またはその他の適当なベヒクルと構成されるために、乾燥産品として提示されてもよい

40

50

。このような液性製剤は、製薬的に受容可能な下記の添加物と共に従来手段によって調製されてもよい。添加物とは、例えば、懸濁剤（例えば、ソルビトールシロップ、セルロース誘導体、または水素添加食用脂肪）；乳化剤（例えば、レシチン、またはアカシア）；非水性ベヒクル（例えば、アーモンド油、油状エステル、エチルアルコール、または分留植物油）；および、防腐剤（例えば、メチルまたはプロピル-p-ヒドロキシベンゾエート、またはソルビン酸）である。製剤はまた、バッファ塩、芳香剤、着色剤、および甘味剤を適当に含んでもよい。

**【0279】**

経口投与用製剤は、活性化合物の調節的放出を実現するように好適に処方される。経口投与のためには、製剤は、従来のやり方で処方される錠剤またはロゼンジの形を取ってもよい。吸入投与のためには、本発明によって使用される化合物は、加圧パックまたは噴霧器から、適当な駆動体、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素、またはその他の適当なガスを用いることによってエロゾルスプレーの形で好適に搬送される。加圧エロゾルの場合は、用量単位は、指定分量を搬送するためのバルブを供給することによって定められる。吸引器または吸引込み器で使用される、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジは、化合物と適当な基礎粉末、例えばラクトースまたはでん粉との粉末混合物を含むように処方される。

10

**【0280】**

化合物は、注入、例えば、ポラス注入または連続輸液による非経口投与用に処方されてもよい。注入用処方は、単位剤形として、例えば、アンプル、または、多数用量容器に入れて、防腐剤を添加させて提示されてもよい。組成物は、懸濁液、溶液、油状または水性ベヒクルにおける乳剤のような形を取ってもよく、また、処方剤、例えば、懸濁剤、安定化剤、および/または、分散剤を含んでもよい。別に、活性成分は、使用前に、適当なベヒクル、例えば、無菌で発熱物質フリーの水と構成されるために、粉末形として存在してもよい。

20

**【0281】**

化合物はまた、直腸用組成物、例えば、坐剤、または保持注腸剤として処方されてもよい、例えば、従来の坐剤ベース、例えば、カカオバターまたはその他のグリセリドを含む組成物であってもよい。

**【0282】**

前述の処方の他に、化合物はさらに滞留製剤として処方されてもよい。このような長期持続処方埋め込み（例えば、皮下、または筋肉内）によって投与されるか、または、筋肉内注射によって投与される。従って、例えば、化合物は、適当なポリマー、または疎水性物質（例えば、受容可能なオイル中の懸濁液として）と共に処方されてもよいし、またはイオン交換樹脂、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として処方されてもよい。他の好適な搬送システムとしてはマイクロスフェアが挙げられる。これは、長期に渡って薬剤を局所非侵襲的に搬送することを可能にする。この技法は、前毛細管サイズのマイクロスフェアで、冠状動脈カテーテルを通じて、任意の選択部分、例えば、心臓またはその他の器官へ、炎症や虚血を起こさずに注入されるマイクロスフェアを利用する。投与された治療剤は、このマイクロスフェアからゆっくりと放出されて、周辺組織細胞（例えば、上皮細胞）によって取り込まれる。

30

40

**【0283】**

全身投与は、経粘膜または経皮手段によって実行することも可能である。経粘膜または経皮投与のためには、浸透すべき障壁に対して適当な浸透剤が処方に用いられる。このような浸透剤は、従来技術で一般的に知られているが、例えば、経粘膜投与用としては胆汁塩およびフシジン酸誘導体が挙げられる。さらに、浸透を助長するために界面活性剤を用いてもよい。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐剤を用いて実行される。局所投与の場合、本発明のオリゴマーは、従来技術で一般的に知られるように、軟膏、塗布剤、ゲル、またはクリームに処方される。治療を加速するため、外傷または炎症を局所的に治療するのに洗浄液を使用することも可能である。

50

## 【0284】

臨床現場では、ビメンチン標的治療剤の治療システムおよび遺伝子搬送システムは、従来技術で馴染みのいくつかの方法から選ばれた任意の方法で患者の中に導入することが可能である。例えば、ビメンチン標的治療剤の製剤は、全身的に、例えば、静脈注射によって導入することが可能である。

## 【0285】

本発明のビメンチン標的治療剤の製剤、受容可能な希釈剤に溶解した化合物から事実上成り、あるいは、遺伝子搬送ベヒクルまたは化合物が埋め込まれた徐放性基質を含むことも可能である。

## 【0286】

組成物は、要すれば、活性成分を含む1個以上の単位剤形を含むパックまたは投与装置に収めて提示されてもよい。パックは、例えば、水泡パックのような金属またはプラスチックパックを含んでもよい。パックまたは投与装置には、投与のための指令が添えられてもよい。

10

## 【0287】

## 実施例

本発明は、下記の実施例によってさらに具体的に説明される。ただし、この実施例は限定的なものと考えてはならない。本出願を通じて引用された参考文献、特許、および、公開特許出願全ての内容が参照することにより本明細書に取り込まれるものとする。本明細書で参照された、公共のデータベースに預託されているヌクレオチドおよびアミノ酸配列も参照することにより本明細書に含める。当業者であれば、ほんの通例の実験をするだけで、本明細書に記載される特定の物質や過程に対して数多くの等価物を認識し、確認することが可能であろう。このような等価物は、冒頭に掲げられた請求項の範囲の中に含まれることが意図される。

20

## 【実施例1】

## 【0288】

## 5.1 MDR固体腫瘍/ガン細胞における53kDaタンパクの過剰発現

多剤耐性腫瘍細胞系統において、その薬剤感受性対立細胞と比べた場合、もしあるとすれば、どのタンパクが別様に発現されているのかを調べるために実験を行った。本実施例で用いた7種の異なる細胞系統を、下の表に示す。

30

## 【0289】

【表 1】

ガン細胞の組織タイプ	薬剤感受性「親」細胞系統	「親」の薬剤感受性細胞系統から得られた多剤耐性細胞系統	細胞の供給源
前骨髄性白血病	HL60	HL60/AR	米国組織培養保存施設 (ATCC、マナサス、バージニア州) およびAurelium BioPharma
前骨髄性白血病	NB4	NB4/VLB NB4/DOX	ドイツ微生物・細胞培養収集施設 (DSMZ, ドイツ) およびAurelium BioPharma
Tリンパ球様	CEM	CEM/VLB CEM/DOX	ATCC、William Beck博士およびAurelium BioPharma
Tリンパ球様	HSB2	HSB2/VLB HSB2/DOX	ATCCおよびAurelium BioPharma
Tリンパ球様	Molt4	Molt4/DOX Molt4/VLB	ATCCおよびAurelium BioPharma
乳房上皮	MCF-7	MCF-7/AR MDA/MITO	ATCCおよびAurelium BioPharma
乳房上皮	MDA	MDA/AR MDA/MITO	ATCCおよびAurelium BioPharma
卵巣	SKOV-3 2008	SKOV-3/T320 2008/T320	ATCCおよびAurelium BioPharma

\* MDR細胞系統は、親細胞系統、次に前向きスラッシュ、次に親細胞系統において耐性を選択するのに用いられた薬剤名の略名と系統的に命名された。この表の薬剤略名は、AR (アドリアマイシン)、VLB (ビンブラスチン)、DOX (ドキシソルビシン)、MITO (マイトマイシン)、および、T320 (タキソール) である。

## 【0290】

懸濁細胞は、10%から15%のウシ胎児血清 (Hyclone, Inc. ローガン、ユタ州から購入) を含むRPMIまたは -MEM培養液にて育成した。細胞を、5% CO2と95%空気の湿潤な雰囲気中で37 で抗生物質無しで育成し、培養物が $1 \times 10^6$ 細胞/ml時に継代した。多剤耐性細胞 (HL60/AR, NB4/VLB, NB4/DOX, CEM/VLB, CEM/DOX, HSB2/VLB, HSB2/DOX, Molt4/VLB, Molt4/DOX) (Aurelium Biopharma Inc., モントリオール (ケベック)、カナダ) を、適当濃度の細胞傷害性薬剤と共に連続育成した。同様に、接着細胞を、10%ウシ胎児血清を含む -MEM培養液 (MCF-7) またはDMEM(MDA)にて育成した。多剤耐性細胞 (MCF-7/AR、MDA/ARおよびMDA/MITO) を適当濃度の細胞傷害性薬剤と共に連続育成した。全ての細胞系統について、市販の (例えば、Stratagene Inc., サンディエゴ、カリフォルニア州) PCRによるマイコプラズマ検出キットをメーカーの指令に基づいて用いて調べ、マイコプラズマ汚染の無いことを確認した。全ての多剤耐性細胞系統について、薬剤の異なるクラスを代表する、一揃いの異なる薬剤を用いて多剤耐性について頻繁に試験した。MDR細胞は、その細胞表面にその他のMDRマーカーを発現した。

## 【0291】

各細胞タイプから様々な抽出物を調製した。細胞を濃縮し、標準法に従って溶解し、そ

10

20

30

40

50

の細胞から細胞全体抽出物を得た（例えば、Ausubel et al. 「分子生物学における最新プロトコル（"Current Protocols in Molecular Biology"）」, John Wiley & Sons Inc., ニューヨーク、ニューヨーク州、1993を参照）。別に、細胞は先ず表面をビオチニル化し、次に溶解して、ビオチニル化細胞全体抽出物を得た（下記の実施例に示す通り）。この実験を行うために、無処置の薬剤感受性（CEM、HL60およびMCF-7/AR）、および、多剤耐性細胞（CEM/VLB、HL60/AR、およびMCF-7/AR）を、膜不透過ビオチニル化剤、Sulfo-NHS-LC-LC-ビオチン（Pierce #21338）にてビオチニル化した。このために、細胞を、3度、50 ml PBS pH8で洗浄してビオチニル化した。次に、膜不透過試薬であるSulfo-NHS-LC-LC-ビオチンを0.1-0.5 mg/mlに調製して、細胞に加えた。Sulfo-NHS-LC-LC-ビオチンとのインキュベーションは、回転させながら、4 で1時間続けた。細胞を10 mMグリシンを含む50 ml PBS pH8で1回、グリシン無添加の50 ml PBSで数回洗浄することによって反応を停止させた。次に、細胞を、プロテアーゼ阻害剤（プロテアーゼ阻害剤：1  $\mu$ g/mlペプスタチン；1  $\mu$ g/mlロイペプチン；1  $\mu$ g/mlベンザミジン；0.2 mM PMSF）を含む、200  $\mu$ lのバッファーA（1% SDSおよび0.05 M Tris/HCl, pH7.4）によって分解し、5分間氷上でインキュベートした。次に、この細胞溶解物を、Vibracell超音波発信器振幅40設定#25によって3x10秒、超音波照射の合間は氷上に1分設置して、超音波処理した。超音波処理細胞溶解物は、プロテアーゼ阻害剤を含む800  $\mu$ lのバッファーB（1.25% Triton-X100, 0.05M Tris/HCl, pH7.4, 190 mM NaCl）と混合し、氷上で5分インキュベートした。次に、この細胞溶解物を、Eppendorfマイクロ遠心器で14,000rpmにて5分間遠心した。上清を取り出し、そのタンパク濃度を、BIORADから得たDCタンパクアッセイキットをメーカーの指示に基づいて用いて定量した（BioRad Laboratories, ヘラクレス、カリフォルニア州）（さらにLowry et al., J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951も参照）。

#### 【0292】

このSulfo-LC-LC-ビオチニル化剤を用いることによって細胞表面に露出するタンパクのリシン側鎖のアミノ基の修飾が確保された。逆に言うと、細胞内タンパクはビオチン化していないことが予想された。なぜなら、このスルフォビオチンは、無処置細胞の細胞膜を横断することができないからである。

#### 【0293】

さらに、各タイプの表面ビオチニル化、または非ビオチニル化細胞について細胞膜標本を調製した。このために $3 \times 10^9$ 細胞（各細胞タイプの）を、12.5 mlの低張バッファー1（10 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM Tris-HCl, pH7.4）に懸濁し、氷上で10分インキュベートした。次に、細胞を、DounceガラスホモジェナイザーB型（15 ml）にてホモジェナイズした。細胞溶解の程度を細胞を鏡検することによって確認した。細胞の85%を破壊するには約40ストロークが必要であった。ホモジェナイズ直後に、2.5XバッファーII（バッファー1X；210 mMマニトール；70 mM蔗糖；5 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA pH7.5）の半量（6.25 ml）をこの細胞ホモジェネートに加え、混合した。ホモジェネートを、SS34ローター使用（ブレーキはオフ）のSorvall遠心器で1300xg（3300 rpm）にて5分回転させた。核画分を含むペレットを、細胞膜と小器官を含む上清から分離した。核分離後の上清を、SS34ローター使用（ブレーキはオフ）のSorvall遠心器で17000xg（11900 rpm）にて15分回転させた。ミトコンドリア濃縮ペレットを、膜濃縮上清画分から分離した（ミトコンドリア分離後画分）。後者の上清を、AH-629ローターおよび、Beckman #cat344058から調達のPAウルトラ透明チューブ使用のSorvall超遠心器で100,000xgにて4 で2時間遠心した。細胞質ゾル濃縮上清を注意深く取り出し、膜濃縮膜ペレットを、前記バッファー1 300  $\mu$ lに再懸濁し、27ゲージ針を用いてよく混合した。この細胞膜を、最後の膜ペレットを、不連続蔗糖勾配（16%, 31%, 45%, 60% w/v 蔗糖 / バッファー1）で分解することによってさらに濃縮した。簡単にまとめると、100,000xgの遠心工程の後、濃縮膜物質から成る再懸濁ペレットに、バッファー1（最終的に16% w/v）に溶解した32% w/vの蔗糖の等量（約350  $\mu$ l）を加えた。蔗糖勾配は、チューブの底部に6.9 ml 60%を、次に9.9 ml 45%蔗糖、13.9 ml 31%蔗糖、および6.9 ml 16%蔗糖のように調製した。未精製細胞膜を含む16%蔗糖を勾配の上辺にゆっくりと注ぎ、このサンプルを、AH-629ローターおよび、Beckman #cat

344058から調達のPAウルトラ透明チューブ使用のSorvall超遠心器で100,000xgにて4で18時間遠心した。高度に濃縮された細胞膜を含む、16%蔗糖と31%蔗糖の間の介在層を収集し、バッファー1による遠心で1度洗浄した。超遠心器による100,000xg遠心後、この高濃縮細胞膜画分を、適当容量(約50 µl)のバッファー1に再懸濁し、-80で保存した。

#### 【0294】

表面ビオチニル化全体細胞抽出物からのタンパクと、各細胞タイプの細胞膜標本(HL60, HL60/AR, NB4, NB4/DOX, NB4/VLB, CEM, CEM/VLB, Mol4, Mol4/AR, Mol4/VLB, HSB2, HSB2/VLB, HSB2/DOX, MCF-7, MCF-7/AR, MDA, MDA/AR, MDA/MITO)からのタンパクのそれぞれ等量を、二次元(2-D)ゲル電気泳動で分析し、銀染色、または、抗VIM抗体またはストレプトアビジン-HRP複合体(ストレプトアビジンはビオチンに結合する)による免疫プロットによって視覚化した。これによって、第一次元では等電位点の差に従って、第二次元では分子量に従ってサンプルの分解を可能とした。第一次元では、13cmの固定pH勾配ストリップ(Amersham Pharmacia Biotech、ピスカタウェイ、ニュージャージー州)を用いて等電点クロマトグラフィーを実行した。簡単に言うと、13cmストリップは、セラミックのストリップホルダーにて、タンパクサンプル(0.5 mg-2 mgタンパク)を含む250 µlの再水和バッファー中で再水和させた。次に、電極パッドを各電極に設置し、タンパクを、下記のプログラムに従ってIPGphor装置にて分離した。

10

13cmストリップ (pH4-7)	-500V	500Vh用として
	-1000V	1000Vh用として
	-8000V	16000Vh用として

20

次にストリップを水で濯ぎ、平衡バッファーに溶解した1%DTTにて15分平衡させ、次いで平衡バッファーに溶解した4%ヨードアセタミドで15分平衡させた。

#### 【0295】

第二次元では、前記等電点ストリップに、Laemmliの方法(Lemmli U.K., Nature 227:680-685, 1970)に従って、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を8%または10%ゲルを用いて行った。分子量マーカーは、2x3mmろ紙に負荷し、ストリップの一端に設置した。次に、ストリップと分子量マーカーろ紙を、移動バッファーとして0.5%アガロース液を含むポリアクリルアミドゲルに密封した。室温で30Vで1時間、タンパクをゆっくりとストリップからゲルに移動させた。分離は、それぞれ、8%または10%のゲルにおいて、70Vまたは75Vで、4-8で17-18時間行った。

30

#### 【0296】

次に、ゲルを銀染色で染め、写真撮影した。(この時点で、ゲル分解タンパクはまた、Hybond Cニトロセルロース膜に転送して、次に、下記の実施例で後述するように、抗体またはストレプトアビジン-HRPで免疫プロットすることが可能であることに注意されたい)。

#### 【0297】

MCF-7およびMCF-7/AR細胞の全体細胞抽出物の銀染色2-Dゲルにおいて約53kDa (pIが約5)のタンパクが特定された。この53kDaタンパクは、薬剤感受性を持つMCF-7細胞に比べると、多剤耐性MCF-7/AR細胞の全細胞抽出物において極めて過剰に発現されていた(図1(A)と(B))。

40

#### 【実施例2】

#### 【0298】

5.2 MCF-7/AR乳ガン細胞の53kDaタンパクがピメンチンであることを特定

乳房MCF-7およびMCF-7/AR細胞の53kDaタンパクの正体を明らかにするために、MCF-7またはMCF-7/AR全細胞抽出物を2-Dゲル(2 x 750 µl, pI 4から7、10%ゲル)に負荷し、銀染色し、53kDaスポットを切り出した。次に、スポットを、ゲルの染色/脱色、トリプシン消化、ペプチド抽出、および、ペプチド精製の最適化工程を用いて処理した。簡単に言うと、ゲルは、メーカー指定の手順によってSilverQuest銀染色にて染め(Invitrogen、

50

カールスバート、カリフォルニア州)た。興味の特異タンパクスポットを、酸で洗浄したカミソリ刃で切り出し、清潔な(酸で洗浄)ガラス板の上で小片に切断し、200  $\mu$ l PCR管(MeOH処理)に移した。このゲル片を、50  $\mu$ lの脱染色液Aおよび50  $\mu$ lの脱染色液B(SilverQuestキットに支給されている)(または、100  $\mu$ lの新鮮調製脱染色液、混合前液から)と混合し、攪拌せず室温で15分インキュベートした。洗液は、毛細管先端を用いて取り除いた。ゲル片に水を加え、混合し、室温で10分インキュベートした。後の工程を3回繰り返した。次に、このゲル片を、室温で5分100  $\mu$ lの100%メタノールにおいて脱水し、次に30%メタノール/水にて再水和させた。次に、ゲル片を、2度水で10分間、2度25 mM Ambic(重炭酸アンモニウム)/30%アセトニトリル(5分)で洗浄し、次いでゲル乾燥工程とした。脱色・洗浄したゲル片のトリプシン消化を、約1容量のトリプシン液(酵素130 ngを25 mM重炭酸アンモニウム、5 mM  $\text{CaCl}_2$ に溶解)を、1容量のゲル片に加えることによって実行し、サンプルを氷上に45分放置した。消化は、37°Cで15-16時間進行させた。消化されたペプチドは、振とうしながら、室温で15分アセトニトリルで抽出した。ゲル片/溶媒を5分超音波処理し、超音波無しで、25 mM Ambic:50%アセトニトリルで再抽出した。消化ペプチドはさらに、新たに調製された5%ギ酸:50%アセトニトリル:45%水にて室温で振とうしながら15分抽出した。混合は1容量のアセトニトリルで完了し、ゲル片/溶媒は5分超音波処理し、同様に超音波無しで再抽出した。収集した材料を合わせ、乾燥した。抽出ペプチドを、0.2%トリフルオロ酢酸(または0.5%ギ酸)を含む5%メタノールに再懸濁し、次に平衡させたC18ベッド(Ziptip、Milliporeによる)に負荷した。負荷したZiptipを、0.2%TFA(または0.5%ギ酸)を含む5%アセトニトリルにて洗浄し、次に、10  $\mu$ lの60%アセトニトリルで溶出した。溶出したペプチド溶液を乾燥し、MALDI質量分析によって分析した(Mann M. et al. Ann. Rev. Biochem. 70:437-473, 2001)。

#### 【0299】

53kDaスポット(精製およびプロテアーゼ消化後)の質量分析図は、20個を超えるトリプシン処理ペプチドから成り、この内16ペプチドは53kDaタンパク由来のもので、残りのペプチドは、トリプシンの自己消化産物(データ図示せず)であった。ProFound(登録商標)(<http://www.proteomics.com/prowl-cgi/Profound.exe>)と呼ばれる、配列データベース探索用シェアウェアソフトウェアプログラムを用いて、53kDaペプチドをさらに分析した。PROFOUNDを用いて、タンパク配列(例えば、米国国立生物工学情報センター(NCBI)の配列の非冗長収集)を求めて公共データベースを探索した。NCBIデータベースは、GenBankに保存されるDNAの全収集物の翻訳タンパク配列ばかりでなく、PDB、SWISS-PROT、およびPIRデータベースのタンパク配列も含んでいる。

#### 【0300】

ProFound(登録商標)プログラムを用い、53kDaタンパクは、ビメンチンであると特定された(Chan et al., Biochemistry 28:1033-1039, 1989; Hale and Mansfield, Nuclear Acids Res. 17(23):10112, 1989)。この特定は、ビメンチンの完全なアミノ酸配列(図12)の43%をカバーする16個のトリプシン処理ペプチド配列の分析に基づいて確率Zスコア2.43(99.9番目のパーセンタイルに入る)にて為された。PROFOUND分析結果を評価する際二つの値を考慮に入れた。すなわち、Z確率スコアと、パーセント占有率(特定されたタンパクの完全アミノ酸配列に対するペプチド配列のパーセントである)である。Z=1.65-2.43は、スコアの受容可能範囲である。Z=1.65とは、結果が95番目のパーセンタイルに入ることを意味し、Z=2.43とは結果が99.9番目のパーセンタイルに入ることを意味する。従って、2.43のZスコアは、この53kDaスポットペプチド配列は、ビメンチンのものと極めて高い確率で一致することを示した。

#### 【0301】

16個のペプチドの配列は、ビメンチン分子の全体に渡って拡散し、まとめると完全なビメンチンタンパクアミノ酸配列の43%に相当していた。従って、特定されたタンパクは完全長タンパクであり、断片または融合タンパクではない。

#### 【0302】

ビメンチンがMCF-7/AR細胞において過剰発現されていることを確認するために、全体抽

出物を2D-PAGEにて分解し、ニトロセルロースに転送し、抗ビメンチン (MS-129-P, NeoMarker) でプロットした。

【0303】

図2(A)と(B)に示すように、ビメンチンは、薬剤感受性MCF-7細胞の全体細胞抽出物に比べると、多剤耐性MCF-7/AR細胞の全体細胞抽出物において、少なくとも11倍過剰に発現されていた。

【実施例3】

【0304】

5.3 MDRリンパ芽球白血病細胞におけるビメンチンの細胞表面発現

ビメンチンが細胞膜の内側にあるのか外側にあるのかを確定するため、無処置リンパ芽球白血病細胞 (CEMおよびCEM/VLB) を、実施例2と同様に、リシンと反応する膜不透過ピオチニル化試薬で処理し、薬剤感受性 (CEM) と多剤耐性 (CEM/VLB) の両方から全細胞抽出物を調製した。CEMとCEM/VLBについて、2-Dゲルの二つの等価的セットを調製し、銀染色し、ニトロセルロースに転送し、ストレプトアビジン-HRPでプロットした。

【0305】

図3AとBは、それぞれ、CEMとCEM/VLB全表面ピオチニル化細胞抽出物の、2-Dストレプトアビジン-HRPプロットを示す。表示された面積は、2-Dゲル (MW=53 kDa、pI=5.1) におけるビメンチンの予想部位と対応する。50kDaタンパクは、薬剤感受性CEM細胞と比べて、多剤耐性CEM/VLB細胞の表面では、少なくとも2倍過剰に発現されていた (図3AとBを比較せよ)。

【0306】

このタンパクの正体がビメンチンであることを確認するために、50kDaスポットを、対応スポットから得た座標を用いて銀染色ゲルの上に位置決めし、切り出し、処理して、実施例2で記載したようにMALDI分析用のサンプルを調製した。この50kDaスポットの質量分析図 (トリプシン消化とペプチド精製後) は、20個を越えるトリプシン処理ペプチドから成り、この内15ペプチドは53kDaタンパク由来のもので、残りのペプチドは、トリプシンの自己消化産物 (データ図示せず) であった。ProFound (登録商標) (<http://www.proteomics.com/prowl-cgi/Profound.exe>) と呼ばれる、配列データベース探索用シェアウェアソフトウェアプログラムを用いて、53kDaペプチドをさらに分析した。

【0307】

50kDaタンパクは、ビメンチンであると特定された (Chan et al., Biochemistry 28:1033-1039, 1989; Hale and Mansfield, Nuclear Acids Res. 17(23):10112, 1989)。この特定は、ビメンチンの完全なアミノ酸配列の52%をカバーする14個のトリプシン処理ペプチド配列の分析に基づいて確率Zスコア2.43 (99.9番目のパーセンタイルに入る) にて為された。2.43のZスコアは、この約50kDaスポットペプチド配列は、ビメンチンのものと極めて高い確率で一致することを示した。

【0308】

完全長ビメンチンタンパクは、CEM/VLB細胞の表面に発現され、一箇所ピオチニル化された。すなわち、分子のC-末端に比較的近くに位置するリシン残基である。15個のペプチドの配列は、ビメンチン分子の全体に渡って拡散し、まとめると完全なビメンチンタンパクアミノ酸配列の52%に相当していた。従って、特定されたタンパクはこの場合も完全長タンパクであり、断片または融合タンパクではない。このピオチニル化領域は二つのやり方で特定された。まず、結合ピオチン成分は、それを含むペプチドの質量を、ピオチニル化されていないペプチドに比べて、変化させる。第二に、ピオチニル化ペプチドはストレプトアビジンビーズ (不動態ストレプトアビジンビーズ、Pierce#20347、ダラス、テキサス州から市販されている) に結合するが、非ピオチニル化ペプチドは結合しない。

【実施例4】

【0309】

5.4 MDR前骨髄球白血病細胞におけるビメンチンの細胞表面発現

ビメンチンが細胞膜の内側にあるのか外側にあるのかを確定するため、無処置前骨髄球

10

20

30

40

50

白血病細胞（HL60およびHL60/AR）を、実施例2と同様に、アミノ酸リシンと反応する膜不透過ビオチニル化試薬と反応させ、薬剤感受性（HL60）と多剤耐性（HL60/AR）の両方から全細胞抽出物を調製した。

#### 【0310】

このために、細胞を、3度、50 ml PBS pH8で洗浄してビオチニル化した。次に、膜不透過ビオチニル化試薬 Sulfo-NHS-LC-LC-ビオチン（Pierce Chemicals、ダラス、テキサス州）を0.1-0.5 mg/mlに調製して、細胞に加えた。Sulfo-NHS-LC-LC-ビオチンとのインキュベーションは、回転させながら、4 で1時間続けた。細胞を10 mMグリシンを含む50 ml PBS pH8で1回、グリシン無添加の50 ml PBSで数回洗浄することによって反応を停止させた。次に、細胞を、プロテアーゼ阻害剤（プロテアーゼ阻害剤：1  $\mu$ g/mlペプスタチン；1  $\mu$ g/mlロイペプチン；1  $\mu$ g/mlベンザミジン；0.2 mM PMSF）を含む、200  $\mu$ lのバッファーA（1% SDSおよび0.05 M Tris/HCl, pH7.4）によって分解し、5分間氷上でインキュベートした。次に、この細胞溶解物を、Vibracell超音波発信器振幅40設定#25によって3x10秒、超音波照射の合間は氷上に1分設置して、超音波処理した。超音波処理細胞溶解物は、プロテアーゼ阻害剤を含む800  $\mu$ lのバッファーB（1.25% Triton-X100, 0.05M Tris/HCl, pH7.4, 190 mM NaCl）と混合し、氷上で5分インキュベートした。次に、この細胞溶解物を、Eppendorfマイクロ遠心器で14,000rpmにて5分間遠心した。上清を取り出し、そのタンパク濃度を、BIORADから得たDCタンパクアッセイキットをメーカーの指示に基づいて用いて定量した（BioRad Laboratories, ヘラクレス、カリフォルニア州）（さらにLowry et al., J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951も参照）。

10

20

#### 【0311】

さらに、HL60およびHL60/AR細胞の表面ビオチニル化全細胞抽出物から、不動化ストレプトアビジン（Pierceから市販、カタログ番号#20347、または、Amersham Pharmacia Biotech RPN1231（ピスカタウェイ、ニュージャージー州））を用いて、ストレプトアビジン精製ビオチニル化タンパクを調製した。このために、500  $\mu$ gから2mgのタンパクを含む50  $\mu$ lサンプルを、プロテアーゼ阻害剤を含むバッファーC（前記バッファーAとBの1:4v/v混合液）にて最終450  $\mu$ lに希釈した。次に、サンプルを、Eppendorf微細遠心器にて14,000rpmで1分遠心した。上清を、新しいEppendorfチューブに移し、100  $\mu$ lのストレプトアビジン連結セファローズビーズと混合した。連結セファローズビーズをあわせたタンパク分解物を回転させながら4 で一晩インキュベートした。混合液を、Eppendorf微細遠心器にて14,000rpmで30秒遠心した。上清を取り出し、タンパク負荷ビーズを、バッファーCで3回洗浄し、次に、バッファーCに溶解した500 mM NaClで、さらにまたバッファーCで洗浄した。タンパクは、ストレプトアビジン連結ビーズから、10分の煮沸後SDSサンプルバッファーによって溶出した。溶出を繰り返し、溶出液をプールした。

30

#### 【0312】

HL60およびHL60/AR（前骨髄球白血病）の細胞表面ビオチニル化全細胞抽出物およびストレプトアビジン精製細胞表面ビオチニル化抽出物から得られた等量タンパクを、Laemmli（上述）の方法に従ってSDS-PAGEで分解し、ウェスタンブロット分析を施し、抗ビメンチン抗体（マウスモノクローナル抗体MS-129-P、NeoMaker）または西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）連結ストレプトアビジン（これはビオチニル化タンパクに特異的に結合する、Amersham RPN1231）によってプローブ探索した。このために、分離タンパクを含むゲルを、Towbinの方法に従って（Towbin, H.T., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354, 1979）、Hybond Cニトロセルロース膜（Amersham、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）に移した。次に、このニトロセルロース膜を、抗体またはHRP-ストレプトアビジンによってプローブ探索した。抗体の結合は、HRP接合ヤギ抗マウス二次抗体（BioRad）によって検出した。二次抗体およびHRP-連結ストレプトアビジンの両方とも、Pierceから市販されるECL化学発光検出用キットを用いて検出した。相対的タンパクレベルを、暗黒にて、XARフィルム（コダック、ロチェスター、ニューヨーク州）に露光させて検出した。

40

#### 【0313】

ビメンチンタンパクに結合した抗ビメンチン抗体は、HL60細胞に比べて、多剤耐性のHL

50

60/AR細胞の表面ビオチニル化全細胞抽出物において有意に高レベルで発現していた(図4 A参照)。ビメンチンも、HL60細胞に比べて、HL60/AR細胞のストレプトアビジン精製細胞表面ビオチニル化タンパクの中に過剰に発現されていた(図4 B参照)。

#### 【0314】

細胞表面のビメンチンが本当にビオチニル化していることを確かめるために、HL60およびHL/60AR細胞からの、表面ビオチニル化全細胞抽出物を、抗ビメンチン抗体と免疫沈降反応を起こさせ、その免疫沈降物をSDS-PAGEにて分解し、ウェスタンブロットした。このために、サンプルを、ストレプトアビジンビーズの代わりにプロテインAセファローズビーズを用いて、前述の通りに調製した。プロテインAセファローズビーズからタンパクを溶出するために、負荷したビーズを、前述のように、プロテアーゼ阻害剤を含む、バッファード(0.03% SDS, 0.05 M Tris-HCl, pH7.4, 0.1% Triton X-100, 5 mg/ml BSA画分V、150 mM NaCl)で5回、バッファードE(150 mM NaCl, 0.05 M Tris-HCl, pH7.4)で1回洗浄した。ビーズからのタンパク溶出は1回以上繰り返し、溶出液はプールした。タンパクは、SDS-PAGEと、前と同様抗VIMモノクローナル抗体またはHRP-標識ストレプトアビジンによるウェスタンブロットによって分解した。

10

#### 【0315】

ブロットは、抗ビメンチン抗体とストレプトアビジン-HRPによってプローブ探索した。予想した通り、ビメンチンは、両方の細胞タイプの免疫沈降物に検出されたが、有意に大量の細胞表面ビオチニル化ビメンチンは、HL60細胞に比べて、HL60/AR細胞の抗ビメンチン免疫沈降物の中に存在した(図4 Cおよび4 Dを参照)。ビメンチンは、D90に、極めて感受性の高いプロテアーゼ反応部位を持っており、これが、ビメンチンを抗ビメンチンと免疫沈降反応させた時に観察されるバンドの分子量が低いことの原因かもしれない。

20

#### 【0316】

以上の結果は、総合すると、ビメンチンの細胞膜を横切って細胞表面に移動する転位が、ビメンチンの追加的な新規合成と同様、HL60/AR細胞における多剤耐性に関連することを示唆する。

#### 【実施例5】

#### 【0317】

### 5.5 MDR乳ガンにおけるビメンチンの細胞表面発現

ビメンチンが細胞膜の内側にあるのか外側にあるのかを確定するため、無処置乳ガン細胞(MCF-7およびMCF-7/AR)を、アミノ酸リシンと反応する膜不透過ビオチニル化試薬で処理し、薬剤感受性(MCF-7)と多剤耐性(MCF-7/AR)の両方から全細胞抽出物を調製した。さらに、MCF-7およびMCF-7/AR細胞の表面ビオチニル化全細胞抽出物から、ストレプトアビジン精製ビオチニル化タンパクを始め、抗ビメンチン免疫反応沈降物を調製し、SDS-PAGEにて分解し、実施例4と同様にニトロセルロースに移した。

30

#### 【0318】

ビメンチンタンパクに結合した抗ビメンチン抗体は、MCF-7細胞に比べて、多剤耐性のMCF-7/AR細胞の表面ビオチニル化全細胞抽出物において有意に高レベルで発現していた(図5A参照)。ビメンチンも、MCF-7細胞に比べて、MCF-7/AR細胞のストレプトアビジン精製細胞表面ビオチニル化タンパクの中に過剰に発現されていた(図5B参照)。さらに、免疫沈降ブロットを、抗ビメンチン抗体とストレプトアビジン-HRPによってプローブ探索した。予想した通り、有意に大量の細胞表面ビオチニル化ビメンチンは、MCF-7細胞に比べて、MCF-7/AR細胞の抗ビメンチン免疫沈降物の中に存在した(図5Cおよび5Dを参照)。

40

#### 【0319】

以上の結果は、総合すると、ビメンチンの細胞膜を横切って細胞表面に移動する転位が、ビメンチンの追加的な新規合成と同様、MCF-7/AR細胞における多剤耐性に関連することを示唆する。

#### 【実施例6】

#### 【0320】

### 5.6 MDR前骨髄球白血病細胞におけるビメンチンの細胞表面発現

50

HL60およびHL60/AR細胞を、この二つの細胞系統におけるビメンチンの細胞表面発現の差を求めるために、細胞表面染色と蛍光活性細胞ソーター（FACS）分析によって分析した。このために、間接的免疫蛍光分析を、1  $\mu$ gのウサギポリクロナール抗体を一次抗体（CBL46, Cymbus Biotech、ハンプシャイヤー、英国）として、次に、ヤギ抗ウサギIgG FITC接合二次抗体（Cat #F9887, Sigma）を用いて実施した。

【0321】

FACS分析用の細胞を調製するために、下記の間接的染色法を用いた。

【0322】

細胞は、50 ml PBS, pH7.4および0.1%NaN<sub>3</sub>で3回洗浄し、カウントした。

【0323】

サンプル当たり1x10<sup>6</sup>個の細胞を、100  $\mu$ l PBSおよび0.1%NaN<sub>3</sub>において、12x75mmチューブに、または深い96ウェルプレートに入れた。一次抗体（ウサギポリクロナール抗ビメンチン抗体）を加え、37  $^{\circ}$ Cで20分インキュベートした。3 ml（または、プレートの場合は1.25ml）のPBS pH7.4と0.1%NaN<sub>3</sub>を加え、混合液を5分間回転した（1000 rpm/200xg）。上清を捨て、ペレットを100  $\mu$ l PBSと0.1%NaN<sub>3</sub>に再懸濁した。

10

【0324】

二次のAb（FITC-接合体）を加えた。この混合液は、PBS pH7.4および0.1% NaN<sub>3</sub>で1/2に希釈し、4  $^{\circ}$ Cで最大スピードで30分回転させた。ペレットから分離し、1/10を染色のために用いた。37  $^{\circ}$ Cで20分インキュベート。3 ml（またはプレートの場合1.25 ml）PBS pH7.4および0.1%NaN<sub>3</sub>を加え、混合液を5分回転させた（1000 rpm/200xg）。上清を捨て、PBSとNaN<sub>3</sub>の添加を繰り返した。再び混合液を5分回転させた（1000 rpm/200xg）。

20

【0325】

1  $\mu$ g-2  $\mu$ g/ $\mu$ lのEMAを加えた。混合液を氷上で10分白光の中でインキュベートした。3 ml（または、プレートの場合は1.25ml）のPBS pH7.4と0.1%NaN<sub>3</sub>を加え、混合液を5分間回転した（1000 rpm/200xg）。上清を捨て、ペレットを100  $\mu$ l PBSと0.1%NaN<sub>3</sub>に再懸濁した。3 ml（または、プレートの場合は1.25ml）のPBS pH7.4と0.1%NaN<sub>3</sub>を加え、混合液を5分間回転した（1000 rpm/200xg）。上清を捨て、PBSとNaN<sub>3</sub>の添加を繰り返した。500  $\mu$ l PBS pH7.2/2%パラフォルムアルデヒドに再懸濁し、暗黒中に4  $^{\circ}$ Cで保存した。

【0326】

各サンプルについて、10,000個の細胞を、蛍光活性細胞ソーター（Beckman Coulter XL MCL）にて分析した。特異的に染められた細胞に対応する蛍光放射は、あらかじめ排除されるウサギIgG陰性コントロールによって530nmにおいて細胞で測定された放射を差し引くことによって求めた。ある場合には、ウサギIgGコントロールは、HL60またはHL60/AR細胞についてもあらかじめ除去された。これは、各細胞系統における非特異的染色を低減させるためである。これは、1  $\mu$ gのウサギIgGを、50-100  $\mu$ lのPBSにおいて1-2x10<sup>6</sup>の細胞と37  $^{\circ}$ Cで10分インキュベートすることによって行った。次に混合物を回転し、上清を陰性コントロールとして用いるか、またはさらに1または2回のインキュベーションを行った。上清は、それぞれ、HL60およびHL60/ARとインキュベートして、HL60およびHL60/ARに対するウサギIgGコントロールとして用いた。

30

【0327】

結果は、ビメンチンは、HL60細胞の表面で発現されたビメンチンレベルよりも、HL60/AR細胞の表面では5倍高いレベルで過剰発現された（図6参照）。

40

【0328】

予期したように、HL60/AR細胞表面におけるビメンチンの発現レベルと、HL60細胞の表面におけるビメンチン発現レベルとの差は、あらかじめ排除したウサギIgGコントロールを用いた時の方がより良く観察された。さらに、HL60/AR細胞表面におけるビメンチンの発現レベルと、HL60細胞の表面におけるビメンチン発現レベルとの差は、低レベルの一次抗体を用いた時の方がより良く観察された。従って、間接的免疫蛍光分析を、ポリクロナール抗ビメンチンの1  $\mu$ gではなく0.1  $\mu$ gを一次抗体（CBL46, Cymbus Biotech, ハンプシャイヤー、英国）として用い、あらかじめ排除された、または非排除のウサギIgGの1

50

$\mu\text{g}$ ではなく $0.1 \mu\text{g}$ を陰性コントロールとして用いた場合、HL60/AR対HL60細胞におけるビメンチン発現レベルの倍数差は、それぞれ、26(あらかじめ排除)と9(非排除)であった。

#### 【0329】

さらに、 $10 \mu\text{g}$ - $20 \mu\text{g}$ - $40 \mu\text{g}$ と増量するモノクローナル抗VIMを一次抗体(NeoMarkerから市販される、カタログ番号MS-129-P)として、その後抗マウスIgG-FITC接合体二次抗体(Chemiconから市販されている、カタログ番号#AP181F)を1:10希釈で用いて、間接的免疫蛍光分析を行った。特異的に染められた細胞に対応する蛍光放射は、マウスIgG1異性体コントロールによって $530\text{nm}$ で細胞において測定された放射を差し引くことによって求めた。 $40 \mu\text{g}$ の抗VIMは、HL60/ARにとっては飽和的であった。

10

#### 【0330】

同様に、HL60細胞を飽和させる抗ビメンチンの濃度を定めるために $2.5 \mu\text{g}$ から $40 \mu\text{g}$ の範囲に渡る抗体によって実験を行った。得られた蛍光強度は、濃度依存的には増加せず、 $0.2$ と $0.9\text{RFI}$ の範囲に渡っていた。これは、細胞は既に $2.5 \mu\text{g}$ で飽和していることを示唆する。従って、HL60およびHL60/AR細胞表面に存在するビメンチン分子の数を定量するのに、 $40 \mu\text{g}$ の抗ビメンチンを用いた。

#### 【0331】

飽和濃度( $40 \mu\text{g}$ のモノクローナル抗ビメンチン)では、ビメンチンは、HL60/AR細胞表面において、HL60細胞の表面に発現されるビメンチンのレベルよりも37倍高いレベルで発現されていた。HL60/HL60/AR細胞表面に発現されるビメンチン分子の数を、フローサイトメトリー定量キット(Serotec #FCSC814:498-44298分子、Raleigh, NC)を用いて定量した。このQSCシステムは、ヤギ抗マウス抗体に結合する、ほぼリンパ球の大きさのマイクロビーズから成る。様々の既知の量のヤギ抗マウス抗体を担持する、マイクロビーズ5集団から成る1セットがキットの中に支給される。このマイクロビーズを、飽和量の、興味のマウスモノクローナル抗体をインキュベートする。マイクロビーズから得られた蛍光強度をプロットして、ビーズに結合した抗体分子の数に対する蛍光強度の標準曲線を生成する。次に、細胞(飽和量において)から得られた信号を、標準曲線を用いて、細胞当たり結合する抗体分子の数に相関させる。この値は、細胞表面に存在する抗原の数に相当する。ビーズと細胞システムに対する抗体の飽和条件では、NeoMarkerから購入したマウスモノクローナル抗ビメンチンを用いた場合、HL60とHL60/ARは、それぞれ、ビメンチンを約186と5052分子担持することが判明した(図7参照)。これは、多剤耐性のH60/AR細胞システムでは、対応する非MDR HL60細胞システムに比べて、細胞表面ビメンチン発現において27倍を越える増加があることに相当する。

20

30

#### 【実施例7】

#### 【0332】

#### 5.7 MDRリンパ芽細胞白血病細胞における細胞表面ビメンチン発現の特性解明

Molt4およびMolt4/DOX細胞を、この二つの細胞システムにおけるビメンチンの細胞表面発現の差を求めるために、細胞表面染色と蛍光活性細胞ソーター(FACS)分析によって分析した。このために、間接的免疫蛍光分析を、 $20 \mu\text{g}$ のマウスモノクローナル抗ビメンチン抗体を一次抗体(MS-129-P, NeoMarker)として、次に、ヤギ抗マウスIgG FITC接合二次抗体(Chemicon, カタログ#AP181F)を用いて実施した。

40

#### 【0333】

細胞は、実施例6で前述した手法に従って調製した。各サンプルについて、 $10,000$ 個の細胞を、蛍光活性細胞ソーター(Beckman Coulter XL MCL、フラートン、カリフォルニア州)にて分析した。特異的に染められた細胞に対応する蛍光放射は、 $20 \mu\text{g}$ のマウスIgG1異性体コントロールによって $530\text{nm}$ において細胞で測定された放射を差し引くことによって求めた。

#### 【0334】

FACS分析の結果は、ビメンチンは、Molt4/AR細胞表面において、Molt4細胞の表面に発現されるビメンチンのレベルよりも1.5倍高いレベルで発現されることを示した(図8参照)

50

。

## 【実施例 8】

## 【0335】

## 5.8 MDR乳ガン細胞における細胞表面ピメンチン発現の特性解明

HS574M, MCF-7, MCF-7/AR, MDA, MDA/ARおよびMDA/MITO乳ガン細胞を、この二つの細胞系統におけるピメンチンの細胞表面発現の差を求めるために、細胞表面染色と蛍光活性細胞ソーター (FACS) 分析によって分析した。このために、間接的免疫蛍光分析を、5および/または20  $\mu\text{g}$ のマウスモノクローナル抗ピメンチン抗体を一次抗体 (MS-129-P, NeoMarker) として、次に、ヤギ抗マウスIgG FITC接合二次抗体 (Chemicon, カタログ#AP181F, Temecula、カリフォルニア州)を用いて実施した。

10

## 【0336】

細胞は、実施例6で前述した手法に従って調製した。各サンプルについて、10,000個の細胞を、蛍光活性細胞ソーター (Beckman Coulter XL MCL) にて分析した。特異的に染められた細胞に対応する蛍光放射は、5  $\mu\text{g}$ または20  $\mu\text{g}$ のマウスIgG1異性体コントロールによって530nmにおいて細胞で測定された放射を差し引くことによって求めた。

## 【0337】

FACS分析の結果は、ピメンチンは、HS574M細胞の表面では発現されないが、MCF-7/AR細胞では、MCF-7細胞の表面で発現されるピメンチンのレベルよりも1.5倍高いレベルで発現されることを示した (図9参照)。同様に、ピメンチンは、MDA/AR細胞では、MDA細胞の表面で発現されるピメンチンのレベルよりも3から5倍高いレベルで発現した (図9参照)。ピメンチンは、MDA/MITO細胞では、MDA細胞の表面で発現されるピメンチンのレベルよりも3倍高いレベルで発現した (図10参照)。

20

## 【0338】

MCF-7およびMCF-7/AR細胞表面に発現されるピメンチン分子の数を、実施例5,6で記述したのと同様にしてフローサイトメトリー定量キット (Serotec #FCSC814:498-44298分子)を用いて定量した。ビーズと細胞系統 (50  $\mu\text{g}$ ) に対する抗体の飽和条件では、NeoMarkerから購入したマウスモノクローナル抗ピメンチンを用いた場合、MCF-7とMCF-7/ARは、それぞれ、ピメンチンを約14556と22010分子担持することが判明した。これは1.5倍差に相当する (図11参照)。

## 【実施例 9】

30

## 【0339】

## 5.9 正常、腫瘍性、MDR新生細胞におけるピメンチン発現の特性解明

次に、細胞表面発現ピメンチンレベルの差を求めるために、正常細胞を、血液ガン細胞およびMDR血液ガン細胞と比較した。このために、ヒト血液サンプル (ヘパリンチューブ) をドナーから入手し、1時間以内に処理した。簡単に言うと、Ficoll hypaque勾配 (Histopaque Sigma 1077-1、セントルイス、ミズーリ州) において赤血球を白血球と血漿から分離した。

## 【0340】

具体的に言うと、15 mlの血液の半分をリン酸バッファー生食液pH7.4で希釈し、等量のFicoll勾配に収めた。細胞は、室温で400xgで30分の遠心によって分離した。上部層 (血漿) を、血漿/Ficoll境界層から0.5cmまで取り出した。単核球 (境界層の) を50ml Falconチューブに収めた。Ficollを外し、赤血球 (チューブの底の) を集めた。全ての細胞タイプを、PBSで2回洗浄し、4 で250xgで10分回転させて、カウントした。次に、細胞をPBSで $1 \times 10^7$ 個/mlに再懸濁し、フローサイトメトリー (FACS) 分析に100  $\mu\text{l}$  ( $1 \times 10^6$ 個)を用いた。

40

## 【0341】

細胞は、実施例6で前述したように、FACS分析用に一次および二次抗体にて染色した。各サンプルについて、10,000個の細胞を、蛍光活性細胞ソーター (Beckman Coulter XL MCL) にて分析した。特異的に染められた細胞に対応する蛍光放射は、異性体適合コントロールによって530nmにおいて細胞で測定された放射を差し引くことによって求めた。

50

## 【0342】

各FACS実験はいくつかのコントロールを用いて実験した。自己蛍光放射を定量するために細胞だけの場合；分析中死亡細胞を特定するために細胞プラスEMA；二次抗体による非特異的相互作用を特定するために細胞プラス二次抗体（Ab）のみ；細胞プラス異性体適合抗体（Abs）または適当な宿主の一次Absコントロール；様々の白血球集団を定め入門させるために細胞（単核球）プラスCD45-PC5マウスモノクローナル、フィコエリスリン-シアニン5複合体（Immunotech PN IM2653）；および、赤血球に対する陽性コントロールとして赤血球プラスグリコフォリンA-FITCマウスモノクローナル、Cymbus CBL 409F。

## 【0343】

正常で、健康なドナーから得た赤血球または白血球を、0.25  $\mu$ g-0.5  $\mu$ gまたは1  $\mu$ g（それぞれ、3名、6名および21名のドナー）のポリクローナル抗ビメンチン抗体（CBL46, Cymbus Biotech）で染めた場合、HL60およびHL60/ARを1  $\mu$ gのポリクローナル抗ビメンチン抗体で染めた場合と違って、正常なRBCとWBCは、その細胞表面にまったくビメンチンを発現しないことが判明した（結果は図示せず）。 10

## 【0344】

従って、同じタイプの非MDR新生細胞に対してMDR新生細胞に増加を示すばかりでなく、細胞表面ビメンチン発現は、同じまたは類似の起源を持つ非新生細胞に対しても、新生細胞において増加する。従って、細胞表面のビメンチンレベルは、新生物の検出および/または診断にもMDR新生物同様に使用することができる。

## 【実施例10】

20

## 【0345】

## 5.10 MDR血液ガン細胞およびMDR乳腺ガン細胞に対するビメンチン系ワクチン

MDR血液ガン細胞の表面に発現される完全長ビメンチンタンパクが、MDR血液ガン細胞に対して動物を免疫するワクチンとして有用かどうかを確定するために、精製ビメンチンタンパクをアジュバント（例えば、フロイント）を混ぜて、血液ガン細胞の存在によってもたらされる血液ガンを患う数群のマウスに投与した。一つの、このような非限定的血液ガンは、急性リンパ球白血病である。

## 【0346】

このために、マウスに、マウスのMHCタイプと適合的な血液ガン細胞を注入した（あるいは、SCIDマウスに注入した）。このマウスの内のあるものは、完全長のビメンチンタンパクによって免疫化される前に腫瘍細胞を注入された。またあるものは、精製された完全長マウスビメンチンタンパクで免疫化された後血液ガン細胞を注入された。精製ビメンチンタンパクは、アジュバントと共に投与してもよいことに注意されたい。各マウス群について適当なコントロールを設けた（すなわち、一つのコントロールグループは、精製マウスビメンチンタンパクだけしか注入されなかった。また別のグループは血液ガン細胞しか注入されなかった）。 30

## 【0347】

マウスに形成された腫瘍は計量し測定した（例えば、腫瘍細胞数をカウントし、腫瘍を取り出し、計量し、あるいは、腫瘍をキャリパーで測定した）。腫瘍細胞注入前にビメンチンでワクチン接種されたマウスは、腫瘍細胞の注入前にビメンチンでワクチン接種されなかったものよりも治療後においてより小さな腫瘍を持つことが判明した。 40

## 【0348】

その後の実験で、ビメンチンの、MDR乳腺ガン細胞（MCF/AR）にたいする抗原としての効力を評価した。簡単に言うと、6週齢雌マウスに、30-250  $\mu$ gの全長ビメンチンまたはコントロール抗原を、アジュバント有り、あるいは無しで、S.C.およびI.P.に、または後ろ足パッドに、1、7、14、21、28、および35日目に注入した。様々な間隔を置いて、眼窩後静脈叢から血液サンプルを収集し抗ビメンチン抗体アッセイに用いた。マウスは、59日目に、1.5X 10<sup>4</sup>生MDR乳腺ガン細胞（MCF/AR）を右横腹にS.C.で投与して抗原惹起（チャレンジ）した。マウスは週に二度検査し、腫瘍出現率を、腫瘍を抱えているマウスの数から求めた。腫瘍サイズはノギスで測定した。生存率は、腺癌によるチャレンジ後最大80 50

日まで測定した。

【実施例 1 1】

【0349】

5.11 MDR造血ガン細胞に対するビメンチン標的治療

既存のガン状態を治療するのに、治療剤を、細胞表面のビメンチンに向けて標的発射することが有用であるかどうかを定めるために、血液ガン細胞を、MHC適合マウスに投与して、腫瘍を形成させた。次に、マウスに、ピンクリスチン（あるいは別の化学療法剤）を、マウス内部の腫瘍細胞の多くのものを殺すが、必ずしも全ての細胞を殺すには足りない用量で投与した。多剤耐性腫瘍細胞を発達させたことが判明しているマウスには、ピンクリスチンと、マウスビメンチンタンパクに特異的に結合する結合剤とを含む組成物を投与した。この結合剤は、リシン毒素と動作的に結合していた。

10

【0350】

前記組成物を投与されたマウスは、結合剤のみ、またはピンクリスチンのみを投与されたマウスと比べて、その予後は優れていた（すなわち、腫瘍は小さく、腫瘍細胞は少なかった）。

【0351】

その後の実験で、MDR乳腺ガン細胞（MCF/AR）治療におけるビメンチン標的療法の効果を評価した。簡単に言うと、MCF-7/ADR異種移植のために無胸腺ヌードマウスを用いた。5-7週齢で、体重18-22gの雄マウスを用いた。マウスの肩の下に接種当たり $0.5 \times 10^6$ 細胞の皮下（s.c.）注射を行った。細胞の皮下移植後、その皮下腫瘍のサイズがほぼ5.5mmとなった時点で、マウスをランダムにコントロールを含む4匹から成る治療グループに割り当てた。グループは、ピンクリスチンまたはドキソルピシン単独投与（4 mg/kg）腹腔内（i.p.）2日に1度；抗ビメンチン単独（100  $\mu$ g-1 mg/kg）；ピンクリスチンまたはドキソルピシンと、抗ビメンチンmAb（100  $\mu$ g-1 mg/kg）i.p.を受けた。動物の体重は4日毎に測定した。各動物には耳タグをつけ、実験を通じて個別に追跡した。投与第1日目開始した腫瘍成長は測定され、移植片の容量は4日毎に監視された。コントロールグループにおける平均腫瘍重量が1gを越えた時点で、マウスを麻酔し、屠殺した。腫瘍組織をマウスから切り出し、その重量を測定した。

20

【実施例 1 2】

【0352】

5.12 MDR乳ガン細胞における細胞表面ビメンチン発現の定性分析

MCF-7およびMCF-7/AR細胞について、この二つの細胞系統におけるビメンチンの細胞表面発現に差があるかどうかを確定するために、免疫染色にて分析した。このために、免疫蛍光分析を、0.5  $\mu$ gの抗ビメンチンを一次抗体（クローンV9、NeoMarker MS-129-P）として用いて、浸透強化した、または浸透強化していない細胞に対して行った。エチジウムモノアジド（EMA）を用いて、浸透強化または損傷細胞の核を染色した。

30

【0353】

図13Aおよび13Bは、細胞を染色するために取るステップを描くフローチャートである。コントロール細胞は、0.5  $\mu$ gのマウスIgG1で染めたMCF-7とMCF-7/ARで、浸透強化、または非浸透強化細胞では染色は観察されなかった。図14に示されるように、ビメンチンは、無処置多剤耐性MCF-7/ARの表面に明瞭に発現しているが、一方、MCF-7は全く染色を示さなかった。細胞が浸透強化されると、MCF-7はごく僅かな染色を示したが、MCF-7/ARは、ビメンチンフィラメントから成る豊富なネットワークを示した（図14）。

40

【実施例 1 3】

【0354】

5.13 MDR前骨髄芽白血病細胞における細胞表面ビメンチン発現の定量分析

HL60およびHL60/AR細胞について、125ヨウ素標識抗ビメンチンを、細胞表面に直接結合させることによってビメンチンの表面露出について分析した。このために、抗ビメンチン（NeoMarker, MS-129-PABX）、マウスIgG1（陰性コントロールに合致する異性体、Sigma, M-9035）、および、抗CD33（陽性コントロール、Serotec, #MCA1271）を、IODOGEN（登録

50

商標)あらかじめコートされたヨウ素化チューブ (Pierce, #28601) を、メーカーの示す手順に従って接種した (得られた平均活性:  $7.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )。

【0355】

細胞を、RPMI 1640で2度洗浄し、同じ溶媒に $10^6$ 細胞/100  $\mu\text{L}$ として再懸濁した。生存率は、トリパンブルー染色で評価したが、5%未満であった。細胞 ( $1 \times 10^6$ ) は、ホウケイ酸チューブに分取し、1  $\mu\text{g}$ の放射標識抗ビメンチン、IgG1、または抗CD33の存在下に、氷上で1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、1 ml RPMI 1640にて3回洗浄し、細胞ペレットをガンマカウンターにてカウントした。

【0356】

無処置細胞ラジオイムノアッセイの結果を、図15のバーグラフに示す。数字は、細胞ペレットから1分当たりのカウントで、IgG1背景を差し引いたものを表す。ビメンチンは、耐性を持つHL60/AR細胞の表面では、薬剤感受性HL60細胞の表面で発現されるビメンチンのレベルよりも3倍のレベルで発現されていた。 10

【実施例14】

【0357】

5.14 放射ヨウ素標識抗ビメンチンのHL60およびHL60/AR細胞に対する細胞傷害性作用

細胞は、RPMI 1640で2度洗浄し、同じ溶媒に $10^6$ 細胞/100  $\mu\text{L}$ として再懸濁した。生存率は、トリパンブルー染色で評価したが、5%未満であった。細胞 ( $1 \times 10^6$ ) は、ホウケイ酸チューブに分取し、5  $\mu\text{g}$ の滅菌フィルター放射標識抗ビメンチン、IgG1、または抗CD33 (ヨウ素化工程は実施例5.13に記載されている) の存在下に、37 ( $0.5\% \text{CO}_2$ ) で4時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、1 ml RPMI 1640, 10% FBS, 1mM HEPESにて1回洗浄し、1 mlの同じ溶媒に再懸濁し、ウェル当たり5000個の割で、平底組織培養96ウェルプレートに撒いた。放射標識抗体の細胞傷害性を、72時間後に、MTTによるアッセイによって評価した。抗CD33を、抗体の表面結合用陽性コントロールとして用い、120 nMドキシソルブシン (Doxo) を、細胞傷害性の陽性コントロールとして用いた。 20

【0358】

細胞傷害性アッセイの結果を図16のバーグラフに示す。数値は、パーセント生存率として表される。抗ビメンチンおよび抗CD33抗体-125I複合体におけるパーセント生存率の値は、放射標識IgG1 (無視できる背景結合で、100%生存率) で得られた値に対して正規化された。抗ガン剤ドキシソルブシンで得られた値は、薬剤処置されていない細胞において得られた値に対して正規化された。 30

【0359】

得られた結果は、放射標識抗ビメンチンは、共に表面にビメンチンを発現するHL60およびHL60/ARに対して細胞傷害性作用を示した。HL60/ARに観察される細胞傷害性の僅かな増加 (10%) は、HL60/AR薬剤耐性細胞は、HL60薬剤感受性細胞よりも、その表面に多くのビメンチンを発現するという事実によるのかも知れない。

【実施例15】

【0360】

5.15 薬剤感受性および薬剤耐性乳ガンおよび卵巣ガン細胞における細胞表面ビメンチンの分子定量 40

乳ガンMCF-7、MCF-7/AR、MDA、MDA/mito、および、卵巣ガンSKOV3、SKOV/T320 (タキソールに耐性)2008、および、2008/T320 (タキソールに耐性) 細胞について、125ヨウ素標識抗ビメンチンを、細胞表面に直接結合させることによってビメンチンの表面露出について分析した。このために、抗ビメンチン (NeoMarker, MS-129-PABX)、および、マウスIgG1 (陰性コントロールに合致する異性体、Sigma, M-9035)、および、抗CD33 (陽性コントロール、Serotec, #MCA1271) を、IODOGEN (登録商標) あらかじめコートされたヨウ素化チューブ (Pierce, #28601) をメーカーの示す手順に従って用いてヨウ素化した (得られた平均活性:  $7.5 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ )。

【0361】

細胞は、ウェル当たり20,000個の割で、96Stripwell (登録商標) (Costar, #9102) プ 50

レートに撒いた。完全培養液中で一晩育成した後（37℃、0.5%CO<sub>2</sub>）、ウェルを、1%FBSを含む100 μlの培養液で穏やかに洗浄し、1%FBSと0.1%アジ化ナトリウムおよび、100 ngの放射標識抗ヒメンチン（またはIgG1）を含む100 μlの培養液中で37℃で一晩インキュベートした（37℃、0.5%CO<sub>2</sub>）。インキュベーションの前に、トリパンブルー染色により死亡率をチェックしたが、通常1%未満であった。インキュベーション後、培養液を捨て、ウェルを、1%FBSを含む350 μlの培養液で2度洗浄し、ガンマーカウンターにて個別にカウントした。

#### 【0362】

無処置細胞ラジオイムノアッセイにおいて、量の増大する放射標識抗ヒメチジンを用いて、MDA/mito細胞について結合実験を行った。スキッチャード分析を用いて、見かけの解離定数（Kd）と細胞当たりの抗体分子数を計算した。細胞当たりの結合抗ヒメンチン分子の平均数は、5回の独立したスキッチャード結果の平均から得たが、図17Aの表に掲げられている。図17Bは、図17Aの表で述べた第1実験のスキッチャードプロットを示す。

10

#### 【0363】

MDA/mito細胞表面に存在するヒメンチンエピトープの平均数は、細胞当たり $2.49 \times 10^6$ 個であり、平均Kdは5.7 nMであった。Kdは、別の実験でMDA細胞について求め、9.3 nMであった（図17Cの表を参照）。これは、MDA/mito細胞について測定したKdと等価であった。

#### 【0364】

MCF-7, MCF-7/AR, MDA, SKOV3, SKOV/T320, 2008および2008/T320上に存在するヒメンチンエピトープの数を、これらの細胞と、MDA/mitoの間で、表面露出の倍数差から計算した。この倍数は、100 ngの放射標識抗ヒメンチンによる前述の無処置細胞ラジオイムノアッセイを用いて、同数（約20,000細胞）のMDA/mito細胞と上述の細胞を調べることによって求めた。後者の、表面ヒメンチンエピトープ数は、複数の独立実験（n=2から5）の平均を表す。これらの数字は、図17Cの表に掲げられているが、MCF-7/AR, MDA, MDA/mito, SKOV3およびSKOV/T320は、その表面に多数のヒメンチンを発現しているが（最大はMDA/mitoの $2.5 \times 10^6$ ）、一方、MCF-7, 2008および2008/T320の数は比較的低い（" $2.5 \cdot E+06$ "とは底が10の指数を表す、すなわち、 $2.5 \times 10^6$ ）。感受性を持つ細胞と耐性を持つ細胞の間のヒメンチン表面露出における倍数差は、R/Sとして与えられ、MCF-7/AR, MDA/mito, SKOV/T320および2008/T320では、それぞれ、41.2、4、1.6、および、2であった。

20

#### 【実施例16】

30

#### 【0365】

##### 5.16 乳ガンおよび卵巣ガン細胞におけるヒメンチン細胞表面露出の誘発

前述の実施例5.15で報告された所見では、ドキソルビシン、ミトキサントロン、またはタキソールで選択された各種乳ガンおよび卵巣ガン細胞は、その感受性仲間と比較して、ヒメンチンの表面露出の増加を示していたが、この点を考えると、これらの薬剤は、MDAおよびSKOV3細胞系統においてヒメンチンの表面露出を誘発するかどうかを判定することは興味がある。このために、20,000個の細胞を、96Stripwell（登録商標）（Costar, #9102）プレートに撒いた。5時間後、培養液を除去し、各種薬剤を含む（図18に示すような）培養液に交換し、37℃で12から16時間インキュベートした（0.5%CO<sub>2</sub>）。インキュベーション後、ウェルを、1%FBSを含む100 μlの培養液で穏やかに洗浄し、1%FBSと0.1%アジ化ナトリウムおよび、100 ngの放射標識抗ヒメンチン（またはIgG1）（標識工程は実施例5.13に示されている）を含む100 μlの培養液中で37℃で1時間インキュベートした（0.5%CO<sub>2</sub>）。インキュベーションの前に、トリパンブルー染色により死亡率をチェックしたが、通常1%未満であった。インキュベーション後、培養液を捨て、ウェルを、1%FBSを含む350 μlの培養液で2度洗浄し、ガンマーカウンターにて個別にカウントした。図18は、MDA細胞が、1または10 μMタキソール、1または10 μMドキソルビシン、または、0.1または1 μMミトキサントロンと共にインキュベートした場合の、ヒメンチンの表面露出を表す。数値は、IgG1による非特異的結合について補正した。全ての薬剤についてヒメンチン表面露出の僅かな誘発が観察されたが、ミトキサントロンがもっとも顕著な作用を示した。SKOV3細胞を1 μMタキソールで処理すると、同様ではあるが、より強度の低い作用が観察さ

40

50

れた。これらの所見は、薬剤と組み合わせた免疫療法を考える場合重要である。

【実施例17】

【0366】

5.17 MCF-7/AR, MDA, MDA/AR, および MDA/mito 細胞による  $^{125}$ I 標識抗ヒメンチンの取り込み

液中に浮遊させた乳ガン細胞 (図19A参照)、または、96ウェルプレートに接着させた細胞 (図19B) において、細胞表面ヒメンチンの取り込みを測定した。図19Aは下記のようにして得られた。10<sup>6</sup>個の細胞を解離バッファー (Gibco, #13150-016) でサブ培養し、次にホウケイ酸チューブに移し、PBSで洗浄し、200  $\mu$ l のアルファ-MEMに、1  $\mu$ g の放射標識抗ヒメンチンを含む3%BSAに、または、1  $\mu$ g の抗ムチン1に陽性コントロールとして、または、1  $\mu$ g のIgG1に背景コントロールとして、再懸濁した。ムチン1 (CD227) は、多くのヒトの組織に広く存在する高度にグリコシル化したタンパクであり、腫瘍細胞では、しばしば高レベルで生産され、また、異常なグリコシル化パターンを示す。マウス抗体は、このようなガンの治療目的で臨床試験に使われており、市販されている (例えば、 Fitzgerald Industries, Inc. コンコード、マサチューセッツ州)。4 で1時間インキュベーション後、細胞を2度洗浄し、さらに4時間4 で、または37 でインキュベートした。放射標識IgGとインキュベーションする前の細胞のトリパンブルー染色によると、細胞の生存率は100%であった。インキュベーション後、細胞を洗浄し、放射ラベルを、サンプルをガンマカウンターでカウントすることによって定量した。次に、細胞を、RTで10分、50 mM L-Gly, pH2.8, 150 mM NaCl で表面剥離 (ストリップ) し、洗浄し、ガンマカウンターにて残留活性をカウントした。図19Aに示すグラフは、4 と37 での、MCF-7/ARにおける表面関連放射ラベル (L-Glyで剥がされたもの) のパーセントと、取り込まれたもの (ストリップ後に残ったもの) を表す。取り込みパーセントは、4 と37 で測定された取り込みの差から得られ、ヒメンチンでは38.2%で、ムチン1では12.5%であった。

10

20

【0367】

この結果から、放射性核種治療剤 (または診断プローブ) に付着した抗ヒメンチン抗体は、多剤耐性乳房上皮新生細胞の表面に存在する表面ヒメンチンに結合し、温度依存的に活発に取り込まれることが示された。この温度依存性は、抗体- $^{125}$ I複合体は、エンドサイトーシスにより能動的に摂取されることを示唆する。摂取のメカニズムがどうあれ、この結果は、抗ヒメンチン抗体は、MDR新生細胞を認識し、その細胞の中に、その細胞の治療 (または診断的検出) のために治療薬剤 (または診断剤) を輸送することが可能であることを示す。

30

【0368】

図19Bのために、細胞を、無処置細胞ラジオイムノアッセイ (ウェル当たり20,000個細胞) の場合と同様に調製した。簡単に言うと、一晚培養後、ウェルを洗浄し、100 ng の放射標識抗ヒメンチン、または、IgG1を背景コントロールとして含む100  $\mu$ l 培養液 + 1%FBS で4 で1時間先行インキュベートした。先行インキュベーション前に、トリパンブルー染色によって死亡率をチェックしたが、1%未満であった。先行インキュベーション後、培養液を廃棄し、ウェルを、1%FBSを含む350  $\mu$ l の培養液で洗浄し、さらに4 または47 で4時間インキュベートした。インキュベーション後、ウェルを、前回と同様に洗浄し、細胞を、RTで10分、50 mM L-Gly, pH2.8, 150 mM NaCl でストリップし、洗浄した。次に、剥がされた物質とウェルの活性をガンマカウンターにてカウントした。図19Bに示すグラフは、4 と37 での、MCF-7/AR, MDA, MDA/AR, MDA/mitoにおける表面関連cpm (L-Glyで剥がされたもの) のパーセントと、取り込まれたもの (ストリップ後に残ったもの) を表す。ヒメンチンの取り込みパーセントは、4 と37 で測定された取り込みの差から得られ、MCF-7/AR, MDA, MDA/ARおよびMDA/mitoでは、それぞれ、11.3、25.3、24.8および8.9%であった。

40

【0369】

この結果は、抗ヒメンチン抗体は、新生細胞およびMDR新生細胞の両方に対して連結された治療および診断剤を狙撃し、取り込ませる点での有用性をさらに支持する。

50

## 5. 等価物

当業者であれば、ほんの通例の実験をするだけで、本明細書に具体的に記載される特定の実施態様に対して数多くの等価物を認識し、確認することが可能であろう。このような等価物は、頭書に掲げられた請求項の範囲の中に含まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0370】

【図1A】図1Aは、MCF-7細胞の全細胞抽出物を展開する銀染色2-Dゲルの写真撮影記録であり、53kDaスポットにビメンチンの存在することを示す。

【図1B】図1Bは、多剤耐性MCF-7/AR細胞の全細胞抽出物を展開する銀染色2-Dゲルの写真撮影記録であり、53kDaスポットにビメンチンの存在することを示す。

10

【図2A】図2Aは、2-Dゲルで展開されニトロセルロースに転送された、MCF-7細胞の全細胞抽出物の抗ビメンチン免疫プロットの記録である。

【図2B】図2Bは、2-Dゲルで展開されニトロセルロースに転送された、MCF-7AR細胞の全細胞抽出物の抗ビメンチン免疫プロットの記録である。

【図3A】図3Aは、2-Dゲルで展開されニトロセルロースに転送された、CEM細胞の表面ビオチニル化全細胞抽出物のストレプトアビジン-HRPプロットの記録である。

【図3B】図3Bは、2-Dゲルで展開されニトロセルロースに転送された、多剤耐性CEM/VLB細胞の表面ビオチニル化全細胞抽出物のストレプトアビジン-HRPプロットの記録である。

【図4A】図4Aは、HL60およびHL60/AR細胞から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット分析の

20

写真撮影記録である。

【図4B】図4Bは、表面ビオチニル化全細胞抽出物から調製されたストレプトアビジン精製抽出物から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット分析の

写真撮影記録である。

【図4C】図4Cは、表面ビオチニル化全細胞抽出物の抗ビメンチン免疫沈降物から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット分析の

写真撮影記録である。

【図4D】図4Dは、ビオチニル化全細胞抽出物の抗ビメンチン免疫沈降物から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、ストレプトアビジン-HRPプローブによるウェスタンブロット分析の

30

写真撮影記録である。

【図5A】図5Aは、MCF-7およびMCF-7/AR細胞から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット分析の

写真撮影記録である。

【図5B】図5Bは、表面ビオチニル化全細胞抽出物から調製されたストレプトアビジン精製抽出物から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット分析の

写真撮影記録である。

【図5C】図5Cは、表面ビオチニル化全細胞抽出物の抗ビメンチン免疫沈降物から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、抗ビメンチン抗体によるウェスタンブロット分析の

写真撮影記録である。

【図5D】図5Dは、表面ビオチニル化全細胞抽出物の抗ビメンチン免疫沈降物から調製された、10%SDS-ポリアクリルアミドゲル展開ビオチニル化全細胞抽出物の、HRP-ストレプトアビジンプローブによるウェスタンブロット分析の

40

写真撮影記録である。

【図6】図6は、ポリクロナール抗ビメンチン抗体による、HL60（白棒）およびHL60/AR（灰色棒）細胞系統におけるビメンチン表面発現のFACS分析結果のグラフ表示である。

【図7】図7は、飽和量のモノクロナール抗ビメンチン抗体による、HL60（白棒）およびHL60/AR（灰色棒）細胞系統におけるビメンチン表面発現のFACS分析結果のグラフ表示である。

【図8】図8は、モノクロナール抗ビメンチン抗体による、Molt4（白棒）およびMolt4/DOX（灰色棒）細胞系統におけるビメンチン表面発現のFACS分析結果のグラフ表示である。

【図9】図9は、モノクロナール抗ビメンチン抗体による、乳ガン薬剤感受性および薬剤

50

耐性モデル細胞系統におけるビメンチン表面発現のFACS分析結果のグラフ表示である。

【図10】図10は、モノクローナル抗ビメンチン抗体による、MDA薬剤感受性およびMDA/MITO薬剤耐性細胞系統におけるビメンチン表面発現のFACS分析結果のグラフ表示である。

【図11】図11は、MCF-7およびMCF-7/AR細胞系統におけるビメンチン表面発現の定量的FACS分析結果のグラフ表示である。

【図12A】図12Aは、GenBankアクセス番号P08670に対応するヒトビメンチンのポリペプチド配列の模式図である（配列識別番号1）。

【図12B】図12Bは、GenBankアクセス番号X56134（配列識別番号2）に対応するヒトビメンチンをコードする核酸配列のヌクレオチド配列の模式図である。ビメンチンタンパク・オープンリーディングフレームの開始および停止コドンには下線が引かれてある。

【図13A】図13Aは、浸透強化されない接着性腫瘍細胞の免疫組織化学的染色の手順を示すフローチャートである。

【図13B】図13Bは、浸透強化されない接着性腫瘍細胞の免疫組織化学的染色の手順を示すフローチャートである。

【図14】図14は、図13AおよびBに記載した手順を用いて抗ビメンチン抗体（クローンV9、NeoMarker MS-129-P）によって免疫染色した、浸透強化および浸透非強化MCF-7およびMCF-7/AR細胞の写真撮影記録である。マウスIgG1が陰性アイソタイプマッチングコントロールとして用いられ、まったく染色を示さなかった（図示せず）。MCF-7/ARのみが表面に露出したビメンチンを示した。

【図15】図15は、HL60薬剤感受性とHL60/AR薬剤耐性細胞系統におけるビメンチン表面露出に関する無処置細胞ラジオイムノアッセイ結果のグラフ表示である。CD33は、表面露出の陽性コントロールとして用いた。

【図16】図16は、HL60およびHL60/AR細胞に対する、放射標識抗ビメンチンの細胞傷害性結果のグラフ表示である。CD33は、表面露出の陽性コントロールとして用いた。

【図17A】図17Aは、MDA/mito細胞におけるビメンチンの表面暴露に関する、5回の独立したスカッチャード分析の結果を示す表である。 $R^2$ 値は、KdおよびBmaxを求めるために使用した非直線的合致の質を表す。分析は、Prizm GraphPadにて行った。

【図17B】図17Bは、表17Aの第1実験で行われたスカッチャード分析の表示である。

【図17C】図17Cは、各種乳ガンおよび卵巣ガン細胞系統の表面に存在するビメンチン分子の数を表す表である。R/Sは感受性および抵抗性の対応する細胞と比較したときの、表面ビメンチンの過剰発現の倍数を示す。

【図18】図18は、ドキシソルピシン、タキソール、およびミトキサントロンによる、ビメンチンの表面発現誘発を調べる無処置細胞ラジオイムノアッセイ結果のグラフ表示である。

【図19A】図19Aは、実験の間浮遊状態に保ったMCF-7/AR細胞におけるビメンチンの取り込み評価結果のグラフ表示である。

【図19B】図19Bは、接着性のMCF-7/AR、MDA、MDA/AR、およびMDA/mito細胞におけるビメンチン取り込みの評価結果のグラフ表示である。

10

20

30

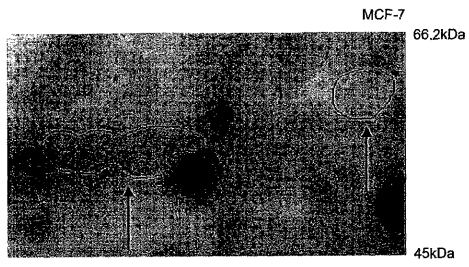


FIG. 1A

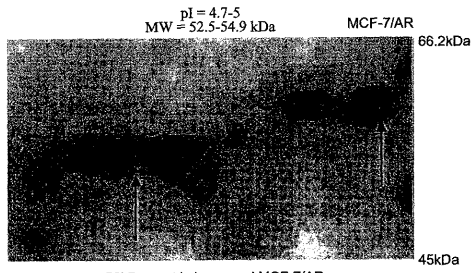


FIG. 1B

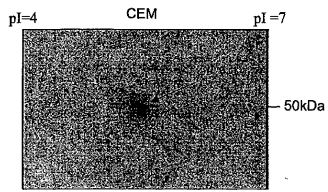


FIG. 3A

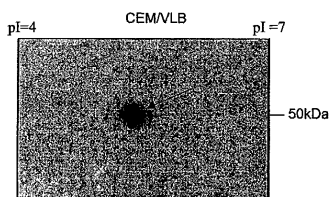


FIG. 3B

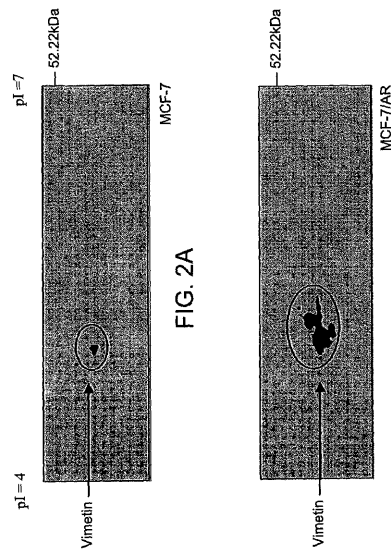


FIG. 2A

FIG. 2B

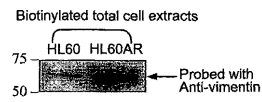


FIG. 4A

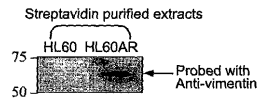


FIG. 4B

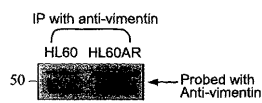


FIG. 4C

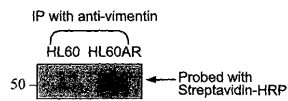
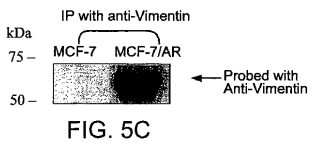
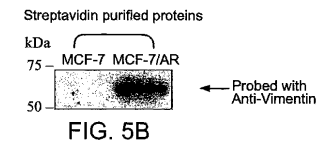
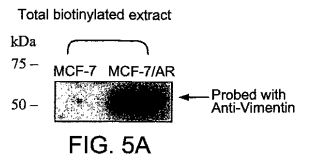
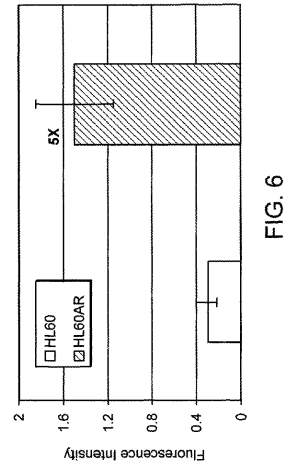


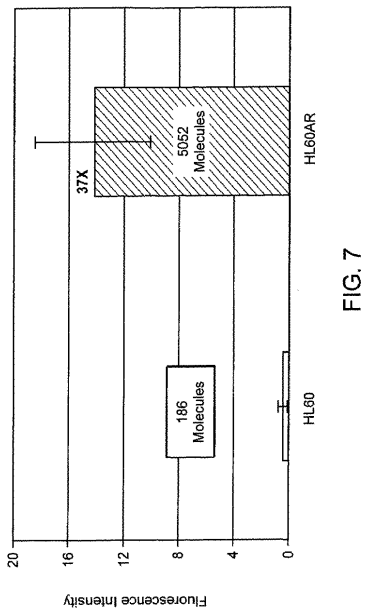
FIG. 4D



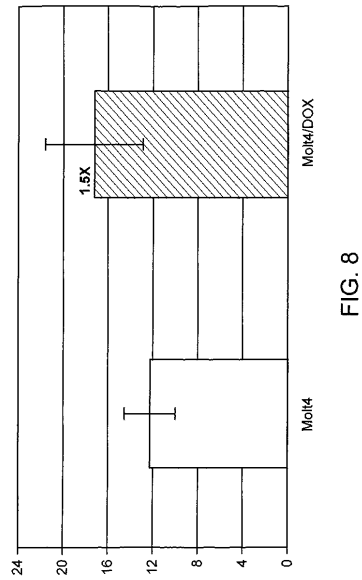
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 9 】

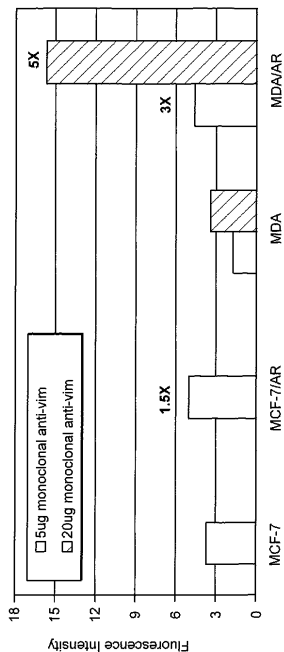


FIG. 9

【 10 】

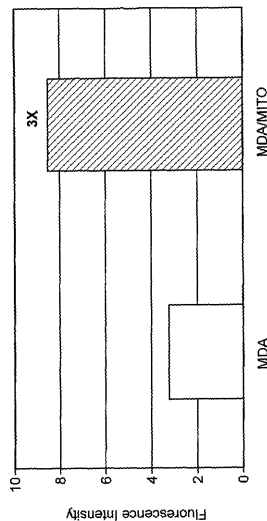


FIG. 10

【 11 】

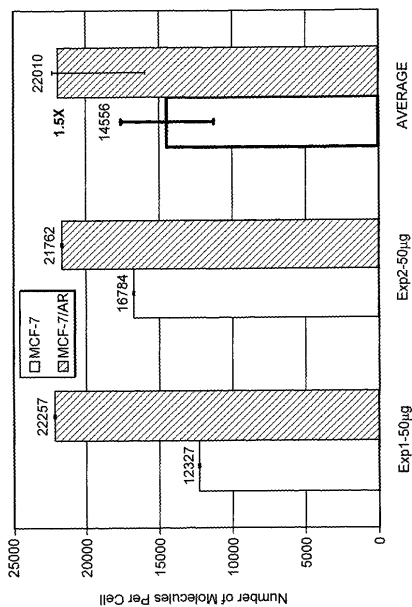


FIG. 11

**POLYPEPTIDE SEQUENCE OF HUMAN VIMENTIN**  
**(GENBANK ACCESSION NO. P08670 (SEQ ID NO.1))**

- 1 MSTRSYSSSS YRMFGGPGT ASRFSSRSY VTTSTRYSL GSALRPSTSR SLYASSPGGV
- 61 YATRSSAVRL RSSVPGVRL QDSVDFSLAD AINTEFKNTR TNEKVELQEL NDRFANYIDK
- 121 VRFLQQNKI LLAELEQLKG QKSRIGDLY EEMRELRRQ VDQLTNDKAR VEVEDNLAE
- 181 DIMFLREKIQ EEMLQREEE NTLQSFQDV DNASLARLDL ERKVESLQEE IAFLLKLHEE
- 241 EIQLQAOIQ EOHVQIDVDV SKPDLFAALR DVROQYESVA AKNLOEAEFW YKSKFADLSE
- 301 AANRNDALR QAKQESTEYR RQVQSLTCEV DALKGTNESL ERQMRMEEN FAVEAANYQD
- 361 TIGSLQDEIQ NKKEEMARHL REYQDLLNVK MALDIEIATY KLLLEGEER ISLPLPWFSS
- 421 INLRETNLDS LPLVDTHSKR TFLIKTIVETR DQOVINETSQ HHDDLE

FIG. 12A

FIG. 12B-1
FIG. 12B-2
FIG. 12B-3

FIG. 12B

FIG. 12B-1

**NUCLEIC ACID SEQUENCE OF HUMAN VIMENTIN  
(GENBANK ACCESSION NO. X56134 (SEQ ID NO.2))**

1 CGCGCCACCG CGCGCCGCCA GGCATCGCC ACCCTCGCA GCEATFCCA CGAGTCCGT  
61 GTCTCTGTC TCCTACCGCA GGAATGTCGG CGGCCGGGC ACCCGAGCC GGCAGACTC  
121 CAGCGGAGC TACGTACTA GTCACCCG CACCTACAGC CTGGGCAGCG CGCTGCGCC  
181 CAGCACGAG CGCAGCTCT ACGCCCTG CCGCGGGGC GTGTATGCCA CGCGCTCCT  
241 TCCGTGCGC CTGGGAGCA GCGTGCCTGG GGTGCGGCTC CTGCAGACT CGFTGGACT  
301 CTGCTGGCC GACGCCATCA ACACCGATT CAAGAACC CCGCACCAAG ARAAGGTGA  
361 GCTGCAGAG CTGAATGACC GCTTCCGCAA CTACATGAC AAGTGGCT TCCTGGAGCA  
421 GCAGATAG ATCCTGCTGG CCGAGCTCGA GCAGCTCAG GCCCAGGCC AGTCGCGCT

1141 GGATGAGATT CAGAAATGA AGGAGAAAT GCTCGTCCAC CTTGCTGAAT ACCRAGACT  
1201 GCTCAATGTT AAGATGGCC TTGACATTTGA GATTGCCACC TACAGGAAGC TGCTGGAAG  
1261 CGAGGAGC AGGATTTCTC TGCCTCTTCC AAATTTTCC TCCCTGACC TGAGGAAAC  
1321 TAATCTGGAT TCACTCCCTC TGGTTGATC CCACTCAAAA AGGACACTTC TGATTAAGAC  
1381 GGTGAACT AGAGTGGC AGTTATCAA CGAACTTCT CAGATCAGC ATGACCTTTGA  
1441 AATAAATTG CACACACTCA GTGCAGCAAT ATATTACCAG CAAGAATAAA ARAAGAAATCC  
1501 ATATCTTAAA GAAACAGCTT TCAAGTGCCT TTCTGCAATT TTTCAGGAGC GCAAGATAGA  
1561 TTTGGAATAG GAATAAGCTC TAGTTCTTAA CAAACGAC TCCTACAGA TTTAGAAAA  
1621 AGTTTACAAC ATAAATCTAGT TTACAGAAA ATCTTTGTCT AGAATACTTT TTAAGAATA  
1681 TTTTGAATC CATTAACACT GCTTTTTTTT TTCCAGCAAG TATCCACCA ACTTGGTTCT  
1741 GCTTCAATTA ATCTTTGGAA AAACCTA

FIG. 12B-3

481 GGGGGACCTC TACGAGGAGG AGATGCGGA GCTGCGCCGG CAGGTGGACC AGCTAACCA  
541 CGACAAAGCC CGCGTCGAGG TGGAGCGGA CAACCTGGCC GAGGACATCA TGCGCTCCG  
601 GGAGAAATTT CAGGAGGAGA TGCTTCAGAG AGAGGAGCC GAAACACCC TGCATCTTT  
661 CAGACAGGAT GTTGACAAATG CGTCTCTGCG ACCTCTTTCAC CTTGAACGCA AAGTGGAAATC  
721 TTTGCAGAA GAGATTTGCC TTTTGAAGA ACTCCACGAA GAGGAAATCC AGGAGCTCA  
781 GCTCAGATT CAGAACAGC ATGTCCAAAT CGATGTGGAT GTTTCRAGC CTGACCTCAC  
841 GGTGCCCCG CTGACGTAC GTCAACAATA TGAAGTGTG GCTGCCAAGA ACTTCAGGA  
901 GGCAGAGAA TGATACAAAT CCAAGTTTGC TGAACCTTCT GAGGCTGCCA ACCGGACAA  
961 TGACGCCCTG CGCAGGCAA AGCAGGATC CACTGATAC CCGAGACAGG TGCAGTCCCT  
1021 CACTGTGAA GTGATGCCC TTAAGGAAAC CAATGATGCC CTGGAACGCC AGATGCGTGA  
1081 AATGGAAGAG AACTTTGCGG TTGAAGCTGC TAACTACCA GACACTATTG GCGGCTGCA

FIG. 12B-2

**Procedure for immunofluorescence (non-permeabilized cells)**

2.5x10 <sup>4</sup> cells O/N in chamber slide in complete media
Block 30 min at RT with 100µl a-MEM/3%BSA/0.1%Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>
Incubate with 1st antibody in 100µl a-MEM/3% BSA/0.1%Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> for 1h at RT
Wash 6X with 200µl a-MEM/3% BSA.
Add 100µl of anti-mouse HRP (1:100) in a-MEM/3% BSA) for 30 min at RT
Wash 4X with 200µl a-MEM/3% BSA.
Add 50µl Tyramide 1:100 in Ampl. Buffer 0.0015% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> for 10 min at RT
Wash 4X with 200µl a-MEM/3% BSA.
Add 50µl streptavidin-FITC for 20min RT
Wash 4X with 200µl a-MEM/3% BSA.
Add 100µl (0.3µg) EMA in a-MEM, incubate 10 min. on ice under light
Wash 4X with 200µl a-MEM
Add 100µl of 4% paraformaldehyde in PBS for 20min at RT
Wash 4X with 200µl a-MEM
Remove wells and glue from slide add ~200 µl of mix A+B of Prolong Antifade cover with a large cover slide (22x74mm), let dry O/N in dark at RT°C, seal with clear nail polish.
OBSERVE UNDER FLUORESCENT MICROSCOPE

Amplification kit used:  
TSA kit #2 with  
HRP-goat anti-mouse  
IgG and Alexa fluor 488  
tyramide from molecular  
probes T-20182

FIG. 13A

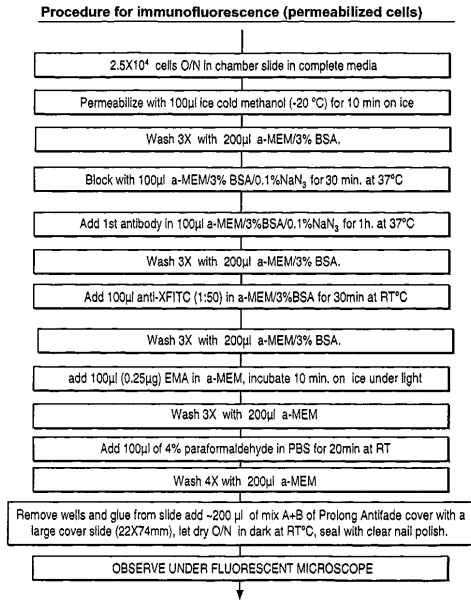


FIG. 13B

【 14 】

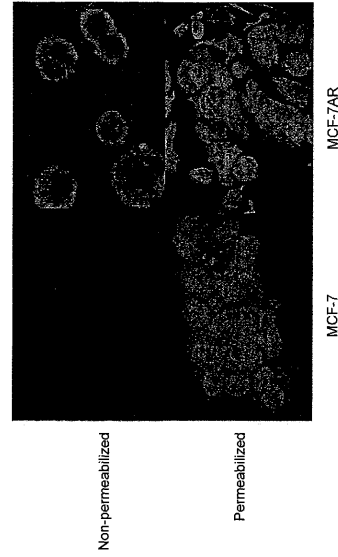


FIG. 14

【 15 】

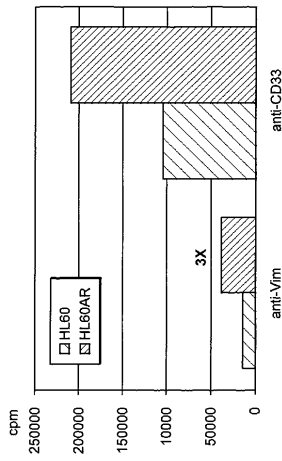


FIG. 15

【 16 】

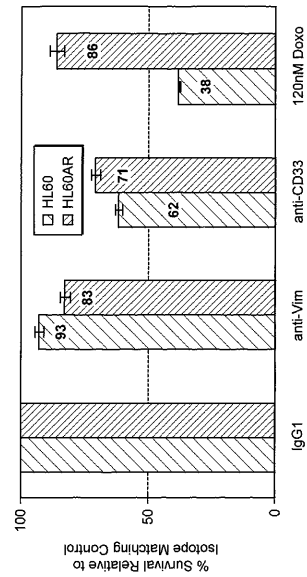


FIG. 16

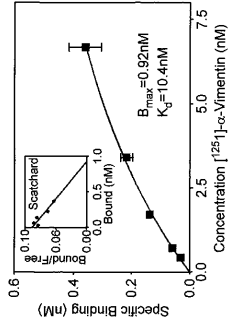


FIG. 17B

Exptl	MDA/mito (epitopes)	Kd (nM)	r2
1	2764751	10.4	0.95
2	3477797	5.9	0.97
3	1496035	2.5	0.98
4	2720065	3.2	0.97
5	2012848	6.7	0.97
Ave	2494299	5.7	
Std	761530	3.1	

FIG. 17A

cells	AVE	STD	Kd	R/S
MCF-7	9.1E+03	8.8E+03	nd	nd
MCF-7AR	3.8E+05	1.1E+05	nd	41.2
MDA	6.2E+05	1.6E+05	9.342.8	
MDA/mito	2.5E+06	7.6E+05	57.23.1	4.0
SKOV3	7.4E+05	3.7E+05	nd	nd
SKOV/T320	1.2E+06	2.0E+05	nd	1.6
2008	4.1E+04	2.2E+04	nd	nd
2008/T320	8.3E+04	1.3E+04	nd	2.0

FIG. 17C

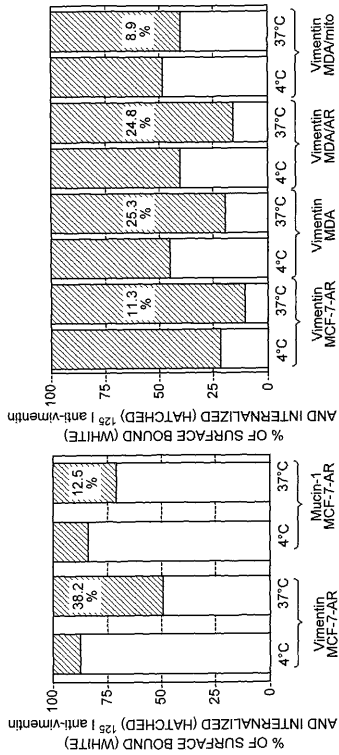


FIG. 19A

FIG. 19B

【 18 】

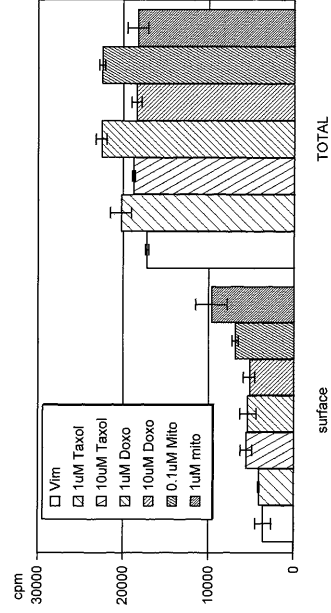


FIG. 18

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		IB 03/06427
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MORAN E. ET AL.: "Co-expression of MDR-associated markers, including P-170, MRP and LRP and cytoskeletal proteins, in three resistant variants of the human ovarian carcinoma cell line, OAW42." EUR. J. CANCER, vol. 33, no. 4, 1997, pages 652-660, XP004282571 cited in the application the whole document ----- -/--	1-9, 15-17, 20,22, 24-27, 32,33, 36,42-58
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 July 2004		Date of mailing of the international search report 28. 01. 05
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Giry, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

IB 03/06427

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUDWIG A. ET AL.: "Identification of differentially expressed genes in classical and atypical multidrug-resistant gastric carcinoma cells." ANTICANCER RES., vol. 22, no. 6a, November 2002 (2002-11), pages 3213-3222, XP009034409 page 3219, column 1 abstract	1-9, 15-17, 20,22, 24-27, 32,33, 36,42-58
X	BICHAT F. ET AL.: "Cytoskeleton alteration in MCF7R cells, a multiresistant human breast cancer cell line." ANTICANCER RES., vol. 17, 1997, pages 3393-3402, XP009034410 the whole document	1-9, 15-17, 20,22, 24-27, 32,33, 36,42-58
X	MESCHINI S. ET AL.: "Intracellular P-glycoprotein expression is associated with the intrinsic multidrug resistance phenotype in human colon adenocarcinoma cells." INT. J. CANCER, vol. 87, 2000, pages 615-628, XP002290524 the whole document	1-9, 15-17, 20,22, 24-27, 32,33, 36,42-58
X	SEKIGUCHI M. ET AL.: "Biological characteristics and chemosensitivity profile of four human anaplastic thyroid carcinoma cell lines." BIOMED. PHARMACOTHER., vol. 55, 2001, pages 466-474, XP002290765 the whole document	1-9, 15-17, 20,22, 24-27, 32,33, 36,42-58
X	SWEET P. ET AL.: "Cyclosporin A and verapamil enhancement of daunorubicin-produced nucleolar protein B23 translocation in daunorubicin-resistant and -sensitive human and murine tumor cells." CANCER RES., vol. 49, 1 February 1989 (1989-02-01), pages 677-680, XP009034587 the whole document	20,24, 25,36

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/IB 03/06427

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32-33, 36-58

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32-33, 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Invention 2 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32-33, 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for HSC70, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Invention 3 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32-33, 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Invention 4 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32-33, 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR3, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Invention 5 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32-33, 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MRP1, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Invention 6 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32-33, 36-58

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MRP5, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Invention 7 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32-33, 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for LRP, vimentin in situ probe and therapeutics comprising an anti-vimentin antibody.

---

Inventions 8-9 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 8) or HSC70 (inv.9), vimentin in situ probe and therapeutics comprising LDL.

---

Inventions 10-11 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 10), or HSC70 (inv. 11), vimentin in situ probe and therapeutics comprising NLK1 protein.

---

Inventions 12-13 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 12) or HSC70 (inv. 13), vimentin in situ probe and therapeutics comprising vimentin.

---

Inventions 14-15 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 14) or HSC70 (inv. 15), vimentin in situ probe and therapeutics comprising desmin.

---

Inventions 16-17 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 16) or HSC70 (inv. 17), vimentin in situ probe and therapeutics comprising glial fibrillary acidic protein.

---

Inventions 18-19 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 18) or HSC70 (inv. 19), vimentin in situ probe and therapeutics comprising peripherin.

---

Inventions 20-21 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 20) or HSC70 (inv. 21), vimentin in situ probe and therapeutics comprising fimbrin.

---

Inventions 22-23 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.), 24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 22) or HSC70 (inv. 23), vimentin in situ probe and therapeutics comprising RhoA-binding kinase alpha.

---

Inventions 24-25 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 23 (part.),

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

24 (part.), 25 (part.), 26-27, 32, 34 (part.), 35 (part.),  
36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 24) or HSC70 (inv. 25), vimentin in situ probe and therapeutics comprising protein phosphatase 2A.

---

Inventions 26-27 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 24 (part.),  
25 (part.), 26-27, 32, 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 26) or HSC70 (inv. 27), vimentin in situ probe and therapeutics comprising synthetic small molecules.

---

Inventions 28-29 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 24 (part.),  
25 (part.), 26-27, 32, 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 28) or HSC70 (inv. 29), vimentin in situ probe and therapeutics comprising chemicals.

---

Inventions 30-31 : claims 1-9, 15-17, 20 (part.), 22, 24 (part.),  
25 (part.), 26-27, 32, 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for nucleophosmin (inv. 30) or HSC70 (inv. 31), vimentin in situ probe and therapeutics comprising nucleic acids.

---

Inventions 32-36 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.),  
26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 32), or MDR3 (inv. 33), or MRP1 (inv. 34), or MRP5 (inv. 35), or LRP (inv. 36), vimentin in situ probe and therapeutics comprising LDL.

---

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Inventions 37-41 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 37), or MDR3 (inv. 38), or MRP1 (inv. 39), or MRP5 (inv. 40), or LRP (inv. 41), vimentin in situ probe and therapeutics comprising NLK1.

---

Inventions 42-46 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 42), or MDR3 (inv. 43), or MRP1 (inv. 44), or MRP5 (inv. 45), or LRP (inv. 46), vimentin in situ probe and therapeutics comprising vimentin.

---

Inventions 47-51 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 47), or MDR3 (inv. 48), or MRP1 (inv. 49), or MRP5 (inv. 50), or LRP (inv. 51), vimentin in situ probe and therapeutics comprising desmin.

---

Inventions 52-56 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 52), or MDR3 (inv. 53), or MRP1 (inv. 54), or MRP5 (inv. 55), or LRP (inv. 56), vimentin in situ probe and therapeutics comprising glial fibrillary acidic protein.

---

Inventions 57-61 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 57), or MDR3 (inv. 58), or MRP1 (inv. 59), or MRP5 (inv. 60), or LRP (inv. 61), vimentin in situ probe and therapeutics comprising peripherin.

---

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Inventions 62-66 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 62), or MDR3 (inv. 63), or MRP1 (inv. 64), or MRP5 (inv. 65), or LRP (inv. 66), vimentin in situ probe and therapeutics comprising fimbrin.

---

Inventions 67-71 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 67), or MDR3 (inv. 68), or MRP1 (inv. 69), or MRP5 (inv. 70), or LRP (inv. 71), vimentin in situ probe and therapeutics comprising RhoA-binding kinase alpha.

---

Inventions 72-76 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 23 (part.), 26-27, 28 (part.), 32, 34 (part.), 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 72), or MDR3 (inv. 73), or MRP1 (inv. 74), or MRP5 (inv. 75), or LRP (inv. 76), vimentin in situ probe and therapeutics comprising protein phosphatase 2A.

---

Inventions 77-81 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32, 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 32), or MDR3 (inv. 33), or MRP1 (inv. 34), or MRP5 (inv. 35), or LRP (inv. 36), vimentin in situ probe and therapeutics comprising synthetic small molecules.

---

Inventions 82-86 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32, 35 (part.), 36-58

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 82), or MDR3 (inv. 83), or MRP1 (inv. 84), or MRP5 (inv. 85), or LRP (inv. 86), vimentin in situ probe and therapeutics comprising chemicals.

---

Inventions 87-91 : claims 1-9, 15-17, 21 (part.), 22, 26-27, 28 (part.), 32, 35 (part.), 36-58

A method for detecting/treating multidrug resistance related to neoplasm by determination of cell surface expressed vimentin, kit comprising a first probe for vimentin and a second probe for MDR1 (inv. 87), or MDR3 (inv. 88), or MRP1 (inv. 89), or MRP5 (inv. 90), or LRP (inv. 91), vimentin in situ probe and therapeutics comprising nucleic acids.

---

Inventions 92-100 : claims 10-11, 12 (part.), 13 (part.), 14, 18-19, 29-31

A method for detecting a multidrug resistant cell in a patient comprising administering a labelled vimentin-binding agent which is modified LDL (inv. 92), or NLK1 protein (inv. 93), or vimentin (inv. 94), or desmin (inv. 95), or glial fibrillary acidic protein (inv. 96), or peripherin (inv. 97), or fimbrin (inv. 98), or RhoA-binding kinase alpha (inv. 99), or protein phosphatase 2A (inv. 100) and vimentin in situ detection probe.

---

Inventions 101-103 : claims 10-11, 13 (part.), 14, 18-19, 29-31

A method for detecting a multidrug resistant cell in a patient comprising administering a labelled vimentin-binding agent which is modified synthetic small molecules (inv. 101), or chemicals (inv. 102), or nucleic acids (inv. 103) and vimentin in situ detection probe.

---

Invention 104 : claims 59-108

Methods for detecting a neoplastic cell, kits for detecting neoplasia, a cell-surface vimentin-targeted agent for treating neoplastic cell growth, a vaccine for treating or preventing neoplasm.

---

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 51/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	43/00	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 K 39/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K	39/00	H
<b>A 6 1 K 39/39 (2006.01)</b>	A 6 1 K	39/39	
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P	35/00	
<b>C 0 7 K 16/18 (2006.01)</b>	C 0 7 K	16/18	

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

(74) 代理人 100135585

弁理士 西尾 務

(72) 発明者 ジョージス, エリアス

カナダ国 ケベック エイチ7エム 3ジェイ7, ラーバル, デ バウブレイ 2095

(72) 発明者 サーファス, ルシル

カナダ国 ケベック エイチ2ティー 2ゼット6, モントリオール, デ レスプラナーダ 5291

(72) 発明者 ボネアウ, アンネ - マリー

カナダ国 ケベック エイチ7エム 3ジェイ7, ラーバル, デ ボウブレイ 2095

(72) 発明者 ダライル, フレデリック

カナダ国 ケベック エイチ2ジェイ 3ビー7, モントリオール, メンタナ 4683

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QS33 QX02 QX07

4C076 AA19 CC06 CC27 CC32 FF32

4C084 AA01 AA02 DA27 DA33 DA34 MA24 NA05 ZB26

4C085 AA03 AA38 BB11 CC03 CC21 DD62 EE01 FF21

4C086 AA01 EA10 MA24 NA05 ZB26

4H045 AA30 BA10 CA40 DA75 EA28 EA31 EA51

专利名称(译)	用于治疗表现出多药耐药性的肿瘤疾病的波形蛋白定向诊断方法和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007515924A</a>	公开(公告)日	2007-06-21
申请号	JP2005512304	申请日	2003-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	出莱斯钾生物制药墨		
申请(专利权)人(译)	Aureriumu生物制药油墨.		
[标]发明人	ジョージスエリアス サーファスルシル ボネアウアンネマリー ダライルフレデリック		
发明人	ジョージス,エリアス サーファス,ルシル ボネアウ,アンネ-マリー ダライル,フレデリック		
IPC分类号	C12Q1/04 G01N33/53 A61K38/00 A61K31/704 A61K9/127 A61K51/00 A61K39/00 A61K39/39 A61P35/00 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/574 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/04.ZNA G01N33/53.D A61K37/02 A61K31/704 A61K9/127 A61K43/00 A61K39/00.H A61K39/39 A61P35/00 C07K16/18		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QS33 4B063/QX02 4B063/QX07 4C076/AA19 4C076/CC06 4C076/CC27 4C076/CC32 4C076/FF32 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/DA27 4C084/DA33 4C084/DA34 4C084/MA24 4C084/NA05 4C084/ZB26 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/CC21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/FF21 4C086/AA01 4C086/EA10 4C086/MA24 4C086/NA05 4C086/ZB26 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA28 4H045/EA31 4H045/EA51		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的肿瘤或损伤的细胞或多药耐药 (MDR)，以检测在肿瘤或受损的细胞耐药,一个与正常细胞相比或在非MDR肿瘤细胞的细胞表面表达的水平波形蛋白的蛋白质，以检测在细胞中的东西的增加波形蛋白的细胞表面表达。技术领域

