

(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2018-516230

(P2018-516230A)

(43) 公表日 平成30年6月21日(2018.6.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 16/28 (2006.01)</b>	C07K 16/28	ZNA 4B064
<b>A61K 39/395 (2006.01)</b>	A61K 39/395	N 4C076
<b>A61K 47/68 (2017.01)</b>	A61K 39/395	T 4C084
<b>A61K 47/65 (2017.01)</b>	A61K 39/395	L 4C085
<b>A61K 47/51 (2017.01)</b>	A61K 47/68	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-549330 (P2017-549330)  
 (86) (22) 出願日 平成28年3月18日 (2016. 3. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月9日 (2017. 11. 9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/023144  
 (87) 国際公開番号 W02016/149621  
 (87) 国際公開日 平成28年9月22日 (2016. 9. 22)  
 (31) 優先権主張番号 62/134, 724  
 (32) 優先日 平成27年3月18日 (2015. 3. 18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/186, 772  
 (32) 優先日 平成27年6月30日 (2015. 6. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501335771  
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシ  
 ティ  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 212  
 18 バルティモアノーブス・チャールズ  
 ・ストリート 3400  
 (71) 出願人 517322042  
 ユニバーシティ オブ メリーランド ボ  
 ルチモア  
 アメリカ合衆国 メリーランド州 212  
 01 ボルチモア ウェスト レキシント  
 ン ストリート 620 フォース フロ  
 ア  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カリウムチャンネルKCNK9を標的とする新規モノクローナル抗体阻害剤

(57) 【要約】

本開示の主題は、哺乳類のKCNK9カリウムチャンネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するおよび/または相互作用する抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体と、それらをコードする核酸分子と、ならびに前記核酸分子を含むベクターとに関する。本開示の主題は、前記抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の調製方法、ならびにそれらを含む医薬組成物、診断用組成物、およびキットを提供する。KCNK9発現細胞の存在を評価するための、細胞におけるKCNK9活性を阻害するための、KCNK9発現細胞（例えば、がん細胞）の増殖または生存を阻害するための、腫瘍の増殖および/または転移を阻害するための、補体依存性がん細胞傷害性を促進するための抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の組成物、キット、方法および使用、ならびにがんの治療もまた提供される。

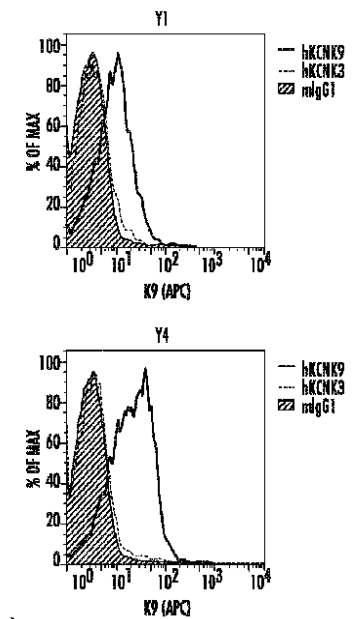


FIG. 3B

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

KCNK9カリウムチャネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する単離された抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体。

## 【請求項 2】

前記抗体、断片、またはそれらの誘導体が他のカリウムチャネルに結合しない、請求項 1 に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 3】

少なくとも1つの前記エピトープがM1P1ドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 4】

少なくとも1つの前記エピトープが、配列番号1のアミノ酸Glu<sub>30</sub>とIle<sub>88</sub>との間にエピトープを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 5】

前記抗体、断片、または誘導体がKCNK9活性を阻害する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体、抗体断片、または誘導体。

## 【請求項 6】

細胞表面上の少なくとも1つの前記エピトープへの抗体、断片、または誘導体の結合が、前記細胞表面上のカリウムチャネルの内在化およびエンドサイトーシスを引き起こす、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 7】

KCNK9発現細胞の表面上の少なくとも1つの前記エピトープへの抗体、断片、または誘導体の結合が、前記KCNK9発現細胞の生存を阻害する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 8】

前記KCNK9発現細胞ががん細胞を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 9】

前記KCNK9カリウムチャネルがヒトKCNK9を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 10】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 11】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 12】

前記抗体がY4である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 13】

前記抗体、断片、または誘導体が少なくとも1つの薬剤に結合している、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 14】

少なくとも1つの前記薬剤が、治療薬剤および標識薬剤からなる群より選択される、請求項 13 に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 15】

少なくとも1つの前記薬剤が抗新生物剤である、請求項 13 または 14 に記載の抗体、断片、または誘導体。

## 【請求項 16】

前記抗体、断片、または誘導体がリンカーを介して少なくとも1つの前記薬剤に結合し

10

20

30

40

50

ている、請求項 13 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体。

【請求項 17】

前記リンカーが、切断可能なリンカーおよび切断不能なリンカーからなる群より選択される、請求項 16 に記載の抗体、断片、または誘導体。

【請求項 18】

切断可能な前記リンカーがペプチドリンカーであり、切断不能なリンカーがチオエーテルリンカーである、請求項 16 または 17 に記載の抗体、断片、または誘導体。

【請求項 19】

前記ペプチドリンカーがバリン-シトルリンペプチドリンカーを含む、請求項 18 に記載の抗体、断片、または誘導体。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体を含む医薬組成物。

【請求項 21】

少なくとも1つの抗新生物剤をさらに含む、請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、または誘導体を含む診断用組成物。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体、断片または誘導体を含むキット。

【請求項 24】

KCNK9発現細胞の存在を評価する方法であって、KCNK9をその表面上に発現することが疑われる細胞または組織を、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、もしくは誘導体、または請求項 22 に記載の診断用組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 25】

KCNK9活性を阻害する方法であって、KCNK9をその表面上に発現する細胞または組織を、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、もしくは誘導体、または請求項 20 または 21 に記載の医薬組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 26】

KCNK9発現がん細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、KCNK9をその表面上に発現するがん細胞を、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、もしくは誘導体、または請求項 20 または 21 に記載の医薬組成物と接触させることを含む方法。

【請求項 27】

前記接触が *in vitro* で細胞または組織において行われる、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記細胞または組織がヒト細胞または組織を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記接触が *in vivo* で被験体において行われる、請求項 24 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記被験体がヒトである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

がんを有するかまたは有すると疑われる被験体における腫瘍の増殖および/または転移を阻害する方法であって、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、もしくは誘導体、または請求項 20 または 21 に記載の医薬組成物を、被験体における腫瘍の増殖および/または転移を阻害するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法。

【請求項 32】

がんを有するかまたは有すると疑われる被験体における補体依存性がん細胞傷害性を促進する方法であって、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の抗体、断片、もしくは誘導体、または請求項 20 または 21 に記載の医薬組成物を、被験体における補体依存性がん

10

20

30

40

50

細胞傷害性を促進するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法。

【請求項 3 3】

治療を必要とする被験体におけるKCNK9発現がんの治療方法であって、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の抗体、断片、もしくは誘導体、または請求項 2 0 または 2 1 に記載の医薬組成物を、被験体におけるKCNK9発現がんを治療するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法。

【請求項 3 4】

被験体に従来のがん治療の有効量を投与することをさらに含む、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

従来の前記がん治療が、化学療法、放射線療法、免疫療法、陽子療法、光線力学療法、および外科手術からなる群より選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記がんが、乳がんおよび肺がんからなる群より選択される、請求項 3 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記肺がんが非小細胞肺癌を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記肺がんが小細胞肺癌を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願との相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2015年3月18日に提出された米国仮出願第62/134,724号および2015年6月30日に提出された米国仮出願第62/186,772号の利益を主張し、その内容は全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

連邦支援の研究開発

本発明は、国立衛生研究所 (NIH) によって授与されたU54MH084691に基づく政府の支援によってなされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

電子提出された資料の参照による組み込み

本明細書には、配列表が含まれている。それは、"111232-00498\_ST25.txt"と題するASCIIテキストファイルとしてEFS-Webを介して電子提出されている。配列表は、20,480バイトのサイズであり、2016年3月15日に作成されたものである。その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 4】

イオンチャネルは、全ての生物において細胞膜を通るイオンの通過を容易にする門脈を制御する。イオン分布の過渡的な変化は、様々な生体内作用の基礎をなす膜電位を変化させる。カリウム ( $K^+$ ) チャネルは、最も豊富で多様なイオンチャネルである (非特許文献 1)。その中で、二孔ドメイン  $K^+$  ( $K2P$ ) チャネルが最も新しいメンバーである。現在までに、15の哺乳類  $K2P$  チャネルサブタイプが発見されており (図 1 A ; 非特許文献 2)、各サブタイプは、精神遅滞、家族性片頭痛およびがんを含む生理学的過程および疾患において、明確な役割を果たす (非特許文献 2 ~ 非特許文献 5)。その重要性にもかかわらず、同質性が高い  $K2P$  の性質と、サブタイプ特異的ツールの不足のために、個々の  $K2P$  サブタイプについての知識は限られている。

【0 0 0 5】

KCNK9は、 $K2P$  チャネルファミリーのメンバーである。生理学的条件下では、KCNK9は小脳などの中枢神経系の組織で主に発現し、休止膜電位を維持し、活動電位発火を調節するように作用する (非特許文献 2)。KCNK9はまた、ヒト乳房腫瘍および肺腫瘍におけるゲ

10

20

30

40

50

ノム増幅、mRNAとタンパク質との過剰発現を含む遺伝的証拠に基づくがんにも関与している（非特許文献5）。強制的なKCNK9発現は、おそらく低酸素状態または血清不足状態下での細胞生存を向上させることにより、ヌードマウスにおけるマウス胚線維芽細胞の形質転換を促進することが示されている（非特許文献5；非特許文献6）。しかしながら、内因性KCNK9が新生物にどのように寄与するかと、治療標的としての可能性とは、KCNK9機能の特異的モジュレーターの欠如のために分かりにくいままである。K2Pチャネルの遺伝学的研究は、発生および補整効果のために、解釈することが困難であることが多い（非特許文献7）。KCNK9の特異的モジュレーターを同定するために小分子のハイスループットスクリーニングが実施されたが、それにもかかわらず、あまり進展しなかった（非特許文献8）。これは、ひとつには、化学的スクリーニングを合理的に設計し、高い配列および構造相同性を共有する標的に対する小分子を開発することが困難なためである。その絶妙な特異性で知られている抗体は、特にがん治療に適用される場合、細胞表面受容体および抗原を標的化するために広く使用されている（非特許文献9；非特許文献10）。しかしながら、イオンチャネル活性を調節するために抗体を使用することの実行可能性は、十分に検討されていない。

【0006】

K2Pチャネルは、かなりの構造上の類似性を共有する。それらは、2つの連結した孔-内膜領域（P1、P2）および4つの膜貫通ドメイン（M1～M4）を含む各サブユニットで、二量体として会合する。K2Pチャネルの特徴の1つは、M1ドメインとP1ドメイン（M1P1）との間の細胞外側にある約60アミノ酸のループである。ヒトK2Pチャネルの結晶構造解析は、細胞外イオン経路を「キャップ」する構造ドメインとしてこのループを明らかにし、一般的なチャネルブロッカーに対するK2Pの非感受性の説明を提供する（非特許文献11；非特許文献12）。突然変異分析およびキメラ研究は、細胞外刺激を感知し、チャネル開閉を調節するM1P1の役割についての説得力のある証拠を提供している（非特許文献13；非特許文献14）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第00/09560号

【特許文献2】国際公開第89/09622号

【特許文献3】欧州特許出願公開第0239400号

【特許文献4】国際公開第90/07861号

【特許文献5】国際公開第91/10741号

【特許文献6】国際公開第94/02602号

【特許文献7】国際公開第96/34096号

【特許文献8】国際公開第96/33735号

【特許文献9】国際公開第88/09344号

【特許文献10】米国特許第4,474,893号

【特許文献11】米国特許第5,959,084号

【特許文献12】米国特許第5,798,229号

【特許文献13】国際公開第95/04064号

【特許文献14】米国特許第5,827,690号

【特許文献15】米国特許第5,756,687号

【特許文献16】米国特許第5,750,172号

【特許文献17】米国特許第5,741,957号

【特許文献18】国際公開第2005/075510号

【特許文献19】米国特許第8,946,168号

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Sun & Li (2013) *Acta Pharmacol Sin* 34, 199-204

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 2】Enyedi & Czirjak, (2010) *Physiological Reviews* 90, 559-605
- 【非特許文献 3】Barel et al. (2008) *The American Journal of Human Genetics* 83, 193-199
- 【非特許文献 4】Lafreniere et al. (2010) *Nat Med* 16, 1157-1160
- 【非特許文献 5】Mu et al. (2003) *Cancer Cell* 3, 297-302
- 【非特許文献 6】Pei et al. (2003) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 7803-7807
- 【非特許文献 7】Linden et al. (2008) *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327, 277-286
- 【非特許文献 8】Miller et al. (2012) *Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]* 10
- 【非特許文献 9】Chan & Carter (2010) *Nat Rev Immunol* 10, 301-316
- 【非特許文献 10】Zhang et al. (2007) *Cell Res* 17, 89-99
- 【非特許文献 11】Fink et al. (1998) *Embo J* 17, 3297-3308
- 【非特許文献 12】Lesage et al. (1996) *Embo J* 15, 1004-1011
- 【非特許文献 13】Clarke et al. (2008) *Journal of Biological Chemistry* 283, 16985-16992
- 【非特許文献 14】Lotshaw (2007) *Cell Biochemistry and Biophysics* 47, 209-256
- 【非特許文献 15】Ausubel, F., et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols in Immunology, Current Protocols in Protein Science, and Current Protocols in Cell Biology*, all John Wiley & Sons, N.Y., edition as of December 2008 20
- 【非特許文献 16】Sambrook, Russell, and Sambrook, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001
- 【非特許文献 17】Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988
- 【非特許文献 18】Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2005
- 【非特許文献 19】Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Ed., McGraw Hill, 2005 30
- 【非特許文献 20】Katzung, B. (ed.) *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill / Appleton & Lange 10th ed. (2006) or 11th edition (July 2009)
- 【非特許文献 21】McKusick, V. A.: *Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12th edition)
- 【非特許文献 22】van de Vijver et al. (2002) *New England Journal of Medicine* 347, 1999-2009
- 【非特許文献 23】Bild et al. (2006) *Nature* 439, 353-357
- 【非特許文献 24】Oquadid-Ahidouch H et al., 2001 40
- 【非特許文献 25】Higgins and Sharp (1989) *CABIOS* 5:151-153
- 【非特許文献 26】Higgins et al. (1992) *Comput. Appl. Biosci.* 8:189-191
- 【非特許文献 27】Kohler and Milstein, *Nature* 256 (1975), 495
- 【非特許文献 28】Galfre, *Meth. Enzymol.* 73 (1981), 3
- 【非特許文献 29】Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105
- 【非特許文献 30】Malmborg, J. *Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13
- 【非特許文献 31】Staerz et al. (1985) *Nature* 314:628
- 【非特許文献 32】Perez et al. (1985) *Nature* 316:354
- 【非特許文献 33】Staerz and Bevan (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:1453
- 【非特許文献 34】Staerz and Bevan (1986) *Immunol. Today* 7:241 50

- 【非特許文献 3 5】Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990), 4712-4716
- 【非特許文献 3 6】Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press
- 【非特許文献 3 7】Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982)
- 【非特許文献 3 8】Mandler et al., J. Natl. Cancer Inst., 92(19), 1549-51 (2000)
- 【非特許文献 3 9】Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:8618-8623 (1996)
- 【非特許文献 4 0】Doronina et al., Nat. Biotechnol. 21:778-784 (2003)
- 【非特許文献 4 1】Francisco et al., Blood (2003); DOI 10.1182/blood-2003-01-0039
- 【非特許文献 4 2】F. C. Kull et al. Applied Microbiology 9, 538 (1961)
- 【非特許文献 4 3】Lopez-Bertoni et al. (2014) Oncogene 10
- 【非特許文献 4 4】Leahy et al. (2000) Protein Expression and Purification 20, 500-506
- 【非特許文献 4 5】Chapoval et al. (2002) Mol Biotechnol 21, 259-264
- 【非特許文献 4 6】Weaver et al. (2004) Journal of Biomolecular Screening 9, 671-677
- 【非特許文献 4 7】Konishi et al. (2008) Clinical and Vaccine Immunology : CVI 15, 88-94
- 【非特許文献 4 8】Hsu et al. (2010) Molecular Cancer 9, 139
- 【非特許文献 4 9】Goodwin et al. (2011) Anti-cancer drugs 22, 905-912
- 【非特許文献 5 0】Bhattacharyya et al. (2010) Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 14541-14546 20
- 【非特許文献 5 1】Mendelsohn (1997) Clinical Cancer Research 3, 2703-2707
- 【非特許文献 5 2】Molina et al. (2001) Cancer Research 61, 4744-4749
- 【非特許文献 5 3】Huang & Jan (2014) The Journal of Cell Biology 206, 151-162
- 【非特許文献 5 4】Kosztka et al. (2011) Melanoma Research 21, 308-322
- 【非特許文献 5 5】Arnould, et al. "Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism?" Br. J. Cancer 94, 259-267 (2006)
- 【非特許文献 5 6】Walser et al., "Immune-mediated modulation of breast cancer growth and metastasis by the chemokine Mig (CXCL9) in a murine model," J. Immunother. 30, 490-498(2007) 30
- 【非特許文献 5 7】Parekh, et al., "Development and validation of an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity-reporter gene assay" mAbs 4, 310-318 (2012)
- 【非特許文献 5 8】Kullmann & Waxman (2010) The Journal of Physiology 588, 1823-1827
- 【非特許文献 5 9】Rask-Andersen et al. (2011) Nat Rev Drug Discov 10, 579-590
- 【非特許文献 6 0】Moskal et al. (2005) Neuropharmacology 49, 1077-1087
- 【非特許文献 6 1】Scott et al. (2012) Nat Rev Cancer 12, 278-287
- 【非特許文献 6 2】Meuth et al. (2008) J Neurooncol 87, 263-270
- 【非特許文献 6 3】Lee et al. (2012) Acta Physiologica 204, 513-524 40
- 【非特許文献 6 4】Li et al. (2006) Journal of the American Society of Nephrology 17, 1848-1857
- 【非特許文献 6 5】Yang, & Brackenbury (2013) Frontiers in Physiology 4, 185
- 【非特許文献 6 6】Boonstra et al. (1981) Journal of Cellular Physiology 107, 75-83 (1981)
- 【非特許文献 6 7】Wonderlin et al. (1995) Journal of Cellular Physiology 165, 177-185
- 【非特許文献 6 8】Lee et al. (2014) Cell 157, 1393-1404
- 【非特許文献 6 9】Shillito et al. (1995) Annals of Neurology 38, 714-722
- 【非特許文献 7 0】Tomimitsu et al. (2004) Annals of Neurology 56, 440-444 50

## 【発明の概要】

## 【0009】

本発明の実施は、特に明記しない限り、当該技術分野の技術の範囲内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子組み換え生物学、微生物学、組み換え核酸（例えば、DNA）技術、免疫学、およびRNA干渉（RNAi）の従来技術を典型的に使用する。これらの技術のいくつかの非限定的な説明は、以下の刊行物で見られる：非特許文献15～非特許文献18。治療薬剤およびヒト疾患に関する非限定的な情報は、非特許文献19、非特許文献20で見られる。遺伝子および遺伝的障害に関する非限定的な情報は、非特許文献21、またはより最近のオンラインデータベース：Online Mendelian Inheritance in Man, OMI M<sup>TM</sup>. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.)、2010年5月1日現在World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>、およびOnline Mendelian Inheritance in Animals (OMIA), a database of genes, inherited disorders and traits in animal species (other than human and mouse), <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>で見られる。本明細書で言及される全ての特許、特許出願、および他の刊行物（例えば、科学論文、書籍、ウェブサイト、およびデータベース）は、その全体が参照により組み込まれる。本明細書と組み込まれた参考文献との間に矛盾がある場合、本明細書（組み込まれた参考文献に基づく可能性のあるその修正を含む）が支配するものとする。本明細書では、特に明記しない限り、標準的技術で受け入れられている用語の意味が用いられる。本明細書では、様々な用語の標準的な略語を使用する。

## 【0010】

一態様では、本開示の主題は、KCNK9カリウムチャネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する単離された抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を提供する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、他のカリウムチャネルに結合しない。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、モノクローナル抗体を含む。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、ヒト化抗体（例えば、ヒト化モノクローナル抗体）を含む。

## 【0011】

一態様では、本開示の主題は、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を含む医薬組成物を提供する。

## 【0012】

一態様では、本開示の主題は、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を含む診断用組成物を提供する。

## 【0013】

一態様では、本開示の主題は、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を含むキットを提供する。

## 【0014】

一態様では、本開示の主題は、KCNK9発現細胞の存在を評価する方法であって、KCNK9をその表面上に発現することが疑われる細胞または組織を、本開示の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の診断用組成物と接触させることを含む方法を提供する。

## 【0015】

一態様では、本開示の主題は、KCNK9活性を阻害する方法であって、KCNK9をその表面上に発現する細胞または組織を、本開示の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の医薬組成物と接触させることを含む方法を提供する。

## 【0016】

一態様では、本開示の主題は、KCNK9発現がん細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、KCNK9をその表面上に発現するがん細胞を、本開示の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の医薬組成物と接触させることを含む方法を提供する。

## 【0017】

一態様では、本開示の主題は、がんを有するかまたは有すると疑われる被験体における腫瘍の増殖および/または転移を阻害する方法であって、本開示の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の医薬組成物を、被験体における腫瘍の増殖および/または転移を阻害するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。

## 【0018】

一態様では、本開示の主題は、がんを有するかまたは有すると疑われる被験体における補体依存性がん細胞傷害性を促進する方法であって、本開示の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の医薬組成物を、被験体における補体依存性がん細胞傷害性を促進するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。

10

## 【0019】

一態様では、本開示の主題は、治療を必要とする被験体におけるKCNK9発現がんの治療方法であって、本開示の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の医薬組成物を、被験体におけるKCNK9発現がんを治療するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。

## 【0020】

本開示の主題の特定の態様を上述したが、それらは本開示の主題によって全体的または部分的に取り上げられており、他の態様は、以下で最も良く説明されるように、添付の実施例および図面に関連して説明が進むにつれて明らかになるであろう。

## 【0021】

本開示の主題を一般的な用語で説明したため、ここで添付図面を参照するが、必ずしも一定の縮尺では描かれていない。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【0022】

【図1A】標的、エピトープおよび抗原の特徴を示す。15個のヒトチャンネル孔ドメイン1配列の配列アラインメントから計算したK2P系統樹を示す。チャンネルは、配列類似性および機能的類似性に基づいて6つのサブファミリーに分けることができる。

【図1B】hKCNK4結晶構造に基づく相同性モデリングによって予測されたhKCNK9の3D構造を示す。抗体によって標的とされるM1P1ドメインは青色に着色する。開閉に不可欠なM1P1ドメイン内の残基は注釈が付いている。

30

【図1C】15個のhK2PサブタイプのM1P1ドメインに対応する配列アラインメントを示す。抗体生成のために選択されたM1P1ドメインは青色に着色されている。hKCNK9および他のK2PサブタイプのM1P1ドメインの間の同一残基の対パーセンテージが計算される。

【図1D】組み換え抗原-hGH-hK9M1P1およびhK9M1P1-mIgGの概略図を示す。

【図1E】mRNAレベルを示すグラフである。

【図1F】腫瘍の大きさを示すグラフである。

【図2A】mAb開発のために生成された抗原を示す。hGH-K9M1P1およびK9M1P1-mIgG抗原（~37kDa）の発現がウエスタンブロット（ベクター：25kDa）によって確認されたことを示す。

40

【図2B】抗原の純度を評価するために用いた銀染色を示す。

【図3A】Y4がサブタイプ特異性および高い親和性でhKCNK9に結合することを示す。Y4および抗hGH抗体でプロットされたhGH-K2PM1P1組み換えタンパク質のウエスタンブロット分析を示す。

【図3B】mAbで最初に染色され、次いで二次APC複合ヤギ抗マウスIgG抗体で対比染色されたhKCNK9またはhKCNK3を一過性に発現するHEK293細胞のフローサイトメトリー分析を示す。

【図3C】Octetプラットフォームによって決定されたY1-4 mAbの結合反応速度を示す。会合速度および解離速度は、hGH-hK9M1P1またはhGH-mK9M1P1組み換えタンパク質の存在下でY1-4 mAbでコーティングされたプローブをインキュベートすることによってリアルタイムで測定される。

50

【図3D】組み換えタンパク質のウエスタンブロットおよびhKCNK9またはmKCNK9を一過性に発現するHEK293細胞のフローサイトメトリー分析によって検証されたヒト対マウスKCNK9に対するY1-4 mAbの示差親和性を示す。

【図3E】調査のフローチャートを示す。

【図4】Y-mAbの、hKCNK3より優先されるhKCNK9への結合を示す。hGH-hKCNK3およびhKCNK9-アルカリホスファターゼ組み換えタンパク質に対するY-mAbのウエスタンブロット分析を行った。抗hGHおよび非特異的mIgG1抗体を対照として用いた。

【図5】Y-mAbの結合のリアルタイム測定を示す。結合( $k_{on}$ )定数および解離( $k_{off}$ )定数をOctetプラットフォームにより測定し、hKCNK9M1P1またはmKCNK9M1P1へのmAb結合の親和性を決定した。

【図6A】Y4が、チャネルの細胞表面からの内在化を誘導することによってhKCNK9を阻害することを示す。タリウム( $Tl^+$ )ベースの蛍光アッセイ原理(Invitrogen)および読み出しの概略図を示す。765および966は、対照化合物として使用される化学修飾物質である。

【図6B】Y1およびY4 mAbで染色されたテトラサイクリン(Tet)誘導性hKCNK9安定細胞株の、Tet誘導の存在下( $Tet^+$ )または非存在下( $Tet^-$ )におけるフローサイトメトリー分析を示す。親HEK293細胞を陰性対照として使用する。

【図6C】0.4mg/mlで適用したY4による $Tl^+$ コンダクタンスの時間依存性阻害を示す。 $Tl^+$ アッセイの前に0.5~48時間、 $Tet^+$ 細胞をY4、Y1 mAbまたはPBSで処置し、未処置細胞と比較した。比較のために、時点80での $Tl^+$ コンダクタンスの差を使用する。

【図6D】経時的な蛍光変化としてプロットした、1時間、6時間または36時間処置した $Tet^+$ (実線)および $Tet^-$ (点線)細胞からの代表的な $Tl^+$ トレースを示す。示された全てのデータは、平均±標準偏差、 $n=24$ 、 $*p<0.0001$ である。

【図6E】Y4による $Tl^+$ コンダクタンスの濃度依存性阻害を示す。 $Tet^+$ 細胞は、0.4mg/mlまたは0.04mg/ml  $\mu M$ のY4およびY1で12~48時間、 $Tl^+$ アッセイの前に処置される。示された全てのデータは、平均±標準偏差、 $n=6$ 、 $*p<0.01$ である。

【図6F】Y4によって誘導された、hKCNK9の細胞表面からの内在化を示す。hKCNK9およびmcherryまたはRFP標識EEA1を一過性に発現するCOS-7細胞を、Alexa488複合Y4と共に4~3時間または30分で12時間インキュベートした。hKCNK3およびmcherryを一過性に発現する細胞を比較して分析した。核はDAPIで対比染色される。Alexa488複合Y4とRFP標識EEA1との間の共局在を、Imarisソフトウェアを用いて分析した。統計分析はピアソンの相関係数に基づいている( $r>0.5$ が有意である)。バー:20  $\mu m$ 。

【図6G】Y4が、チャネルの細胞表面からの内在化を誘導することによってhKCNK9を阻害することを示す。

【図7A】hKCNK9のmAb介在性阻害が、細胞/チャネル数の変化ではなく、チャネル活性に起因することを示す。mAbスクリーニングに適合した $Tl^+$ アッセイの概要を示す。

【図7B】Y2、H8、H10、H14、およびH30 mAbの36時間処置における代表的な $Tl^+$ トレースも阻害を示したことを示す。

【図7C】時間0での蛍光は、表示期間のmAbインキュベーションにおいて有意差を示さず、細胞数に劇的な差がないことを示唆していることを示す。

【図8】Y4の経時的実験からの代表的な $Tl^+$ トレースを示す。0.5~24時間処置した代表的な $Tl^+$ トレースおよび $Tet^-$ 細胞は、経時的な蛍光変化としてプロットした。

【図9A】Y4が、電気生理学的記録において有意な急性効果を示さなかったことを示す。hKCNK9に対するY4の急性効果を調べるために使用される電気生理学的パッチクランプ記録プロトコルを示す。

【図9B】Y4の存在下でのhKCNK9チャネルコンダクタンスの定量を示す。M1P1ドメインは、hKCNK9によるpH感知に関与する。2つの異なるpH条件を使用して、M1P1ドメインへのY4結合が細胞外pHに対するhKCNK9の感受性を変化させるかどうかを調べた。

【図10A】Y4が、細胞表面上に発現するhKCNK9チャネルの数を減少させたことを示す。Y-mAbのインキュベーション後に細胞表面に残っているhKCNK9を検査するように設定され

10

20

30

40

50

た染色およびフローサイトメトリー分析の概要を示す。

【図10B】hKCNK9について陽性に染色した細胞の絶対パーセンテージの変化の要約を示す。

【図10C】平均蛍光強度の有意な左シフト（減少）を示したhKCNK9染色を示す代表的なヒストグラムを示す。

【図11】11Aは、Y4のAlexa488との結合は、細胞表面抗原の結合親和性を変化させなかったことを示す。Y4結合（Life technologies）の概略図を示す。11Bは、表示希釈度の未標識Y4またはAlexa488標識Y4のいずれかで染色し、続いてAPC標識抗mIgG二次抗体で染色し、フローサイトメトリー分析したTet誘導性hKCNK9安定細胞株を示す。K9<sup>+</sup>細胞のパーセンテージをmAb用量に対してプロットした。

【図12A】Y4が、KCNK9の高発現を伴うがん細胞の生存を阻害することを示す。hKCNK9またはhKCNK3遺伝子発現レベル（平均より2倍高いまたは低い）に関連する扁平上皮細胞肺がんおよび乳がん患者の生存に関する Kaplan-Meier 曲線を示す。データセットは公表された研究からのものである（非特許文献22；非特許文献23）。患者の遺伝子発現データおよび臨床データを手動で一致させ、有効な遺伝子発現データおよび臨床データの両方を有する患者のみを分析に含めた。\* $p < 0.05$ 、ログランク（マンテル-コックス）検定に基づく。

【図12B】フローサイトメトリーおよびウエスタンブロット分析によって確認されるように、がん細胞株で発現される内因性KCNK9を検出するY4の能力を示す。

【図12C】DNA含有量に基づくK9<sup>+</sup>およびK9<sup>-</sup>BEN細胞の細胞周期分析を示す。G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> : 2N、S : 2N ~ 4N、G<sub>2</sub>/M : 4N。

【図12D】Y4が細胞生存率を低下させ、KCNK9発現がん細胞株の細胞死を増加させることを示す。hKCNK9発現レベル（K9<sup>+</sup>またはK9<sup>-</sup>）、BT-549、MDA-MB-231および410.4細胞によって選別したBEN細胞を、0.4mg/mlのmIgG1またはY4で、10%血清または0.1%血清の存在下で24~72時間処置した。示した全てのデータは、0.1%熱不活性化（HI）血清で、平均±標準偏差、n=6、\* $p < 0.01$ ；0.1%および10%血清、両側スチューデントt検定で\*\* $p < 0.01$ である。

【図12E】Y4が補体を活性化し、in vitroで補体依存性がん細胞傷害性をもたらすことを示す。K9<sup>+</sup>選別BEN細胞およびBT-549細胞を、0.4mg/mlのmIgG1またはY4の存在下で、LDH測定前の3時間、正常または熱不活性化マウス補体で処置する。示された全てのデータは、平均±標準偏差、n=6、\* $p < 0.05$ である。

【図12F】Y4が、KCNK9の高発現を伴うがん細胞の生存を阻害することを示す。

【図13A】ヒトおよびマウスのがん細胞株におけるKCNK9発現を示す。qRT-PCRおよびフローサイトメトリー分析によって確認されたhKCNK9発現を示す。

【図13B】qRT-PCRおよびウエスタンブロット分析によって確認されたmKCNK9発現を示す。濃度測定定量を、プロットの下に示す。66.1、4T1、410.4はマウス転移性乳がん細胞株であり；67および410はマウス非転移性細胞株であり；EpH4はマウスの正常な乳腺細胞株である。

【図14】K9<sup>-</sup>BEN細胞がin vitroで継代した後に安定であったことを示す。BENおよびBT-549細胞を、hKCNK9発現に基づいてFACS選別し、P1（K9<sup>+</sup>）およびP2（K9<sup>-</sup>）細胞を生じさせた。in vitroで3回継代した後、それらを染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

【図15】15Aは、全身性Y4が、免疫不全マウスの皮下腫瘍異種移植片を増殖させるBEN細胞の能力を阻害することを示す。PBSと共に週2回22日間NOD/SCIDマウス（n=10）に腹腔内注射した4mg/kgのmIgG1またはY4で処置されたBEN生着物の増殖曲線を示す、\* $p < 0.01$ 。mAb治療は、初期腫瘍確立中のmAbの効果を観察するために、細胞注射の同じ日に開始される。22日目にNOD/SCIDマウスにおいて形成された腫瘍（点線）を示す代表的な写真。15Bは、mIgG1またはY4で処置したマウス（n=10）の体重を示す。15Cは、mIgG1またはY4処置群におけるKi67<sup>+</sup>細胞の定量およびKi67染色を示す腫瘍断面の代表的な写真を示す。15Dは、mIgG1またはY4処置群における切断型カスパーゼ-3<sup>+</sup>細胞の定量および切断型

10

20

30

40

50

カスパーゼ-3染色を示す腫瘍断面の代表的な写真を示す。示された全てのデータは、平均±標準偏差、 $n=30$ 、 $*p<0.01$ である。15Eは、mIgG1またはY4処置群におけるhKCNK9の定量および腫瘍組織のY4による代表的なウエスタンブロットを示す。示された全てのデータは、平均±標準偏差、 $n=10$ 、 $*p<0.05$ である。15Fは、PBSと共に週2回14日間NOD/SCIDマウス ( $n=10$ ) に腹腔内注射した4mg/kgのmIgG1またはY4で処置されたBEN生着物の増殖曲線を示す、 $*p<0.01$ 。腫瘍が測定可能である8日目の後にmAb処置を開始する。22日目にNOD/SCIDマウスにおいて形成された腫瘍(点線)を示す代表的な写真。15Gは、mIgG1またはY4で処置したマウス ( $n=10$ ) の体重を示す。15Hは、mIgG1またはY4処置群におけるKi67<sup>+</sup>細胞の定量およびKi67染色を示す腫瘍断面の代表的な写真を示す。15Iは、mIgG1またはY4処置群における切断型カスパーゼ-3<sup>+</sup>細胞の定量および切断型カスパーゼ-3染色を示す腫瘍断面の代表的な写真を示す。示された全てのデータは、平均±標準偏差、 $n=30$ 、 $*p<0.01$ である。15Jは、mIgG1またはY4処置群におけるhKCNK9の定量および腫瘍組織のY4による代表的なウエスタンブロットを示す。示された全てのデータは、平均±標準偏差、 $n=10$ 、 $*p<0.05$ である。15Kは、mIgG1またはY4で週2回15日間腹腔内で処置したNSGマウスにおけるLX22患者由来異種移植片(PDX)生着物の増殖曲線を示す。平均±標準偏差、群当たり $n=10$ 、 $*P<0.01$ 、両側スチューデントt検定。15Lは、Ki67<sup>+</sup>細胞の定量および腫瘍断面の代表的な染色を示す。平均±標準偏差、群当たり $n=30$ 、 $*P<0.05$ 、両側スチューデントt検定；スケールバー、1,000  $\mu\text{m}$ 。15Mは、切断型カスパーゼ-3<sup>+</sup>細胞の定量および腫瘍断面の代表的な染色を示す。平均±標準偏差、群当たり $n=30$ ；スケールバー、1,000  $\mu\text{m}$ 。15Nは、hKCNK9の定量および腫瘍組織の代表的なウエスタンブロットを示す。平均±標準偏差、群当たり $n=10$ 、 $*P<0.05$ 、両側スチューデントt検定。

【図16A】Y4が410.4細胞の肺転移を阻害し、免疫応答性マウスにおいて免疫応答を活性化することを示す。週2回PBSと共に腹腔内注射した4mg/kgのmIgG1またはY4で処置したBALB/cByJマウス ( $n=10$ ) における肺転移病巣の数を示す、 $*p<0.01$ 。

【図16B】mIgG1またはY4処理マウス ( $n=5$ ) の肺組織から抽出されたmRNAのqRT-PCRによって確認された免疫マーカーの発現を示す、 $*p<0.05$ 。

【図16C】Y4が補体を活性化し、*in vitro*で補体依存性細胞傷害性を生じることが示す。K9<sup>+</sup>BEN細胞およびBT-549細胞を、LDH測定前に正常または熱不活性化マウス補体のいずれかの存在下で、Y4で2時間処置した。平均±標準偏差、 $n=6$ 、 $*P<0.05$ 、両側スチューデントt検定。

【図16D】Y4がADCCレポーター細胞を活性化することを示す。BEN細胞を、異なる用量のY4およびmIgG1、ならびにFC RIIIを安定に発現する改変マウスJurkat T細胞およびルシフェラーゼ発現を駆動するNFAT応答エレメント(NFAT-RE-luc2)と共にインキュベートした。測定されたルシフェラーゼ活性は、ADCC誘導を示す。平均±標準偏差、 $n=3$ 、 $*P<0.01$ 、両側スチューデントt検定。

【図17A】mAb H23を用いた細胞生存率アッセイを示す。

【図17B】mAb H28を用いた細胞生存率アッセイを示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

特許または出願ファイルは、カラーで作成された少なくとも1つの図面を含む。カラー図面付きの本特許または特許出願公報の写しは、要請および必要な手数料の支払いがあった場合に、庁によって提供される。

【0024】

本開示の主題は、哺乳類のKCNK9カリウムチャネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するおよび/または相互作用する抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体と、それらをコードする核酸分子と、ならびに前記核酸分子を含むベクターとに関する。本開示の主題は、前記抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の調製方法、ならびにそれらを含む医薬組成物を提供する。本開示の主題は、抗体、抗体断片またはそれらの誘導体を含む診断用組成物およびキットをさらに提供する。いくつかの様態では、本開示の主題は、KCNK9発現細胞の存在を評価するための方法を提供する。ある態様では、本

10

20

30

40

50

開示の主題は、細胞におけるKCNK9活性を阻害する方法を提供する。いくつかの態様では、本開示の主題は、KCNK9発現細胞（例えば、がん細胞）の増殖または生存を阻害する方法を提供する。他の態様では、本開示の主題は、腫瘍の増殖および/または転移を阻害するための方法、補体依存性がん細胞傷害性を促進するための方法、ならびにがん（例えば、KCNK9発現がん）の治療に関連する方法における抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の使用を含む。

#### 【0025】

本開示の主題は、本発明の全てではないがいくつかの実施形態が示されている添付の図面を参照して、以下でより詳しく説明される。同様の番号は、全体を通して同様のエレメントを指す。本開示の主題は、多くの異なる形態で具体化されてもよく、本明細書に記載の実施形態に限定されるものと解釈されるべきではない；むしろ、これらの実施形態は、本開示が適用法的要件を満たすように提供される。実際に、本明細書に記載された本開示の主題の多くの修正および他の実施形態は、前述の説明および関連する図面に提示された教示の利益を有する本開示の主題に関係する技術分野の当業者には思い当たるであろう。したがって、本開示の主題は、開示された特定の実施形態に限定されるものではなく、修正および他の実施形態は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されていることを理解されたい。

#### 【0026】

カリウムチャンネルは、細胞内に遍在して存在する。その1つの理由は、チャンネルが細胞の静止電位の調節に関与していることであると考えられており、これはその主要な役割と考えられている。しかしながら、異なる細胞型におけるチャンネルの遍在的存在を考慮すると、それは、「ハウスキーピング」機能などのより一般的な機能に関与している可能性があると考えられている。特に、実験的証拠は、細胞分裂周期におけるそれらの関連を示唆しており（非特許文献24）、発がんに関与する可能性を示唆している。実際、KCNK9は、ヒト乳房腫瘍および肺腫瘍におけるゲノム増幅、mRNAとタンパク質との過剰発現を含む遺伝的証拠に基づくがんに関与している（非特許文献5）。そのようなチャンネルは、様々な細胞型、特に、新生細胞などががん細胞を含む分裂細胞においても発現されるため、カリウムチャンネルに関連する治療および/または診断用途に使用され得るツールを提供することは医学的に重要である。

#### 【0027】

現在、hKCNK9の細胞外ドメインを特異的に認識するモノクローナル抗体は存在しない。同様に、KCNK9の生物学的機能を効果的に阻害するサブタイプ特異的薬物は存在しない。診断および/または治療の適用をさらに広げるために、哺乳動物、特にヒトのKCNK9と、KCNK9に最も密接に関連するK2Pメンバーのうち、KCNK3などの他の二孔ドメインカリウム（K2P）チャンネルサブタイプとを特異的に識別する抗体を有することが望ましい。

#### 【0028】

したがって、本開示の主題の基礎となる技術的問題は、異なる哺乳動物種、特にhKCNK9活性からのKCNK9活性と相互に関連する欠陥および/または疾患のさらなる特異的研究、診断、予防および治療のために使用され得るそのような抗体を提供することであった。

#### 【0029】

前記技術的課題に対する解決策は、特許請求の範囲で特徴付けられた実施形態を含む本開示の主題を提供することによって達成される。

#### 【0030】

したがって、本開示の主題は、KCNK9カリウムチャンネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、K2PファミリーのメンバーであるKCNK1、KCNK2、KCNK3、KCNK4、KCNK5、KCNK6、KCNK7、KCNK8、KCNK10、KCNK11、KCNK12、KCNK13、KCNK14およびKCNK15などの他のカリウムチャンネルには結合しない。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのエピトープは、M1P1ドメインを含む。本明細書で使用される場合、「M1P1ドメイン」は、KCNK9のM1ドメインとP1ドメイン（アミノ

10

20

30

40

50

酸30～88)との間に存在する哺乳類のKCNK9の第1細胞外ドメインを指す。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのエピトープは、ヒトカリウムチャネルサブファミリーKメンバーのKCNK9(hKCNK9)タンパク質(配列番号1)のアミノ酸Glu<sub>30</sub>とIle<sub>88</sub>との間にエピトープを含む。

【0031】

MKRQNVRTLSLIVCTFTYLLVGAAVFDALESDEMREEEKLKAAEIRIKGKYNISSEDIRQLELVILQSEPHRAGVQWKFAGSFYFAITVITTIYGYGHAAPGTDAGKAFCMFYAVLGLPLTLVMFQSLGERMNTFVRYLLKRIKKCCGMRNTDVS MENMVTVGFFSCMGTLICAAAQSQCEEWSFFHAYYYCFITLTTIGFGDYVALQTKGALQKKPLYVAFSFMYLVLGLTVIGAFNLVVLRLFLTMNSEDERRDAEERASLAGNRNSMVIHPEEPRPSRPRYKADVPDLQSVCSCTCYRSQDYGGRSVAPQNSFSAKLAPHYFHSISYKIEEISPTLKNLFPSPISISSPGLHSFTDHQRLMKRRKSV(配列番号1)

10

【0032】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのエピトープは、配列番号1と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一であるエピトープを含む。

【0033】

タンパク質またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」または「同一性」は、特定の比較ウィンドウ内の一致を最大にするために整列された際の、同一である2つのアミノ酸配列におけるアミノ酸残基を指す。したがって、「配列同一性のパーセンテージ」とは、比較ウィンドウ内の2つの最適に整列した配列を比較することによって決定される値を指し、ここで、比較ウィンドウ内のアミノ酸配列の部分は、2つの配列の最適なアライメントのための参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含み得る。パーセンテージは、両方の配列において同一のアミノ酸残基が存在する位置の数を決定し、一致した位置の数を得て、一致した位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で割り、結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることにより計算される。パーセント配列同一性の有用な例には、限定されないが、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%、または50%～100%の任意の整数パーセンテージが含まれる。これらの同一性は、本明細書に記載されている任意のプログラムを使用して決定することができる。

20

【0034】

配列アラインメントおよびパーセント同一性または類似性の計算は、LASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングスイートのMegAlign(商標)プログラム(DNASTAR社、マディソン、ウィスコンシン州)を含むが、これに限定されない相同配列を検出するために設計された様々な比較方法を用いて決定され得る。本出願の文脈内では、配列分析ソフトウェアが分析に使用される場合、他に特定されない限り、分析の結果は、参照されるプログラムの「デフォルト値」に基づくことが理解される。本明細書で使用される場合、「デフォルト値」は、初めに初期化されたときに最初にソフトウェアでロードされる値またはパラメータの任意のセットを意味する。「Clustal Vアラインメント法」は、Clustal Vと命名されたアラインメント方法(非特許文献25;非特許文献2に記載)に対応し、LASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングスイートのMegAlign(商標)プログラム(DNASTAR社、マディソン、ウィスコンシン州)で見られる。

30

40

【0035】

タンパク質またはポリペプチドが同一もしくは類似の機能または活性を有する場合、多くのレベルの配列同一性がタンパク質またはポリペプチドを(例えば他の種から)同定するのに有用であることは、当業者にはよく理解されている。パーセント同一性の有用な例には、限定されないが、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%、または50%～100%の任意の整数パーセンテージが含まれる。実際、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%などの50%～100%の任意

50

の整数のアミノ酸同一性は、本開示の主題を説明するのに有用であり得る。

【0036】

本開示の抗体は、それらの結合特異性および生物活性に関して有利な特性を示す。例えば、本開示の主題は、抗体がヒトKCNK9カリウムチャンネルを認識するだけでなく、マウスKCNK9などの他の哺乳動物種のKCNK9カリウムチャンネルをも認識することができることを示す。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、以下の特徴の1つ以上を示す：

- ・細胞外孔ドメイン内の3次元または直線状エピトープへ結合する / 細胞外ドメインへ結合する；
- ・高い親和性で結合する；および / または
- ・高い特異性で結合する。

10

【0037】

したがって、本開示の抗体は、ヒト組織だけでなく広範囲の実験動物に対してKCNK9の特異的検出に使用できるという利点を有する。したがって、異なる種におけるKCNK9を認識する抗体の産生のための費用は低減され得る。

【0038】

本開示の主題の抗体は、*in vitro*および*in vivo*の両方で、哺乳類のKCNK9カリウムチャンネルの特異的認識を可能にする。

【0039】

いくつかの実施形態では、本開示のKCNK9抗体は、以下の特徴の1つ以上を示す：

- ・K<sup>+</sup>チャンネル介在性電流を阻害する；
- ・イオンチャンネルの内在化およびエンドサイトーシスをもたらす；
- ・イオンチャンネルのサブユニット会合を妨害する；
- ・セカンドメッセンジャーの放出または活性化を減少させる；
- ・細胞増殖を減少または阻害する；
- ・細胞死を増加させるおよび / または
- ・イオンチャンネルホモ / ヘテロ多量体の形成を妨害する。

20

【0040】

いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、KCNK9活性を阻害する。本明細書で使用されるいくつかの文脈において、「KCNK9活性」は、カリウムチャンネルコンダクタンスを指す。本明細書で使用される場合、用語「低減する」または「阻害する」、およびそれらの文法的派生は、生体分子、経路または作用機序を妨害する、部分的に妨害する、干渉する、低下させる、低減させる、または不活性化する薬剤の能力を指す。したがって、当業者であれば、用語「阻害する」は、活性の完全なおよび / または部分的な喪失、例えば活性の少なくとも10%の喪失、いくつかの実施形態では、活性の少なくとも20%、30%、50%、75%、95%、98%、および100%までの喪失を含むことを理解するであろう。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、KCNK9介在性カリウムチャンネルコンダクタンスを10%、20%、30%、40%、50%またはそれ以上も阻害する。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、KCNK9介在性カリウムチャンネルコンダクタンスを60%、70%、80%、90%、95%またはそれ以上も阻害する。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、細胞におけるKCNK9介在性カリウムチャンネルコンダクタンスを完全に阻害する。

30

40

【0041】

いくつかの実施形態では、KCNK9を発現する細胞の表面上の少なくとも1つのエピトープへの抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体の結合は、細胞の表面上のカリウムチャンネルの内在化およびエンドサイトーシスを引き起こす。すなわち、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、いくつかの実施形態において、KCNK9発現細胞におけるKCNK9カリウムチャンネルの内在化を引き起こす能力がある。いくつかの実施形態では、KCNK9発現細胞の表面上の少なくとも1つのエピトープに対する抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体の結合は、KCNK9発現細胞の生存を阻害する。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、腫瘍などの細胞集団におけるKCNK9発現細胞の生存を阻害する。

50

いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、巨大腫瘍（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍など）におけるKCNK9発現細胞の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、または少なくとも75%の生存を阻害する。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、巨大腫瘍（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍など）におけるKCNK9発現細胞の少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の生存を阻害する。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、巨大腫瘍（例えば、乳房腫瘍、肺腫瘍など）における全てのKCNK9発現細胞の生存を阻害する。

#### 【0042】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体を細胞表面に結合したKCNK9発現細胞は、補体系または細胞介在性細胞傷害性などの免疫系機能によって攻撃される。いくつかの実施形態では、KCNK9発現細胞はがん細胞を含む。いくつかの実施形態では、KCNK9発現細胞は乳がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、KCNK9発現細胞は肺がん細胞を含む。いくつかの実施形態では、KCNK9発現細胞は、小細胞肺がんに罹患している被験体から得られる。いくつかの実施形態では、KCNK9発現細胞は、非小細胞肺がんに罹患している被験体から得られる。

#### 【0043】

本開示の抗体は、それらの結合特異性および生物活性に関して、特に、様々な哺乳動物におけるKCNK9カリウムチャネルのエピトープを認識する能力、および細胞増殖を減少させる能力に関して、有利な特性を示す。本開示の抗体の医薬的および/または診断的適用には、限定されないがヒトが含まれるため、本開示の主題は、潜在的な負の免疫原性副作用をヒトにおける使用のために最小化するヒト化抗体を考慮する。用語「ヒト化抗体」は、本明細書で使用される場合、ヒト細胞によって作製されるであろう抗体により酷似するように改変された可変領域および定常領域を有する非ヒト細胞によって作製される抗体を含むことを意図する。例えば、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列中に見出されるアミノ酸を組み込むように非ヒト抗体アミノ酸配列を改変することにより。本開示の主題のヒト化抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列（例えば、*in vitro*でのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発または*in vivo*での体細胞突然変異によって導入された変異）によってコードされていないアミノ酸残基、例えばCDRを含み得る。用語「ヒト化抗体」は、本明細書で使用される場合、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植された抗体も含む。

#### 【0044】

いくつかの実施形態では、KCNK9カリウムチャネルは、ヒトKCNK9カリウムチャネルを含む。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、例えば、非特許文献27、および非特許文献28に最初に説明された十分に確立された技術によって調製することができ、それはマウスミエロマ細胞と、当該技術分野で開発された改変を加えた免疫化哺乳動物由来の脾臓細胞との融合を含む。

#### 【0045】

いくつかの実施形態では、抗体はヒト化モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はY4である。

#### 【0046】

いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、哺乳類のKCNK9カリウムチャネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するおよび/または相互作用し、哺乳類のKCNK3カリウムチャネルには結合しないおよび/または相互作用しない。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、ヒトKCNK9カリウムチャネルの細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに特異的に結合するおよび/または相互作用し、ヒトKCNK3カリウムチャネルには結合しないおよび/または相互作用しない。本明細書で使用される場合、用語「細胞外ドメイン」は、当該技術分野でよく知られている用語であり、細胞外環境に広がるKCNK9カリウムチャネルの

10

20

30

40

50

部分に関する。このドメインは、とりわけ、哺乳類のKCNK9分子のアミノ酸30~88を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、抗体断片またはその誘導体は、Fab断片、F(ab<sub>2</sub>)'-断片、一本鎖抗体、キメラ抗体抗体、CDR移植抗体、二価抗体構築物、ヒト化抗体、ヒト、合成抗体、もしくはその化学的に修飾された誘導体、多重特異性抗体、二重特異性抗体、Fv断片、または他の型の組み換え抗体である。

【0048】

KCNK9の細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに向けられる本開示の抗体の断片または誘導体は、例えば、非特許文献17に記載の方法を使用することによって得ることができる。前記抗体の誘導体がファージ提示技術によって得られる場合、BIAcoreシステムで使用される表面プラズモン共鳴を用いて、KCNK9の細胞外ドメインの少なくとも1つのエピトープに結合するファージ抗体の効率を高めることができる（非特許文献29；非特許文献30）。

10

【0049】

本開示の主題は、核酸分子、ベクターおよび宿主細胞を使用して、突然変異KCNK9抗体を産生することを意図する。抗体を重鎖および/または軽鎖の可変ドメインにおいて突然変異させ、抗体の結合特性を変化させてもよい。例えば、1つ以上のCDR領域に突然変異を行い、KCNK9に対する抗体のKdを増加もしくは減少させるか、または抗体の結合特異性を変化させてもよい。部位特異的突然変異誘発における技術は、当該技術分野でよく知られている。例えば、上記のSambrookらの非特許文献16およびAusubelらの非特許文献15を参照。さらに、変異は、KCNK9抗体の可変領域の生殖系列と比較して変化することが知られているアミノ酸残基で行われる。別の態様では、核酸分子は、1つ以上のフレームワーク領域において突然変異される。フレームワーク領域または定常ドメインに突然変異を行い、KCNK9抗体の半減期を増加させてもよい。例えば、2000年2月24日に公開された特許文献1を参照。フレームワーク領域または定常ドメインにおける突然変異を作製し、抗体の免疫原性を改変させる、別の分子への共有結合もしくは非共有結合部位を提供する、または補体結合などの特性を変化させることができる。突然変異は、単一突然変異抗体中のフレームワーク領域、定常ドメインおよび可変領域のそれぞれにおいてなされ得る。あるいは、突然変異は、単一突然変異抗体中のフレームワーク領域、可変領域または定常ドメインのうちのみでなされ得る。

20

30

【0050】

キメラ抗体の産生は、例えば特許文献2に記載されている。ヒト化抗体の製造方法は、例えば、特許文献3および特許文献4に記載されている。本発明に従って利用されるさらなる抗体源は、いわゆる異種抗体である。ヒト抗体などの異種抗体のマウスにおける産生に関する一般原則は、例えば、特許文献5~特許文献8に記載されている。上述のように、本開示の主題の抗体は、完全な抗体の他に様々な形態で存在し得る；例えば、Fv、FabおよびF(ab)<sub>2</sub>、ならびに一本鎖を含む；例えば、特許文献9を参照。

【0051】

いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片またはそれらの誘導体は、VH鎖およびVL鎖のそれぞれの少なくとも1つのCDRを含む。

40

【0052】

一実施形態では、本開示の主題で使用する抗体は、二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、2つの異なる抗原に対する結合部位を単一抗体ポリペプチド内に有する。抗原結合は、同時または逐次的であり得る。トリオーマおよびハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌することができる細胞株の2つの例である。ハイブリッドハイブリドーマまたはトリオーマによって産生される二重特異性抗体の例は、特許文献10に開示されている。二重特異性抗体は、化学的手段（非特許文献31および非特許文献32）ならびにハイブリドーマ技術（非特許文献33および非特許文献34）によって構築されている。二重特異性抗体は、特許文献11にも記載されている。二重特異性抗体の断片は、

50

特許文献 1 2 に記載されている。

【 0 0 5 3 】

本開示の主題の態様は、抗体、抗体断片またはそれらの誘導体をコードする核酸分子に関する。本明細書で互換的に使用される場合、用語「核酸」、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」は、一本鎖または二重鎖のいずれかの形態の1つより多いヌクレオチドのRNA、DNAまたはRNA/DNAハイブリッド配列を含む。用語「ヌクレオチド」は、一本鎖または二重鎖形態の任意の長さのRNA、DNA、またはRNA/DNAハイブリッド配列を含む分子を説明するための形容詞として本明細書で使用される。用語「ヌクレオチド」は、プリンまたはピリミジン、リボースもしくはデオキシリボース糖部分、およびリン酸基、またはオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチド内のヌクレオチドの場合にはリン酸ジエステル結合を含むより大きな核酸分子中の分子または個々の単位を意味する、個々のヌクレオチドまたは種々のヌクレオチドを指す名詞として本明細書でも使用される。用語「ヌクレオチド」はまた、以下の修飾の少なくとも1つを含む「修飾ヌクレオチド」を包含するために本明細書でも使用される：(a) 代替連結基、(b) プリンの類似形態、(c) ピリミジンの類似形態、または(d) 類似の糖。類似連結基、プリン、ピリミジン、および糖の例については、例えば特許文献 1 3 を参照。本開示の主題のポリヌクレオチド配列は、合成、組み換え、*ex vivo*生成、またはそれらの組み合わせを含む任意の既知方法によって、ならびに当該技術分野で知られている任意の精製方法を利用して調製され得る。

10

【 0 0 5 4 】

本明細書で使用される場合、「発現」は、ポリヌクレオチドがDNA鋳型から(例えば、mRNAまたは他のRNA転写物へ)転写されるプロセスおよび/または転写されたmRNAが、その後ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質へ翻訳されるプロセスを指す。本明細書で使用される用語「ポリペプチド」または「タンパク質」は、ペプチド結合によって共に連結された少なくとも3つのアミノ酸の鎖を含む分子を指す。用語「タンパク質」および「ポリペプチド」は互換的に使用され得る。タンパク質は、組み換え体であっても天然由来であってもよい。

20

【 0 0 5 5 】

抗体、抗体断片またはそれらの誘導体をコードする本開示の核酸分子は、例えば、DNA、cDNA、RNAまたは合成的に産生されたDNAもしくはRNA、または任意のそれらの核酸分子を単独もしくは組み合わせて含む組み換え産生されたキメラ核酸分子であり得る。核酸分子は、遺伝子全体もしくはその実質的な部分に一致する、またはその断片および誘導体に一致するゲノムDNAでもあり得る。ヌクレオチド配列は、天然に存在するヌクレオチド配列に一致してもよく、または単一もしくは複数のヌクレオチド置換、欠失または付加を含み得る。いくつかの実施形態では、核酸分子はcDNA分子である。

30

【 0 0 5 6 】

本開示の主題は、本明細書に記載の核酸分子を含むベクターにも関する。前記ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウイルスまたはレトロウイルスベクターであり得る。レトロウイルスベクターは、複製可能または複製欠損であり得る。後者の場合、ウイルス増殖は、一般に、相補的な宿主細胞においてのみ起こるのである。

40

【 0 0 5 7 】

本明細書に記載の核酸分子は、宿主細胞における増殖のための選択マーカを含むベクターに連結され得る。一般に、プラスミドベクターは、リン酸カルシウム沈殿物もしくは塩化ルビジウム沈殿物などの沈殿物中に、または荷電した脂質との複合体中に、またはフラレンなどの炭素系クラスター中に導入される。ベクターがウイルスである場合、それは、宿主細胞に適用する前に適切なパッケージング細胞株を用いて*in vitro*でパッケージングされ得る。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態では、ベクターは、原核生物および/または真核生物の宿主細胞における転写および必要に応じて発現を可能にする1つ以上の制御配列に核酸分子が作動的

50

に連結されている発現ベクターである。前記核酸分子の発現は、好ましくは翻訳可能なmRNAへの核酸分子の転写を含む。真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞における発現を確実にする調節エレメントは、当業者にはよく知られている。それらは、通常、転写の開始を確実にする調節配列、ならびに必要に応じて転写の終結および転写物の安定化を確実にするポリAシグナルを含む。さらなる調節エレメントは、転写エンハンサーおよび翻訳エンハンサーを含み得る。原核宿主細胞における発現を可能にする可能性のある調節エレメントは、例えば、大腸菌のlac、trpまたはtacプロモーターを含み、真核宿主細胞における発現を可能にする調節エレメントの例は、酵母におけるAOX1もしくはGAL1プロモーター、または哺乳動物およびその他の動物細胞におけるCMV-、SV40-、RSV-プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMV-エンハンサー、SV40-エンハンサーもしくはグロビンイントロンである。転写の開始に関与するエレメントに加えて、そのような調節エレメントは、ポリヌクレオチドの下流に、SV40-ポリA部位またはtk-ポリA部位などの転写終結シグナルも含み得る。この文脈では、Okayama-Berg cDNA発現ベクター-pcDV1（Pharmacia）、pCDM8、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3（In-vitro gene）、pSPORT1（GIBCO BRL）などの適切な発現ベクターが当該技術分野で知られている。好ましくは、前記ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子導入もしくは標的化ベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシパピローマウイルスなどのウイルス由来の発現ベクターを、本開示の主題のポリヌクレオチドまたはベクターの標的細胞集団への送達に使用してもよい。当業者によく知られている方法を用いて、組み換えウイルスベクターを構築することができる；例えば、非特許文献16および非特許文献15に記載の技術を参照。あるいは、本開示の主題の核酸分子をリボソームに再構成し、標的細胞に送達することができる。

10

20

#### 【0059】

本開示の主題は、さらに、本開示の主題のベクターを含む宿主細胞に関する。前記宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。宿主細胞中に存在する本開示の主題のポリヌクレオチドまたはベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得るか、または染色体外で維持され得る。この点でも、本開示の主題の核酸分子を、「遺伝子ターゲティング」および/もしくは「遺伝子置換」のために、変異遺伝子を復元するために、または相同組み換えを介して変異遺伝子を作製するために使用することができることが理解されるべきである；例えば、非特許文献35；非特許文献36を参照。

30

#### 【0060】

宿主細胞は、細菌、昆虫、真菌、植物、動物、哺乳動物または、好ましくはヒト細胞などの任意の原核細胞または真核細胞であり得る。好ましい真菌細胞は、例えばサッカロミセス属のもの、特にS.セレヴィシ工種のものである。用語「原核生物」は、本開示の主題の変異ポリペプチドの発現のためのポリヌクレオチドで形質転換またはトランスフェクトされ得る全ての細菌を含むことを意味する。原核生物宿主細胞は、グラム陰性細菌ならびにグラム陽性細菌、例えば大腸菌、ネズミチフス菌、セラチア・マルセッセンズおよび枯草菌を含み得る。当業者に一般的に知られている任意の技術を用いて宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトするために、本開示の主題の変異ポリペプチドの変異型をコードするポリヌクレオチドを使用することができる。融合されたまたは作動的に連結された遺伝子を調製し、それらを細菌または動物細胞で発現させる方法は、当該技術分野でよく知られている（非特許文献16）。本明細書に記載の遺伝子構築物および方法は、本開示の主題の変異抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の、例えば原核宿主細胞における発現に利用され得る。一般に、挿入された核酸分子の効率的な転写を促進するプロモーター配列を含む発現ベクターは、宿主細胞に関連して使用される。発現ベクターは、典型的には、複製起点、プロモーター、およびターミネーター、ならびに形質転換細胞の表現型選択を提供することができる特定の遺伝子を含む。形質転換された原核生物宿主細胞を、発酵槽中で増殖させ、当該技術分野で知られている技術に従って培養し、最適な細胞増殖を達成することができる。次いで、本開示の主題の抗体、抗体断片またはそれらの誘導体を、増殖培地、細胞溶解物、または細胞膜画分から単離することができる。微生物によるまたは別

40

50

の方法で発現された本開示の主題の抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の単離および精製は、例えば、分取クロマトグラフィー分離など、およびモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の使用を含むような免疫学的分離などの任意の従来手段によるものであってもよい。

【0061】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、細菌、真菌、植物、両生類または動物細胞である。動物細胞には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、サル腎臓細胞（COS）、3T3細胞、NSO細胞、および多くの他の細胞株が含まれるが、これらに限定されない。

【0062】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は昆虫細胞である。昆虫細胞には、SF9細胞株の細胞が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、宿主細胞はヒト細胞またはヒト細胞株である。前記ヒト細胞には、ヒト胎児腎臓細胞（HEK293, 293T, 293自由型）が含まれるが、これらに限定されない。さらに、前記ヒト細胞株には、HeLa細胞、ヒト肝細胞癌細胞（例えば、Hep G2）、A549細胞が含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

特に好ましい細胞株は、どの細胞株が高い発現レベル（例えば、KCNK9発現細胞）を有するかを決定することによって選択される。

【0064】

異なる細胞株またはトランスジェニック動物によって発現される抗体は、異なるグリコシル化状態を有する可能性が高い。しかし、本明細書で提供される核酸分子によってコードされるか、または本明細書で提供されるアミノ酸配列を含む全ての抗体は、抗体のグリコシル化状態にかかわらず、本開示の主題の一部である。

【0065】

本開示の主題は、本開示の主題の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を産生するために使用され得る本開示の主題の1つ以上の核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物も提供する。抗体は、ヤギ、ウシ、ウマ、ブタ、ラット、マウス、ウサギ、ハムスターもしくは他の哺乳動物の組織または乳、血液もしくは尿などの体液で産生するおよびそれらから回収することができる。例えば、特許文献14～特許文献17を参照。上述のように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む非ヒトトランスジェニック動物は、KCNK9またはその一部（例えば、MIP1ドメイン）で免疫化することによって産生することができる。

【0066】

本開示の主題の様態は、抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の調製方法であって、本開示の主題の宿主細胞を、前記抗体、抗体断片またはそれらの誘導体の合成を可能にする条件下で培養すること、および前記抗体、抗体断片またはそれらの誘導体を前記培養物から回収することを含む方法に関する。

【0067】

形質転換された宿主細胞を、発酵槽中で増殖させ、当該技術分野で知られている技術に従って培養し、最適な細胞増殖を達成することができる。いったん発現すると、全抗体、それらの二量体、個々の軽鎖および重鎖、または本開示の主題の他の免疫グロブリン形態を、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該技術分野の標準的な手順に従って精製することができる；非特許文献37を参照。本開示の主題の抗体またはその対応する免疫グロブリン鎖（単数または複数）を、その後、増殖培地、細胞溶解物、または細胞膜画分から単離することができる。例えば、微生物により発現される本開示の主題の抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、例えば分取クロマトグラフィー分離など、および例えば本開示の主題の抗体の定常領域に対して向けられるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の使用を含むような免疫学的分離などの任意の従来手段によるものであってもよい。

【0068】

例えば薬物ターゲティングおよびイメージング用途のために、本開示の主題の抗体が他

10

20

30

40

50

の部分に結合され得ることは、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、少なくとも1つの薬剤に結合される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの薬剤は、治療薬剤および標識薬剤からなる群より選択される。そのような結合は、抗体もしくは抗原の発現後に化学的に結合部位に行うことができ、または複合産物を本開示の主題の抗体または抗原にDNAレベルで組み込むことができる。次に、DNAを適切な宿主系で発現させ、発現されたタンパク質を収集し、必要に応じて復元する。

**【0069】**

いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片またはそれらの誘導体は、カリケアマイシン、アウリスタチンEまたはモノメチルアウリスタチンE (MMAE) などのエフェクター、放射性同位元素またはゲルダナマイシンおよびメイタンシンなどの毒性化学療法剤に結合される。いくつかの実施形態では、抗体複合体は、細胞、例えばKCNK9を発現するがん細胞を排除のために標的化するのに有用である。さらに、本開示の主題の抗体/抗体断片の放射性同位体への連結は、例えば、腫瘍治療に利益をもたらす。化学療法および他の従来形態のがん治療とは異なり、放射性免疫療法または放射性同位体-抗体併用の投与は、周囲の正常で健康な組織への最小の損傷で、がん細胞を直接標的とする。本開示の主題における使用が意図される放射性同位体には、例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ が含まれる。

10

**【0070】**

本開示の主題の様態は、本明細書に記載の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を、がんの治療用の少なくとも1つの薬剤に結合させることを伴う。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの薬剤は抗新生物剤である。いくつかの実施形態では、本発明の主題の抗体は、少なくとも1つの薬剤、毒性化学療法剤、例えば、ゲルダナマイシン (非特許文献38) およびメイタンシン、例えばメイタンシノイド薬、DM1 (非特許文献39) アウリスタチン-E (非特許文献40)、およびモノメチルアウリスタチンE (非特許文献41) と結合した場合、がんを治療するために利用することができる。いくつかの実施形態では、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、リンカーを介して少なくとも1つの薬剤に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーおよび切断不能なリンカーからなる群より選択される。酸性もしくは還元性の条件下で、または特定のプロテアーゼへのばく露時に薬物を放出する異なるリンカーが、この技術で使用される。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーはペプチドリinkerである。いくつかの実施形態では、ペプチドリinkerは、パリン-シトルリンペプチドリinkerを含む。いくつかの実施形態では、切断不能なリンカーはチオエーテルリンカーである。本開示の主題の抗体は、当該技術分野で説明されるように結合され得る。

20

30

**【0071】**

いくつかの態様では、本開示の主題は、本開示の主題の抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体、核酸分子、ベクター、宿主細胞、または本開示の主題の方法によって得られる抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体を含む医薬組成物を提供する。

**【0072】**

本明細書で使用される用語「組成物」は、少なくとも1つの本発明の化合物を含む。好ましくは、そのような組成物は、医薬組成物または診断用組成物である。

40

**【0073】**

組成物は、固体、液体または気体の形態であってもよく、とりわけ、粉末 (単数もしくは複数)、錠剤 (単数もしくは複数)、液剤 (単数もしくは複数) またはエアロゾル剤 (単数もしくは複数) の形態であってもよい。前記組成物は、本開示の主題の少なくとも2つ、好ましくは3つ、より好ましくは4つ、最も好ましくは5つの化合物または前記化合物をコードする核酸分子を含み得る。前記組成物は、本開示の主題の方法によって得られる最適化された抗体、抗体断片またはそれらの誘導体も含み得る。

**【0074】**

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、場合により薬学的に許容される担体および /

50

または希釈剤を含む。本開示の医薬組成物は、過剰なKCNK9発現レベルおよび/または活性（例えば、KCNK9を発現するまたは過剰発現する疾患（例えば、KCNK9発現がん））に関連する障害の治療に使用され得る。

【0075】

本開示の主題の発明は、KCNK9の発現または過剰発現に関連する疾患/障害の治療に使用される本開示の主題の化合物を含む医薬組成物を提供する。

【0076】

適切な医薬担体、賦形剤および/または希釈剤の例は、当該技術分野においてよく知られており、リン酸緩衝生理食塩水、水、油/水エマルションなどのエマルション、様々なタイプの湿潤剤、滅菌溶液などを含む。そのような担体を含む組成物は、よく知られている従来方法によって製剤化することができる。これらの医薬組成物は、適切な用量で被験体に投与することができる。適切な組成物の投与は、種々の方法、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所、皮内、鼻腔内または気管支内投与によって行うことができる。本開示の主題の組成物は、例えば、脳のような外部または内部の標的部位への微粒子銃送達によって、標的部位に直接投与されてもよい。投薬計画は主治医および臨床因子によって決定される。医学分野においてよく知られているように、任意の一人の患者用の投薬量は、患者の体格、体表面積、年齢、投与される特定の化合物、性別、投与の時間および経路、一般的な健康状態、ならびに同時に投与される他の薬物を含む多くの要因に依存する。タンパク性の薬学的に活性な物質は、用量当たり $1\mu\text{g} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 体重の間の量で存在し得る；しかしながら、上記の要因を特に考慮して、この例示的な範囲より下または上の用量が想定される。投薬計画が連続注入である場合、それは、体重1キログラム当たり1分当たり $1\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ の範囲内であるべきである。

10

20

【0077】

進行状況は、定期的な評価によって観察することができる。本発明の主題の組成物は、局所的にまたは全身的に投与され得る。

【0078】

非経口投与用の製剤には、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液およびエマルションが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール/水溶液、エマルションまたは懸濁液が含まれ、生理食塩水および緩衝媒体が挙げられる。非経口溶媒には、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンガーまたは固定油が含まれる。静脈内溶媒には、流体および栄養補充剤、電解質補充剤（リンガーデキストロースがベースのものなど）などが含まれる。防腐剤および他の添加剤、例えば抗菌剤、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガスなども存在し得る。さらに、本開示の主題の医薬組成物は、医薬組成物の意図される用途に応じて、さらなる薬剤を含むことができる。医薬組成物が、例えば、医薬組成物は、例えば、付加的な抗新生物剤、小分子阻害剤、抗腫瘍剤または化学療法剤などのさらなる薬剤を含むことが特に好ましい。

30

【0079】

本開示の主題の様態は、少なくとも1つの抗新生物剤と組み合わせた抗体、抗体断片またはそれらの誘導体を含む医薬組成物にも関する。前記組み合わせは、例えば、異常な細胞増殖を阻害するのに有効である。多くの抗新生物剤が当該技術分野で知られている。一実施形態では、抗新生物剤は、限定されるものではないが、抗体または免疫調節タンパク質を含む治療用タンパク質の群から選択される。別の実施形態では、抗新生物剤は、有糸分裂阻害剤、キナーゼ阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、インターカレーション抗生物質、増殖因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、抗生存剤、生物学的応答修飾物質、抗ホルモン剤、例えば抗アンドロゲン剤、および抗血管新生剤からなる小分子阻害剤または化学療法剤の群より選択される。

40

【0080】

本開示の主題の様態は、少なくとも1つの放射線治療剤と組み合わせた抗体、抗体断片

50

またはそれらの誘導体を含む医薬組成物にも関する。

【0081】

本開示の主題の様態は、少なくとも1つの免疫療法剤と組み合わせた抗体、抗体断片またはそれらの誘導体を含む医薬組成物にも関する。

【0082】

本開示の主題の様態は、少なくとも1つの光増感剤と組み合わせた抗体、抗体断片またはそれらの誘導体を含む医薬組成物にも関する。

【0083】

いくつかの実施形態では、組み合わせて投与される場合、2つ以上の薬剤は、相乗効果を有し得る。本明細書中で使用される場合、「相乗効果」または「相乗的組み合わせ」または「相乗的組成物」などの「相乗効果」、「相乗的」、「相乗的に」という用語およびそれらの派生は、「相乗的組成物」は、薬剤と少なくとも1つのさらなる治療薬剤との組み合わせの生物活性が、個別に投与された場合のそれぞれの薬剤の生物活性の合計よりも大きい状況を指す。

10

【0084】

相乗効果は、「相乗指数(SI)」を単位として表すことができ、これは、一般に、非特許文献42に記載されている方法によって、以下によって決定される比率から決定することができる：

$$Q_a Q_A + Q_b Q_B = \text{相乗指数 (SI)}$$

式中：

20

$Q_A$  は、単独で作用し、成分Aに関して終点を生じた成分Aの濃度である；

$Q_a$  は、混合物中において、終点を生じた成分Aの濃度である；

$Q_B$  は、単独で作用し、成分Bに関して終点を生じた成分Bの濃度である；および

$Q_b$  は、混合物中において、終点を生じた成分Bの濃度である。

【0085】

一般に、 $Q_a/Q_A$  と  $Q_b/Q_B$  との合計が1より大きい場合、拮抗作用が示される。合計が1に等しい場合、相加性が示される。合計が1未満である場合、相乗効果を実証される。SIが低いほど、その特定の混合物によって示される相乗効果が大きくなる。したがって、「相乗的組み合わせ」は、単独で使用された場合の個々の成分の観察された活性に基づいて予想される活性よりも高い活性を有する。さらに、成分の「相乗的に有効な量」は、例えば、組成物中に存在する別の治療薬剤において相乗効果を引き出すのに必要な成分の量を指す。

30

【0086】

いくつかの実施形態では、本開示の主題の医薬組成物は、獣医用途のために使用することもできる。

【0087】

いくつかの様態では、本開示の主題は、本開示の主題の抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体、核酸分子、ベクター、宿主細胞、または過剰および/もしくは異常なKCNK9発現ならびに/または活性に関連する障害の予防または治療用の医薬組成物の、本開示の主題の調製方法によって得られる抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体の使用に関する。

40

【0088】

いくつかの様態では、本開示の主題は、本開示の主題の抗体、抗体断片もしくはそれらの誘導体、本開示の主題の核酸分子、ベクター、宿主細胞、または本開示の主題の方法によって得られる抗体、抗体断片もしくは誘導体、および場合により薬学的に許容される担体を含む診断用組成物を提供する。

【0089】

本開示の主題の診断用組成物は、異なる細胞、組織または試料における哺乳類のKCNK9カリウムチャネルの望ましくない発現または過剰発現の検出に有用であり、試料を本開示の主題の抗体と接触させ、試料中のKCNK9の存在を検出することを含む。したがって、本発明の主題の診断用組成物は、KCNK9関連疾患の発症または疾患状態を評価するために使

50

用され得る。本明細書で使用される場合、「KCNK9関連疾患」は、KCNK9の発現および/または活性の異常なレベルと直接的または間接的に相関する任意の疾患、状態または障害を指す。さらに、KCNK9を発現するがん細胞などの悪性細胞は、本発明の主題の抗体、抗体断片またはそれらの誘導体で標的化することができる。したがって、本開示の主題の抗体に結合した細胞は、補体系などの免疫系機能によって、または細胞介在性細胞傷害性によって攻撃され、それによりがん細胞の数が減少し得る、または根絶し得る。これらの考察は、転移および再発腫瘍の診断にも同様に当てはまる。

#### 【0090】

本開示の主題の別の態様では、本明細書に記載の抗体、抗体断片またはそれらの誘導体は、標識薬剤または標識基に結合される。そのような抗体は、診断用途に適している。本明細書中で使用される場合、用語「標識基」は、例えば、マークされたアビジンによって検出され得る放射標識されたアミノ酸またはビオチン部分などの検出可能なマーカーを指す。抗体などのポリペプチドおよび糖タンパク質を標識するための様々な方法は、当該技術分野において知られており、本開示の主題を実施する際に使用され得る。適切な標識基の例には、以下が含まれるが、これらに限定されない：放射性同位元素または放射性核種（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、蛍光基（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素基（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光基、ビオチニル基、または二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）。

10

20

#### 【0091】

特定の態様では、標識基を様々な長さのスペーサーアームによって結合し、潜在的な立体障害を低減することが望ましい場合がある。

#### 【0092】

いくつかの態様では、本開示の主題は、KCNK9発現細胞の存在を評価する方法であって、KCNK9をその表面上に発現することが疑われる細胞または組織を、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物と接触させることを含む方法を提供する。

#### 【0093】

ある態様では、本開示の主題は、KCNK9活性を阻害する方法であって、KCNK9をその表面上に発現する細胞または組織を、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物と接触させることを含む方法を提供する。

30

#### 【0094】

他の態様では、本開示の主題は、KCNK9発現がん細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、KCNK9をその表面上に発現するがん細胞を、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物と接触させることを含む方法を提供する。

#### 【0095】

いくつかの実施形態では、接触は、*in vitro*で細胞または組織において行われる。いくつかの実施形態では、細胞または組織はヒト細胞または組織を含む。いくつかの実施形態では、接触は、*in vivo*で被験体において行われる。

40

#### 【0096】

用語「被験体」および「患者」は、本明細書では互換的に使用される。本明細書に記載の方法は、用語「被験体」に含まれることが意図される全ての脊椎動物種に対して有効であると理解されるべきであるが、多くの実施形態において本開示の方法によって治療される被験体は、望ましくはヒト被験体である。したがって、「被験体」は、既存の状態または疾患の治療などの医療目的のためのヒト被験体、または状態もしくは疾患の発症を予防するための予防的処置、または医療、獣医学的目的、もしくは開発目的のための動物被験体を含むことができる。適切な動物被験体としては、限定されないが、霊長類、例えばヒ

50

ト、サル、類人猿など；ウシ、例えば畜牛、雄牛など；ヒツジ、例えば羊など；ヤギ、例えば山羊など；ブタ、例えばブタ、豚など；ウマ、例えば馬、ロバ、シマウマなど；野猫および家猫を含むネコ科動物；犬を含むイヌ科動物；兎、野兎などを含むウサギ目動物；ならびにマウス、ラットなどのげっ歯類を含む哺乳類が挙げられる。動物は、トランスジェニック動物であってもよい。いくつかの実施形態では、被験体は、胎児、新生児、乳児、若年者および成人被験体を含むが、これらに限定されないヒトである。さらに、「被験体」は、状態または疾患に罹患しているか、または罹患している疑いがある患者を含むことができる。

【0097】

いくつかの態様では、本開示の主題は、被験体における腫瘍の増殖および/または転移を阻害する方法であって、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物を、被験体における腫瘍の増殖および/または転移を阻害するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、被験体における乳房腫瘍の増殖および/または転移を阻害する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、被験体における乳房腫瘍の転移を阻害する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、被験体における肺腫瘍の増殖および/または転移を阻害する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体は、被験体における肺腫瘍の転移を阻害する。

10

【0098】

いくつかの態様では、本開示の主題は、被験体における補体依存性がん細胞傷害性を促進する方法であって、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物を、被験体における補体依存性がん細胞傷害性を促進するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。

20

【0099】

いくつかの実施形態では、本開示の主題は、治療を必要とする被験体におけるKCNK9発現がんの治療方法であって、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物を、被験体におけるKCNK9発現がんを治療するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。

30

【0100】

いくつかの態様では、本開示の主題は、哺乳動物におけるKCNK9の発現および/または活性の異常なレベルと直接的または間接的に関連する疾患を治療する方法であって、抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を、疾患を治療するのに有効な量で哺乳動物に投与することを含む方法を提供する。

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示の主題は、過剰なKCNK9発現および/または活性に関連する障害の治療方法であって、本開示の主題の抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、または本開示の主題の医薬組成物を、過剰なKCNK9発現に関連する障害を治療するのに有効な量で被験体に投与することを含む方法を提供する。

40

【0102】

本開示の主題は、過剰なKCNK9発現および/または活性が関与する任意の疾患、状態または障害、すなわち、KCNK9の発現および/または活性の異常なレベルと直接的または間接的に関連する疾患の治療を意図する。一般に、過剰なKCNK9発現および/または活性に関連する障害には、心臓血管疾患、内分泌疾患、胃腸疾患、がん、炎症、血液疾患、神経疾患、泌尿器疾患および呼吸器疾患が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がんは乳がんである。いくつかの実施形態では、がんは小細胞肺癌である。いくつかの実施形態では、がんは非小細胞肺癌である。

【0103】

KCNK9は、様々なヒト組織において発現される（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる特許文献18を参照）。

50

## 【0104】

## 神経学的障害

神経学的障害には、中枢神経系の障害（CNS障害）ならびに末梢神経系の障害（PNS障害）が含まれる。

## 【0105】

CNS障害には、限定されないが、脳損傷、脳血管疾患およびそれらの結果、パーキンソン病、大脳皮質基底核変性、運動ニューロン疾患、ALSを含む痴呆、多発性硬化症、外傷性脳損傷、脳卒中、脳卒中後遺症、外傷後脳損傷、ならびに小血管脳血管疾患が含まれる。認知症、例えばアルツハイマー病、血管性認知症、レビー小体認知症、第17染色体に関連する前頭側頭型認知症およびパーキンソニズム、ピック病を含む前頭側頭型認知症、進行性核麻痺、大脳皮質基底核変性症、ハンチントン病、視床変性、クロイツフェルト・ヤコブ認知症、HTV認知症、認知症を伴う統合失調症、ならびにコルサコフ精神病なども、定義の意義の範囲内でCNS障害と考えられている。

10

## 【0106】

同様に、認知関連障害、例えば軽度認知障害、加齢性記憶障害、加齢性認知低下、血管認知障害、注意欠陥障害、注意欠陥多動性障害、および学習障害児の記憶障害などもCNS障害と考えられている。

## 【0107】

疼痛も、この定義の意義の範囲内で、CNS障害と考えられている。疼痛は、CNS障害、例えば多発性硬化症、脊髄損傷、坐骨神経痛、後背手術症候群、外傷性脳損傷、てんかん、パーキンソン病、脳卒中後遺症ならびに脳および脊髄における血管病変（例えば、梗塞、出血、血管奇形）などに関連し得る。非中枢性神経障害性疼痛には、乳房切除術後疼痛、幻感触、反射性交感神経性ジストロフィー（RSD）、三叉神経痛神経根障害、術後疼痛、HIV/エイズ関連疼痛、がん性疼痛、代謝性神経障害（例えば、糖尿病性神経障害、結合組織疾患に続発する脈管炎神経障害）、例えば、肺癌、白血病、もしくはリンパ腫、または前立腺、結腸もしくは胃の癌、三叉神経痛、頭蓋神経痛およびヘルペス後神経痛に関連する腫瘍随伴性多発性神経障害に関連するものが含まれる。末梢神経障害、中枢痛（すなわち、脳虚血に起因する）に関連する痛み、および様々な慢性疼痛、すなわち、腰痛、背痛（腰痛）、炎症性および/またはリウマチ痛。頭痛（例えば、前兆を伴う片頭痛、前兆を伴わない片頭痛、および他の片頭痛障害）、一過性および慢性緊張型頭痛、緊張型様頭痛、群発性頭痛、ならびに慢性発作性片側頭痛も、CNS障害である。

20

30

## 【0108】

膵炎、腸管膀胱炎、月経困難症、過敏性腸症候群、クローン病、胆石疝痛、尿路疝痛、心筋梗塞ならびに骨盤腔の疼痛症候群、例えば外陰痛、睾丸痛、尿道症候群および前立腺痛などの内臓痛も、CNS障害である。

## 【0109】

また、神経系の障害であると考えられるものは、急性疼痛、例えば術後疼痛および外傷後疼痛である。

## 【0110】

ヒトKCNK9は、以下の脳組織において高度に発現される：胎児脳、脳、アルツハイマー脳、小脳、小脳（右）、小脳（左）、大脳皮質、アルツハイマー大脳皮質、前頭葉、アルツハイマー脳前頭葉、後頭葉、頭頂葉、側頭葉、中心前回、中枢後回、扁桃小脳、小脳虫部、橋、脳髄膜、大脳脚、海馬、視床、後根神経節、脊髄、網膜。脳組織における発現、ならびに特に罹患組織アルツハイマー脳および健常組織脳間、罹患組織アルツハイマー大脳皮質および健常組織大脳皮質間、罹患組織アルツハイマー脳前頭葉および健常組織前頭葉間の差次的発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが神経系疾患を診断するために利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、神経系疾患を治療するために調節され得る。

40

## 【0111】

## 心臓血管疾患

心不全は、心臓機能の異常が、代謝組織の必要性に見合った速度で血液を送り出す心臓

50

の不全の原因である病態生理学的状態として定義される。これには、高拍出量および低拍出量、急性および慢性、右側または左側、収縮期または拡張期など、根底にある原因とは無関係に、全ての形態の心力不全が含まれる。

【0112】

心筋梗塞(MI)は、一般に、動脈硬化によってすでに狭窄された冠状動脈の血栓閉塞に続発する冠動脈血流の急激な低下によって引き起こされる。MIの急性治療および合併症の予防と同様に、MI予防(原発および二次予防)が含まれる。

【0113】

虚血性疾患は、冠状動脈流が制限され、酸素の心筋需要を満たすには不十分な灌流をもたらす状態である。この疾患群には、安定狭心症、不安定狭心症および無症候性虚血が含まれる。

10

【0114】

不整脈には、全ての形態の心房性および心室性頻脈性不整脈、心房頻拍、心房粗動、心房細動、房室リエントリー性頻脈、早期興奮症候群、心室頻拍、心室粗動、心室細動、ならびに徐脈型不整脈が含まれる。

【0115】

高血圧性血管疾患には、原発性およびあらゆる種類の二次性動脈性高血圧、腎性、内分泌性、神経原性、その他が含まれる。この遺伝子は、高血圧症の治療のための、ならびに心臓血管疾患に起因する全ての合併症の予防のための薬物標的として使用され得る。

【0116】

末梢血管疾患は、動脈および/または静脈流が減少し、血液供給および組織酸素要求量の不均衡をもたらす血管疾患と定義される。それには、慢性末梢動脈閉塞症(PAOD)、急性動脈血栓症および塞栓症、炎症性血管障害、レイノー現象および静脈疾患が含まれる。

20

【0117】

アテローム性動脈硬化症は、血管壁が再形成され、血管の内腔を損なう心臓血管疾患である。アテローム性動脈硬化性再形成過程は、血管壁の内膜における細胞、平滑筋細胞と単球/マクロファージ炎症細胞との両方の蓄積を含む。これらの細胞は、おそらく循環から脂質を取り込み、成熟したアテローム性動脈硬化病変を形成する。

【0118】

これらの病変の形成は、成人の人生で数十年にわたって起こる慢性過程であるが、動脈硬化に関連する罹患率の大部分は、病変が破裂し、動脈を急速に閉塞する血栓形成性破片が放出されたときに起こる。そのような急性事象が冠状動脈で起こると、心筋梗塞が起こり、最悪の場合には死に至ることがある。

30

【0119】

アテローム性動脈硬化病変の形成は、遊走、脂質蓄積、炎症細胞の動員、血管平滑筋細胞の増殖、および細胞外マトリックス沈着などの5つの重複段階で起こると考えられ得る。これらの過程の各々は、アテローム性動脈硬化症のヒトおよび動物モデルにおいて起こることが示され得るが、病変の病理および臨床的意義に対するそれぞれの相対的な寄与は不明である。

40

【0120】

したがって、アテローム性動脈硬化症などの心臓血管疾患、および冠状動脈疾患に関連するその他の状態を治療するための治療方法および薬剤の必要性が存在する。

【0121】

心臓血管疾患には、限定されないが、鬱血性心不全、心筋梗塞、心臓の虚血性疾患、あらゆる種類の心房性および心室性不整脈、高血圧性血管疾患、末梢血管疾患、およびアテローム性動脈硬化症などの心臓ならびに血管系の障害が含まれる。

【0122】

血流中の脂質、特にコレステロールの過剰に高いまたは低いレベルは、長期的な問題を引き起こす可能性がある。アテローム性動脈硬化症および冠状動脈または頸動脈疾患を発

50

症するリスク（したがって、心臓発作または脳卒中を起こすリスク）は、総コレステロールレベルの増加と共に増加する。とはいえ、極めて低いコレステロール値は健康でない可能性もある。脂質代謝の障害の例は、高脂血症（異常に高いレベルの血中脂肪（コレステロール、トリグリセリド、またはその両方）であり、高脂血症の家族歴により引き起こされる）、肥満、高脂肪食、運動不足、中程度～高いアルコール消費、たばこ喫煙、管理不良糖尿病、および甲状腺機能亢進症）、遺伝性高脂血症（I型高リポ蛋白血症（家族性高カイロミクロン血症）、II型高リポ蛋白血症（家族性高コレステロール血症）、III型高リポ蛋白血症、IV型高リポ蛋白血症、またはV型高リポ蛋白血症）、低リポタンパク質血症、脂質代謝異常（脂肪を代謝する酵素の異常により引き起こされる）、ゴーシェ病、ニーマン・ピック病、ファブリー病、ウォルマン病、脳腱黄色腫症、シトステロール血症、レフサム病、またはテイ・サックス病である。

10

## 【0123】

腎障害は高血圧または低血圧につながる可能性がある。高血圧につながり得る腎障害の例は、腎動脈狭窄症、腎盂腎炎、糸球体腎炎、腎臓腫瘍、多発性腎臓病、腎臓への損傷、または腎臓に影響を与える放射線療法である。

## 【0124】

多尿は低血圧につながる可能性がある。

## 【0125】

ヒトKCNK9は、以下の心臓血管関連組織において高度に発現される：心膜、心房（左）、心室（左）、大動脈、動脈、静脈、副腎、血小板、腎臓、腎腫瘍。上記組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが心臓血管疾患の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、心臓血管疾患を治療するために調節され得る。

20

## 【0126】

ヒトKCNK9は、腎組織：腎臓、腎腫瘍において高度に発現される。腎組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが心臓血管障害としての血圧障害の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、限定されないが、高血圧または低血圧としての血圧障害を治療するために調節され得る。

## 【0127】

ヒトKCNK9は、副腎において高度に発現される。副腎組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが心臓血管障害としての血圧障害の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、高血圧または低血圧としての血圧障害を治療するために調節され得る。

30

## 【0128】

## 血液疾患

血液疾患は、血液の全ての成分の生成または分解に関する器官および組織の疾患だけでなく、血液およびその全成分の疾患を含む。

## 【0129】

それらには、限定されないが、1) 貧血、2) 骨髄増殖性疾患、3) 出血性障害、4) 白血球減少症、5) 好酸球性障害、6) 白血病、7) リンパ腫、8) 血漿細胞疾患、9) 血液疾患の過程での脾臓の障害が含まれる。1)に記載の障害には、限定されないが、ヘム合成欠損または不足による貧血、赤血球生成欠損が含まれる。2)に記載の障害には、限定されないが、真性赤血球増加症、腫瘍関連赤血球増加症、骨髄線維症、血小板血症が含まれる。3)に記載の障害には、限定されないが、脈管炎、血小板減少症、ヘパリン誘発性血小板減少症、血栓性血小板減少性紫斑病、溶血性尿毒症症候群、血小板機能の遺伝性および後天性疾患、遺伝性凝固障害が含まれる。4)に記載の障害には、限定されないが、好中球減少症、リンパ球減少症が含まれる。5)に記載の障害には、限定されないが、過好酸球増加症、特発性好酸球増加症候群が含まれる。6)に記載の障害には、限定されないが、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病、骨髄異形成症候群が含まれる。7)に記載の障害には、限定されないが、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、菌状息肉腫皮膚T細胞リンパ腫が含まれ

40

50

る。8)に記載の障害には、限定されないが、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症、重鎖病が含まれる。前述の特発性血小板減少性紫斑病の延長において、鉄欠乏性貧血、巨赤芽球性貧血(ビタミンB12欠乏症)、再生不良性貧血、サラセミア、悪性リンパ腫骨髄浸潤、悪性リンパ腫皮膚浸潤、溶血性尿毒症症候群、巨大血小板症も、血液疾患であると考えられている。

#### 【0130】

ヒトKCNK9は、以下の血液学的系の組織において高度に発現される：赤血球、リンパ節、血小板、骨髄CD71+細胞。上記組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが血液疾患の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、血液疾患を治療するために調節され得る。

10

#### 【0131】

##### 胃腸および肝臓疾患

胃腸疾患は、後天性または遺伝性、良性または悪性または化生性であってもよく、胃腸管の器官または全身を侵し得る胃腸管の器官の原発性または二次性、急性または慢性疾患を含む。それらには、限定されないが、1)食道疾患、例えばアカラシア、劇症アカラシア、嚥下障害、輪状咽頭の協調不全、食道前嚥下障害、びまん性食道痙攣、球感覚、パレット化生、胃食道逆流、2)胃および十二指腸の障害、例えば機能性消化不良、胃粘膜の炎症、胃炎、ストレス性胃炎、慢性びらん性胃炎、胃腺の萎縮、胃組織の化生、胃潰瘍、十二指腸潰瘍、胃新生物、3)膵臓障害、例えば急性または慢性膵炎、膵臓の外分泌または内分泌組織不全、例えば脂肪便症、糖尿病、膵臓外分泌腺または内分泌腺新生物、例えば3.1)多発性内分泌腺腫症候群、導管腺がん、嚢胞腺癌、島細胞腫、インスリノーマ、ガストリノーマ、カルチノイド腫瘍、グルカゴノーマ、ゾリンジャーエリソン症候群、ピポーマ症候群、吸収不良症候群、4)腸障害、例えば腸の慢性炎症性疾患、クローン病、イレウス、下痢および便秘、結腸無力症、巨大結腸症、吸収不良症候群、潰瘍性大腸炎、4.1)機能性腸障害、例えば過敏性腸症候群、4.2)腸新生物、例えば家族性ポリポシス、腺癌、原発悪性リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カボジ肉腫、ポリープ、結腸および直腸のがんが含まれる。

20

#### 【0132】

肝疾患は、後天性または遺伝性、良性または悪性であってもよく、肝臓または全身を侵し得る肝臓の原発性または二次性、急性または慢性疾患または損傷を含む。これらには、限定されないが、ビリルビン代謝異常、黄疸、ギルバート症候群、クリグラー・ナジャー病、デュービン・ジョンソンおよびローター症候群；肝内胆汁鬱滞、肝腫大、門脈圧亢進症、腹水、バッド・キアリ症候群、門脈体循環性脳症、脂肪肝、脂肪症、ライ症候群、アルコールによる肝疾患、アルコール性肝炎または肝硬変、線維症および肝硬変、先天性代謝異常または外因性物質による肝臓の線維症および肝硬変、蓄積症、ゴーシェ病の症候群、ツェルヴェーガー病、ウィルソン病、急性または慢性肝炎、ウイルス性肝炎およびその異型、ウイルス、細菌、真菌、原虫、蠕虫による肝臓の炎症状態；薬物誘発性肝障害、慢性肝疾患、例えば原発性硬化性胆管炎、アルファ-アンチトリプシン欠損症、原発性胆汁性肝硬変、術後肝障害、例えば術後肝内胆汁鬱滞、肝肉芽腫、全身性疾患に関連する血管性肝障害、良性または悪性肝新生物、新生児または早産における肝臓代謝の障害。

30

40

#### 【0133】

ヒトKCNK9は、以下の消化器系組織において高度に発現される：食道、食道腫瘍、結腸、結腸腫瘍、回腸、回腸腫瘍、回腸慢性炎症、直腸。上記組織における発現、ならびに特に罹患組織回腸慢性炎症および健常組織回腸間の差次的発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが胃腸疾患の診断に利用され得ることを示す。

#### 【0134】

さらに、ヒトKCNK9の活性は、胃腸疾患を治療するために調節され得る。

#### 【0135】

##### 内分泌系およびホルモン

内分泌系は、ホルモンを生成して直接血流に分泌させることを主な機能とする器官の群

50

からなる。内分泌系の主要な器官は、視床下部、下垂体、甲状腺、副甲状腺、膵島、副腎、精巣および卵巣である。

【0136】

視床下部は、下垂体を刺激するいくつかのホルモンを分泌する：いくつかは下垂体ホルモンの放出を引き起こす；その他は下垂体ホルモンの放出を抑制する。

【0137】

下垂体は他の内分泌腺の多くの機能を調整するが、いくつかの下垂体ホルモンは直接作用を有する。

【0138】

膵臓のインスリン分泌細胞は、グルコースおよび脂肪酸に応答する。副甲状腺細胞はカルシウムおよびリン酸に反応する。副腎髄質（副腎の一部）は、副交感神経系による直接刺激に応答する。

10

【0139】

内分泌腺機能不全の場合では、血液中のホルモンレベルが異常に高くなったり低くなったりし、身体機能を乱すことがある。多くの障害は、内分泌系またはホルモンの機能不全によって引き起こされる。そのような障害の例を以下に示す。

【0140】

真性糖尿病は、身体がインスリンを適切に放出または使用しないため、血中グルコースレベルが異常に高い疾患である。

【0141】

I型糖尿病（インスリン依存性糖尿病）を患う人々は、インスリンをほとんどまたは全く産生しない。

20

【0142】

I型糖尿病では、膵臓のインスリン産生細胞（ベータ細胞）の90%より多くが永久に破壊される。結果として生じるインスリン欠乏症は重度であり、生存するために、I型糖尿病を患う人は定期的にインスリンを注射しなければならない。

【0143】

II型真性糖尿病（非インスリン依存性糖尿病）では、身体はインスリン効果に対する耐性を生じ、相対的なインスリン欠乏をもたらす。

【0144】

膵臓は、2つの主要機能を有する：消化酵素を含む液体を十二指腸に分泌し、ホルモンであるインスリンとグルカゴンとを分泌する。慢性膵炎は長期にわたる膵臓の炎症である。最終的に、膵臓のインスリン分泌細胞が破壊され、徐々に糖尿病に至ることがある。インスリノーマは、インスリンを分泌する稀なタイプの膵臓腫瘍である。インスリノーマの症状は、低血糖値に起因する。ガストリノーマは、過剰なレベルのホルモンガストリンを産生する膵臓腫瘍であり、胃を刺激して酸および酵素を分泌し、消化性潰瘍を引き起こす。ガストリノーマによって分泌された過剰のガストリンは、ゾリンジャーエリソン症候群と呼ばれる症状を引き起こす。グルカゴノーマは、ホルモンであるグルカゴンを産生する腫瘍であり、血中グルコースレベルを上昇させ、特有の発疹を生じさせる。

30

【0145】

糖尿病は、不十分な抗利尿ホルモンレベルが過度の渇き（多渴症）と非常に希薄な尿の過剰産生（多尿）とを引き起こす疾患である。尿崩症は、抗利尿ホルモン（バソプレッシン）の産生が減少した結果生じる。

40

【0146】

身体は2つの副腎を有する。副腎の髄質は、血圧、心拍数、発汗、および交感神経系によっても調節される他の活動に影響を及ぼすアドレナリン（エピネフリン）などのホルモンを分泌する。皮質は、コルチコステロイド（コルチゾン様ホルモン）、アンドロゲン（男性ホルモン）、ならびにミネラルコルチコイドを含む多くの異なるホルモンを分泌し、これらは血圧と体内の塩およびカリウムのレベルとを制御する。

【0147】

50

副腎不全を特徴とする疾患は、アジソン病（副腎皮質機能不全）である。

【0148】

いくつかの障害は、過活動副腎を特徴とする。その原因は、副腎腺自体の変化または下垂体による過剰刺激であり得る。これらの疾患の例を以下に列挙する。

【0149】

アンドロゲン性ステロイド（テストステロンおよび類似のホルモン、男性化を引き起こす）の過剰産生、コルチコステロイド（原因は下垂体または副腎の腫瘍である可能性があり、クッシング症候群をもたらす）の過剰産生、ネルソン症候群（両方の副腎が除去され、下垂体の肥大を特徴とする人々によって発症される）、アルドステロンの過剰産生（高アルドステロン症）、コーン症候群（腫瘍によって引き起こされる高アルドステロン症）、褐色細胞腫（副腎のクロム親和性細胞に由来し、カテコールアミンの過剰産生を引き起こす腫瘍）。甲状腺は、喉仏の下に位置する小さな腺である。それは、代謝率を制御する甲状腺ホルモンを分泌する。甲状腺はヨウ素を捕捉し、それを甲状腺ホルモンに変換する。

10

【0150】

甲状腺機能不全症候群は、T4形態の甲状腺ホルモンのT3形態への変換の欠如を特徴とする。甲状腺機能亢進症（過活動甲状腺、過剰なホルモンの産生）にはいくつかの原因がある。甲状腺炎（甲状腺の炎症）は、典型的には甲状腺機能亢進症の段階に至る。炎症は甲状腺を傷つける可能性があるため、後の段階でこの疾患は一時的または永久的な不活動（甲状腺機能低下症）を特徴とする。

20

【0151】

中毒性甲状腺結節（腺腫）は、しばしば甲状腺ホルモンを大量に産生する。中毒性多結節性甲状腺腫（プランマー病）は、結節が多い疾患である。グレイブス病（中毒性びまん性甲状腺腫）は、甲状腺を刺激して甲状腺ホルモンを過剰に産生する抗体によって引き起こされると考えられている。中毒性結節性甲状腺腫では、甲状腺の1つ以上の結節が甲状腺ホルモンを過剰に生成し、甲状腺刺激ホルモンの制御下にない。

【0152】

二次性甲状腺機能亢進症は、（稀に）甲状腺刺激ホルモンを過剰に分泌する下垂体腫瘍によって、下垂体の甲状腺ホルモンへの抵抗により、下垂体が甲状腺刺激ホルモンを過剰に分泌するようになることによって、または女性の胞状奇胎によって引き起こされることがある。甲状腺クリーゼは突然の過度の甲状腺の過活動であり、迅速な治療を必要とする生命を脅かす緊急事態である。

30

【0153】

甲状腺機能低下症は、甲状腺が不活性であり、甲状腺ホルモンの生成が少なすぎる状態である。非常に重度の甲状腺機能低下症は、粘液水腫と呼ばれる。橋本甲状腺炎（自己免疫性甲状腺炎）では、甲状腺がしばしば拡大し、甲状腺機能領域が徐々に破壊されるため、甲状腺機能低下症が生じる。甲状腺機能低下症の稀な原因には、甲状腺細胞の酵素の異常によって引き起こされるいくつかの遺伝性疾患が含まれる。他の稀な疾患では、視床下部または下垂体のいずれかが、正常な甲状腺機能を刺激するのに必要なホルモンを十分に分泌できない。

40

【0154】

甲状腺炎の他の例は、無痛性リンパ球性甲状腺炎、橋本甲状腺炎、または亜急性肉芽腫性甲状腺炎である。

【0155】

甲状腺がんは、甲状腺悪性腫瘍の4つの主なタイプ：乳頭状、濾胞性、未分化または髄様のうちの任意の1つである。

【0156】

下垂体は、脳の基底にある骨構造（トルコ鞍）にあるエンドウ豆の大きさの腺である。

【0157】

トルコ鞍は下垂体を保護するが、拡大できる空間がほとんどない。下垂体が拡大すると

50

、上方に押し上げられ、しばしば目からの信号を伝える脳の領域を圧迫することになり、頭痛または視力障害を引き起こす可能性がある。下垂体は2つの異なる部分を有する：前葉（前方）および後葉（後方）。前葉は、最終的に甲状腺、副腎、ならびに生殖器（卵巣および精巣）の機能；乳房での乳生産（授乳）；ならびに全身の成長を制御するホルモンを産生する（分泌する）。それは、皮膚を暗くし、痛感を抑えるホルモンも生成する。後葉は、水分平衡を調節し、授乳中の女性の乳房からの搾乳を刺激し、子宮の収縮を刺激するホルモンを産生する。

#### 【0158】

下垂体障害の例は、トルコ鞍空洞症候群；下垂体機能低下症（不活動下垂体）；末端肥大症、成長ホルモンの過分泌に起因する過剰増殖であり、ほぼ常に良性の下垂体腫瘍（腺腫）によって引き起こされる；乳汁漏出症、男性または授乳中でない女性の母乳生産であるが、両方の性別において、乳汁漏出症の最も一般的な原因は、下垂体のプロラクチン産生腫瘍（プロラクチノーマ）である。

10

#### 【0159】

ヒトKCNK9は、以下の内分泌系組織において高度に発現される：副腎。上記組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが内分泌疾患の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、内分泌疾患を治療するために調節され得る。

#### 【0160】

##### がん

この定義の範囲内のがんは、その組織における正常または異常細胞の制御不良なまたは制御されていない増殖および全身へのその影響により特徴付けられる哺乳動物の器官または組織の任意の疾患を含む。定義の範囲内のがん疾患は、良性新生物、形成異常、過形成および転移増殖を示す新生物、またはその他の形質転換、例えばがんの発生にしばしば先立つ白斑症などを含む。細胞および組織は、それらが正常細胞よりも急速に増殖し、周囲の健康な組織または身体の任意の他の組織に移動または広がり転移性増殖とされるとがん性であり、異常な形状や大きさを呈し、それらの核細胞質比、核多染色体の変化を示し、最終的には停止することがある。がん性細胞および組織は、腫瘍随伴症候群を引き起こす場合、全身を侵す可能性があるか、または重要器官もしくは組織内にがんが発生した場合、正常な機能が損なわれるか停止する可能性があり、致命的な結果をもたらす可能性がある。原発性または転移性のいずれかのがんによる重要器官の最終的な関与は、罹患した哺乳動物の死を招く可能性がある。がんは広がる傾向があり、その広がり程度は、通常、その個体が疾患から生き延びる可能性に関係している。がんは、一般に、3段階の増殖のうちの一つにあると言われている：早期、もしくは限局期、腫瘍が依然として原発組織もしくは原発部位に限局している時期；直接的拡張、腫瘍からのがん細胞が隣接組織に侵入したか、もしくは局所リンパ節のみに広がった時期；または転移、がん細胞が、原発部位から血液またはリンパ系を介して体の遠隔部位に移動し、感染の二次的部位を確立した時期。がんは、治療されなければ死に至る傾向があるために悪性であると言われている。良性腫瘍は通常は死亡を引き起こさないが、その位置、大きさ、または腫瘍随伴症の副作用のために、正常な身体機能を妨害する可能性がある。したがって、良性腫瘍もこの定義の範囲内でがんの定義に該当する。一般に、がん細胞は正常細胞よりも速い速度で分裂するが、がん性組織と正常組織の増殖の区別は、がん細胞における増殖抑制の部分的または完全な喪失であるため、前者における細胞分裂の迅速性ほどではなく、正常組織の増殖の機能的平衡を特徴付けるタイプの有用で限定された組織に分化することができないことである。がん組織は特定の分子受容体を発現する場合があります、おそらく宿主の感受性および免疫の影響を受け、特定の乳がんおよび前立腺がんは、例えば、それらの存在のために特定のホルモンに依存すると考えられている。定義の範囲にある用語「がん」は、単純な良性新生物に限定されず、他の良性および悪性新生物、例えば1) 癌腫、2) 肉腫、3) 癌肉腫、4) 血液形成組織のがん、5) 脳を含む神経組織の腫瘍、6) 皮膚細胞のがんを含む。1) に記載のがんは、外側の身体（皮膚）および線状粘膜ならびに胸部、肺、呼吸器および胃腸管、内分泌腺および泌尿生殖器系などの器官の内側の空洞構造を覆う上皮組織におい

20

30

40

50

て生じる。管状または腺要素は、甲状腺癌、胃腺癌、子宮腺癌などの腺癌において見られるように、上皮腫瘍にとどまり得る。皮膚および舌、唇、喉頭、膀胱、子宮頸部、または陰茎のがんなどの特定の粘膜の被蓋細胞上皮のがんは、それぞれの組織の類表皮細胞癌または扁平上皮癌と称されてもよく、がんの定義の範囲にも含まれる。2)に記載のがんは、繊維組織、脂肪(脂肪)組織、筋肉、血管、骨および軟骨を含む結合組織に発生する、例えば骨形成肉腫；脂肪肉腫、線維肉腫、滑膜肉腫。3)に記載のがんは、上皮組織および結合組織の両方で発生するがんである。この定義の範囲内にあるがん疾患は、原発性または二次性であり得るため、原発は、別の病変からの転移を介して二次部位として確立されたのではなく、発見された組織に由来するがんを表す。この定義の範囲内のがんおよび腫瘍疾患は、良性または悪性である場合があり、哺乳類の身体の全ての解剖学的構造に影響し得る。例として、限定されるものではないが、それらは、骨髄および骨髄由来細胞のがんおよび腫瘍疾患(白血病)、IT)内分泌腺および外分泌腺、例えば、甲状腺、副甲状腺、下垂体、副腎、唾液腺、膵臓BD乳房、例えば、男性または女性のいずれかの乳腺の良性または悪性腫瘍、乳管、腺癌、髄様癌、面疱癌、乳頭のバジェット病、若年女性の炎症性癌、IV)肺、V)胃、VI)肝臓および脾臓、VII)小腸、VIM)結腸、IX)骨およびその支持組織ならびに結合組織、例えば悪性または良性骨腫瘍、例えば悪性骨形成肉腫、良性骨腫、軟骨腫瘍；例えば悪性軟骨肉腫または良性軟骨腫；骨髄腫瘍、例えば悪性骨髄腫または良性好酸球性肉芽腫、ならびに身体の他の場所の骨組織からの転移性腫瘍；X)口、喉、喉頭、および食道、XI)膀胱ならびに男性および女性の泌尿生殖器系の内部および外部器官および構造、例えば卵巣、子宮、子宮頸部、精巣および前立腺、XD)前立腺、XHI)膵臓、例えば、膵管腺癌；XIV)リンパ組織、例えばリンパ腫およびリンパ系原発の他の腫瘍、XV)皮膚、XVI)呼吸作用および胸部の筋肉および内層を含む呼吸器系に属する全ての解剖学的構造のがんならびに腫瘍疾患、XVII)リンパ節の原発性または二次性がん、XVE)舌および硬口蓋または洞の骨構造の、XVIV)口、頬、首および唾液腺、XX)心臓およびそれらの内層を含む血管、XXI)平滑筋または骨格筋ならびにそれらの靭帯および内層、XXII)末梢神経、自律神経、小脳を含む中枢神経系、XXWX)脂肪組織を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0161】

ヒトKCNK9は、以下のがん組織において高度に発現される：食道腫瘍、結腸腫瘍、回腸腫瘍、肺腫瘍、卵巣腫瘍、乳房腫瘍、腎腫瘍。上記組織における発現、ならびに特に罹患組織食道腫瘍および健常組織食道間、罹患組織結腸腫瘍および健常組織結腸間、罹患組織回腸腫瘍および健常組織回腸間、罹患組織肺腫瘍および健常組織肺間、罹患組織卵巣腫瘍および健常組織間、罹患組織乳房腫瘍および健常組織乳房間、罹患組織腎臓腫瘍および健常組織腎臓間の差次的発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが、がんの診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、がんを治療するために調節され得る。

#### 【0162】

##### 炎症性疾患

炎症性疾患は、体組織の炎症を引き起こし、続いて急性もしくは慢性炎症状態をもたらす免疫系または組織の細胞性または非細胞性メディエーターによって引き起こされる疾患を含む。そのような炎症性疾患の例は、I-IV型の過敏反応、例えば、限定されるものではないが、喘息を含む肺の過敏性疾患、アトピー性疾患、アレルギー性鼻炎または結膜炎、眼の血管浮腫、遺伝性血管浮腫、抗レセプター過敏反応および自己免疫疾患、橋本甲状腺炎、全身性エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、天疱瘡、重症筋無力症、グレーブス病およびレイノー病、B型インスリン抵抗性糖尿病、関節リウマチ、乾癬、クローン病、強皮症、混合結合組織病、多発性筋炎、サルコイドーシス、糸球体腎炎、急性または慢性宿主対移植片反応である。

#### 【0163】

ヒトKCNK9は、以下の免疫系組織および免疫系成分に応答する組織ならびに炎症メディエーターに応答する以下の組織において高度に発現される：回腸慢性炎症、肺COPD。上記組織における発現、ならびに特に罹患組織回腸慢性炎症および健常組織回腸間、罹患組織肺COPDおよび健常組織肺間の差次的発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが炎症性疾患の診断に

利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、炎症性疾患を治療するために調節され得る。

【0164】

呼吸器に関連する障害（呼吸器疾患）

喘息は、複数の遺伝的要因と環境的要因との相互作用の結果として生じると考えられ、3つの主要な特性によって特徴付けられる：1) 気管支収縮、粘液産生の増加、および気道の狭窄をもたらす気道壁の肥厚によって引き起こされる断続的かつ可逆的な気道閉塞、2) 気道過敏症、ならびに3) 気道炎症。特定の細胞は、喘息の炎症反応にとって重要であり、T細胞および抗原提示細胞、IgEを産生するB細胞、および肥満細胞、好塩基球、好酸球ならびにIgEに結合する他の細胞が挙げられる。これらのエフェクター細胞は、気道のアレルギー反応部位に蓄積し、急性病理および最終的には障害に関連する組織破壊に寄与する毒性産物を放出する。平滑筋細胞、肺上皮細胞、粘液産生細胞、および神経細胞などの他の常在細胞もまた、喘息を患う個体では異常であり、その病理に寄与し得る。断続的な喘鳴および息切れとして臨床的に提示される喘息の気道閉塞は、通常、即時治療を必要とする疾患の最も差し迫った症状であるが、この疾患に伴う炎症および組織破壊は不可逆的な変化をもたらし、結局は喘息を、長期管理を必要とする慢性的で障害を引き起こす疾患にする。

10

【0165】

慢性閉塞性肺（または気道）疾患（COPD）は、慢性気管支炎による肺気腫および末梢気道閉塞の混合から一般に生じる気流閉塞として生理学的に定義される状態である [Botstein, 1980]。肺気腫は、肺の空気空間の異常な拡大をもたらす肺胞壁の破壊を特徴とする。慢性気管支炎は、連続した2年の間に3カ月間にわたる慢性的な喀痰を伴う咳の存在と臨床的に定義されている。COPDでは、気流閉塞は通常進行性であり、部分的にのみ可逆的である。COPD発症の最も重要なリスク因子は喫煙であるが、この疾患は非喫煙者でも起こる。

20

【0166】

ヒトKCNK9は、以下の呼吸器系組織において高度に発現される：肺、肺腫瘍、肺COPD。上記組織における発現、ならびに特に罹患組織肺COPDおよび健常組織肺間の差次的発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが呼吸器疾患の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、これらの疾患を治療するために調節され得る。

30

【0167】

泌尿器に関連する障害

泌尿生殖器障害は、女性および男性の尿生殖器系を構成する器官の良性および悪性疾患、急性または慢性腎不全などの腎疾患、腎臓移植拒絶反応などの免疫介在性腎疾患、ループス腎炎、免疫複合体腎臓病、糸球体症、腎炎、中毒性腎症、良性前立腺肥大症（BPH）などの閉塞性尿路症、神経因性膀胱症候群、切迫性、ストレス性、または溢流性失禁などの尿失禁、骨盤痛、ならびに勃起不全などが挙げられる。

【0168】

ヒトKCNK9は、以下の泌尿器組織において高度に発現される：後根神経節、脊髄、陰茎、海綿体、腎臓、腎臓腫瘍。上記組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが泌尿器系疾患の診断に利用され得ることを示す。さらに、ヒトKCNK9の活性は、泌尿器系疾患を治療するために調節され得る。

40

【0169】

ヒトKCNK9は、後根神経節組織において高度に発現される。後根神経節における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが泌尿器系障害としての失禁を診断するために利用され得ることを示す。後根神経節は、泌尿器系のニューロン調節に関与する。さらに、ヒトKCNK9の活性は、限定されないが、失禁を治療するために調整され得る。

【0170】

ヒトKCNK9は、脊髄組織：脊髄において高度に発現される。脊髄組織における発現は、ヒトKCNK9またはmRNAが泌尿器科障害としての失禁を診断するために利用され得ることを示す。脊髄組織は、泌尿器系のニューロン調節に関与する。さらに、ヒトKCNK9の活性は

50

、限定されないが、失禁を治療するために調整され得る。

【0171】

本開示の主題は、心臓血管疾患、内分泌疾患、胃腸疾患、がん、炎症、血液論理疾患、神経疾患、泌尿器疾患および呼吸器疾患の予防方法および治療方法の両方を提供する。

【0172】

一般に、活性薬剤もしくは薬物送達デバイスの「有効量」または「治療有効量」は、所望の生物学的応答を誘発するのに必要な量を指す。当業者には理解されるように、薬剤またはデバイスの有効量は、所望の生物学的エンドポイント、送達される薬剤、カプセル化マトリックスの組成、標的組織などの要因に応じて変化し得る。

【0173】

いくつかの実施形態では、被験体はがんを患っているか、または患っていると疑われる。いくつかの実施形態では、本方法は、有効量の従来のがん治療を被験体に施すことをさらに含む。従来のがん治療の例には、化学療法、放射線療法、免疫療法、プロトン療法、光線力学療法、および手術が含まれるが、これらに限定されない。

【0174】

本明細書で使用される場合、用語「免疫療法薬剤」は、細胞、組織、器官または被験体における免疫応答を誘導、増強または抑制することによって疾患の治療を助けることができる分子を指す。

【0175】

本明細書で使用される場合、「放射線治療薬剤」および「放射線療法」は、互換的に使用され、がん治療の治療分野で従来採用されてきた薬剤を指し、化学結合イオン化に十分なエネルギーを有する光子、例えば放射性核からのアルファ線（線）、ベータ線（線）およびガンマ線（線）、ならびにX線が挙げられる。放射線は高LET（線エネルギー付与）または低LETであってもよい。LETは距離の単位長あたりに伝達されるエネルギーである。高LETは高密度電離放射線と言われ、低LETは低密度電離放射線と言われている。高LETの代表的な例は、中性子および粒子である。低LETの代表的な例は、X線およびガンマ線である。X線と線の両方を含む低LET放射線は、がん患者の放射線療法に最も一般的に用いられている。放射線は、通常は外来で提供される外部放射線療法、または腫瘍の非常に近くもしくは内部に設置された放射線を使用する内部放射線療法に使用され得る。内部放射線治療の場合、放射線源は、通常、インプラントと呼ばれる小さなホルダー内に密閉される。インプラントは、細いワイヤー、カテーテルと呼ばれるプラスチックチューブ、リボン、カプセル、またはシードの形態であってもよい。インプラントは、体内に直接入れられる。内部放射線療法は入院が必要な場合がある。電離放射線源は、単位線量の放射線として提供され、X線管であることが好ましく、なぜなら、それは放射線源を容易にオン/オフすることができる便利な調節可能線量、および最小の処理問題などの多くの利点を提供するためである。放射線の単位線量は、一般にグレイ（Gy）で測定される。電離放射線源はまた、固体放射性同位体源（例えば、ワイヤ、ストリップ、ペレット、シード、ビーズなど）または液体放射性同位体充填バルーンなどの放射性同位体も含み得る。後者の場合、バルーンは、放射性同位体物質のバルーンから体腔または血流への漏出を防止するように特別に構成されている。さらに、電離放射線源は、ペレットまたは液体などの放射性同位体物質を受け取るための容器をカテーテル本体内に備えていてもよい。放射性同位体材料は、線、線、および線を放出するように選択されてもよい。通常は線および線が好ましく、なぜなら、それらは周囲組織によって迅速に吸収され、治療を受ける体腔の壁を実質的に越えて透過しないためである。したがって、治療領域に隣接する心臓および他の器官の偶発的な照射を実質的に排除することができる。提供される単位の総数は、電離放射線を用いる治療の当業者によって治療的に有効であると決定される量である。この量は、被験体および治療される悪性腫瘍または新生物のタイプによって変化する。その量は変化し得るが、患者は数週間にわたって約30~75Gyの線量を受け得る。

【0176】

少なくとも1つの代謝再プログラミング剤、少なくとも2つの代謝再プログラミング剤、

10

20

30

40

50

または少なくとも3つの代謝再プログラミング剤と併用して使用することが意図されている例示的な放射線治療薬剤には、DNA損傷を引き起こす要因、例えば線、X線、および/または腫瘍細胞への放射性同位体の指向性送達が含まれる。マイクロ波およびUV照射などのDNA損傷因子の他の形態も意図される。X線の線量範囲は、長期間(3~4週間)では50~200レントゲンの1日線量から、2000~6000レントゲンの単回線量に及ぶ。放射性同位元素の線量範囲は大きく異なり、同位体の半減期、放出される放射線の強度およびタイプ、ならびに標的細胞による取り込みに依存する。いくつかの実施形態では、放射線療法薬剤は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる特許文献19に記載のように、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{199}\text{Au}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{32}\text{P}$ および $^{33}\text{P}$ 、 $^{71}\text{Ge}$ 、 $^{77}\text{As}$ 、 $^{103}\text{Pb}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{111}\text{Ag}$ 、 $^{119}\text{Sb}$ 、 $^{121}\text{Sn}$ 、 $^{131}\text{Cs}$ 、 $^{143}\text{Pr}$ 、 $^{161}\text{Tb}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{191}\text{Os}$ 、 $^{193}\text{MPT}$ 、 $^{197}\text{H}$ 、 $^{43}\text{K}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{77}\text{Br}$ 、 $^{81}\text{Rb}$ 、 $^{81}\text{MKr}$ 、 $^8\text{MSr}$ 、 $^{99}\text{MTC}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{113}\text{MIn}$ 、 $^{127}\text{Cs}$ 、 $^{129}\text{Cs}$ 、 $^{132}\text{I}$ 、 $^{197}\text{Hg}$ 、 $^{203}\text{Pb}$ および $^{206}\text{Bi}$ からなる群より選択される。

#### 【0177】

本明細書で使用される「光線力学療法」は、光放射線療法、光線療法、および光化学療法としても知られ、光と組み合わせて感光剤を使用し、がん細胞を死滅させる治療を指す。感光剤は、光活性化によりがん細胞を死滅させる。

#### 【0178】

本明細書で使用される「プロトン療法」は、陽子線療法としても知られ、陽子線を使用してがん細胞を照射し死滅させる治療を指す。

#### 【0179】

いくつかの実施形態では、被験体はヒトである。

#### 【0180】

本開示の主題はまた、本開示の主題の方法を実施するためのキット、ならびに本開示の主題の抗体、抗体断片、またはそれらの誘導体を含むキット、前記成分をコードする核酸分子および/または本開示の主題のベクターに関する。

#### 【0181】

一般に、本開示のキットは、本開示の主題による方法を実施するための成分、試薬、供給物などの一部または全部を含む。いくつかの実施形態では、用語「キット」は、任意の意図される任意の製品(例えば、パッケージまたは容器)を指し、少なくとも1つの抗体、抗体断片、もしくはそれらの誘導体、それらを含む医薬組成物または診断用組成物、および本開示の主題の方法を実施するための特定の使用説明書一式を含む。キットは、段ボール箱、瓶、アンプル、チューブなどの分割されたまたは分割されていない容器に包装することができる。本開示の組成物は、乾燥、凍結乾燥、または液体の形態で包装することができる。提供される追加の成分は、乾燥成分の還元用の溶媒を含むことができる。好ましくは、全てのそのような溶媒は、有害反応を起こすことなく被験者への注射に適しているように、無菌で非発熱性であることが好ましい。当業者は、本明細書に記載の任意のがんまたは固形腫瘍の治療のためにキットを組み立てることができることを理解するであろう。

#### 【0182】

本明細書に開示される化合物を包含する全ての実施形態は、単一化合物として、または医薬品の調製のために組み合わせて使用することができる。

#### 【0183】

特定の用語を本明細書では使用しているが、それらは一般的かつ説明的な意味でのみ使用され、限定するためではない。他に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語および科学用語は、本開示の主題が属する当該技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。

#### 【0184】

長年にわたる特許法の慣例に従い、用語「a」、「an」および「the」は、特許請求の範囲を含む本出願で使用される場合、「1つ以上」を指す。したがって、例えば、「被験体

」への言及は、文脈が明らかに反対（例えば、複数の被験体）などでない限り、複数の被験体を含む。

【0185】

本明細書および特許請求の範囲を通して、用語「含む」（「comprise」、「comprises」、「comprising」）は、文脈上他の意味に解すべき場合を除いて、非排他的な意味で使用される。同様に、用語「含まれる」（「include」）およびその文法上の変形は、限定的ではなく、リスト内の品目の列挙が、リストされた品目に置換または追加され得る他の同様の品目を除外するものではないようにする。

【0186】

本明細書および添付の特許請求の範囲の目的のために、特に断りのない限り、量、大きさ、寸法、割合、形状、処方、パラメータ、パーセンテージ、パラメータ、量、特徴、ならびに明細書および特許請求の範囲で使用される他の数値を表す全ての数字は、用語「約」が値、量または範囲と共に明示的に現れなくても、用語「約」によって全ての場合において修飾されると理解されるべきである。したがって、反対のことが示されていない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載の数値パラメータは、正確ではないおよび正確である必要はないが、所望に応じて近似であるおよび/またはより大きくても小さくてもよく、本開示の主題によって得られることが求められる所望の特性に応じて、許容誤差、換算係数、四捨五入、測定誤差など、および当業者に知られている他の因子を反映する。例えば、用語「約」は、値を指す場合、いくつかの実施形態では±100%、いくつかの実施形態では±50%、いくつかの実施形態では±20%、いくつかの実施形態では±10%、いくつかの実施形態では±5%、いくつかの実施形態では±1%、いくつかの実施形態では±0.5%、およびいくつかの実施形態では±0.1%の特定の量からの変動を包含することを意味することができ、そのような変動は、開示の方法を実施するのに、または開示の組成物を使用するのに適切である。

【0187】

さらに、用語「約」は、1つ以上の数字または数値範囲と関連して使用される場合、範囲内の全ての数字を含む全てのそのような数を指すと理解されるべきであり、記載の数値の上および下の境界を延長することによってその範囲を変更する。終点による数値範囲の列挙は、全ての数字、例えば、その範囲内に包含されるその小数を含む整数全体（例えば、1~5の列挙は、1、2、3、4および5、ならびにそれらの小数、例えば、1.5、2.25、3.75、4.1などを含む）ならびにその範囲内の任意の範囲を含む。

【実施例】

【0188】

以下の実施例は、本開示の主題の代表的な実施態様を実施するための指針を当業者に提供するために含まれている。本開示および当業者の一般的なレベルに照らして、当業者であれば、以下の実施例は例示的なものに過ぎず、本開示の主題の範囲から逸脱することなく、多くの変更、修正、および代替を採用することができることを理解することができる。以下の合成の説明および具体的な実施例は、説明のためにのみ意図されており、他の方法による本開示の化合物の製造方法を限定するものとして解釈されるべきではない。

【0189】

（実施例1）

概要

二孔ドメインカリウム（K2P）チャネルは、多くの生物学的過程の前提条件である細胞静止膜電位を維持するように作用する。K2PファミリーのメンバーであるKCNK9は、様々なヒト腫瘍におけるその過剰発現ならびに新生細胞の生存および増殖を促進する能力のために、がんに関与する。しかし、KCNK9の悪性度への根本的な寄与は、特定のモジュレーターが存在しないために依然として分からない。ここでは、KCNK9細胞外ドメインに対する新規モノクローナル抗体（mAb）の開発と、その機能的効果とが記載されている。最も高い親和性結合を有するあるmAb（Y4）が、内在化を誘導することによってチャネル活性を阻害することが示されている。KCNK9発現細胞で試験すると、Y4は細胞生存率を低下させ

10

20

30

40

50

；細胞死を増加させ、補体依存性細胞傷害性を誘発する。この抗体の全身投与は、ヒト肺がん異種移植片およびマウスにおけるマウス乳がん転移を効果的に阻害する。これらの研究は、mAbベースのKCNK9標的化が、KCNK9発現悪性腫瘍における治療戦略であることを明らかにする。さらに、本開示のmAbベースの戦略は、他のイオンチャネルの研究に一般に適用可能であるべきである。

#### 【0190】

##### 材料および方法

試薬：以下の供給源から抗体を得た：マウス抗ヒト成長ホルモン抗体 (Abcam)、ウサギ抗KCNK9抗体 (Alomone)、ヤギ抗KCNK9抗体 (Santa Cruz)、マウス抗  $\alpha$ -アクチン抗体、ウサギ抗切断型カスパーゼ-3 (Cell Signaling)、ウサギ抗Ki67抗体 (Abcam)、およびAPC複合ヤギ抗マウスIgG抗体 (Biolegend)。アイソタイプ適合マウスIgG1 (mIgG1) 対照は、SouthernBiotechから得た。Rapid ELISAマウスmAbアイソタイプングキット (Pierce) を用いて、抗KCNK9 mAbをアイソタイプ決定した。K2Pチャネルの一過性トランスフェクションは、Fugene6 (Promega) を用いて行った。

10

#### 【0191】

細胞培養：HEK293、COS-7、BEN扁平上皮細胞肺癌細胞 (DSMZ、ドイツ) およびMDA-MB-231乳がん細胞 (Sara Sukumar博士からの寄贈) を、10%ウシ胎仔血清 (FBS) および2mMのL-グルタミン (L-Gln) を補充したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で増殖させた。HEK293-KCNK9安定細胞株を前もって作製し (非特許文献8)、1  $\mu$ Mテトラサイクリンで16時間インキュベートすることによってKCNK9発現を誘導した。これらの細胞を、10% FBS、2mMのL-グルタミン、400  $\mu$ g/mlのハイグロマイシン、および15  $\mu$ g/mlのプラストサイジンで補充したDMEM中で培養した。BT-549乳がん細胞 (Sara Sukumar博士からの寄贈) を、10% FBSおよび2mMのL-Glnを補充したRPMI-1640培地で維持した。410および410.4ネズミ乳がん細胞 (Amy Fulton博士からの寄贈) を、10% FBS、2mMのL-Gln、0.15%w/v重炭酸ナトリウムおよび100  $\mu$ MのMEM非必須アミノ酸を補充したDMEM中で培養した。全ての細胞を37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>で維持した。

20

#### 【0192】

QRT-PCR、ウェスタンブロットおよびフローサイトメトリー：RNeasy Mini Kit (Qiagen) およびTRIZOL Reagent (Invitrogen) を用い、それぞれ製造元の指示に従い、細胞株および瞬間凍結腫瘍組織から全RNAを抽出した。以前に記載されたようにQRT-PCRを行った (非特許文献43)。各遺伝子の相対発現を、ヒト18S rRNAまたはマウスGAPDH RNAに対して正規化した。全てのプライマー対の配列を表1に列挙する。

30

#### 【0193】

以前に記載されたようにタンパク質を抽出した (非特許文献43)。ウェスタンブロットは、定量的ウェスタンブロットシステム (LI-COR Bioscience) を用い、製造元の指示に従って行った。二次抗体をIRDye赤外色素 (LI-COR Biosciences) で標識した。

#### 【0194】

単一細胞懸濁液を、30分間4  $^{\circ}$ C で、抗KCNK9 mAbで標識した。氷冷PBSで洗浄した後、細胞をAPC複合ヤギ抗mIgG二次抗体とともに30分間4  $^{\circ}$ C でインキュベートした。次いで、染色された細胞を洗浄し、FACS Caliburフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて分析するか、またはFACS Aria-IIフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて選別した。

40

#### 【0195】

【表 1】

## QRT-PCR プライマー配列

遺伝子	アクセッション 番号	フォワード	リバース
hKCNK9	NM_016601	GCTCCTTCTACTTTGCGATCACG (配列番号：2)	CTGGAACATGACCAGTGTGACG (配列番号：3)
mKCNK9	NM_001033876	CCCCTGACGCTGGTTATGTTC (配列番号：4)	CATGCCACAGCACTTCTTGAT (配列番号：5)
mCD4	NM_013488	ACACACCTGTGCAAGAAGCA (配列番号：6)	GCTCTTGTGGTTGGGAATC (配列番号：7)
mCD8	NM_009856	CTCACCTGTGCACCCTACC (配列番号：8)	ATCCGGTCCCCTTCACTG (配列番号：9)
mCD20	NM_026956	AACCTGCTCCAAAAGTGAACC (配列番号：10)	CCCAGGGTAATATGGAAGAGGC (配列番号：11)
mCD25	NM_008367	GCGTTGCTTAGGAACTCCTGG (配列番号：12)	GCATAGACTGTGTGGCTTCTGC (配列番号：13)
mCD56	NM_001081445	GGTCCGAGATGGTCAGTTGCT (配列番号：14)	CAAGGACTCCTGTCCAATACGG (配列番号：15)
mCD68	NM_009853	CCATCCTCACGATGACACCT (配列番号：16)	GGCAGGGTTATGAGTGACAGTT (配列番号：17)
mCD279	NM_008798	CGGTTTCAAGGCATGGTCATTGG (配列番号：18)	TCAGAGTGTGTCCTTGCTTCC (配列番号：19)
m グランザイム B	NM_013542	CCACTCTCGACCCTACATGG (配列番号：20)	GGCCCCAAAGTGACATTTATT (配列番号：21)
mCXCL9	NM_008599	CCTAGTGATAAGGAATGCACGAG (配列番号：22)	CTAGGCAGGTTTGTCTCCGTTT (配列番号：23)
mCXCL11	NM_019494	GGCTTCCTTATGTTCAAACAGGG (配列番号：24)	GCCGTTACTCGGTAAATTACA (配列番号：25)
h18s rRNA	X03205	GTAACCCGTTGAACCCATT (配列番号：26)	CCATCCAATCGGTAGTAGCG (配列番号：27)
mGAPDH	NM_008084	CATCACTGCCACCCAGAAGACTG (配列番号：28)	ATGCCAGTGAGCTCCCCTCAG (配列番号：29)

10

20

30

40

## 【 0 1 9 6 】

抗体の生成および精製：哺乳動物発現ベクターで組み換え発現し、続いて免疫化のためにアフィニティー精製したhKCNK9（アミノ酸30～88）の第1細胞外ドメイン（M1P1）に対するマウスモノクローナル抗体（mAb）を生成した（非特許文献44；非特許文献45）。ハイブリドーマを得た後、複数回の限界希釈クローニングを行った。サブクローニング

50

の各段階で、ハイブリドーマ由来の培養上清を、組み換えhKCNK9M1P1およびhKCNK3M1P1を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によってスクリーニングした。hKCNK9M1P1に特異的な最も高いELISA価を有するクローンを、さらなるスクリーニングのために、組み換えhKCNK9M1P1-eGFPを一過性に発現するHEK293T細胞の染色のフローサイトメトリー分析により選択した。このスクリーニング戦略は、hKCNK9 M1P1ドメインに対する高親和性結合を有する単一クローンを得ることを目的とする。選択されたクローンをスケールアップし、製造元の推奨に従ってプロテインGアガロースビーズ (Pierce) を用いてmAbを精製した。全てのmAbはIgG1サブタイプである。

#### 【0197】

抗体-抗原結合特性評価：MAb特異性を、ウエスタンブロットでの9個の組み換えhK2PM1P1サブタイプに対する交差反応性に基づいて調べ、全長hKCNK9およびその密接に関連するK2PサブタイプであるhKCNK3で一過性にトランスフェクトした細胞の染色のフローサイトメトリー分析によってさらに検証した。組み換えヒトおよびマウスKCNK9M1P1への結合親和性を、Octet (登録商標) システム (Pall Life Sciences) を用いて測定した。 $K_D$ を、リアルタイム測定からの結合 ( $K_{on}$ ) および解離 ( $K_{off}$ ) 定数を導き出すことによって推定し、 $K_D = K_{on}/K_{off}$ によって計算した。

#### 【0198】

タリウム ( $Tl^+$ ) ベースの蛍光アッセイ：KCNK9の小分子モジュレーターの高スループットスクリーニングのために以前に開発された蛍光アッセイを、mAbの機能的効果を調べるために適合させた (非特許文献46; 非特許文献8)。このアッセイでは、 $Tl^+$ は $K^+$ の代用イオンとして働いた。KCNK9発現のテトラサイクリン誘導に際して、細胞を0.4mg/mlのmAbとともに0.5~72時間37 でインキュベートした。洗浄後、細胞に $Tl^+$ 感受性蛍光色素、FluxOR (商標) (Invitrogen) を与えた。2.8mMの $K^+$ によるチャネル活性化により、 $Tl^+$ 流入は、時間の関数として観察された蛍光変化を生じた (非特許文献8)。親HEK293および非誘導性HEK293-KCNK9細胞を陰性対照として用いた。

#### 【0199】

チャネル内在化のフローサイトメトリー分析：Tet誘導性HEK293-KCNK9細胞を0.4mg/mlのY-mAbと36時間30 でインキュベートし、エンドサイトーシスを誘導した。原形質膜上に残ったKCNK9チャネルをポリクローナル抗KCNK9抗体で染色し、続いて二次抗体染色およびフローサイトメトリー分析を上記のように行った。

#### 【0200】

チャネル内在化の共焦点顕微鏡分析：実験の前に、抗KCNK9 mAbをAlexa Fluor 488色素 (Life Technologies) に結合させた。COS-7細胞を12ウェルプレート中のカバースリップ上に播種し、hKCNK9またはhKCNK3で一過性にトランスフェクトした。Mcherryをトランスフェクション対照として共トランスフェクトした。36時間のトランスフェクション後、細胞を0.4mg/mlのY4と共に、3時間4 または12時間30 のいずれかで処理した。インキュベーションの終わりに、各ウェルをPBSで洗浄した。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBSで洗浄し、DAPIを含むProLong (登録商標) Gold Antifade Mountant (Life Technologies) でマウントした。画像をスキャンズーム1.0で63倍/1.4で撮影した。共局在化分析のために、COS-7細胞をRFP標識EEA1 (Addgene) と共トランスフェクトした後、同じmAb処理プロトコルを行った。画像をスキャンズーム1.0で40倍/1.3で撮影した。画像定量化は、Imarisソフトウェア (Bitplane) を用いて行った。赤と緑のチャネルの最小閾値を選択し、画像を異なる領域から分析した。データは、200個の細胞の分析を表す。

#### 【0201】

細胞周期分析：BEN細胞表面上のhKCNK9チャネルを、前項で説明したようにY4および二次抗体で標識した。次いで、細胞を固定し、80%エタノールで浸透させた後、ヨウ化プロピジウム (PI) 染色を行った。フローサイトメトリー分析の間、 $K9^+$ および $K9^-$ 細胞をゲーティングし、それらの対応するPIシグナルを分析のために収集した。

#### 【0202】

細胞生存率および細胞死アッセイ：がん細胞株を、10%FBS培地の存在下で、一晚37 で

播種した。翌日、細胞をPBSで洗浄し、0.1%または10%FBS培地において2.6 μM抗体で24~72時間37 °Cで処理した。Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies) を用いて、製造元の推奨に従って細胞生存率を測定した。CytoTox 96 (登録商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (Promega) による乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出を製造元の指示に従って測定することにより、細胞死を判定した。細胞生存率および細胞死のパーセンテージを、PBSで処理した細胞に対して正規化した。

【0203】

補体依存性細胞傷害性 (CDC) : CDCアッセイプロトコールを、以前の研究から適合させた (非特許文献47; 非特許文献48)。がん細胞株を12時間血清欠乏させた後、ネズミ血清補体 (Rockland) を含むまたは含まない0.4mg/mlの抗体で2時間37 °Cで処理した。マウス由来の凍結乾燥補体血清をPBSで復元し、1:10~1:1000で連続希釈した。30分間56 °Cで熱不活性化した補体血清を、陰性対照として含めた。細胞死は、前項で説明したように判定した。

【0204】

異種移植研究: 雌の6~8週齢のnu/nuマウス (Charles River) を5mg/kgキシラジンの腹腔内 (i.p.) 注射により麻酔した。BEN皮下 (s.c.) 異種移植片については、25 μLのPBSおよび25 μLのマトリゲル (Corning) 中の4 × 10<sup>6</sup>個のBEN細胞を、マウスの背側腹部にs.c.投与した。腫瘍発生に対するmAbの効果を観察するために、マウスを無作為に群分けし (n=10/群)、100 μLのPBS中の4mg/kgのY4またはアイソタイプ適合対照をi.p.投与し、開始は0日目とし、mAbのi.p.注射を週に2回行った。腫瘍が50mm<sup>3</sup>に達した後の腫瘍退行に対するmAbの効果を観察するために、マウスを無作為に群分けし (n=10/群)、100 μLのPBS中の4mg/kgのY4またはアイソタイプ適合対照を週に2回i.p.投与した。腫瘍体積は、2次元 [長さ (a) および幅 (b)] を測定することによって推定し、式:  $V = ab^2/2$  を用いて計算した。各実験の終わりに、腫瘍を分析用に切除した (非特許文献43)。

【0205】

転移研究: 雌の4~6週齢のBalb/cByJマウス (Jackson Laboratory) を無作為に群分けし (n=10/群)、100 μLのPBS中の4mg/kgのY4またはアイソタイプ適合対照を、細胞注射前の1週間、週に2回i.p.投与することにより準備した。肺定着は、2 × 10<sup>5</sup>個の生存410.4細胞をマウスの側尾静脈へi.v.注射することにより評価した。その後、マウスを100 μLのPBS中の4mg/kgのY4またはアイソタイプ適合対照で、週に2回、25日間i.p.投与により処理した。全てのマウスを移植後25日目に安楽死させるか、瀕死の場合は早期に安楽死させた。肺を、解剖顕微鏡下で腫瘍コロニーについて検査した。

【0206】

免疫組織化学: クライオスタット切片を、以前に記載されたように、抗切断型カスパーゼ-3および抗Ki67抗体で染色した (非特許文献49)。後に3,3'-ジアミノベンジジンペルオキシダーゼ基質とのインキュベーションが続くビオチン化接合二次抗体を使用し、一次Abを検出した。抗切断型カスパーゼ-3および抗Ki67染色切片をメチルグリーンで対比染色した。増殖およびアポトーシス指数は、ImageJソフトウェア (rsb.info.nih.gov/ij/) を使用するコンピュータ支援定量化により、以前に報告されたように (非特許文献49) 決定した。

【0207】

統計分析: 2つの群の比較をt検定またはANOVAによって分析し、P値を計算した。特に断りのない限り、P<0.05は有意であるとみなした。示された全てのデータは平均 ± 標準偏差である。共局在化の統計分析は、緑チャネルおよび赤チャネル間のピアソンの相関係数を計算することによって行った。r>0.5を有意と見なした。

【0208】

前書き

M1P1ドメイン内の配列は、所望の細胞外エピトープ保有を表すK2Pサブタイプ間 (図1C) ではほとんど保存されていない。ただし、M1P1ドメインは重要な調節部位を有する (非特許文献13; 非特許文献14) M1P1ドメインに対して生じた抗体は、KCNK9機能の高

10

20

30

40

50

度に選択的な操作を可能にすると仮定された。この研究では、KCNK9の細胞外ドメインに対する抑制抗体が開発された。抗体ベースのKCNK9標的化を特性評価し、がん細胞の生存、腫瘍増殖および転移を効果的に阻害することを見出した。本開示の主題は、*in vivo*で有意な治療効果を示す、最初に報告されたイオンチャネル標的化モノクローナル抗体を提供する。本開示の主題はまた、その他の関連チャネルならびに健康および疾患におけるそれらの使用に関する。

#### 【0209】

##### 結果

M1P1ドメイン標的化抗体は、KCNK9チャネル活性を阻害する：天然のhKCNK9構造を再現する抗原を生成するために、M1P1ドメイン（図1B、図1C）をCHO-SおよびHEK293T細胞中で組み換えタンパク質として発現させ、3-D構造の提示および翻訳後修飾を最適化した（図1D、図2A、図2B）。40のネズミmAbがうまく生成された。その中で、4つのmAbをhK9M1P1-mIgGへと成長させ、Y-mAbと命名し、36のmAbをhGH-hK9M1P1へと成長させ、H-mAbと命名した。全てのmAbはIgG1サブタイプであり、KCNK9に最も密接に関連するK2Pメンバーのうち、hKCNK3を含む他のK2Pサブタイプを上回るhKCNK9へのサブタイプ特異的結合を示した（図3A、図3B、図4）。Y-mAbは、最も親和性が高いY4（ $K_D \sim 0.7\text{nM}$ ）を有する組み換えhKCNK9抗原への結合のナノモル～サブナノモルの親和性を示すことが見出された。Y-mAbはまた、組み換えマウスKCNK9（mKCNK9）M1P1ドメインとより低い親和性で交差反応した（図3C、図3D、図5）。交差反応性の程度は、Y-mAbによって異なった。ヒトおよびネズミのKCNK9 M1P1ドメインは、わずか5アミノ酸だけ異なり（図1C）、Y-mAbによって認識される特有のエピトープについての洞察を提供する。

#### 【0210】

hKCNK9チャネルに対するY-およびH-mAbの効果を試験するために、hKCNK9化学スクリーニング用に以前に開発されたタリウム（ $\text{TI}^+$ ）ベースの蛍光イオン流出アッセイを使用した（非特許文献46；非特許文献8）。このアッセイでは、記録された蛍光シグナルは、細胞表面上の開いた $\text{K}^+$ チャネルの数に比例する（図6A）。12のmAbは、 $\text{TI}^+$ アッセイで使用されたhKCNK9発現HEK293細胞の表面に陽性染色を示した（図6B）。これらの12のmAbのうち6つは、プレインキュベーションプロトコール後のhKCNK9コンダクタンスの阻害に有効であった。この応答は、蛍光測定の間0における同等の蛍光強度によって示される細胞生存率の差異によるものではなかった（図6C、図7A、図7B、図7C）。これらの中でも、Y4は、36時間のmAbインキュベーション後に、最大30%の $\text{TI}^+$ シグナル阻害を示す最も強力なものであった。したがって、追跡調査のためにY4を選択した。経時的実験は、Y4介在性チャネル阻害が、より長いばく露後に（図6C、図6D、図8）およびmAb濃度に依存して（図6E）より強くなることを示した。チャネルコンダクタンスに対するmAbの急性効果も電気生理学的アッセイを用いて調査し、いずれのmAbも、hKCNK9活性に対して検出可能な効果を示さなかった（図9A、図9B）。

#### 【0211】

Y4は、細胞表面でチャネルエンドサイトーシスを誘導することによってKCNK9を阻害する：Y4介在性チャネル阻害の時間依存性は、Ab誘導性エンドサイトーシスの機構を示唆した（非特許文献50；非特許文献51；非特許文献52）。フローサイトメトリーを用い、この可能性を調べた。hKCNK9を過剰発現するCOS-7細胞を抗体とともに12時間37°Cでインキュベートし、細胞表面に残っているチャネルをポリクローナルウサギ抗hKCNK9抗体を用いて染色した。フローサイトメトリー分析は、Y4処理細胞では表面染色の減少を示したが、他のmAbで処理した細胞では示さず（図10A、図10B、図10C）、Y4によるエンドサイトーシス誘導を支持する。さらなる分析のために、共焦点顕微鏡法を用いて蛍光標識Y4を追跡した。Y4の蛍光結合は、hKCNK9に対するその結合親和性を変化させなかった（図11A、図11B）。hKCNK9発現細胞とのインキュベーション時に、核周囲領域において主に見られる細胞内シグナルの増加と連動した表面シグナルの一貫した低下が、エンドサイトーシスを許容する温度でのみ観察された。内在化Y4は、初期エンドソームマーカであるEEA1と共局在化した（図6F）。この現象は、hKCNK3を発現する細胞において変

化が検出されなかったため、hKCNK9に特異的である(図6F)。まとめると、これらのデータは、イオン流入アッセイにおける細胞表面チャネル活性の低下が、mAb誘導性内在化およびエンドサイトーシスに起因することを示している。

#### 【0212】

Y4は、がん細胞株において発現される内因性KCNK9を認識する：KCNK9ゲノム増幅およびタンパク質過剰発現が、乳がんおよび肺がん患者の約30%で報告されている(非特許文献5)。KCNK9の強制発現は、マウス胚線維芽細胞の腫瘍増殖能を促進し、この形質転換は優性阻害KCNK9突然変異体によって排除され、腫瘍増殖中のKCNK9の役割を示唆している(非特許文献5；非特許文献6)。KCNK9の臨床的関連を評価するために、公開されたデータセットを用いてKCNK9発現と患者の生存との相関を分析した。KCNK9の高発現は、扁平上皮細胞がんおよび乳がん患者の総生存期間の短縮と有意に相関していた。KCNK3発現と患者の生存との間に有意な相関は見られなかった(図12A)。これは、KNCK9が腫瘍増殖を促進し、KCNK9発現がんの治療標的であり得るという考えを支持する。

10

#### 【0213】

Y4がK2Pサブタイプ特異的にhKCNK9に結合して阻害することを考えると、Y4介在性チャネル調節は、がん生物学における内因性KCNK9の役割を調べる有利な戦略を提供する。BEN扁平上皮細胞肺がん細胞株は、hKCNK9をmRNAレベルで豊富に発現することが既に示されている(非特許文献6)。これは、Y4を用いてタンパク質レベルで確認された(図12B)。続いて、qRT-PCR(図13A)によってヒトおよびマウスのがん細胞株のパネルをスクリーニングし、続いてウェスタンブロットおよびフローサイトメトリー分析による検証により、高hKCNK9発現の細胞株を同定した。BENに加えて、BT-549乳がん細胞株および小細胞肺がんのLX22患者由来異種移植からの細胞は、比較的高いレベルでhKCNK9を発現することが判明した。一方、MDA-MB-231乳がん細胞株は、検出不能なチャネル発現を有し、陰性対照として選択された(図12B)。マウスKCNK9(mKCNK9)発現は、転移性および非転移性マウス乳がん細胞株で見られた(図13B)。2つの転移性細胞株66.1および410.4においてより高い発現レベルが見出され、転移におけるKCNK9のこれまで調べられていない潜在的役割を示唆している。410.4細胞で染色されたY4は、mKCNK9との十分な交差反応性を示した(図12B)。興味深いことに、BENおよびBT-549細胞株の両方は、hKCNK9の表面染色に基づいて2つの細胞集団を示し、K9<sup>+</sup>細胞およびK9<sup>-</sup>細胞と命名した(図14)。これらの2つの亜集団がhKCNK9発現以外に本質的な相違を有するかどうかを調べるために細胞周期分析を実施し、K9<sup>+</sup>BEN亜集団は、K9<sup>-</sup>BEN亜集団と比較して、S+G<sub>2</sub>/M期で34%の細胞濃縮を示した(図12C)。これは、hKCNK9の発現および/または機能が細胞周期の進行に関連していることを示唆している。実際、カリウムチャネルは、細胞周期に依存した発現、局在化および機能を示し、それが細胞周期の進行および増殖を調節することが報告されている(非特許文献53)。

20

30

#### 【0214】

Y4によるKCNK9の阻害は、細胞生存率を低下させ、細胞死を増加させる：優性阻害突然変異体またはshRNAの強制発現によるKCNK9の阻害は、がん細胞株の増殖を25~65%阻害することが示されている(非特許文献6；非特許文献54)。HEK293におけるトランスジェニックhKCNK9の内在化の誘発に対するY4の効果と同様に、本発明者らは、Y4がBEN細胞株における内因性KCNK9の内在化を誘導し、KCNK9陽性細胞を21.7%減少させ、KCNK9陽性細胞における全蛍光を9.8%減少させたことを見出した。hKCNK9機能のY4介在性調節が任意の生物学的結果をもたらすかどうかを評価するために、BEN、BT-549、MDA-MB-231、LX22および410.4細胞を、抗体で24~72時間、10%血清または0.1%血清中で処理した。0.4mg/mlのY4は、K9<sup>+</sup>BEN、BT-549、LX22および410.4細胞の生存率を有意に抑制したが、K9<sup>-</sup>BENまたはMDA-MB-231細胞は生存率を有意に抑制しなかった(図12D)。ヒトがん細胞株を使用した結果と一致して、Y4は410.4細胞生存率を阻害するのに有効でもあり、その細胞死を増加させた(図12D)。K9<sup>+</sup>BEN細胞およびLX22細胞における阻害は0.1%血清でより顕著であり、低血清におけるKCNK9突然変異体のより顕著な効果を示す以前の報告と一致した。

40

#### 【0215】

50

細胞生存率の変化は、細胞増殖、細胞死または代謝の変化に起因し得る。Y4の生物学的効果をさらに解明するために、Y4が細胞死に及ぼす影響を、mAb処理後の細胞からのL-乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出を測定することによって調べた。Y4は、K9<sup>+</sup>BEN、BT-549、LX22 および410.4細胞の有意な細胞死を誘導した。LDHの有意な放出は、K9<sup>-</sup>BENまたはMDA-MB-231細胞では検出されなかった (図 1 2 E)。これは、観察された細胞生存率の低下が、Y4によって誘発された細胞死の増加に起因し得ることを示唆する。生存効果と標的の存在量との相関は、KCNK9特異的機構と一致する。

#### 【 0 2 1 6 】

ネズミIgG1アイソタイプは、エフェクター機能を媒介する能力を有する。Y4が補体依存性細胞傷害性 (CDC) を誘発する能力があるかどうかを調べるために、細胞を連続希釈したネズミ補体の存在下でY4と共に2時間インキュベートし、細胞傷害性をLDH放出として測定した。Y4は、K9<sup>+</sup>BENおよびBT-549細胞に対するCDCの誘導に有効であった。このエフェクター応答は補体濃度に依存したが、一方でK9<sup>-</sup>BEN細胞において、または補体が熱不活性化された場合には効果が見られなかった (図 1 2 E)。

#### 【 0 2 1 7 】

Y4は *in vivo*での腫瘍増殖を抑制する：mAbベースのKCNK9標的化の治療効果を調べるために、4mg/kgのY4をヌードマウス腹腔内 (i.p.) に、BEN皮下移植の同日に投与し、腫瘍発生時のmAbの影響を観察するか、または目に見える腫瘍が形成された後に投与し、確立した腫瘍への影響を観察した。Y4は、両方の実験計画において、腫瘍増殖を効果的に抑制した (図 1 5 A、図 1 5 F)。Y4の全身投与は、体重の劇的な変化がないことから示唆されるように、マウスにおいて十分に許容された (図 1 5 B、図 1 5 G)。Ki67および切断型カスパーゼ-3免疫組織化学を用いて、腫瘍成長速度の差が、細胞増殖の減少またはアポトーシスの増加にそれぞれ起因するかどうかを判定した。Y4で処理した腫瘍は、mIgG1処理腫瘍と比較して、より低い増殖指数およびより高いアポトーシス指数を示した (図 1 5 C、図 1 5 D、図 1 5 H、図 1 5 I)。Y4処理腫瘍由来のタンパク質抽出物も、hKCNK9の減少を示した (図 1 5 E、図 1 5 J)。本発明者らは、非常に侵襲性の強い小細胞肺癌の患者由来の異種移植片モデルであるLX22におけるY4の *in vivo*効果を検証し、腫瘍増殖阻害、増殖指数の低下およびKCNK9下方制御について同様の結果を見出した (図 1 5 K、図 1 5 L、図 1 5 Mおよび図 1 5 N)。これらの結果は、Y4処理が、増殖および/またはアポトーシスに影響を及ぼすことによって腫瘍増殖を妨げることができ、腫瘍関連KCNK9を下方制御することを示している。

#### 【 0 2 1 8 】

Y4は、*in vivo*での転移を抑制する：Y4がCDCを誘発することができることから、抗体-抗原相互作用による直接殺傷に加えて、抗腫瘍免疫成分の活性化によって治療的有用性が得られることは妥当である。Y4とmKCNK9との交差反応性は、免疫応答性モデルにおけるKCNK9の役割を調査し、腫瘍細胞のY4誘導性免疫標的化の可能性を調べる利点を提供した。410.4細胞を免疫担当BALB/cByJマウスの尾静脈に注射し、Y4の肺転移に対する効果を調べた。肺コロニーの定量化に基づいて、Y4処理動物は有意に少ない肺転移を示し、毒性は検出されなかった (図 1 6 A)。これらのデータは、Y4が原発腫瘍形成に対してのみならず、転移に対しても有効であることを示唆している。これは、KCNK9阻害による直接効果、またはmAbエフェクター機能を介した腫瘍細胞への免疫応答の上昇に起因する可能性がある。本発明者らは、肺組織からmRNAを抽出し、免疫マーカーの発現を特性評価した (非特許文献 5 5)。Y4処理マウスは、CD56+ナチュラルキラー細胞、グランザイムB+細胞傷害性T細胞の高い浸潤およびT細胞化学誘引物質ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド-9の増加を示した (図 1 6 B)。本発明者らは、ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド-9の強制発現が、ナチュラルキラーおよびT細胞に關与する機構によってネズミ乳がん細胞の増殖および転移を阻害することを以前に示した (非特許文献 5 6)。

#### 【 0 2 1 9 】

免疫エフェクター応答を誘発するY4の可能性を探索するために、*in vitro*でCDCおよびADCCアッセイを行った。本発明者らは、LDHアッセイ前に、ネズミ補体の存在下で、がん細胞

10

20

30

40

50

胞をY4と共に2時間インキュベートした。Y4は、K9+BENおよびBT-549細胞に対するCDCの誘導に有効であった。この応答は補体濃度に依存したが、一方でK9+BEN細胞において、または補体が熱不活性化された場合には効果が見られなかった(図16C)。Y4誘導性ADCCの可能性を調べるために、本発明者らは、ADCC研究用に確立された生物発光Jurkat T-レポーター細胞の存在下で、BEN細胞をY4濃度を増加させながらインキュベートした(非特許文献57)。本発明者らは、ルシフェラーゼ活性によって示されるように、ADCCの用量依存性誘導を見出した(図16D)。これらのin vitro知見に基づいて、転移のY4介在性阻害は、細胞自律作用および/または免疫依存性経路の両方に関与し得ると考えられる。

#### 【0220】

免疫系の可能な役割を解明するために、治療用抗体によって誘発される細胞ベースの抗腫瘍応答を特性評価するために使用される免疫マーカー、肺組織から抽出したmRNAを分析した(非特許文献55)。Y4処理マウスは、CD56<sup>+</sup>ナチュラルキラー細胞、グランザイムB<sup>+</sup>細胞傷害性T細胞およびCD25<sup>+</sup>調節性T細胞を含むT細胞ならびにT細胞化学誘引物質CXCL-9の増加により示されるように、免疫細胞のより高い浸潤を示した。これは、Y4介在性肺転移阻害が、部分的に、Y4のエフェクター機能を介した抗腫瘍免疫応答の活性化に起因し得ることを示唆する。したがって、免疫調節剤または細胞ベースの療法と組み合わせたY4は、治療的有用性をもたらし得る。

#### 【0221】

##### 討論

本開示の主題は、チャンネル内在化を誘導することによってKCNK9の機能を選択的かつ効果的に阻害する新規mAbに基づく戦略を開示する。さらに、この戦略を使用して、本開示の主題は、原発腫瘍増殖および転移を促進するKCNK9の極めて重要な役割を開示する。ヒトゲノムは、400を超えるイオンチャンネル遺伝子をコードする。その膨大な数と多様性により、イオンチャンネルは、神経や筋肉の興奮、ホルモン分泌、細胞増殖、学習および記憶を含む広範囲の生物学的過程を媒介することができる。結果として、イオンチャンネル機能の欠陥は、しばしば、大きな生理作用がある。今日までに、60を超える種々のイオンチャンネル遺伝子における突然変異がヒト疾患を引き起こすことが判明している(非特許文献58)。この臨床的意義のために、イオンチャンネルは2番目に大きい薬物標的クラスを構成する(非特許文献59)。精力的な治療研究にもかかわらず、特性評価されたイオンチャンネルの40%には既知リガンド/薬物は報告されておらず、残りの60%の阻害剤のほとんどは非選択的である。したがって、より選択的な薬剤への関心が高まっている(非特許文献59)。抗体は、最も急成長している治療分野を構成する。がん、自己免疫疾患および炎症性疾患に対する抗体ベースの治療は十分に確立されている(非特許文献60;非特許文献61)。抗体は、イオンチャンネル研究および構造研究のための有効なツールであるが、イオンチャンネルモジュレーターとしての抗体の利用についてはほとんど検討されていない。これは、部分的に、エピトープの低い利用可能性、細胞外ドメインの特異性、ならびに高品質の抗原と、機能的抗体を同定するための有効なスクリーニング戦略とを得る上での技術的課題に起因するものである。おそらくこれが、これまでに生成されたほとんど全ての抗体モジュレーターが、生物活性がほとんどまたは全くないポリクローナルである理由である(非特許文献1)。

#### 【0222】

ヒト乳がんおよび肺がんにおける新規アンプリコンの高分解能マッピングは、KCNK9を単一過剰発現遺伝子として同定した。追跡調査解析により、ゲノム、転写および翻訳レベルでのKCNK9の過剰発現を確認した(非特許文献5)。KCNK9の異所性発現は、腫瘍原性を、そうでなければ非腫瘍原性である細胞へ付与した(非特許文献5)。これらの初期の研究以来、KCNK9の腫瘍形成特性は、乳癌、肺癌、黒色腫および神経膠腫細胞株を含むがん細胞株モデルにおいて研究されてきた(非特許文献6;特許文献54;非特許文献62;非特許文献63)。研究されたがんの種類およびチャンネル機能を操作するために使用される方法に依存して、KCNK9は腫瘍原性に対して異なる効果を与える。例えば、優性阻害突然変異体、アンチセンスshRNAまたは非特異的薬物プロックによるKCNK9の阻害は、肺が

ん、黒色腫および神経膠腫細胞の増殖を抑制した（非特許文献6；特許文献54；非特許文献62）。MDA-MB-231乳がん細胞におけるKCNK9のサイレンシングは、細胞浸潤および遊走を増加させた（非特許文献63）。これらの相違は、細胞増殖および遊走の制御、がんの種類の違い、またはオフターゲット効果におけるKCNK9の異なる役割に起因する可能性がある。KCNK9は、KCNK3とヘテロ二量体を形成することができる。突然変異体およびshRNAベースの標的化は、KCNK9ホモ二量体ならびにKCNK9/KCNK3ヘテロ二量体の機能を妨害し、潜在的にKCNK9機能の相反する解釈を導く可能性がある。これに関して、Y4がKCNK3への検出可能な結合を示さず、エンドサイトーシスを誘導するために結合の高い親和性/結合活性が必要とされる限り、mAbは、KCNK9ホモ二量体の優先的ターゲティングを提供する。さらに、ミトコンドリアKCNK9が報告され、黒色腫細胞増殖に関連していた（非特許文献54）。細胞外mAbモジュレーションは、KCNK9の空間特異的調節を可能にする。実際、この報告で使用されたmAbは、天然のKCNK9チャネルのin vivoでの発癌特性を初めて明らかにし、本研究では、腫瘍増殖および転移における一貫した腫瘍促進特性を得た。

#### 【0223】

KCNK9に加えて多数のK<sup>+</sup>チャネルは、ヒトがんにおいて差次的に発現され、細胞増殖、移動および生存を含む腫瘍原性の様々な局面を調節することが報告されている（非特許文献53）。しかし、細胞シグナル伝達カスケードの不可欠な成分として機能するカルシウムイオン（Ca<sup>2+</sup>）とは異なり、K<sup>+</sup>イオンコンダクタンスがどのように生物学的過程を制御するかは未だにほとんど知られていない。非興奮性細胞および興奮性細胞では、静止膜電位は通常、負の値に維持される。K<sup>+</sup>チャネル、特にK2Pは、膜電位を微調整して規定範囲（-30~-85mV）に保つ。様々なチャネルが開くと、膜電位は、静止膜電位と比較して、過分極してより負になるか、または脱分極してより正になることができる。膜電位の変化は、細胞増殖、接着および遊走を調節する細胞体積動態などの細胞生理を変化させることができる（非特許文献53）。例えば、Ca<sup>2+</sup>活性化K<sup>+</sup>チャネル（K<sub>Ca</sub>）および内向整流K<sup>+</sup>チャネル（K<sub>ir</sub>）は、前縁および後縁における局所細胞体積を調節してがん細胞の遊走および浸潤を促進する能力がある（非特許文献53）。静止膜電位の維持も、電位感受性であるタンパク質の機能および調節に重要である。例えば、K2Pチャネルの開口によって引き起こされる過分極は、Ca<sup>2+</sup>流入を増加させ、細胞周期の進行中にG<sub>1</sub>-S期転移を調節し得る。この研究では、Y4によって誘発された細胞傷害性は低血清濃度でより顕著であることが見出され、KCNK9機能が無血清微環境下で細胞を保護するという以前の知見を裏付けている（非特許文献6）。この保護的役割は、ストレスにตอบสนองして活性化するCa<sup>2+</sup>依存性生存カスケードを介して間接的に仲介され得る（非特許文献64）。膜電位振動は、細胞周期の進行を直接制御し得る。K<sup>+</sup>チャネルは、複数の細胞型において細胞周期に依存した発現、局在化および活性を有することが示されている（非特許文献53）。多くの報告は、膜過分極を伴うK<sup>+</sup>の増加がG<sub>1</sub>-Sの進行で起こり、S期開始に必要なものであることを示している。脱分極は、ネズミ神経芽腫細胞およびMCF-7ヒト乳がん細胞を含む複数の細胞株におけるG<sub>1</sub>/S移行を防止することができる（非特許文献53；非特許文献65；非特許文献66；非特許文献67）。この研究では、細胞周期とKCNK9発現との間に関連性が見出された。KCNK9発現がS+G<sub>2</sub>/M期に不均衡に関連し、KCNK9の開口が過分極を生じるという事実は、KCNK9の発現/活性の増加が細胞周期の進行を促進することを示唆する。これは、mAbによるKCNK9ターゲティングが増殖指数を減少させ、in vivoでの全身腫瘍組織量を減少させたという知見を裏付けるものである。

#### 【0224】

イオンチャネル標的抗体がチャネル機能を乱す複数の機構が存在する。合理的設計によって生成されたほとんどの抗体は、イオン透過経路を塞ぐか、または様々な刺激によるチャネル開閉に必須の様式を変えることによって作用する（非特許文献1；非特許文献68）。本明細書に記載の抗体は、チャネル内在化を誘導する。この作用様式は、後天性ニューロミオトニアなどの腫瘍随伴症チャネル病の研究における自己反応性抗体について報告されている（非特許文献1）。腫瘍抗原は、電位依存性K<sup>+</sup>チャネルを含む腫瘍細胞表面タンパク質に対する自己反応性抗体の生成を誘発すると考えられている。これらの自己反応

10

20

30

40

50

性抗体は、チャンネル内在化を誘導し、神経筋伝達異常を引き起こす（非特許文献69；非特許文献70）。遮断抗体と比較して、内在化を誘導することによって作用する抗体の利点は、有効な阻害が、細胞表面上に発現される抗原の量および密度に依存することである。これは、十分に高いチャンネル発現を伴う腫瘍細胞のみが抗体によって標的化されるような機構に基づく特異性を提供する。さらに、効率的にエンドサイトーシスする抗体は、腫瘍細胞を死滅させるための細胞毒性ペイロードの腫瘍特異的送達を抗体が促進する抗体-薬物複合体を開発するために選択される。したがって、Y4の機構は、それを、細胞傷害性複合体の組み合わせにおける特異性および/または有効性の増強により、望ましい治療指数を有する有利な治療戦略とする。

【0225】

本開示の主題は、イオンチャンネルが抗体によってターゲティング可能であり、このアプローチが治療上の将来性があることを開示している。抗体を開発し特性評価する本明細書に記載の戦略は、他のイオンチャンネルにも適用でき、この研究されていないクラスのチャンネルタンパク質の生理学および病理学的意義についての洞察を提供する。

【0226】

参考文献

本明細書において言及された全ての刊行物、特許出願、特許およびその他の参考文献は、本開示の主題が関連する当該技術分野の当業者のレベルを示す。全ての刊行物、特許出願、特許およびその他の参考文献は、それぞれ個々の刊行物、特許出願、特許およびその他の参考文献が参照により組み込まれることを具体的かつ個別に示しているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。多数の特許出願、特許およびその他の参考文献が本明細書で言及されているが、そのような参考文献は、任意のこれらの文献が当該技術分野における一般知識の一部をなすことを認めるものではないことが理解される。本明細書と任意の組み込まれた参考文献との間に矛盾がある場合、本明細書（組み込まれた参考文献に基づき得るそれらの任意の修正を含む）が支配するものとする。本明細書では、特に明記しない限り、標準的な技術で受け入れられた用語の意味を使用する。本明細書では、様々な用語の標準的な略語を使用する。

【0227】

前述の主題は、理解を明確にする目的で例示および実施例によっていくらか詳細に記載されているが、当業者には、特定の変更および修正を添付の特許請求の範囲内で実施できることが理解されるであろう。

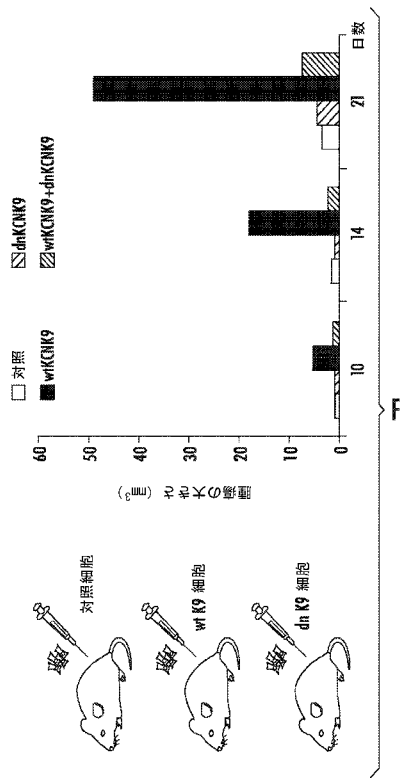
10

20

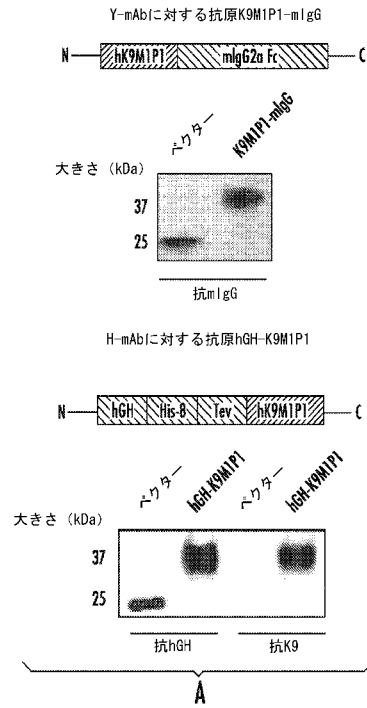
30



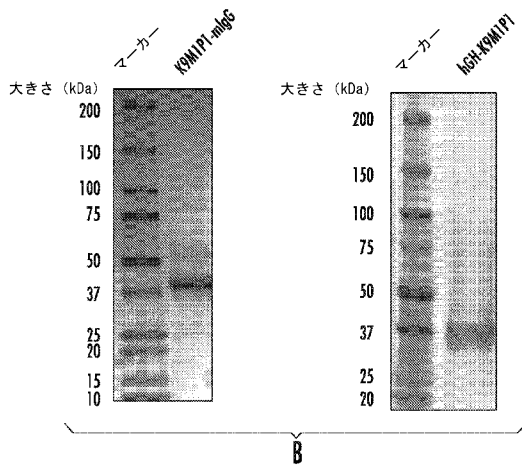
【 図 1 F 】



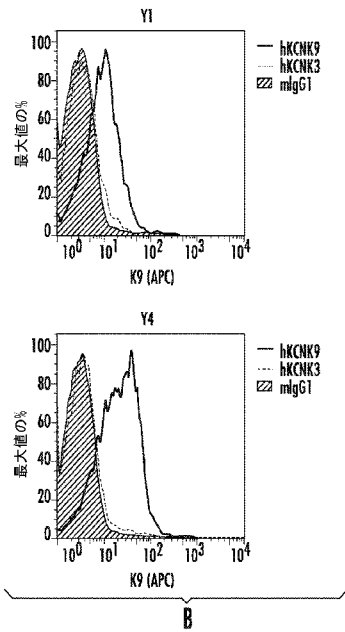
【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



【 図 3 B 】



【 図 3 A 】

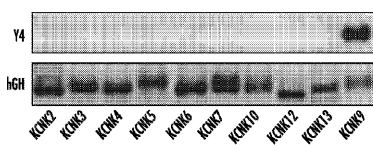


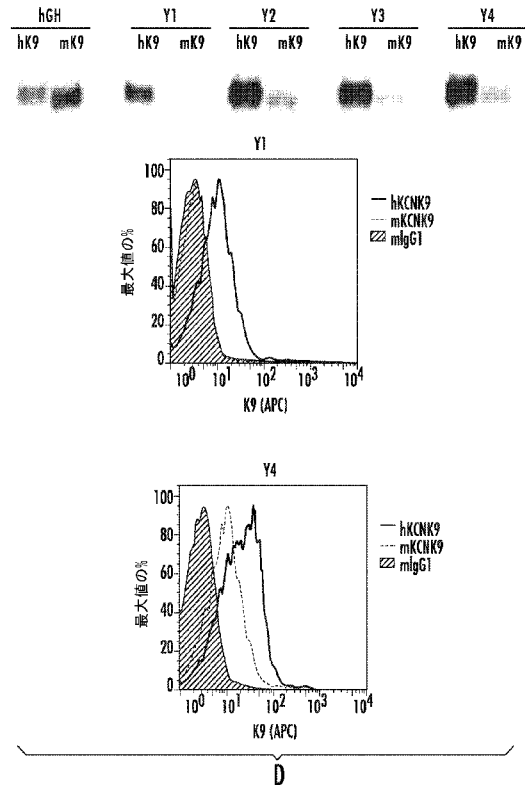
FIG. 3A

【 図 3 C 】

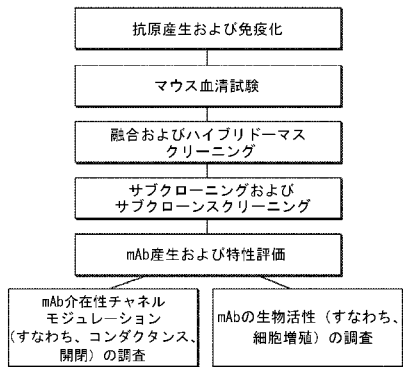
hKCNK9 ESDHEMREEEKLKAEVRYEGKYNISSSDYQGLELVILQSEPHRAGVQWK ( 配列番号 .45 )  
 mKCNK9 ESDHEMREEEKLKAEVRLRGKYNISSSDYQGLELVILQSEPHRAGVQWK ( 配列番号 .46 )

	K <sub>D</sub> (nM)	
	hKCNK9	mKCNK9
Y1	3.1	2950
Y2	2.2	81.8
Y3	2	61.5
Y4	0.7	28.3

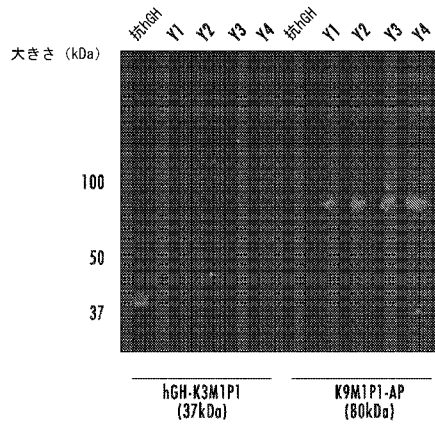
【 図 3 D 】



【 図 3 E 】



【 図 4 】



E

【 図 5 】

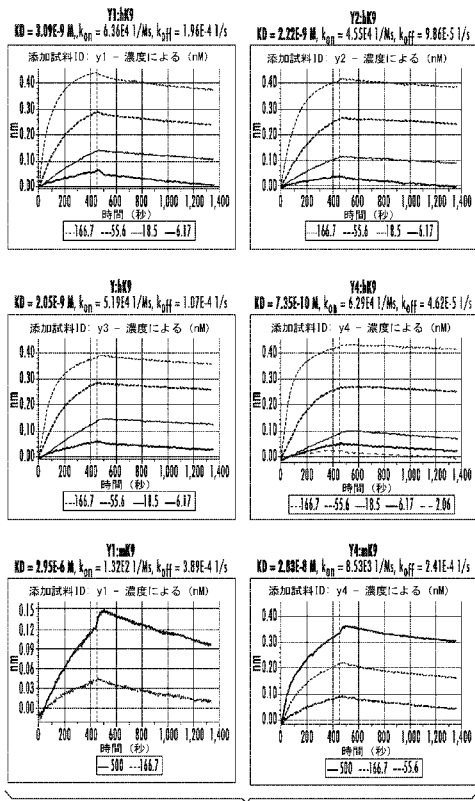
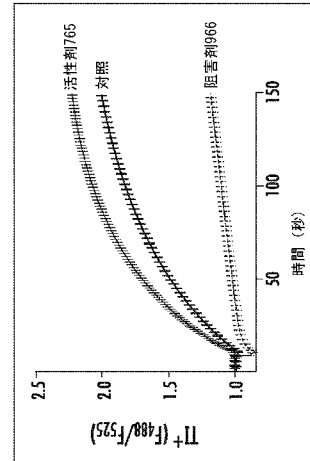
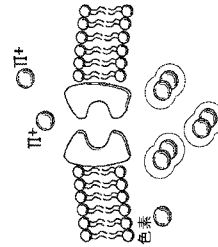


図5

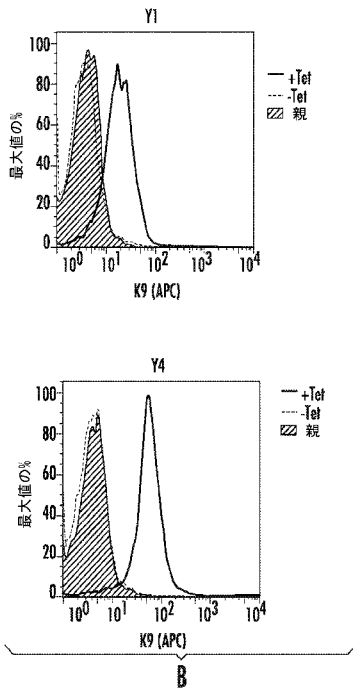
【 図 6 A 】



A

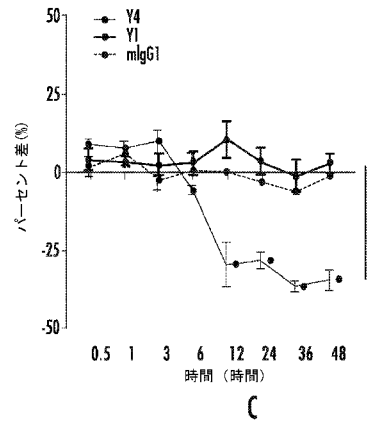


【 図 6 B 】



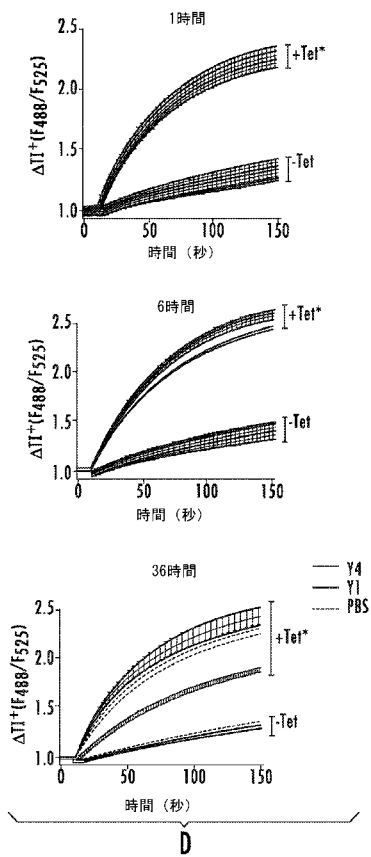
B

【 図 6 C 】

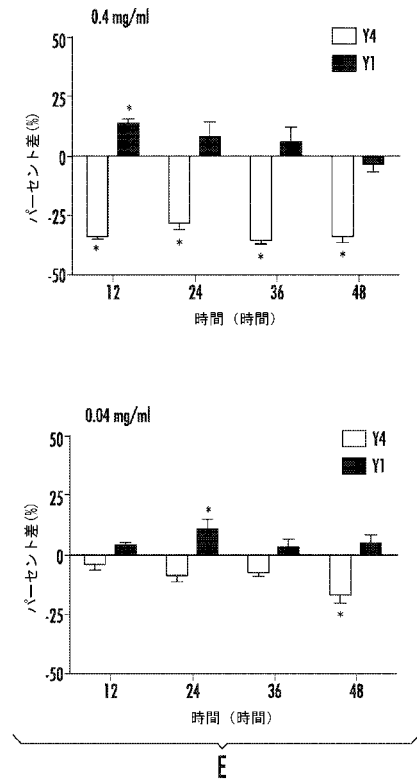


C

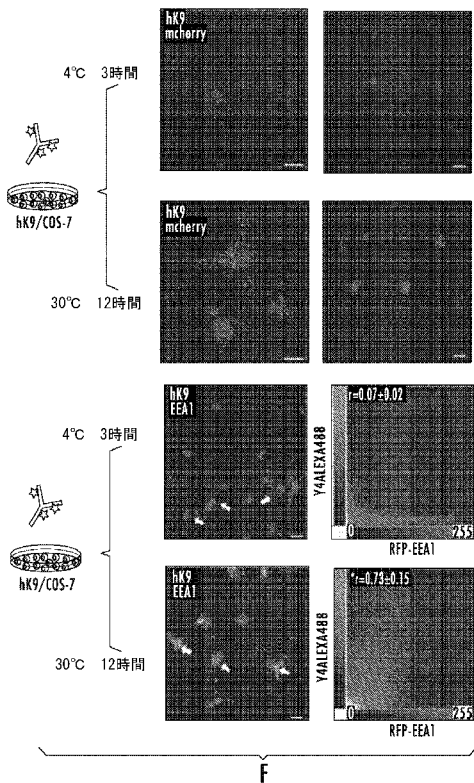
【 図 6 D 】



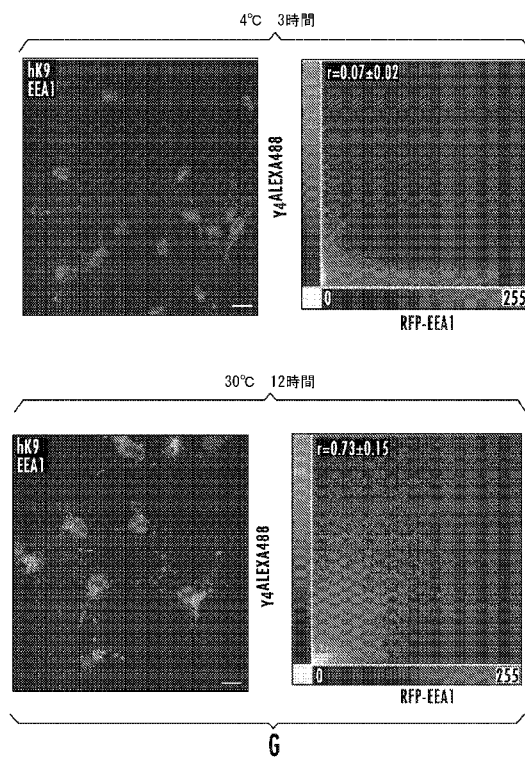
【 図 6 E 】



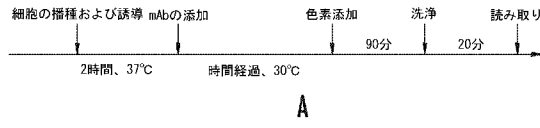
【 図 6 F 】



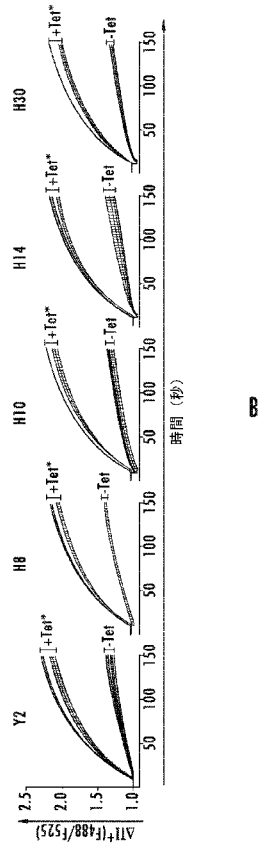
【 図 6 G 】



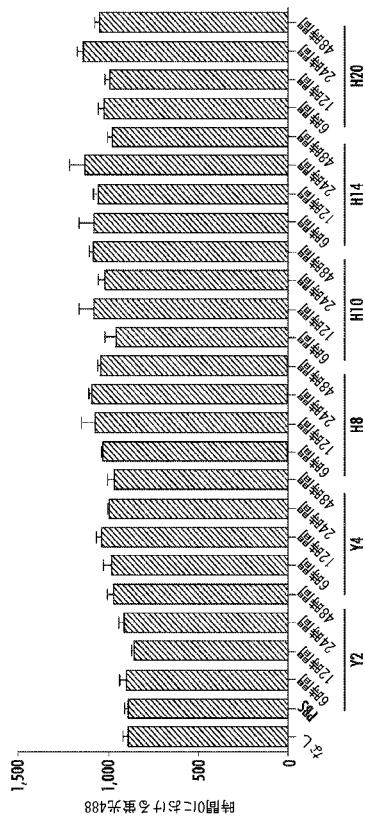
【 図 7 A 】



【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 】

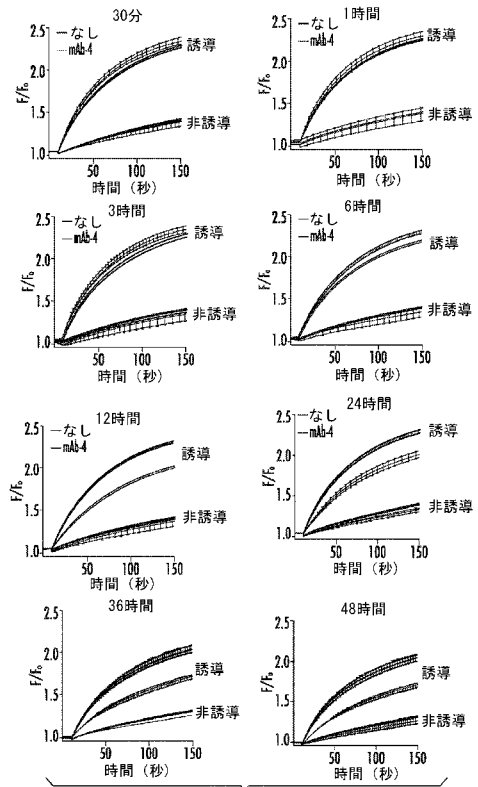
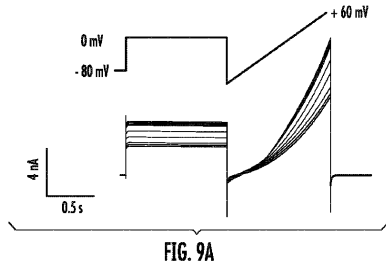
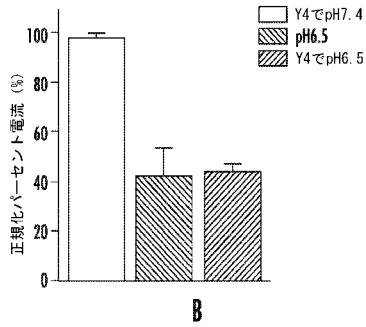


図8

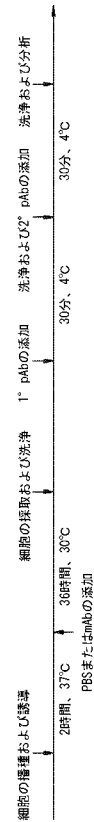
【 図 9 A 】



【 図 9 B 】



【 図 10 A 】

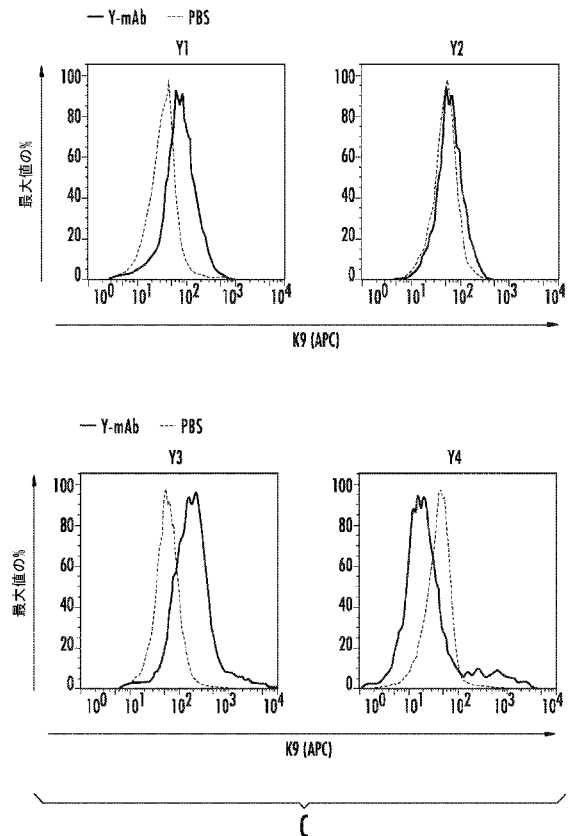


【 図 10 B 】

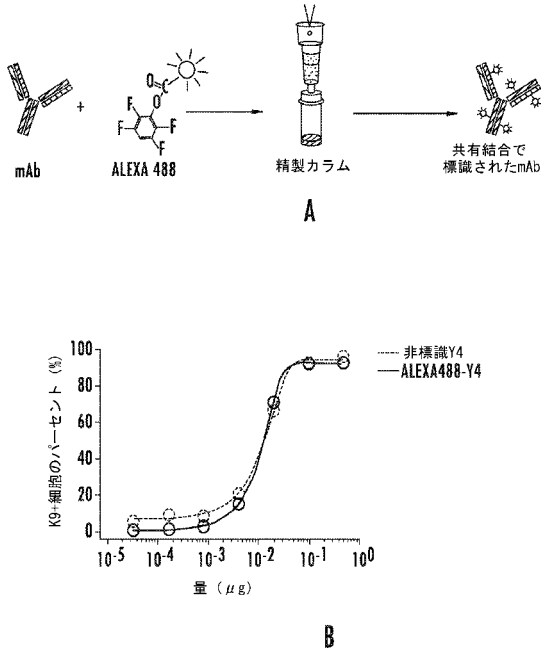
処理	hK9+細胞における差 (%)
Y1	+ 3.1%
Y2	+ 0.8%
Y3	- 0.2%
Y4	- 15.6%

B

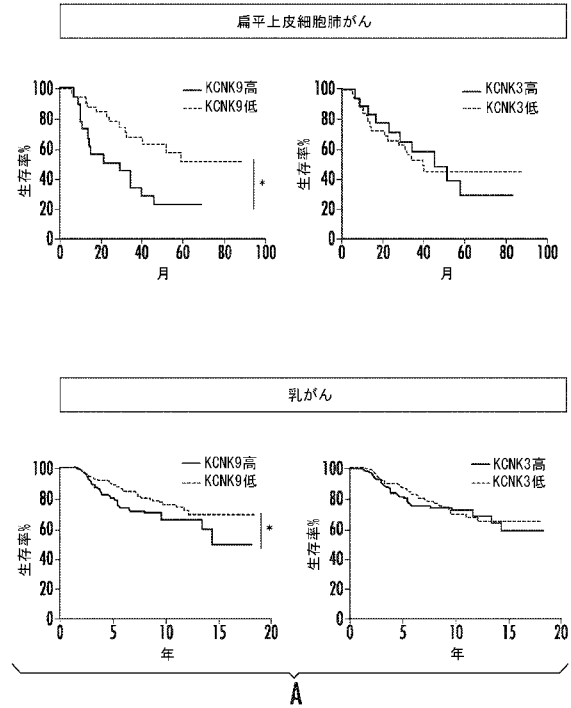
【 図 10 C 】



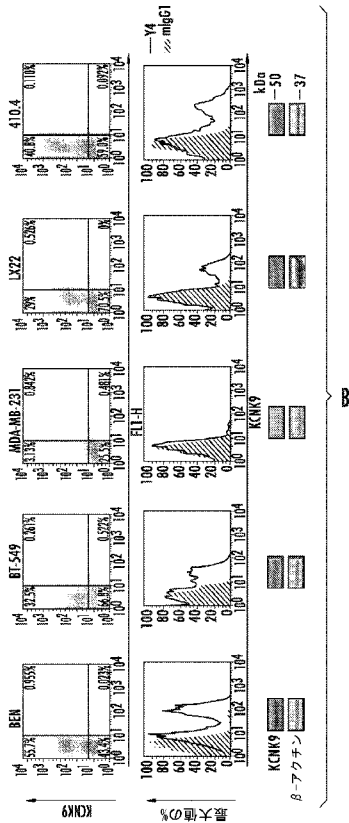
【図 1 1】



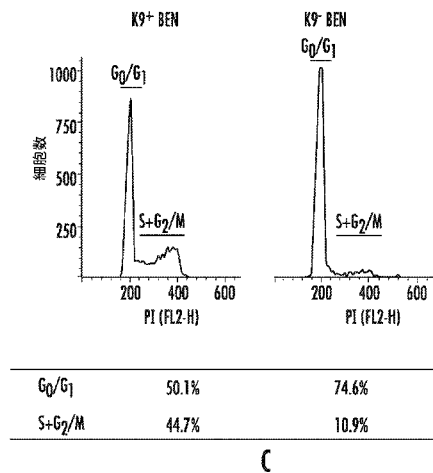
【図 1 2 A】



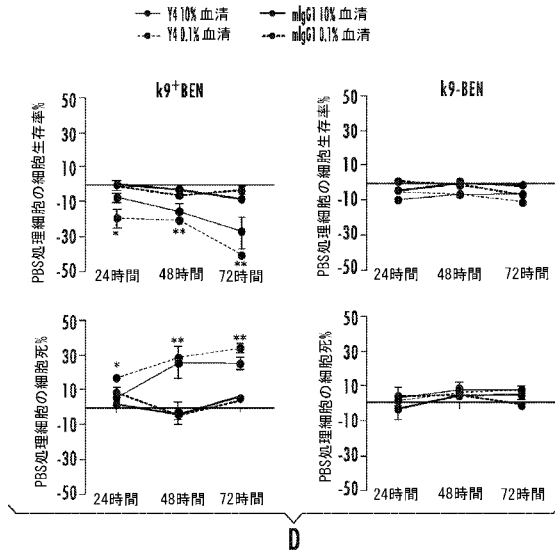
【図 1 2 B】



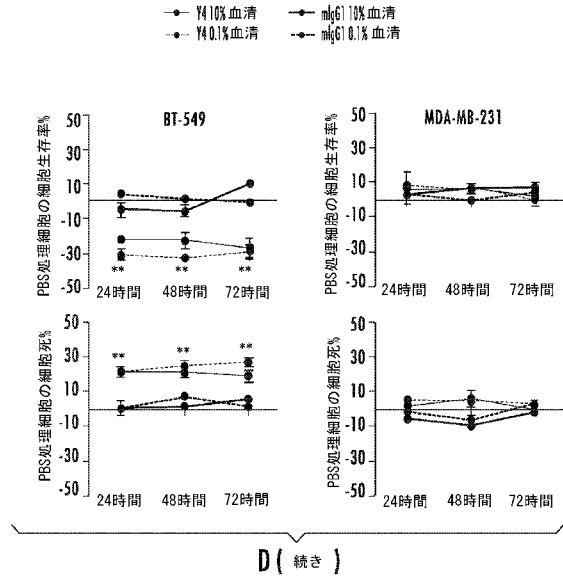
【図 1 2 C】



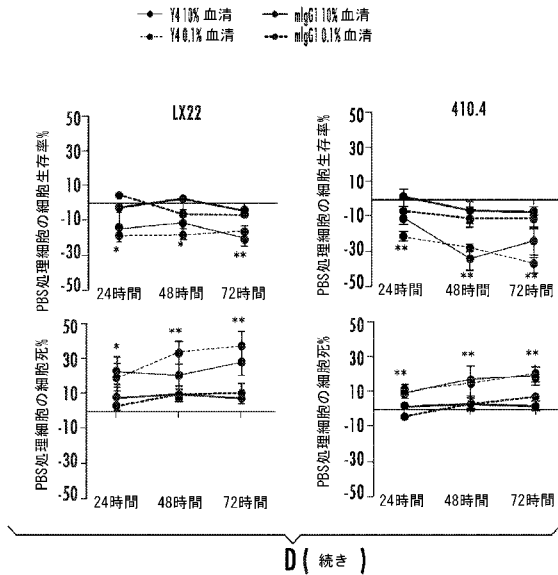
【 図 1 2 D - 1 】



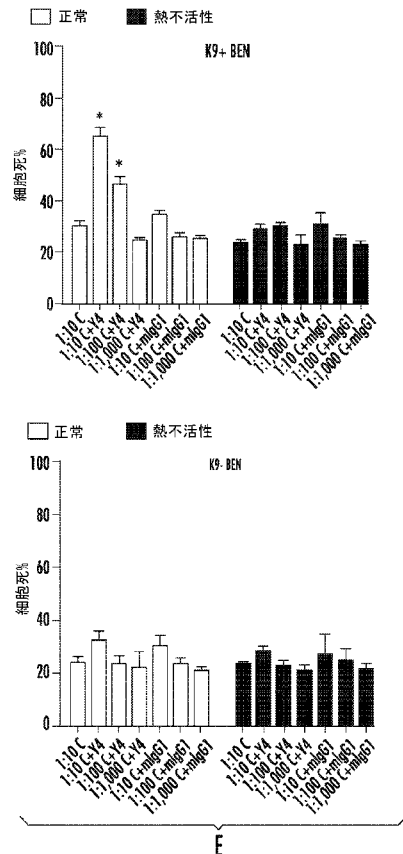
【 図 1 2 D - 2 】



【 図 1 2 D - 3 】

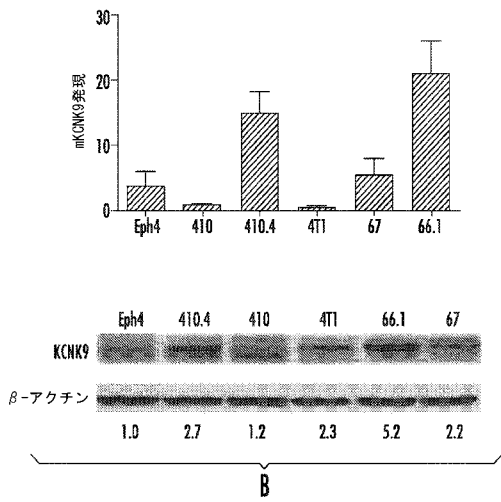


【 図 1 2 E - 1 】

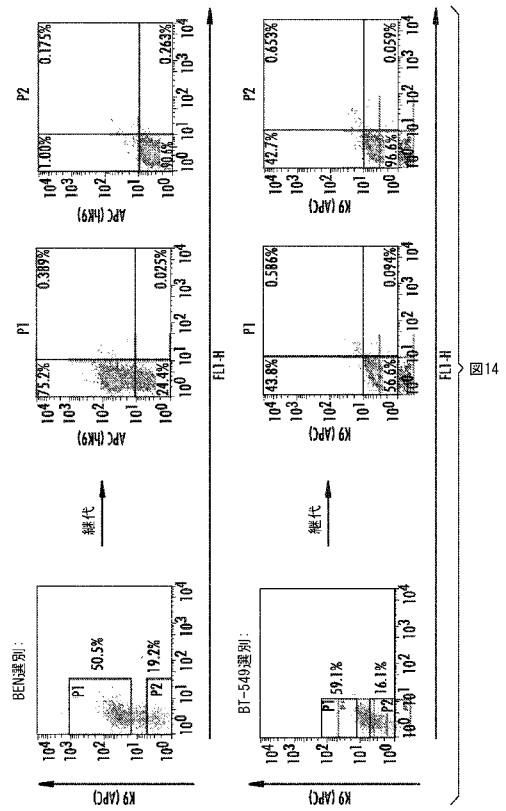




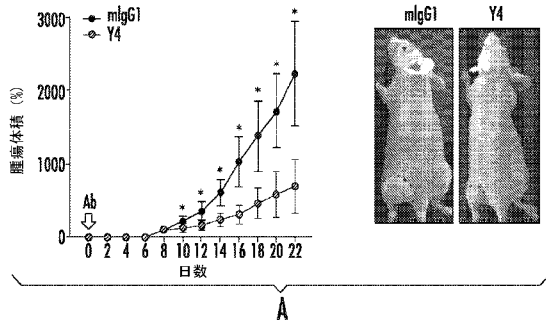
【 図 1 3 B 】



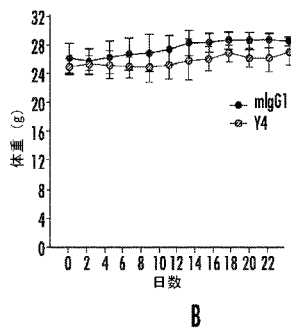
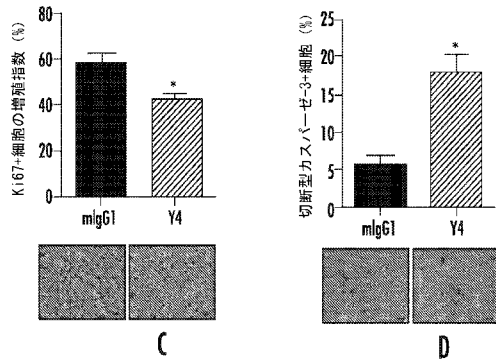
【 図 1 4 】



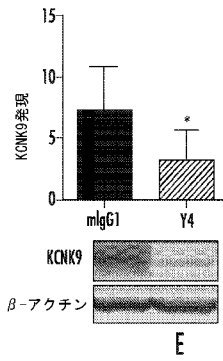
【 図 1 5 - 1 】



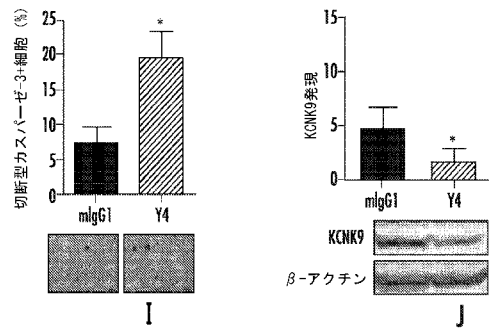
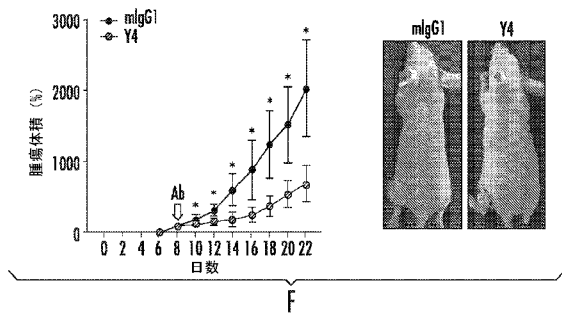
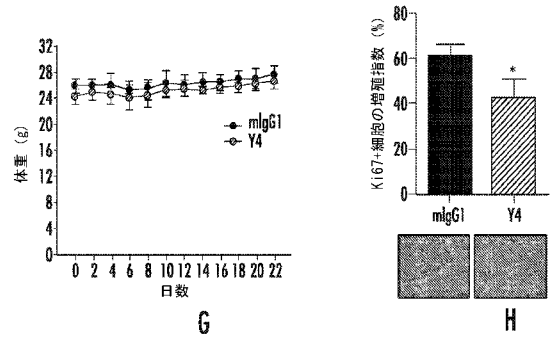
【 図 1 5 - 2 】



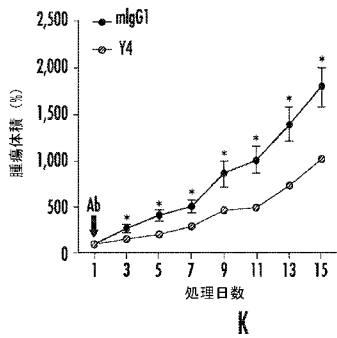
【 図 1 5 - 3 】



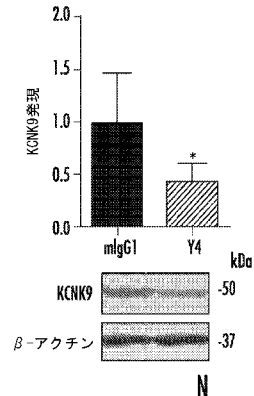
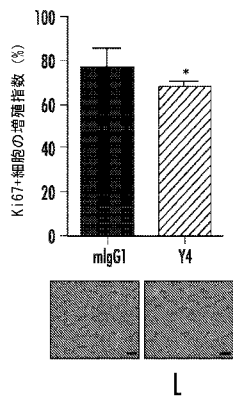
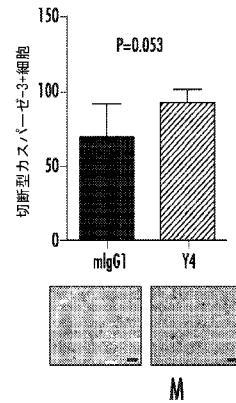
【 図 1 5 - 4 】



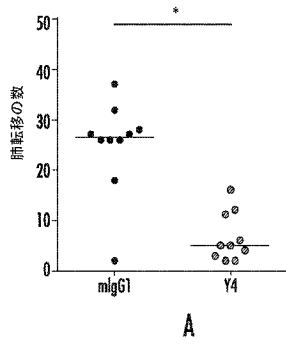
【 図 1 5 - 5 】



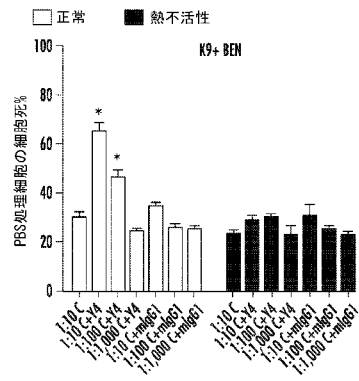
【 図 1 5 - 6 】



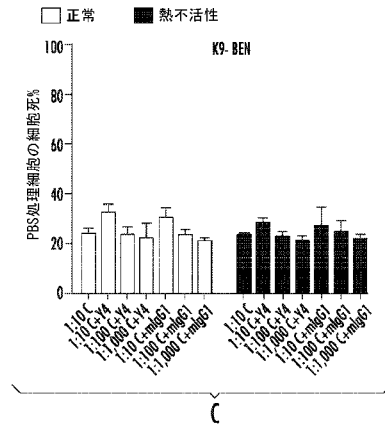
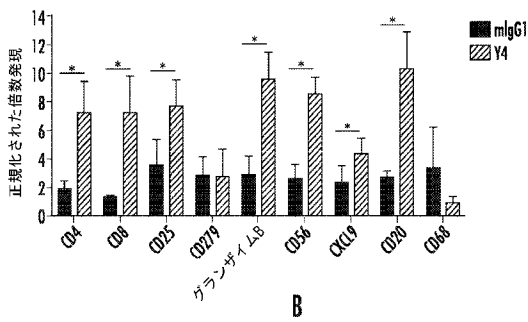
【 図 1 6 A 】



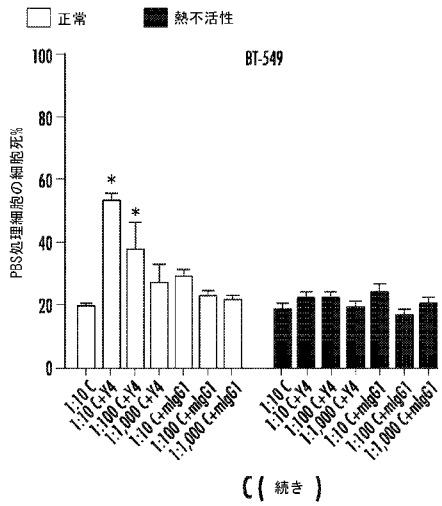
【 図 1 6 C - 1 】



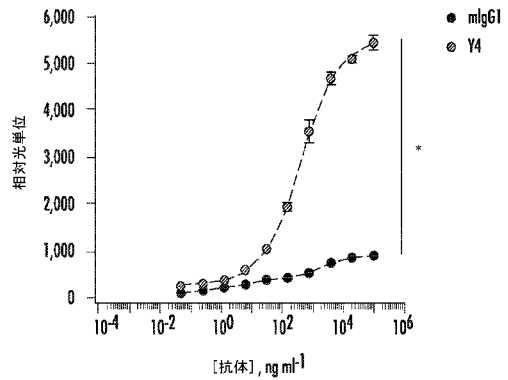
【 図 1 6 B 】



【 図 1 6 C - 2 】



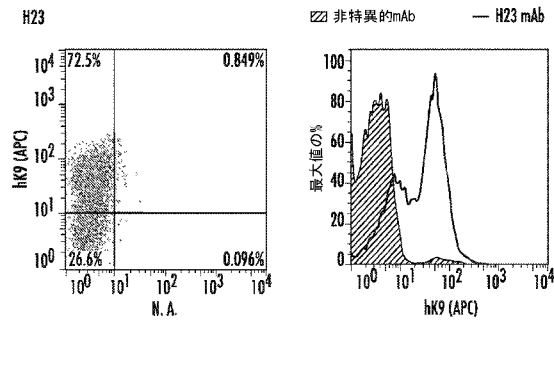
【 図 1 6 D 】



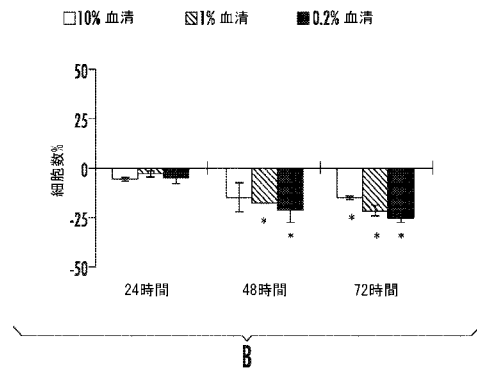
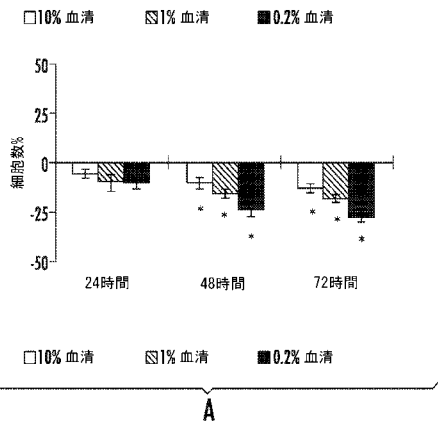
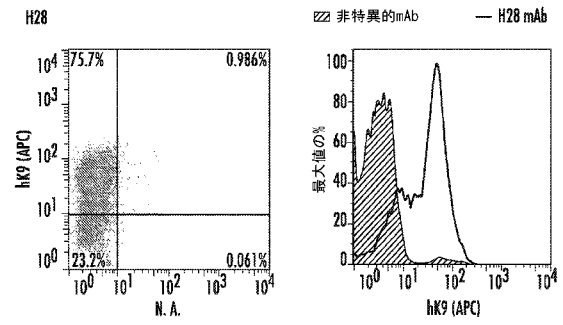
	EC50, ng ml <sup>-1</sup>	誘導、フォールドチェンジ
Y4	415 ± 36	29 ± 0.4
mgIg1	1,121 ± 605	4 ± 0.5

D

【 図 1 7 A 】



【 図 1 7 B 】



【 配 列 表 】

2018516230000001 . app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/US2016/023144</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>C07K 16/28(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61K 47/48(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</b>		
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) C07K 16/28; A61K 31/47; A61K 31/4412; G01N 33/68; A61K 39/395; A61K 47/48; A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: KCNK9, M1P1 domain, potassium channel, cancer, antibody		
<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	CLARKE et al., 'The M1P1 loop of TASK3 K2P channels apposes the selectivity filter and influences channel function' Journal of Biological Chemistry, Vol.283, No.25, pp.16985-16992 (2008) See abstract.	1-3
X	KIM et al., 'TASK-3, a new member of the tandem pore K+ channel family' Journal of Biological Chemistry, Vol.275, No.13, pp.9340-9347 (2000) See abstract; and figure 2.	1-3
A	HUANG et al., 'Targeting potassium channels in cancer' The Journal of Cell Biology, Vol.206, No.2, pp.151-162 (2014) See the whole document.	1-3
A	US 2009-0149496 A1 (BRENDDEL et al.) 11 June 2009 See the whole document.	1-3
PX	SUN et al., 'A monoclonal antibody against KCNK9 K+ channel extracellular domain inhibits tumour growth and metastasis' Nature Communications, Vol.7, Article No.10339, Internal pages 1-12 (04 February 2016) See abstract; and pages 2, 3, 8, 9.	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 June 2016 (21.06.2016)		Date of mailing of the international search report <b>21 June 2016 (21.06.2016)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/023144

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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.: 24-26,29-38  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 24-26 and 29-38 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv), to search.
2.  Claims Nos.: 14,17,19,21,28,30,35,37,38  
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:  
Claims 14, 17, 19, 21, 28, 30, 35, 37 and 38 refer to one of claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a).
3.  Claims Nos.: 4-13,15,16,18,20,22-27,29,31-34,36  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

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 fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
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.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2016/023144**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0149496 A1	11/06/2009	EP 2012758 A2 JP 2009-534434 A JP 5161871 B2 KR 10-1390239 B1 KR 10-2008-0111509 A WO 2007-124849 A2 WO 2007-124849 A3	14/01/2009 24/09/2009 13/03/2013 30/04/2014 23/12/2008 08/11/2007 08/10/2009

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/65	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/51	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	
A 6 1 K 51/10 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	A 6 1 K 51/10	2 0 0
	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 15/00	A

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

(74)代理人 230118913

弁護士 杉村 光嗣

(74)代理人 100181847

弁理士 大島 かおり

(72)発明者 ジョン ジェイ ラテラ

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 1 2 ボルチモア セント アルバンス ウェイ 5 4 0 1

(72)発明者 ミン リー

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 0 9 3 ルーザービル ティモニアム バッドリー サークル 6 6 7

(72)発明者 ハン スン

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 1 ボルチモア チャールズ ブラザ 8 アpartment 8 0 4

(72)発明者 エイミー エム フルトン

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 1 2 0 1 ボルチモア ウェスト ボルチモア ストリート 6 5 5

Fターム(参考) 4B064 AG20 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4C076 AA95 BB11 BB13 BB15 BB16 BB25 BB27 CC15 CC17 CC26

CC27 CC29 CC41 EE59

4C084 AA11 AA19 NA05 ZA591 ZA811 ZB021 ZB022 ZB091 ZB092 ZB212

ZB262

4C085	AA14	AA15	BB31	CC23	DD62	EE01	EE03	GG02	GG03	GG04
	GG05	GG06	GG10	HH03	HH11	KA04	KA27	KA29	KB45	KB57
	KB82	LL09	LL12	LL18						
4H045	AA11	AA30	BA10	CA40	DA50	DA75	DA76	EA20	FA74	

专利名称(译)	新型单克隆抗体抑制剂靶向钾通道KCNK9		
公开(公告)号	<a href="#">JP2018516230A</a>	公开(公告)日	2018-06-21
申请号	JP2017549330	申请日	2016-03-18
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学 马里兰大学巴尔的摩分校		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	ジョンジェイラテラ ミンリー ハンスン エイミーエムフルトン		
发明人	ジョン ジェイ ラテラ ミン リー ハン スン エイミー エム フルトン		
IPC分类号	C07K16/28 A61K39/395 A61K47/68 A61K47/65 A61K47/51 A61K45/00 A61P43/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P15/00 A61P11/00 A61K41/00 A61K49/00 A61P37/04 C07K16/46 G01N33/53 A61K51/10 C12P21/08 C12N15/09		
CPC分类号	A61K47/6849 A61K2039/505 A61K2039/545 A61P35/00 C07K16/28 C07K2317/734 C07K2317/76 C07K2317/77 C07K2317/92 G01N33/6872 A61K47/65 C07K2317/24 G01N2333/705 A61K39/3955 A61K39/39558 C07K16/286		
FI分类号	C07K16/28.ZNA A61K39/395.N A61K39/395.T A61K39/395.L A61K47/68 A61K47/65 A61K47/51 A61K45/00 A61P43/00.111 A61P35/00 A61P43/00.105 A61P35/04 A61P15/00 A61P11/00 A61K41/00 A61K49/00 A61P37/04 C07K16/46 G01N33/53.D A61K51/10.200 C12P21/08 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB25 4C076/BB27 4C076/CC15 4C076/CC17 4C076/CC26 4C076/CC27 4C076/CC29 4C076/CC41 4C076/EE59 4C084/AA11 4C084/AA19 4C084/NA05 4C084/ZA591 4C084/ZA811 4C084/ZB021 4C084/ZB022 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/BB31 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4C085/GG10 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB45 4C085/KB57 4C085/KB82 4C085/LL09 4C085/LL12 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	杉村健二		
优先权	62/134724 2015-03-18 US 62/186772 2015-06-30 US		
其他公开文献	JP2018516230A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本公开的主题涉及与哺乳动物KCNK9钾通道的细胞外结构域的至少一个表位特异性结合和/或相互作用的抗体，其抗体片段或衍生物，编码它们的核酸分子，和包含所述核酸分子的载体关于。本公开的主题提供了用于制备所述抗体，抗体片段或其衍生物的方法

以及包含它们的药物组合物，诊断组合物和试剂盒。抑制肿瘤生长和/或转移以抑制表达KCNK9的细胞（例如癌细胞）的增殖或存活以抑制细胞中的KCNK9活性以评估KCNK9表达细胞的存在促进补体依赖性癌细胞的细胞毒性还提供了组合物，试剂盒，身体的方法和用途，抗体片段或其衍生物以及癌症的治疗。

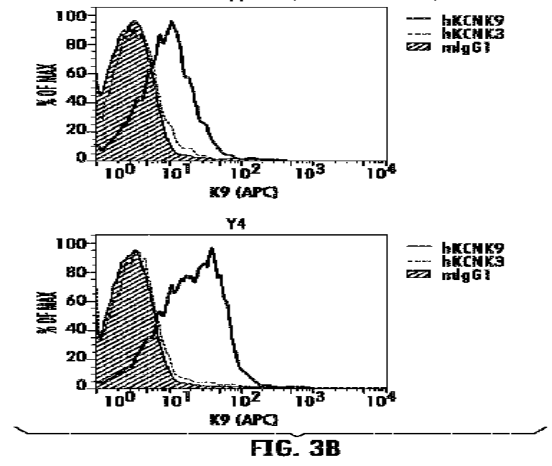


FIG. 3B