

(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2013-542720

(P2013-542720A)

(43) 公表日 平成25年11月28日(2013.11.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 6 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 5
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2013-528731 (P2013-528731)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月20日 (2011. 9. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年5月17日 (2013. 5. 17)
 (86) 国際出願番号 PCT/ES2011/070655
 (87) 国際公開番号 W02012/038573
 (87) 国際公開日 平成24年3月29日 (2012. 3. 29)
 (31) 優先権主張番号 P201031402
 (32) 優先日 平成22年9月21日 (2010. 9. 21)
 (33) 優先権主張国 スペイン (ES)

(71) 出願人 513067532
 フンダシオン セントロ ナシオナル デ
 インベ스티ガシオネス オンコロヒカ
 ス (セエネイオ)
 FUNDACION CENTRO NA
 CIONAL DE INVESTIGA
 CIONES ONCOLOGICAS (C
 NIO)
 スペイン, エ-28029 マドリード,
 3, セ/メルチョル フェルナンデス アル
 マグロ
 C/Melchor Fernandez
 Almagro, 3, E-28029
 Madrid, Spain

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗エフリンー B 2 抗体およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、新規の抗エフリンー B 2 抗体、ならびにこのタンパク質の検出用のその使用、および疾患の処置における血管新生およびリンパ管新生を阻害する医薬としてのその使用に関する。上記過程をともなっている当該疾患は、例えばがんである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 1 と少なくとも 76% の配列同一性のアミノ酸配列を含んでおり、

(b) エフリン B2 を特異的に認識し、エフリン B2 と特異的に結合することを特徴とする単離されているポリペプチド。

【請求項 2】

上記アミノ酸配列は配列番号 1 である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

抗体である、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

上記抗体はヒト型である、請求項 3 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

ヒト型の上記抗体のアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 または IgA である、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

シグナルペプチドをさらに含んでいることを特徴とする、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

上記シグナルペプチドは配列番号 6 である、請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

少なくとも 1 つのマーカ―をさらに含んでいることを特徴とする、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

上記マーカ―は、c-myc、FLAG、HA、ヒスチジン鎖、GST、ビオチン、VSV-G、HSVtk、V5、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、マルトース結合タンパク質および蛍光タンパク質を含んでいるリストから選択される、請求項 8 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

上記マーカ―は、ヒスチジンの鎖、c-myc、または両方である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

上記ポリペプチドの上記アミノ酸配列は配列番号 7 である、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

エフリン B2 に対する抗体であって、当該抗体のアミノ酸配列は、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを含んでいる、抗体。

【請求項 13】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 12 に記載の抗体をコードしている、核酸。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の核酸を含んでいる、ベクター。

【請求項 15】

発現ベクターである、請求項 14 に記載のベクター。

【請求項 16】

請求項 14 または 15 に記載のベクターを含んでいる、細胞。

【請求項 17】

原核生物である、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 18】

真核生物である、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 19】

10

20

30

40

50

哺乳類細胞である、請求項 18 に記載の細胞。

【請求項 20】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 12 に記載の抗体を得る方法であって、

以下の工程：

(a) 細胞において請求項 15 に記載のベクターを発現させること、および (b) 工程 (a) において発現されたポリペプチドを精製することを包含している、方法。

【請求項 21】

上記細胞は原核生物である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

上記細胞は真核生物である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

エフリン B2 の検出および/または定量化の方法であって、

以下の工程：

(a) 単離された生物学的サンプルを、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 12 に記載の抗体と接触させること、ならびに (b) 工程 (a) において使用されたサンプルにおける、エフリン B2 と上記ポリペプチドまたは抗体によって形成された複合体を検出するか、および/または定量化することを包含している、方法。

【請求項 24】

エフリン B2 の発現と関連付けられている疾患を診断する方法であって、

以下の工程：

(a) 単離された生物学的サンプルを、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 12 に記載の抗体と接触させること、(b) 工程 (a) において使用されたサンプルにおける、エフリン B2 と上記ポリペプチドまたは抗体によって形成された複合体を検出するか、および/または定量化すること、(c) 検出されたエフリン B2 レベルをコントロールのレベルと比較すること、ならびに (d) この比較の結果を、疾患の存在または非存在と関連付けることを包含している、方法。

【請求項 25】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドまたは請求項 12 に記載の抗体の、医薬の調製のための、使用。

【請求項 26】

血管新生を阻害するための、請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

血管新生と関連している病理学的状態の予防処置または治療処置のための、請求項 25 または 26 に記載の使用。

【請求項 28】

腫瘍またはがんの予防処置または治療処置のための、請求項 25～27 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 29】

上記腫瘍またはがんは固形である、請求項 28 に記載の使用。

【請求項 30】

上記がんは、膵臓がん、大腸がんまたは肺がんである、請求項 29 に記載の使用。

【請求項 31】

請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 12 に記載の抗体、請求項 13 に記載の核酸、請求項 14 もしくは 15 に記載のベクター、または請求項 17～19 のいずれか 1 項に記載の細胞を含んでいる、組成物。

【請求項 32】

薬学的組成物である、請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 33】

10

20

30

40

50

薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含んでいることを特徴とする、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

抗血管新生剤をさらに含んでいることを特徴とする、請求項 3 1 または 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

化学療法剤をさらに含んでいることを特徴とする、請求項 3 1 または 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

請求項 3 1 ～ 3 5 のいずれか 1 項に記載の組成物の、医薬の調製のための、使用。

10

【請求項 3 7】

血管新生を阻害するための、請求項 3 6 に記載の使用。

【請求項 3 8】

血管新生と関連する病理学的状態の予防処置または治療処置のための、請求項 3 6 または 3 7 に記載の使用。

【請求項 3 9】

腫瘍またはがんの予防処置または治療処置のための、請求項 3 8 に記載の使用。

【請求項 4 0】

上記腫瘍またはがんは固形である、請求項 3 9 に記載の使用。

【請求項 4 1】

20

上記がんは、膵臓がん、大腸がんまたは肺がんである、請求項 4 0 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、生物医学および生物工学の分野に属し、血管の形成（血管新生）およびリンパ管の形成（リンパ管新生）を遮断可能な、エフリン B 2 に特異的な新規の抗体に関する。さらに、本発明は、例えば医薬の調製のための、上記抗体の使用に関する。

【0002】

〔最新技術〕

血管新生（すなわち、すでに存在している血管からの新たな血管の形成）は、胚発生および出生後の生活の間における多くの生理学的過程（生殖、瘢痕化および炎症）に重要な役割を果たしている。血管新生性の表現型への内皮細胞の移行を引き起こす分子機序は、完全には知られていないが、当該分子機序は、内皮細胞の増殖、遊走および集合（これらに続く血管周囲細胞（例えば、周皮細胞または筋細胞）のリクルートメントおよび細胞外マトリクスの再構築）に参与する複雑な過程である（Risau, W. Nature 1997, 386:671-674）。血管の無制御な成長は、多くの病態（例えば、リウマチ様関節炎もしくは糖尿病性網膜症、および特に腫瘍性の過程）における潜在的な異常である。腫瘍の成長は、新血管のネットワーク形成を介した酸素および栄養素の一定の供給に依存しているので、十分な血管新生の非存在下において、細胞は、腫瘍体積の増加を阻害するか、または抑制するネクロシスおよび／またはアポトーシスの過程を起こす。

30

40

【0003】

血管に加えて、脊椎動物の循環系は、生物の発生および病理過程の間に重大な役割を果たすリンパ管を備えている。リンパ系は、（１）組織の間質液を流出させ、かつ血管系に間質液を送り込み、（２）また消化器系から脂質を吸収し、（３）免疫系の細胞を輸送する個体の免疫防御の一部であり、（４）例えば炎症および種々の病理的障害において、リンパ水腫、炎症性疾患を誘導し、（５）がん腫の浸潤および転移に参与している（Tammela, T. and Alitalo, K. Cell 2010, 140:460-76）。リンパ管新生（すなわち、すでに存在しているリンパ管からのリンパ管の形成）の研究は、数十年間、遅れたままであり、腫瘍の播種および転位を研究するために利用されている生体分子機序および特異的なマーカーについて説明されたのは、近年になってからである。

50

【0004】

胚発生の際に、血管は、脈管形成と呼ばれる過程において、中胚葉に由来する内皮性の前駆体から生じ、リンパ管の形成は、頸部領域および中腎周辺からの静脈内皮細胞の集合から開始されると考えられている。それらの共通する胚性の起源のために、両方の脈管系は、それらの発達および成熟を調節する同様の分子機序を共有している。種々のシグナル伝達経路は、チロシンキナーゼ受容体が心脈管系の形成のそれらの機序において非常に重要な役割を果たしていると同定されている。当該シグナル伝達経路は、特に、アンジオポエチンによって制御されている Tie-1 受容体および Tie-2 受容体の活性と共同している、それらの対応する受容体 (VEGFR) を介した血管内皮成長因子 (VEGF) シグナル伝達経路である (Thurston, G., Cell Tissue Res 2003; 314:61-68)。さらに、分子の他の群 (対応するそれらの受容体 (Eph) をともなった ephrin (“producing hepatoma erythropoietin receptor interactors” の頭文字)) はまた、血管系 (Adams, RH and Klein, R. Trends Cardiovasc Med 2000, 10: 183-188) およびリンパ管系 (Makinen, T et al. Genes Dev 2005, 19:397-410) の再構成に関与していると示されている。このファミリーは、14の受容体および8のリガンドを有しているチロシンキナーゼの最大の公知のグループを含んでおり、それらの配列相同性および対応するリガンドの結合特性に基づいて、2つの受容体のカテゴリ (Eph A および Eph B) に細分される。Eph A 受容体は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 分子によって膜に固定されることによって特徴付けられているサブグループエフリン A のリガンドと結合する。Eph A 受容体は、細胞内ドメインがうしろに続いている膜貫通領域を介して膜に固定されているサブグループエフリン B のリガンドと結合する。動脈は膜貫通型リガンドのエフリン B2 を発現しており、静脈はエフリン B2.4 受容体を発現していると報告されている (Adams, RH and Alitalo K. Nat Rev Mol. Cell Biol 2007, 8: 464-478)。

【0005】

このグループの分子は、種々の細胞機能を担っている。当該細胞機能は、例えば、細胞骨格の組織化を変更すること、ならびにインテグリンおよび他の細胞内の接着分子の活性に影響を及ぼすことによる、形態、遊走、反発、細胞接着および浸潤である (Pasquale, EB. Cell 2008, 133:38-52)。これらの活性は、ある細胞において発現されている Eph 受容体の、他の細胞において発現されている対応するエフリンとの相互作用に依存しており、関与する各細胞に作用する2方向性のシグナルを生成する。Eph 受容体によってもたらされるシグナル伝達は、“フォワード”と呼ばれ、その細胞内領域に位置しているチロシンキナーゼドメインに依存している。当該チロシンキナーゼドメインは、自己および他のタンパク質のリン酸化能、ならびに他のエフェクター分子との受容体の会合に関する能力を有している。この部分のために、リガンドであるエフリン B は、“リバース”と呼ばれる他のシグナルを生成する。当該シグナルは、一方で Src ファミリーキナーゼによって行われるその細胞内ドメインにおける種々のチロシンのリン酸化、および他方での関連タンパク質に依存している。さらに、Eph 受容体およびエフリン B のほとんどは、上記生理学的機能 (特にエフリン B の) を果たすために重要な、それらの細胞内ドメインに PDZ ドメインに対する結合部位を有している (Makinen, T et al. Genes Dev 2005; 19:397-410)。

【0006】

遺伝子導入マウスにおける Eph B4 をコードしている遺伝子の不活性化に関する研究は、脈管系の発生における両方のタンパク質の基本的な役割を示している。これらの遺伝子に関する欠損マウスは、胚形成期において致死的な、変化した血管新生を有しており (Wang, HU et al. Cell 1998, 93:741-753; Adams, RH et al. Genes Dev 1999, 13:295-306)、シグナル伝達の活性部位に変異を有しているエフリン B2 を発現しているマウスの研究によって、このタンパク質は、VEGF シグナル伝達経路の制御を介してリンパ管新生性および血管新生性の成長を制御していることが示された (Wang, Y et al. Nature 2010, 465: 483-6; Sawamiphak S et al. Nature 2010, 465:487-91)。

【0007】

国際公開第2007/127506号および国際公開第2010/019565号には、エフリン B2抗体について記載されている。国際公開第2007/127506号には、上述の抗体は、エフリン B2およびEph B4の間におけるシグナル伝達を遮断し、動物モデルにおける腫瘍体積を減少可能な、血管新生における阻害作用を有していることが示されている。

【0008】

しかし、血管新生を制御可能な新規の治療薬に対する必要性は、存在し続けている。

【0009】

〔発明の説明〕

本発明は、血管新生を制御可能な新規の治療薬を提供し、血管およびリンパ管の新たな形成を阻害可能であり、かつ腫瘍の増殖を著しく抑制する、エフリン B2に対する新規な抗体に関する。当該抗体は、これまでに説明されている抗体と異なる配列を有しており、高い特異性を有している。国際公開第2007/127506号に記載のエフリン B2抗体は、血管新生を阻害可能であるが、抗リンパ管新生の阻害作用について説明されていない。

【0010】

本発明は、エフリン B2を認識し、エフリン B2と特異的に結合する抗体に基づいており、エフリン B2に関連しているそれらの病状に対する診断または治療の重要なツールを構成する、上述の抗体および方法、ならびにそれらに基づく組成物を指す。

【0011】

第1の局面において、本発明は、抗血管新生活性および抗リンパ管新生活性を有しており、固形腫瘍の増殖を抑制可能な、エフリン B2に対する新規抗体に関する。

【0012】

本発明は、血管新生異常をともなう疾患（例えばがん）を制御する課題に対する新たな解決法をもたらす。

【0013】

発明者らによって証明されている通り、本明細書に記載のB11抗体は、Eph B4受容体との結合を阻害するように、エフリン B2を特異的に認識する。当該結合の阻害は、インビトロアッセイにおいて、細管形成および内皮細胞（HUEC）の遊走能を阻害し、膵臓がん、大腸がんおよび肺がんの細胞を用いたインビボアッセイにおいて、腫瘍における血管およびリンパ管の数を著しく低下させる。本発明者らは、本発明の抗体が腫瘍の増殖を著しく遅らせ、腫瘍のサイズを著しく低下させ得ることを、さらに見出した。本発明者らは、エフリン B2の、Eph B4に対する相互作用をB11抗体が遮断したことを示しており、当該抗体がその受容体を介したエフリンシグナル伝達をどのように阻害可能であるかをも示している（本明細書における図5を参照）。

【0014】

また、2B1抗体は、インビボアッセイにおいて、細管形成および内皮細胞（HUEC）の遊走能を阻害可能であり、腫瘍における血管およびリンパ管の数を低下させる。本明細書の図5に示されている通り、2B1抗体は、Eph B4遮断のBiacore（商標）アッセイおよび細胞性アッセイのいずれにおいても、Eph B4受容体と競合しない。

【0015】

したがって、本発明の第1の局面は単離されたポリペプチドに関する。当該ポリペプチドは、a. 配列番号1と少なくとも76%の配列同一性のアミノ酸配列を含んでおり、b. エフリン B2を特異的に認識し、エフリン B2と特異的に結合する。

【0016】

上記ポリペプチドは、配列番号1と少なくとも80%、85%、90%、90%、99%の配列同一性を有しているアミノ酸配列を含んでいることが好ましい。上記ポリペプチドは、配列番号1のアミノ酸配列を含んでいることがより好ましい。

【0017】

本明細書に使用されるとき、ポリペプチドに言及している“単離された”という用語は、当該ポリペプチドが同定されており、かつ天然環境から分離されているか、および／または抽出されていることを意味する。

【0018】

ポリペプチドに対する“%の配列同一性”という用語は、必要に応じて保存的置換を考慮せずに2つの配列の同一のパーセンテージを最大化するために、2つの配列を整列化し、かつ空白を導入した後に、比較されている配列のアミノ酸と同一であると説明されている配列のアミノ酸のパーセンテージを指す。整列化は、例えば一般のツール（例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign（DNASTAR））を用いた、当業者に公知の異なる方法において実施され得る。当業者は、整列化を評価するために適切なパラメータ（比較される配列の最大の整列化を達成するために必要とされる任意のアルゴリズムが挙げられる）を決定し得る。

10

【0019】

本明細書に使用されるとき、“エフリン B2”という用語は、特に示されていないか、または文脈的に示されていない限り、エフリン B2タンパク質の任意の天然のポリペプチドまたは任意のバリエーションを指す。このタンパク質の名称は、“erythropoietin producing hepatoma receptor interactors”についての頭文字であるが、エフリンとも呼ばれ得る。天然に存在するポリペプチドは、天然にトランケートされているか、もしくは分泌される形態（例えば、細胞外ドメイン）、または天然に存在する任意のバリエーション（例えば、選択的な種々の“スプライシング”形態）もしくは対立形質の任意のバリエーションであり得る。

20

【0020】

上記ポリペプチドは抗体であることが好ましい。上記抗体はヒト型であることがより好ましい。ヒト型の上記抗体のアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgAであることが好ましい。

【0021】

“抗体”または“免疫グロブリン”という用語は、広義に使用されており、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、および多重特異性（所望の生物学的活性を示す限り）を包含しており、抗体断片を包含し得る。上記抗体は、ヒト型であるか、ヒト化されているか、および／または成熟された親和性であり得る。

30

【0022】

“ヒト型の抗体”は、そのアミノ酸配列がヒトによって産生される抗体のアミノ酸配列と一致している抗体である。

【0023】

本発明の抗体は、短鎖の可変断片（scFv、英語“single chain variable Fragment”）であり得る。“可変”という用語は、抗体の可変部のある部分がそれらの配列とまったく異なっており、その抗原に対する各抗体の特異的結合を担っている配列であることを指す。しかし、可変性は、上記抗体の可変領域の全体にわたって一様に配分されているわけではない。この可変性は、軽鎖および重鎖の両方の可変部に見られるCDR（英語“complementarity-determining regions”）または超可変部と呼ばれる3つの部分に集中させられている。可変領域の最も保存されている部分は、枠組み構造と呼ばれている。2つの鎖（軽鎖および重鎖）に由来するCDRは、抗原結合部位の形成に寄与している。可変断片または“Fv”は、完全な抗原認識結合部位を含んでいる最小の抗体断片である。短鎖の可変断片は、重鎖および軽鎖が会合して抗原結合部位を形成し得ること許容するペプチドによって、共有結合的に連結されている重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域を有し得る。また、Fvは2つの鎖によって形成され得る。任意の場合に、3つのCDRのみを有している単一の可変領域でさえ、より低い親和性を有しているものの、抗原を認識し、当該抗原と特異的に結合するために十分である。

40

【0024】

50

抗体または脊椎動物の免疫グロブリンの軽鎖は、それらの定常部のアミノ酸配列にしたがって、カッパおよびラムダと呼ばれる2つのタイプに属し得る。重鎖の定常部のアミノ酸配列にしたがって、免疫グロブリンは、異なるクラスまたはタイプに分類される。主要な5つのタイプまたはクラス：I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g Mがある。さらに、それらの一部は、サブクラスまたはアイソタイプ（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1およびI g G A 2）に分けられる。さらに、免疫グロブリン、および異なるクラスの重鎖の定常部のそれぞれは、アルファ、ベータ、イプシロン、ガンマおよびミューと呼ばれる。

【0025】

抗体断片は、抗体全体の機能を維持している抗体の任意の部分であり得る。抗体断片の例は、F v、F a b（抗原結合断片）、F a b 2（2つの抗原結合部位を有している断片）であり、すべて当業者にとって周知である。短鎖の可変断片（s c F v）は、単一のポリペプチド鎖におけるこれらのドメインであるV_Hドメイン（重鎖の可変領域）およびV_L（軽鎖の可変領域）抗体を含んでいる。本発明の抗体の他の形態は、（1）s c F vとC H 3型の定常部とを含んでいる、ミニ抗体もしくは“ミニボディー”、または（2）s c F vとC H 2およびC H 3の定常部とを含んでいるいわゆるs c F v－F cとして知られている形態であり得る。これらの形態は、s c F vの分子量を増大させ、腎臓による速やかな排除を回避し、画像化技術におけるs c F vの使用にとって非常に有用であり得る。

10

【0026】

“抗原”という用語は、上記抗体が選択的に結合可能な所定の抗原を指す。抗原は、ポリペプチド、含水炭素、核酸、脂質、ハプテンまたは他の天然分子もしくは合成分子であり得る。

20

【0027】

本発明の発明者らは、エフリン B 2に対する抗体2 B 1およびB 1 1の親和性を調べ、B 1 1が、1 1 0 n Mの結合定数（K_D）である、抗原に対する高い親和性を有しており、2 B 1が、6 3 0 n MのK_Dであるより低い親和性を有していることを見出している。抗体および抗原の認識部位および結合部位の間における結合の親和性は、両者間における非共有結合性相互作用の総和の強度である。これとは別に分子の親和性は、解離定数（K_D）とも呼ばれる親和性定数によって、一般的に表される。親和性は、周知されている方法（例えば、これらに限定されないが、本明細書に記載の方法）によって測定され得る。

30

【0028】

抗体がその抗原に対する低い親和性を有している場合、当該抗体は、しばしば当該抗原と緩やかに結合し、容易に解離する。その抗原に対する抗体の親和性を向上させるために、文献に十分に説明されている手法は、“親和性を成熟させるために”採用され得る（Marks et al. BioTechnology 1992. 10:779:783; Barbas, CF et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1994 26; 91:3809-13）。これらの手法は、なかでも、V_HおよびV_Lドメインの“シャッフリング”、またはランダム変異生成である。

【0029】

本発明の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドはシグナルペプチドをさらに含んでいる。上記シグナルペプチドは、p e l Bとして公知のErwinia carotovoraの細菌ペクチン酸塩リアーゼのシグナルペプチドである、配列番号6であることが好ましい。このシグナルペプチドは、s c F vが細胞周辺質に位置することを可能にする。細胞周辺質は、酸化環境の結果としてs c F vが正しいフォールディングを受ける場所である。

40

【0030】

シグナルペプチドは、特定の細胞内部位（例えば、小胞体、ミトコンドリアまたは核）へのポリペプチドまたはタンパク質の輸送に関する3～60アミノ酸の短い配列である。また、上記シグナルペプチドは、分泌、またはEscherichia coliといった細胞の場合における細胞周辺質と等価であり得るタンパク質の細胞外輸送に関し得る。ポリペプチドの分

50

泌に関するシグナルペプチドのいくつかの例は、p e l B、ストリ (stli)、エコチナ (ecotina)、l a m B、ヘルペスの G D、l p p、アルカリホスファターゼ、転化酵素、アルファ因子、およびプロテイン A のリーダー配列である。

【0031】

本発明の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドは少なくとも 1 つのマーカをさらに含んでいる。上記マーカは、c - m y c、F L A G、H A、ヒスチジン鎖、G S T、ビオチン、V S V - G、H S V t k、V 5、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、マルトース結合タンパク質および蛍光タンパク質を含んでいるリストから選択されることが好ましい。上記マーカは、ヒスチジン、c - m y c または両方の鎖であることがより好ましい。ヒスチジン鎖は 4 ~ 1 2 のヒスチジンを含んでいることが好ましい。ヒスチジン鎖は 6 のヒスチジンを含んでいることがより好ましい。本発明の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドは、複数のマーカ (ヒスチジンの鎖および c - m y c) を含んでいる。本発明の好ましい実施形態において、上記ポリペプチドのアミノ酸配列は配列番号 7 である。

10

【0032】

本明細書に使用されるとき、“マーカ”という用語は、それらが融合タンパク質としてこのタンパク質とともに産生されている場合に、所望のタンパク質の同定を可能にするマーカペプチドまたはマーカタンパク質を指す。上記マーカペプチドまたはマーカタンパク質は、所望のタンパク質の同定および／または局在化のために使用される。これは、(1) そのようなマーカが、特定の分子もしくは原子に対する結合部位に該当する (例えば、ヒスチジンの鎖、G S T、アビジンもしくはストレプトアビジン) か、(2) それらが、免疫化学的手法によって容易に検出可能である (例えば、血球凝集素、V S V - G、H S V t k、F L A G、V 5 または m y c) か、または (3) それらが容易に観察される (例えば、蛍光タンパク質) からである。

20

【0033】

マーカペプチド V S V - G は、水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質に属する。H S V t k マーカペプチドは、単純ヘルペスウイルス 1 型のチミジンキナーゼに属する。F L A G ペプチドは、組換えタンパク質に対するマーカとして特に設計された 8 アミノ酸のエピトープである。V 5 は、パラミクソウイルスのシミアンウイルス 5 (S V 5) の P タンパク質および V タンパク質に存在する小エピトープである。m y c エピトープは、1 0 アミノ酸を有しており、転写因子ヒト c - m y c の配列の一部である。

30

【0034】

本発明の他の実施形態は、そのアミノ酸が本発明の第 1 の局面の上記ポリペプチドを含んでいる抗体である。

【0035】

本発明の第 2 の局面は、本発明の第 1 の局面の上記ポリペプチドをコードしている核酸に関する。上記核酸はベクターであることが好ましい。上記ベクターは発現ベクターであることがより好ましい。

【0036】

核酸またはポリヌクレオチドは、任意の長さのヌクレオチド (D N A および R N A が挙げられる) の重合体である。上記ヌクレオチドは、D N A ポリメラーゼもしくは R N A ポリメラーゼ、または合成反応によって重合体に組み込まれ得るデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド、または任意の基質であり得る。

40

【0037】

“コードしている”という用語は、ヌクレオチド配列がどのようなポリペプチドまたはタンパク質に翻訳されるかを決定する遺伝暗号を指す。配列におけるヌクレオチドの順序は、ポリペプチドまたはタンパク質に沿ったアミノ酸の順序を決定する。

【0038】

ベクターは、細胞に遺伝物質を運ぶために使用される核酸分子である。また、ベクターは、上述した遺伝物質の他に、種々の機能要素 (転写を制御する要素 (例えば、プロモ-

50

タもしくはオペレータ、エンハンサまたは転写因子の結合のための領域、ならびに翻訳を開始させる制御エレメントおよび翻訳を終結させる制御エレメント）が挙げられる）を含み得る。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組換え発現カセットおよびトランスポゾンが挙げられるが、これらに限定されない。あるベクターは、いったんそれらが宿主細胞に導入されると、自発的に複製または分裂可能である（例えば、細菌の複製開始点を有している細菌ベクターまたはエピソードの哺乳類ベクター）。他のベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、細胞性のゲノムとともに複製され得る。発現ベクターは、作動可能に連結されている遺伝子の発現を導き得るベクターの1つである。発現ベクターは、所望の遺伝子の転写および翻訳に使用され、通常、プロモータに制御されている。プロモータは、所望の遺伝子の翻訳を制御するヌクレオチドの配列である。プロモータは、所望の遺伝子と作動可能に連結されている。“作動可能に連結されている”は、所望の遺伝子に関する、プロモータ配列の機能的な関連性および位置を指し、例えば、プロモータまたはエンハンサは、コード配列の転写に影響する場合に当該コード配列と作動可能に連結されている。一般的に、作動可能に連結されているプロモータは、所望の配列の直前にある。しかし、エンハンサは、その発現を制御するための所望の配列と近接している必要はない。

10

【0039】

本明細書に使用されるとき、“複製開始点”という用語は、複製点が形成されており、DNA複製が開始するヌクレオチド配列を指す。

【0040】

本発明の第3の局面は、本発明の第2の局面の上記ベクターを含んでいる細胞に関する。上記細胞は、例えば、限定されることなく原核生物であり得、上記細胞は、本発明の上記抗体を生成するために使用される細菌（例えば、E. coli）であり得る。上記細胞は、本発明の上記抗体を生成するために使用される真核生物（例えば、限定されることなく酵母細胞または昆虫細胞）であり得る。真核細胞は、細胞療法に使用され得るか、または本発明の第2の局面の上記ベクターを遺伝子療法によって取り込んでいる細胞であり得る。本発明の好ましい実施形態において、上記細胞は哺乳類細胞である。哺乳類細胞は、その種が、動物界、脊索動物門、脊椎動物亜門、および哺乳類に属する任意の細胞である。

20

【0041】

本発明の第4の局面は、本発明の第1の局面の上記ポリペプチドを入手する方法に関する。当該方法は、次の工程：（a）本発明の第2の局面の上記ベクターを細胞において発現させること、および（b）工程（a）において発現されたポリペプチドを精製することを包含している。

30

【0042】

本発明の第4の局面の好ましい実施形態において、上記細胞は原核生物である。本発明の第4の局面の好ましい他の実施形態において、上記細胞は真核生物である。

【0043】

本発明の第5の局面は、エフリン B2の検出および／または定量化の方法に関する。当該方法は、次の工程：（a）単離された生物学的サンプルを、本発明の第1の局面のポリペプチドと接触させること、ならびに（b）工程（a）において使用されたサンプルにおける、エフリン B2および上述したポリペプチドによって形成される複合体を検出するか、および／または定量化することを包含している。

40

【0044】

本発明の第5の局面の好ましい実施形態は、エフリン B2の発現と関連している疾患を診断する方法である。当該方法は、次の工程：（a）単離された生物学的サンプルを、本発明の第1の局面の上記ポリペプチドと接触させること、（b）工程（a）において使用されたサンプルにおける、エフリン B2と上述したポリペプチドとによって形成される複合体を検出するか、および／または定量化すること、（c）検出されたエフリン B2のレベルをコントロールのレベルと比較すること、ならびに（d）上述した比較の結果を、疾患の存在または非存在と関連付けることを包含している。

50

【0045】

エフリン B2 の発現と関連する疾患は、なかでも血管新生の脱調節をともなう任意の疾病（例えば、腫瘍性疾患および非腫瘍性疾患）であり得る。血管新生の調節不全を示す非腫瘍性疾患としては、異常な肥大、関節炎、リウマチ性関節炎、乾癬、サルコイドーシス、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、増殖性網膜症、血管新生緑内障、加齢性黄斑変性症、糖尿病性黄斑変性症、糖尿病性黄斑水腫、角膜新血管新生、髄膜腫、血管腫、血管線維種、甲状腺過形成、慢性炎症、肺炎、敗血症、脳浮腫、滑膜炎、骨形成の異常発達、骨関節炎、多嚢胞性卵巢症候群、子宮内膜症、クローン氏病、潰瘍性大腸炎、血友病性関節、瘢痕肥大、強皮症、トラコーマ、滑膜炎、皮膚炎、子癇前症が挙げられるが、これらに限定されない（国際公開第2007/127506号）。

10

【0046】

単離された生物学的サンプルは、身体（例えば、人体または動物体）から単離されたサンプルであり、生物の生理的液体および／または任意の細胞もしくは組織に由来し得る。生物学的サンプルは、組織（例えば、限定されることなく生検物または細針吸引物）であり得る。好ましい実施形態において、工程（a）における単離された生物学的サンプルは、生物学的な液体である。生物学的な液体は、身体から排泄されたか、または分泌された液体、ならびに通常ではみられない液体を包含し得る。生物学的な液体としては、胎児を囲んでいる羊水、眼房水、間質液、リンパ液、母乳、粘液（経鼻排液および痰が挙げられる）、唾液、皮脂（スキンオイル）、乳漿、汗、涙液、尿、心膜液、血液および血漿が挙げられるが、これらに限定されない。より好ましい実施形態において、生物学的な液体は、血液、血漿または血清である。本発明の方法の工程（a）における単離された生物学的サンプルは、例えば、限定されることなく、新鮮であるか、凍結されているか、固定されているか、またはパラフィンに包埋され得る。

20

【0047】

本発明の第1の局面の上記ポリペプチド、およびエフリン B2 によって形成される、単離された生物学的サンプルにおける複合体を“検出するか、および／または定量化する”という用語は、本明細書に使用されるとき、好ましくは半定量的または定量的な方法における、存在の検出および／または量もしくは濃度の測定を指す。測定は、直接的または間接的に実施され得る。直接の測定は、上記サンプルに存在する複合体分子の存在の数と直接に相関している上述した複合体から直接に得られるシグナルに基づいて、本発明の第1の局面の上記ポリペプチド、およびエフリン B2 によって形成される複合体の量または濃度を測定することを指す。強度シグナルとも呼ばれ得るこのシグナルは、例えば上記複合体の物理特性または化学特性の強度値を測定することによって、入手され得る。間接の測定は、補助的な構成要素（例えば、上記複合体の異なる構成要素）または生物学的な測定系（例えば、細胞応答、リガンド、“タグ”、または酵素反応生成物）から得られる測定値を包含している。

30

【0048】

“量”という用語は、特に限定されないが、本発明の第1の局面の上記ポリペプチド、およびエフリン B2 によって形成される複合体の絶対量または相対量、ならびに上記複合体と関連するか、または当該複合体に由来し得る任意の他の値または変数を指す。そのような値または変数は、上記複合体の物理特性または化学特性のいずれかから得られ、かつ直接の測定によって得られるシグナルの強度値（例えば、質量分析または核磁気共鳴から得られる強度値）を包含している。さらに、これらの値または変数は、間接の測定によって得られる値または変数を包含する。

40

【0049】

当業者によって理解される通り、検出は、分析されたサンプルの100%において正確であると意図されていない。しかし、統計学的に有意な数のサンプルが正確に分類される必要がある。統計的に有意な量は、種々の統計学的なツール（例えば、信頼区間、p 値決定、ステューデント t 検定、またはフィッシャーの差別関数）を用いて、当業者によって証明され得る。信頼区間は、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、

50

少なくとも98%または少なくとも99%である。p値は、0.1、0.05、0.01、0.005または0.0001であることが好ましい。本発明は、分析される所定の群または集団のうち少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%の対象における疾患を正確に検出し得ることが好ましい。

【0050】

本明細書に使用されるとき、“比較すること”という用語は、分析されるべき生物学的サンプル（問題の生物学的サンプルとも呼ばれる）における、エフリン B2および本発明の第1の局面の上記ポリペプチドによって形成される複合体の量を、コントロールと呼ばれる基準サンプルの複合体の量と比較することを指すが、これに限定されない。基準サンプルは、例えば問題の生物学的サンプルと同時に、または当該生物学的サンプルに続いて、分析され得る。比較は、手動においてか、またはコンピュータを利用して実施され得る。

10

【0051】

本発明の第6の局面は、本発明の第1の局面の上記ポリペプチドの、医薬の調製のための使用に関する。本発明の好ましい実施形態において、上記医薬は、血管新生を阻害するために使用される。好ましくは、血管新生に関連する病理学的状態の治療処置または予防処置のため。より好ましくは、腫瘍またはがんの予防処置または治療処置のため。

【0052】

血管新生に関連する病理学的状態は、任意の腫瘍形成、および非腫瘍性疾患（例えば、国際公開第2007/127506号に記載の疾患）であり得る。

20

【0053】

本発明の第6の局面の好ましい実施形態において、上記腫瘍またはがんは固形である。好ましくは膵臓がん、大腸がんまたは肺がん。腫瘍またはがんは、腔または液体を含んでいない組織の集団である場合に固形であると説明される。細胞腫に依存して、固形腫瘍は、異なる名称（例えば、肉腫、がん腫またはリンパ腫）を有している。

【0054】

本発明の第7の局面は、本発明の第1の局面の上記ポリペプチド、本発明の第2の局面の上記核酸もしくはベクター、または本発明の第3の局面の上記細胞を含んでいる組成物に関する。本発明の第7の局面の好ましい実施形態において、上記組成物は薬学的組成物である。また、上記組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤を含んでいることによって特徴づけられていることが好ましい。さらに、上記賦形剤は薬理学的に許容可能である必要がある。

30

【0055】

“賦形剤”は、活性成分ではなく、なかでも希釈剤、担体または充填剤である薬学的組成物の構成要素であり、安全であり、無毒であり、かつ副作用を有していない場合に“薬学的に許容可能”とみなされる。“賦形剤”という用語は、化合物の吸収を補助するか、当該化合物を安定化させるか、または堅さもしくはより好ましくさせる風味を付与する意味において医薬の調製に役立つ物質を指す。したがって、上記賦形剤は、この段落に挙げられていない他の種類の担体を除外することなく、成分をまとめる作用（例えば、スターチ、糖類またはセルロース）、甘味作用、着色作用、例えば空気および／または水分を隔離するための薬剤保護作用、錠剤、カプセル剤または他の提供形態の充填作用（例えば、二塩基性のリン酸カルシウム）、腸における化合物の溶解およびそれらの吸収を容易にする崩壊作用を有し得る。

40

【0056】

“薬学的に許容可能”という賦形剤の用語は、担体が投与される生物に損傷を与えないと認められ、かつ評価されることを意味する。さらに、担体は、薬学的に好適である必要があり、薬学的組成物の化合物の活性を許容する（すなわちそれらの構成要素と適合する）必要がある。

【0057】

“ビヒクル”または担体は、不活性な物質であることが好ましい。ビヒクルの機能は、

50

他の化合物の導入を容易にすること、より良好な製剤および投与を可能にすること、または薬学的組成物に堅さおよび形態を与えることである。したがって、担体は、本発明の薬学的組成物の任意の構成要素を所定の体積または重量まで希釈するために使用される物質であるか、または希釈されていない構成要素は、より良好な製剤および投与を可能にし得るか、もしくは医薬に堅さおよび形状を付与し得る。提供形態が液体である場合に、薬学的に許容可能な担体は希釈剤である。

【0058】

他のより好ましい実施形態において、薬学的組成物は他の活性物質をさらに含んでいる。他の治療薬の使用を必要とし得る治療有効性の要求の他に、本発明の化合物および他の治療薬の組合せの使用を強いるか、または強く推奨するさらなる論理的理由があり得る。“活性”という用語は、ヒト、動物、植物、化学または他の由来に関わらず、薬剤であるべき適切な活性を有している任意の材料を意味する。

10

【0059】

本発明の第7の局面の好ましい実施形態において、薬学的組成物は抗血管新生剤をさらに含んでいる。抗血管新生剤は、血管新生、脈管形成、または所望されない血管透過性を、直接的または間接的に阻害可能な分子である。抗血管新生剤の例は、ある血管新生因子を遮断可能なこれらの分子（例えば、すべて十分に記述されている周知のVEGFもしくはVEGF受容体に対する抗体、またはVEGF経路を遮断する小分子など）である。

【0060】

本発明の第7の局面の好ましい実施形態において、薬学的組成物は化学療法薬をさらに含んでいる。化学療法薬はがんの処置に有用な化合物である。化学療法薬の例は、細胞障害性化合物（例えば、アントラシクリン、ダウノルビシン、アドリアマイシン、ドセタキセルの誘導体、ピンカアルカロイド、ピンクリスチン、カルムスチン、シスプラチン、フルオロウラシル）、細胞増殖抑制化合物（例えば、ポリアミン阻害剤、タモキシフェンまたはプロダゾンサンドスタチン）、またはアポトーシスを誘導する化合物（例えば、酪酸ナトリウムまたはマイトマイシンC）、抗生剤（例えば、ペニシリン、ベータラクタミン、セファロスポリン、サイクリン、アミノグリコシド、マクロライドまたはスルホンアミド）、または抗ウイルス剤（例えば、AZT、プロテアーゼ阻害剤またはアシクロビル、レトロビルまたはフォスカーネット）である。

20

【0061】

本発明の第8の局面は、本発明の第7の局面の組成物の、医薬の調製のための使用に関する。本発明のこの局面の好ましい実施形態において、医薬は血管新生を阻害するために使用される。好ましくは、血管新生に関連する病理学的状態の予防処置または治療処置のため。より好ましくは、腫瘍またはがんの予防処置または治療処置のため。好ましい実施形態において、上記腫瘍またはがんは固形である。上記がんは、膵臓がん、大腸がんまたは肺がんであることが好ましい。

30

【0062】

本発明の第8の局面の好ましい実施形態において、治療有効量が投与される。“治療有効量”という用語は、必要とされるある投与量において必要な期間に投与される、所望の予防効果または治療効果の実現に有効な量を指す。本発明の上記ポリペプチドまたは薬学的組成物の“治療有効量”は、個体の疾患の段階、年齢、性別および体重にしたがって変化し得、所望の予防効果または治療効果を実現可能であり、かつ毒性または副作用を示さない量を指す。“個体”は脊椎動物である。脊椎動物は哺乳類であることが好ましい。哺乳類はヒトであることがより好ましい。なかでも、哺乳類としては、家畜（例えばウシ）、スポーツに関連する動物、ペット（例えば、ネコ、イヌおよびウマ）、霊長類、マウスおよびラットが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0063】

薬剤の形態が使用される投与の種類に適合されている各場合において、本発明の組成物は、液剤の形態または臨床的に許容可能な投与の他の形態に基づいて、治療有効量において提供され得る。本発明の薬学的組成物は、固体、半固体、液体または気体（例えば、錠

50

剤、カプセル剤、散剤、粒剤、軟膏剤、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル、微粒子またはエアゾル剤）において製剤化され得る。本発明の好ましいさらなる実施形態によれば、薬学的組成物は経口投与または非経口投与に適合されている形態である。

【0064】

経口投与に適合されている形態は、経口投与をおそらく許容する物理的な状態を指す。経口投与に適合されているそのような形態は、ドロップ剤、シロップ剤、吸引剤、エリキシル剤、懸濁剤、即時懸濁剤、飲用バイアル、錠剤、カプセル剤、粒剤、カチャット、丸薬、錠剤、トロッチ剤、口内剤または凍結乾燥剤を含んでいるリストから選択される。

【0065】

非経口投与のために適合されている形態は、注入投与をおそらく可能にする物理的な状態（好ましくは液体）を指す。非経口投与は、筋肉内、動脈内、静脈内、皮内、皮下または骨内を介して実施され得るが、非経口投与経路のこれらの種類のみに限定されない。

【0066】

他の可能性は、薬学的組成物が、舌下投与、経鼻投与、くも膜下投与、気管支投与、直腸投与、経皮投与、または吸入投与に適合されている形態において存在していることである。

【0067】

明細書および特許請求の範囲を通じて、“含んでいる”という単語およびその変化形は、他の技術的特徴、添加物、構成要素または工程を除外することを意図されていない。当業者にとって、本発明の他の目的、利点および特徴は、部分的に本明細書および部分的に本発明の実施から明らかになる。以下の実施例は、例示を目的として与えられており、本発明を限定することを意図されていない。

【0068】

〔図面の説明〕

図1、選択されたクローンの、E. coliにおける発現。エフリン B2に対して選択された s c F v（2 B 1 クローン、A 1、B 1 1 および E 4）の発現（総抽出物）、および浸透圧ショックによって単離された対応する周辺質画分（周辺質）のアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）およびクーマシーブルー染色による分析。分子量は図面の左において k D a を単位として示されている。

【0069】

図2、クローン 2 B 1 および B 1 1 は、大量に精製されている。エフリン B2 の s c F v A 1、B 1 1、E 4 および 2 B 1 特異物の、アクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）およびクーマシーブルー染色による精製の分析。周辺質の抽出物のそれぞれに存在する s c F v は、固定化された $N i^{2+}$ に対する親和性クロマトグラフィーによって精製された。図面は、各 s c F v のクロマトグラフィー溶出の異なる画分を示している。分子量は k D a を単位として示されている。

【0070】

図3、クローン B 1 1 および 2 B 1 はより特異的である。異なるエフリン B に対して免疫ブロットによって選択された s c F v 抗エフリン B2 の特異性の決定。市販の組換えタンパク質であるマウスのエフリン B1-Fc（EB1）、マウスのエフリン B2-Fc（EB2）およびヒトのエフリン B3-Fc（EB3）は、電気泳動によって分離され、ニトロセルロース膜に転写された。続いて、コントロール（C）としての市販の抗体である抗エフリン B2 とともに、B 1 1 および 2 B 1 クローンの反応性を分析した。分子量は図面の左において k D a を単位として示されている。

【0071】

図4、Biacore（商標）による s c F v 抗エフリン B2 の親和性の分析。センサグラムは、異なる4つの濃度（0.4、0.2、0.1、0.05 μM ）を用いて固定化されたクローン B 1 1（A）、ならびに30、20、10および7.5 μM の濃度におけるクローン 2 B 1（B）の、エフリン B2 との結合曲線に対応する時間に対する応答を表しており、それぞれの親和性定数（KD）が、クローン B 1 1 について110 nM およびク

10

20

30

40

50

ローン 2 B 1 について 6 3 0 n M と算出された。

【0072】

図 5、E p h B 4 に対するエフリン B 2 の結合を遮断する試験。A. E p h B 4 に対するエフリン B 2 の結合のパーセンテージを示すグラフ。s c F v 抗エフリン B 2 の存在下における E p h B 4 に対するエフリン B 2 の、表面プラズモン共鳴による結合阻害試験。s c F v B 1 1 (●) または 2 B 1 (○) の系列希釈物は、エフリン B 2 と混合され、チップ上に固定化された E p h B 4 の全体に注入された。E p h B 4 と結合したエフリン B 2 の相対量は、各サンプルの注入の直後に測定され、s c F v の濃度に応じてプロットされた。図面は、標準偏差 (n = 3) を表すエラーバーとともに、s c F v の各濃度についての平均値を示している。B. s c F v B 1 1 は、細胞アッセイにおいてエフリン B 2 と E p h B 4 受容体との相互作用を遮断可能である。H E K 2 9 3 細胞の表面上に過剰発現されたエフリン B 2 を用いた刺激に対する、H U V E C 細胞における E p h B 4 受容体のチロシンリン酸化の分析。エフリン B 2 を過剰発現する H U V E C 細胞および H E K 2 9 3 細胞は、抗エフリン B 2 s c F v の存在下または非存在下において 2 0 分にわたって共培養された。E p h B 4 受容体の免疫沈降後に、このタンパク質の総量 (下のパネル) およびそのリン酸化レベル (上のパネル) を免疫プロットによって分析した。

10

【0073】

図 6、マトリゲルにおける内皮細胞 H U V E C によるインビトロの管状構造形成に対する B 1 1 および 2 B 1 の阻害作用。B 1 1、2 B 1 またはネガティブコントロールとしての無関係な s c F v (C-) の存在下におけるマトリゲル上の H U V E C 細胞培養物の 6 時間における管形成の代表的な顕微鏡写真 (倍率 4 倍)。ポジティブコントロールとして V E G F を使用した。グラフは管形成の定量化を示している。各処理は、少なくとも 3 回にわたって繰り返され、対応する値 (平均 + / - 標準偏差) は、任意の処理なしのコントロールと比べて試験した抗体の存在下において形成形成された管のパーセンテージとしてプロットされている。

20

【0074】

図 7、インビトロの傷治癒アッセイによる細胞の側方遊走の分析。H U V E C 細胞を、コンフルエンスまで培養し、単層細胞に損傷を与えた。それから、遊走刺激としての V E G F の非存在下 (コントロール) または存在下の、無血清培地において細胞をインキュベートした。細胞の側方遊走を、s c F v B 2、B 1 1 もしくは B 2、ネガティブコントロールとしての無関係な s c F v の存在下において 2 4 時間にわたってモニターした。図面は、時間 0 における細胞のない初期の領域を破線によって示した傷領域の 2 4 時間後における代表的な顕微鏡写真 (倍率 4 倍) を示している。グラフは、2 4 時間における細胞の遊走を定量化している。各 s c F v を少なくとも 3 回にわたって試験し、対応する値 (平均 + / - 標準偏差) を、時間 0 に対して遊走を受けた領域のパーセンテージをプロットした。* = P < 0. 001。

30

【0075】

図 8、インビボにおける管状構造形成の阻害作用の分析。マトリゲル移植を胸腺欠損の n u / n u マウスにおいて実施し、内皮細胞およびヘモグロビンの定量化によって、移植の 6 日後に血管新生を評価した。A. 6 日後に取り出し、内皮細胞マーカー C D 3 4 を用いて染色した対応する移植片の組織切片の代表的な顕微鏡写真 (倍率 4 倍)。B. グラフは、マーカー C D 3 4 についてポジティブな領域のパーセンテージ、および V E G F なしのコントロール移植片 (右パネル) に対する上記移植片のヘモグロビン含量の変化率を示している。

40

【0076】

図 9、膵臓がん細胞 (B x P C 3) を用いて異種移植され、B 1 1 または 2 B 1 を用いて処理したマウスにおける腫瘍成長の阻害。グラフは、2 0 m g / k g の B 1 1 (黒ぬりの三角)、2 B 1 (黒塗りの四角) または未処理 (C-) (◆) を用いて処理した各群についての、各点における平均の腫瘍体積および標準偏差を示している。

50

【0077】

図10、膵臓がん細胞（B x P C 3）を異種移植し、B 1 1または2 B 1を用いて処理した腫瘍の組織病理学的な分析。移植の38日後である抗体の最終投与の1日後に分析を実施した。対応する免疫組織化学染色を続いて実施するために、腫瘍を、ホルマリンにおいて固定し、パラフィンに包埋した。アポトーシスした細胞を、活性なカスパーゼ3を染色することによって検出し、増殖活性を、K i 6 7染色によって分析し、血管分布を、C D 3 4染色によって標識し、リンパ管を、L Y V E 1染色することによって検出した。続いて、細胞をカウントするか、または陽性領域および平均値を、それぞれの標準偏差とともにカウントしたすべての視野についてプロットした。 $*p = 0.0001$ 、 $** = < 0.001$ 。

10

【0078】

図11、B 1 1は、大腸がん細胞（S W 6 2 0）（A）および肺がん細胞（H 4 6 0）（B）を用いて異種移植したマウスにおける腫瘍成長を阻害可能である。グラフは、20 mg / kgのB 1 1を用いて処理した群および処理したコントロール群における各点の、標準偏差をともなった腫瘍体積の平均（上パネル）および蛍光強度の平均（下パネル）を示している。

【0079】

図12、B 1 1および2 B 1の体内分布分析、ならびに腫瘍塊の位置。胸腺欠損のn u / n uマウスは、蛍光タンパク質m C h e r r yを安定に発現している肺がんのH 4 6 0細胞を用いて異種移植された。腫瘍が、肉眼で、かつ610 nmにおける蛍光強度を用いて検出可能なサイズに達したときに、蛍光色素を結合させた適切なs c F v AlexaFluor（登録商標）を静脈内に投与した。A. 上記s c F vの投与後の0.5、2、6、24および48時間における背側領域の画像。B. AlexaFluor（登録商標）を用いて標識したs c F v B 1 1および2 B 1の投与、ならびにネガティブコントロール（C-）をP B S処理の6および48時間後に励起された、腫瘍の750 nmにおける蛍光強度。

20

【0080】

〔実施例〕

本発明は、発明者らによってなされた試験によって以下に例示される。当該試験は、エフリン B 2に対する本発明の抗体の特異性、ならびに新たな血管およびリンパ管の形成の阻害におけるそれらの有効性を証明している。

30

【0081】

（実施例1：エフリンB 2に対する新規なヒト抗体の同定および性質決定）

哺乳類細胞において発現され、アフィニティークロマトグラフィーによって精製されたエフリン B 2の細胞外ドメインに対する連続的な選択を介して、ファージM 1 3の表面上に発現されたヒト抗体のライブラリから、E L I S AによってB 2抗原と陽性反応したファージクロンの収集物を得た。これらのクロンを、特異的なプライマーを用いて配列決定し、V_H（可変性の重鎖）およびV_L（可変性の軽鎖）の両方において成熟した異なる配列の4つの短鎖の可変断片（s c F v）と同定し、4つの短鎖の可変断片をA 1、B 1 1、E 4および2 B 1と呼ぶ。続いて、選択された各s c F vの発現および精製の分析を実施した。この目的のために、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を容易にするためのヒスチジンテイルを有している断片をもたらし、これらを、T 7 R N Aポリメラーゼのプロモータに基づくベクターp E T 2 8 bにサブクロニングした。組換えベクターを、生成し、E. coliのB L 2 1株（D E 3）に導入して、I P T Gを用いて発現を続いて誘導した。周辺質画分を、穏やかな浸透圧ショックによって調製し、S D S - P A G Eによるs c F vの存在について試験した（図1）。それから、ニッケルのアフィニティークロマトグラフィーを用いて周辺質画分に存在するs c F vの精製を行い、ゲル濾過によってP B Sに緩衝液を交換した（図2）。最大の収率は、クローン2 B 1（その配列は配列番号8である）の場合に得られ、次にクローンB 1 1（その配列は配列番号7である）であった。しかし、s c F v A 1およびE 4の発現は、達した量がこれらの抗体のさらなる性質決定を行うには不十分なほど低かった（図2）。したがって、反

40

50

応性を分析するために、クローン B 1 1 および 2 B 1 を選択した。E L I S A による機能的アッセイは、それらの抗体が、それらの標的抗原エフリン B 2 を特異的に認識するための機能的に活性な形態において発現されることを示した。

【0082】

エフリン B 2 ファミリーの他の構成要素：市販の組換え形態におけるエフリン B 1 およびエフリン B 3 との B 1 1 および 2 B 1 の反応性を、エフリン B 2 との反応性と比較する免疫ブロット（ウエスタンブロット）分析および E L I S A 分析によって、2 つの抗体の特異性を確認した（図 3）。コントロールとして、市販の抗エフリン B 2（R & D）を使用した。B 1 1 および 2 B 1 の両方の抗体はエフリン B 2 のみを認識し、エフリン B 1 およびエフリン B 3 を認識する市販の抗体をはるかに超えた、このタンパク質に対する高い特異性を証明している。これらの結果を E L I S A によって確認した。

【0083】

ファージライブラリから得られた特異的なエフリン B 2 抗体由来の短鎖可変断片（s c F v）の選択

非免疫化個体に由来する 1.5×10^{10} の s c F v のヒト抗体のライブラリを用いた、ファージの表面に対するタンパク質ディスプレイ手法（ファージディスプレイ）を使用した。ヒト I g G の F c ドメインと融合されたエフリン B 2 の細胞外ドメインを、E L I S A プレート（酵素結合免疫吸着検定法、Maxisorp, Nunc）に固定化された抗原として用いて、1 回目のパニングを実施した。当該細胞外ドメインは、哺乳類細胞から発現され、精製され、16 時間にわたって 4 °C において、 $1 \mu\text{g}/\text{ウェル}$ 、P B S（リン酸緩衝食塩水）において E L I S A プレートに固定化された。ウェルの 3 回の P B S 洗浄後に、P B S における 2 % のミルクを用いたブロッキングステップを、2 時間にわたって 37 °C において実施し、それから、2 時間にわたって 37 °C においてライブラリをインキュベーションした。非特異的に結合したファージを、P B S - 0.1 % の T w e e n を用いて連続する洗浄によって除去し、 $100 \mu\text{l}$ のトリプシンを用いて、抗原特異的なファージを溶出させた。細胞を、対数増殖期（ 600nm （ OD_{600} ）の波長における、0.4 の吸光度）にある Escherichia coli 株 T G 1（MRC Geneservices）とともに、30 分にわたって 37 °C において溶出させたファージに感染させた。感染させた細菌を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンおよび 1 % のグルコースを補った T Y E プレート（T Y E、トリプトン酵母抽出物）に播き、16 時間にわたって 37 °C において培養した。次に、細菌を、15 % のグリセロールを補った $2 \times \text{T Y}$ 培地（ $16 \text{g}/\text{l}$ のトリプトン、 $10 \text{g}/\text{l}$ の酵母抽出物および $5 \text{g}/\text{l}$ の N a C l）を用いてプレートから回収し、希釈した $50 \mu\text{l}$ の細菌を、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンおよび 1 % のグルコースを補った 50ml の $2 \times \text{T Y}$ 培地に回収し、培養物を、対数増殖期に達するまでインキュベートし、細胞を、 2.5×10^{11} のヘルパーファージ K M 1 3（MRC Geneservices）に感染させた。37 °C における 30 分のインキュベーションの後に、培養物を遠心分離し、ペレットを、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリン、 $50 \mu\text{g}/\text{l}$ のカナマイシンおよび 1 % のグルコースを補った同容積の $2 \times \text{T Y}$ 培地に再懸濁させ、30 °C において一晚培養した。

【0084】

各選択から得られたファージを、培養培地から沈殿させた。このために、培養物を 15 分にわたって $3300 \times \text{g}$ において遠心分離し、 10ml のポリエチレングリコール / N a C l を加え、 40ml の上清を 1 時間にわたって氷上に放置した。それから、それらを 30 分にわたって $3300 \times \text{g}$ において遠心分離し、上清を捨てた。沈殿物を、 2ml の P B S に再懸濁させ、10 分にわたって $11000 \times \text{g}$ において遠心分離した。上清を回収し、ファージを、抗体の親和性を向上させるために使用される抗原の量を低下させる特異点をともなう、上述と同様の次の選択に使用した。第 2 の選択において結合したファージを、増幅させ、エフリン B 2 に対する反応性の s c F v を有しているファージの濃縮物を得るために、第 3 の選択に供した。

【0085】

ファージに対する E L I S A

各選択から生成された、エフリン B 2 の特異的なファージの濃縮の程度を評価するために、ファージに対する E L I S A を実施した。3 μ g のエフリン-B 2 -F c およびネガティブコントロールとしての無関係なタンパク質を用いて、16 時間にわたって 4 $^{\circ}$ C、P B S において、柔軟な E L I S A プレート (Falcon, BD Biosciences) を被覆した。P B S を用いた数回の洗浄後に、2 時間にわたって室温、2 % のミルクの P B S において、プレートをブロッキングし、1 時間にわたる室温、P B S - 2 % のミルクにおける各選択から得られたファージの異なる希釈物とともにインキュベートした。ウェルを、P B S - 0.1 % の T w e e n 2 0 を用いてふたたび洗浄し、ペルオキシダーゼ (H R P) と結合したモノクローナル抗-M 1 3 抗体 (1 : 5 0 0 0 希釈) (GE Healthcare) とともに、1 時間にわたって室温においてインキュベートした。P B S - 0.1 % の T w e e n 2 0 を用いた 4 回の洗浄後に、T M B (3, 3', 5, 5' -テトラメチルベンジジン) (Sigma) を用いて現像した。1 M の硫酸を用いて比色反応を停止させ、吸光度を 450 nm において測定した。

【0086】

選択した 2 つの s c F v (B 1 1 および 2 B 1) を、種々の手法を用いて性質決定した。まず、固定化したエフリン B 2 の細胞外ドメインおよび精製した s c F v の異なる希釈物を用いた、Biacore X に対する表面プラズモン共鳴手法によって、エフリン B 2 に対する抗体の親和性定数を決定した。B 1 1 クローンは、最も高い親和性定数 (110 nM) を示し、クローン 2 B 1 の親和性は、630 mM とより低かった (図 4)。それから、エフリン B 2 の結合について天然の受容体 E p h B 4 と競合する抗体の能力を、同じ手法を用いて分析した。この目的のために、E p h B 4 -F c をチップに固定化し、エフリン B 2 に対する結合を、異なる濃度の B 1 1 または 2 B 1 の存在下において測定した。B 1 1 の存在は、エフリン B 2 に対する E p h B 4 の結合を、0.3 μ M の I C₅₀ を有して濃度依存的に抑制し、これは、B 1 1 が E p h B 4 受容体の同じ結合部位と競合することを示している。しかし、2 B 1 抗体は遮断作用を示さない (図 5)。

【0087】

モノクローナルのファージの E L I S A

個々のコロニーを、3 回目の選択から選び、100 μ g / m l のアンピシリンおよび 1 % のグルコースを補った、96 ウェルプレート (Sarstedt) に入っている 100 μ l の 2 $\times$ T Y 培地において、攪拌しながら 37 $^{\circ}$ C において一晚培養した。翌日に、培養物を、同じ培地において 100 倍に希釈し、2 時間にわたって 37 $^{\circ}$ C において攪拌しながらインキュベートした。次に、10⁹ の K M 1 3 ヘルパーファージを有している 25 μ l の培地を加え、1 時間にわたって 37 $^{\circ}$ C においてインキュベートした。細菌を遠心分離し、細胞ペレットを、50 μ g / m l のカナマイシンを補った 2 $\times$ T Y に再懸濁させ、30 $^{\circ}$ C において一晚培養した。最後に、培養物を遠心分離し、50 μ l の上清を、上述した同じ条件における E L I S A のために使用した。

【0088】

配列分析

複数のオリゴヌクレオチド (すなわち、p e l B F o r w a r d プライマー (5'-CATAA TGAAATACCTATTGCCTA-3' : 配列番号 2) および c m y c R e v e r s e プライマー (5'-CT TATTAGCGTTTGCCATT-3' : 配列番号 3)) を用いた P C R によって、s c F v 由来のコード配列を増幅させた。複数の酵素 (使用されなかったオリゴヌクレオチドを除去するための、30 分にわたる 37 $^{\circ}$ C における E x o I (USB)、および残った d N T P を除去するための、15 分にわたる 80 $^{\circ}$ C における S A P (USB)) を用いて、P C R 産物を処理し、そのような産物を、両方のオリゴヌクレオチドとともに配列決定した。配列を得た後に、互いを比較して、ClustalW プログラムおよび翻訳ツール ExPASy Proteomics Server を用いて固有の配列のクローン数を決定した。

【0089】

s c F v の p E T 2 8 b へのサブクロニング

精製を容易にするヒスチジンテイルを選択された s c F v に付加するために、ベクター

p E T 2 8 b (Novagen) にクローニングした。それぞれが、X h o I および R c a I の 2 つの制限酵素部位を含んでいるプライマー、p E T 2 8 - s c F v M e h t a 5' (5' CAGTCATCATGAAATACCTATTGCCTAC3' : 配列番号 4) および p E T 2 8 - s c F v M e h t a 3' (5' CACCGGACTCGAGTGC GGCCCATTCAG3' : 配列番号 5) を用いた P C R によって、s c F v を増幅させ、続いて、X h o I および R c a I と部位適合性の N c o I を用いてあらかじめ消化されている p E T 2 8 b ベクターにクローニングした。挿入物：ベクターのモル比を 3 : 1 に設定し、T 4 リガーゼ酵素 (Roche) を用いた 1 6 °C における一晩のインキュベーションによって、消化された挿入物およびベクターのライゲーションを実施した。E. coli 株 D H 5 a ライブラリコンピテント細胞を、ヒートショックによって形質転換し、5 0 μ g / m l のカナマイシンを有している LB-Agar (L B、“溶原性ブロス” 10) のプレート上において選択した。各コンストラクトのポジティブコロニーを、カナマイシンを補った L B に植菌し、3 7 °C において一晩培養した。Wizard キット (Promega) を用いて組換えベクターを精製し、D N A 配列決定することによって配列を確認した。

【0090】

s c F v の発現および精製

E. coli 株 B L 2 1 (D E 3) コンピテント細胞を、ヒートショックによって組換えプラスミドを用いて形質転換した。5 0 μ g / m l のカナマイシンを有している L B プレート上において、形質転換体の細菌を選択した。培養物の O D ₆₀₀ が 0. 6 になったときの、1 m M の最終濃度の I P T G (イソプロピルー β - D - 1 - チオガラクトピラノシド) を用いた誘導によって、s c F v 発現を実施した。S D S ポリアクリルアミドゲル (ド 20 デシル硫酸ナトリウム) によって s c F v の発現レベルを分析し、クーマーシーブリアントブルーを用いて染色した。機能的な s c F v は細胞周辺質領域に集中しているので、穏やかな浸透圧ショックによって細菌の外壁を溶解させ、2 0 μ g / m l のベンズアミジン (Sigma) および 1 0 μ g / m l のダイズトリプシン阻害剤 (Sigma) を補った 1 / 5 0 倍体積の T E S 緩衝液に、細胞を、再懸濁させ、続いて 0. 2 × T E S 緩衝液において 1. 5 倍に希釈した。溶菌液を、3 0 分にわたって氷上に放置し、1 6 2 5 0 × g において 1 0 分にわたって遠心分離し、周辺質画分を含んでいる上清を回収した。

【0091】

Ni²⁺ HisTrap (GE Healthcare) のカラムを用いた、固定化金属に対するアフィニティークロマトグラフィー (I M A C) によって、s c F v の精製を実施し、続いて、コンピ 30 ュータ AKT A xpress に対してタンデムに連結したゲル濾過 HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare) のカラム上において脱塩した。アフィニティークラムの平衡緩衝液として、2 0 m M のリン酸ナトリウム (p H 7. 4)、0. 5 M の N a C l、2 0 m M のイミダゾールを用い、0. 3 M のイミダゾールの濃度を有している平行緩衝液と同じ緩衝液を、溶出緩衝液として用いた。ゲル濾過によってこの緩衝液を P B S に交換した。

【0092】

免疫プロット (ウエスタンブロット)

マウスの組換えタンパク質エフリン B 2 - F c、マウスのエフリン B 2 - F c およ 40 びヒトのエフリン B 3 - F c (R & D) を、1 0 % ゲルの S D S ポリアクリルアミドにおける電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜 (GE Healthcare) に転写させた。3 % のスキムミルク粉末の P B S を用いて 1 時間にわたって膜をブロッキングした後に、3 % の粉ミルクの P B S において 1. 5 倍希釈した周辺質画分とともに、1 6 時間にわたって 4 °C においてインキュベートした。使用した 2 次抗体は、2 時間にわたる室温における 1 : 1 0 0 0 倍希釈の c - M y c (Sigma)、および 1 時間にわたる室温における 1 : 5 0 0 0 倍希釈の抗マウスのペルオキシダーゼ結合物 (Sigma) であった。ECL 試薬 (ECL、“Enhanced Chemiluminescence”) をともなったインキュベーションによって可視化した。

【0093】

s c F v の速度定数の分析

s c F v の親和性定数を試験するために、BIAcore X 装置 (BIAcore) を用いた表面プラ 50

ズモン共鳴の手法を用いた。10 μ l / 分の流量において7分にわたって、1 : 1 の比における0.4 MのEDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド) および0.1 MのNHS (N-ヒドロキシコハク酸塩) を用いたチップのデキストランマトリクスのカルボキシル基の活性化によって、エフリン B2-FcをCM5チップ (GE Healthcare) の表面に共有結合させた。pH 4の10 mMの酢酸ナトリウムにおいてエフリン B2-Fcタンパク質を10 μ g/mlまで希釈し、HBS-E P緩衝液 (10 mMのHEPES (pH 7.4)、150 mMのNaCl、3 mMのEDTA、0.005 %の界面活性剤P20) (GE Healthcare) において、この溶液の30 μ lを、10 μ l / 分の流量においてチップ表面上を通過させた。過剰に活性化したエステル基を、7分にわたる10 μ l / 分の流量における1 Mのエタノールアミン (pH 8.5) の注入によってブロックした。このプロトコルを用いて、約2000応答ユニット (RU) のエフリン B2を固定化した。

【0094】

s c F vの親和性定数を決定するために、増加する順序において異なる濃度の抗体を、30 μ l / 分の流量において継続的に注入した。センサグラムを得た後に、ラングミュアの1 : 1モデルによる評価プログラムBIAsoftwareを用いて、親和性定数を算出した。

【0095】

E p h B4との結合についての、競合の分析

表面プラズモン共鳴競合性結合アッセイによって、E p h B4受容体に対するエフリン B2の結合を阻害するs c F vの能力を分析した。上述した同じプロトコルを用いて、可溶性のE p h B4 (R&D) をCM5チップ (GE Healthcare) に結合させた。各s c F vの希釈系列を、HBS-E P緩衝液における定濃度 (0.2 μ M) のエフリン B2と混合し、30 μ lの各混合物をE p h B4の被覆チップに対して20 μ l / 分の流量において注入した。E p h B4に結合したエフリン B2の相対量は、抗体の対応する濃度に応じて表されている。

【0096】

s c F v B11 抗エフリン B2を用いたE p h B4シグナル伝達の阻害

エフリン B2に誘導されるリン酸化を介したE p h B4の活性化を遮断する抗エフリン B2 s c F vの能力を試験するために、細胞アッセイを実施した。当該細胞アッセイでは、エフリン B2を一過性に発現しているHEK293細胞が、高レベルのE p h B4および低レベルのエフリン B2を発現することによって特徴づけられているH U V E C細胞を刺激するために使用された。結果を図5に示す。20分にわたる2つの細胞のインキュベーションの後に、HEK293細胞の表面に発現されているエフリン B2は、H U V E C細胞におけるE p h B4の効率的なリン酸化を誘導する。しかし、この過程におけるs c F v B11の存在は、E p h B4のリン酸化のほぼ完全な阻害をもたらし、s c F v B11を用いた処理は、細胞間の直接的な接触と関連して、エフリン B2およびその受容体E p h B4の間における相互作用を遮断するというを示している。この作用は、s c F v B2を用いた処理を実施したときには、認められなかった。s c F v B2の場合、E p h B4のリン酸化レベルは、抗体の非存在下に認められるリン酸化レベルと同等であった。

【0097】

E p h B4のリン酸化細胞アッセイ

5 %のウシ胎児血清を補ったRPM1 (Sigma) において培養したHEK293細胞を、プラスミドp c D N A 3 - e p h r i n B2を用いてトランスフェクトした。4.5 $\times$ 10⁶のHEK293細胞を、プラスチックボトルT-75 (Nunc) に播種した。翌日に、1 mlのOPTIMEM培地 (Invitrogen) における20 μ gのp c D N A 3 - e p h r i n B2および60 μ lのFUGENEトランスフェクション試薬 (Roche) を有している混合物を調製し、室温において30分にわたってインキュベートした。無血清のOPTIMEM培地 (Invitrogen) を用いて数回にわたって単層の細胞を洗浄し、DNA-FUGENEの混合物を加えた。37 $^{\circ}$ Cおよび5 %のCO₂における5時間にわたるインキュベーションの後に、培地

を取り除き、5%のウシ胎児血清を含んでいるRPMIを加えた。48時間目に、5mMのEDTA-PBSを用いてトランスフェクションした細胞を惹起させ、 5×10^6 細胞をHUVEC細胞とともに、P100プレート(Falcon)に加えた。当該HUVEC細胞は、10%のウシ胎児血清を補ったEGM Bullet Kit培地(Lonza)において、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のscFv抗エフリンB2の存在下または非存在下でコンフルエントまで培養されていた。37℃および5%のCO₂における20分にわたるインキュベーションの後に、プロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche)およびホスファターゼ(Sigma)を補った溶解緩衝液(100mMのTris HCl(pH8.0)、150mMのNaCl、1mMのEDTA、5mMのDTT、0.5%のTriton X100)を用いて、細胞を溶解させた。16000×gおよび4℃において25分にわたって溶解物を遠心分離し、それから、EphB4に特異的な抗体(R&D)およびセファロースに結合されたGタンパク質(GE Healthcare)を用いて、16時間以上にわたって4℃においてあらかじめ形成された複合体とともに、上清を2時間にわたって4℃においてインキュベートした。最後に、溶解緩衝液を用いて2回にわたって免疫複合体を、洗浄し、7.5%のポリアクリルアミドゲルのSDS-PAGEにおいて電気泳動した。

10

【0098】

リン酸化されたEphB4を免疫プロットによって検出した。これを実施するために、抗EphB4によって免疫沈降され、電気泳動によって分離されたタンパク質を、ニトロセルロース膜Hybond-C(GE Healthcare)に転写し、0.05%のTween20(Sigma)および3%のPhosphoblocker(登録商標)ブロッキング試薬(Cell Biolabs, Inc.)を補ったPBSを用いて、1時間にわたって室温においてブロッキングした。それから、ペルオキシダーゼと結合されているモノクローナル抗体4G10抗ホスホチロシン(Millipore)の1:2000希釈物とともに、16時間にわたって4℃において膜をインキュベートした。SuperSignal(登録商標)West Femto Substrate(Thermo Scientific)による化学発光検出を用いて可視化した。総EphB4の検出のために、同じ膜を、Strong Plus ReBlot試薬(Cheicon)を用いて15分にわたって室温において再生し、0.05%のTween20および5%のスキムミルクを有しているPBSにおいて1:1000に希釈した抗EphB4抗体とともに、16時間にわたって4℃においてインキュベートした。0.05%のTween20を有しているPBSを用いた数回の洗浄後に、ペルオキシダーゼ結合抗ヤギ抗体(1:500)(Dako)とともに、2時間にわたって室温において、膜をインキュベートし、ECL Plus試薬(GE Healthcare)を用いてバンドを可視化した。

20

30

【0099】

(実施例2: HUVEC細胞におけるB11および2B1抗体の、インビボにおける抗血管新生活性)

血管新生能および内皮細胞の遊走に対するB11および2B1抗体の作用を分析した。このために、HUVEC細胞(臍静脈内皮細胞)を用いた、Matrigelにおける管形成およびインビトロの傷治癒アッセイの実験をそれぞれ行った。

【0100】

Matrigelにおける管形成の実験において、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のB11抗体の存在下におけるHUVEC細胞は、抗体なしのコントロールまたは無関係なscFvを用いたコントロールより2倍少ない管を構成する(図6)ことに加えて、処理の6時間において細管の数が減少しており、単層の細胞としてより多く堆積していることが分かった。これは、上記抗体の存在が管の形成を抑制していることを証明している。B11と比べて低い阻害能(コントロールに対して40%)を有していたが、同様の結果がクローン2B1を用いて得られた。

40

【0101】

HUVEC細胞の側方への遊走に対する作用を決定するために、遊走を刺激する因子としての血管内皮成長因子(VEGF)の存在下において、単層の治癒における実験を実施した。傷をつけた24時間後に、過程においてVEGFまたはVEGF+無関係なscF

50

vが存在する場合に、60%の単層細胞は空いた空間に遊走した。一方で、VEGFおよびB11もしくは2B1を用いて処理された傷には、それぞれ25%または30%の細胞が定着し、これらのデータは、遊走刺激なしのネガティブコントロールにおいて遊走した細胞の数(20%)に匹敵した。

【0102】

したがって、両方の実験から、エフリン B2に特異的なB11および2B1抗体(特に前者)は、血管新生能を示し、インビトロにおける内皮細胞の遊走を阻害可能と結論づけられる。

【0103】

マトリゲルにおける柱状構造の形成アッセイ

Matrigel((BD Biosciences))を用いて24ウェルプレートに被覆し、ゲル化のために20分にわたって37℃においてインキュベートした。それから、10%のウシ胎児血清を補った1mlの完全培地EGM-2 bullet Kit(Lonza)における 5×10^4 のHUVEC細胞を播き、100 μ g/mlまでの異なる抗体の存在下において、6時間にわたって37℃においてインキュベートした。カメラを備えている顕微鏡Axiovert 100(Zeiss)において得られたデジタル画像を解析することによって、6時間目に柱状構造の形成の程度を調べた。

【0104】

インビトロの傷治癒試験

インビトロの傷治癒を利用して、細胞遊走アッセイを実施した。0.5%のウシ胎児血清を補ったEGM-2(Lonza)を用いた1時間のインキュベーション後に、24ウェルプレートにおいてコンフルエントまでHUVEC細胞を増殖させ、ピペットのチップを用いて線状のひっかきを作り、その領域の画像を撮影した。遊走刺激剤としての100 μ g/mlのVEGF(血管内皮成長因子)および100 μ g/mlの対応する抗体の存在下または非存在下(コントロール条件)において、細胞をインキュベートした。上記領域の画像を撮影してから24時間後に、ひっかきを実施した時点から、傷に向かって側方に遊走した細胞をカウントし、遊走した領域のパーセンテージを決定した。

【0105】

(実施例3:マトリゲル移植片の血管新生に対するB11および2B1抗体の作用)

2B1およびB11がインビボの血管新生を直接的に阻害可能であることを証明するために、1群につき6匹の動物を用いて、胸腺欠損のnu/nuヌードマウスにおける、VEGF(Peprotech)を補ったMatrigel移植片の実験を実施した。取り出した移植片に存在するヘモグロビンの定量、およびCD34の免疫組織染色、これに続くこの血管マーカーの陽性領域の算出によって、柱状のネットワーク形成の評価を、対応するMatrigel移植の6日後に実施した。それぞれの抗体を用いた処理を、Matrigelの移植の直後に開始し、300 μ g/マウスの最終投与量まで隔日に行った。VEGFなしの移植片を、ネガティブコントロールとして使用し、当該移植片は、血管新生をまったく生じなかった(図8A)。一方で、VEGF移植片、ならびにVEGFおよび無関係なscFvを用いて処理した移植片は、顕著な血管新生を示し、実験のポジティブコントロールとみなされた。抗体B11を用いて処理した動物は、成長因子なしのMatrigelを用いて移植した血管新生と匹敵する、ポジティブコントロールより95%低い最小の血管新生を示し、CD34についてポジティブな内皮細胞および移植片におけるヘモグロビンの欠如に反映されている(図8B)。2B1抗体を用いて処理したマウスの群は、ポジティブコントロールに対して、血管新生の50%の阻害を示した。

【0106】

インビボの管形成アッセイ

4~6週齢の胸腺欠損のnu/nuマウス(Charles River)を使用した。コントロール群について、2%のイソフルレンを用いて麻酔したマウスに200 μ lのMatrigel(BD Biosciences)を注入した。他の群の動物の上腹部領域に、50ng/mlのVEGFおよび375 μ g/mlのヘパリン(Sigma)を補った200 μ lのMatrigelを注入した。

血管内への s c F v を用いた処理を、Matrigel 移植の直後に開始し、300 μ l / マウスの総投与量まで隔日に行った。6 日後に移植片を取り出し、新たな血管の形成を、血管のマーカーである抗 C D 3 4 を用いて染色した組織切片に存在するヘモグロビンの濃度にしたがって決定した。ヘモグロビンを測定するために、Matrigel 移植片の各部分を取り、各部分の重量を計り、各部分を 300 μ l の蒸留水においてホモジナイズした。16000 $\times$ g における 5 分にわたる遠心分離の後に、100 μ l の上清を取り、TMB 基質 (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) (Sigma) を用いて 1 : 1 に希釈した。15 分後に、650 nm における吸光度を測定することによって呈色反応を評価した。最後に、値を移植片の重量に対して標準化した。

【0107】

免疫組織学分析のために、移植片の一部を、10%の緩衝化したホルマリンにおいて固定し、パラフィンに包埋し、ミクロトームを用いて 2.5 μ m の厚さに薄片化した。T r i s - E D T A (p H 9.0) を用いて抗原性不活化処理を実施し、内皮細胞を、1 : 75 に希釈したラットのモノクローナル抗 C D 3 4 (Abcam) を用いて標識し、続いて、ペルオキシダーゼを用いて標識した抗ラットの 2 次抗体 (Biocare Medical) を用いた。3, 3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド プラス (DAKO) を用いて可視化し、ヘマトキシリンを用いて対比染色した。ポジティブな細胞を AxioVision system (Zeiss) によってカウントした。

【0108】

(実施例 4 : B 1 1 および 2 B 1 抗体は、胸腺欠損マウスにおけるヒト腫瘍の発達を抑制する)

インビボおよびインビトロにおける血管新生に影響を与える B 1 1 および 2 B 1 抗体の証明された能力を考慮して、それらが腫瘍の発達のような、血管新生に強く依存する過程を阻害可能であるか否かを調べた。このために、膵臓がん細胞 (B x P C 3)、結腸 (S W 6 2 0)、および肺 (H 4 6 0) を用いた 3 つの異種移植片マウスモデルを使用した。結腸細胞および肺細胞は、発せられる蛍光を分析することによって腫瘍の進行を追跡するための蛍光タンパク質 m C h e r r y を恒常的に発現している。B 1 1 および 2 B 1 の両方の抗体は、採用された 3 つの細胞株におけるインビトロの細胞生存能力に対して影響を生じないことを、あらかじめ確認された。

【0109】

8 匹のマウスの 2 群に対して、B x P C 3 細胞を皮下に移植し、腫瘍塊が肉眼によっていったん検出されると、B 1 1 および 2 B 1 を用いた 20 m g / k g の総投与量まで隔日の皮下に対する処理、またはネガティブコントロールとしての P B S を用いた処理を開始した。腫瘍細胞の移植の 60 日後に、B 1 1 抗体を用いて処理したマウスの群が腫瘍サイズの有意な低下 (コントロール群の平均の腫瘍サイズと比べて 70% の成長阻害) を示したことが、認められた (図 9)。2 B 1 処理マウスは、腫瘍成長の中程度の低下 (約 35%) を示した。

【0110】

腫瘍成長におけるこの阻害を担っている機序を調べるために、抗体を用いた処理の終了から 1 日においていくつかの腫瘍を取り出し、活性なカスパーゼ 3、K i 6 7、C D 3 4 および L y v e 1 のそれぞれに対する抗体を用いて、アポトーシスの状態、増殖性、血管新生性およびリンパ管新生性を評価するために、免疫組織学的分析を実施した。B 1 1 を用いて処理した腫瘍においてアポトーシスを起こした細胞の数は、コントロールと比べて 5 倍に増加していた。一方で、2 B 1 を用いて処理した腫瘍およびコントロールの間におけるアポトーシスを起こした細胞の数における差は、有意ではなかった。

【0111】

増殖マーカー K i 6 7 について、増殖性は、処理動物およびコントロール動物の間において差異がなく、3 つのすべての群において約 30% の K i 6 7 ポジティブ細胞を示した。

【0112】

腫瘍におけるCD34についてポジティブな領域を測定することによって血管の存在について分析したとき、B11を用いて処理した腫瘍において、コントロールに対して80%の低下、および2B1を用いて処理した腫瘍において、コントロールに対して55%の低下が認められた。

【0113】

最後に、Lyveマーカーによるリンパ管の存在を分析した。B11を用いて処理した腫瘍において、リンパ管をほぼ完全に欠いていると観察された。また、2B1を用いて処理した腫瘍において、リンパ管の数の有意な減少が観察されたが、B11の場合ほど顕著ではなかった。

【0114】

それから、他の異種移植モデルにおけるB11抗の抗血管新生能、抗リンパ管新生能、および腫瘍成長の阻害能を、上述した同じ手順にしたがって調べた。細胞株SW620結腸がんの場合、移植後の23日に腫瘍サイズの90%の低下が観察され(図11A)、肺細胞の場合、65%の低下が観察された(図11B)。それぞれのサイズにおけるこの低下は、腫瘍細胞に存在する蛍光発光mCherryタンパク質の類似の減少を伴って確認された。膵臓がん細胞のモデルにおいて観察されている通り、免疫組織化学的分析によって、B11を用いて処理した腫瘍における血管の数の減少およびリンパ管の非存在が確認された。

【0115】

したがって、エフリン B2に特異的なB11抗体は、強い抗血管新生能および抗リンパ管新生能を有しており、当該抗体を用いて処理した腫瘍の成長の低下または遅延を生じると結論付けられ得る。また、2B1抗体は良好な抗血管新生能および抗リンパ管新生能を有している。

【0116】

異種移植片

3種類の異種移植片がある：膵臓がん細胞(BxPC3)、結腸(蛍光タンパク質mCherryを安定して発現しているSW620(Clontech))、および肺(蛍光タンパク質mCherryを安定して発現しているH460)。3つの場合のすべてにおいて、同じプロトコルに基本的にしたがった。0.2mlのPBSの体積において百万~5百万の腫瘍細胞を、免疫不全マウス(ヌードまたはSCID、“重症複合免疫不全”)の横腹の皮下に、肉眼によって腫瘍塊を確認できるまで(約30mm³)注入した。このときに、2週間にわたってか、または20mg/kgの最終投与量に達するまで隔日における、100~200μlのPBSにおける対応する抗体の尾静脈を介した血管内投与による処理を開始した。コントロール動物は同じガイドラインにしたがってPBSを受けた。1週間に2~3回にわたってキャリバーを用いて腫瘍のサイズを測定し、mCherry蛍光タンパク質によって標識された細胞を用いて移植されたマウスの場合、mCherryタンパク質の発光強度に応じた腫瘍成長を示すために、IVIS imaging System Spectrum 200(Caliper Life Sciences)において610nmに対する蛍光発光強度も測定した(1秒および1平方センチメートル当たりの光子の数)。画像の最終的な処理は、残余のシグナルの減算(自己蛍光の排除)およびシグナル強度のプロファイルにしたがったカラースケールを包含している。腫瘍が1500~2000mm³の所定のサイズに達したとき、実験動物の使用に関する現行の法律にしたがってCO₂を用いた窒息によって動物を屠殺した。ステューデントt検定を用いたパラメータ解析によって腫瘍成長を評価する統計解析を実施した。統計的な有意さの程度をP≤0.05に設定した。

【0117】

組織学的分析

異種移植したマウスから得られた腫瘍サンプルを、抗体を用いた処理の終了後の1日に屠殺した動物から摘出した。サンプルを、ホルマリンを用いて固定し、パラフィンに包埋した。各腫瘍から得られた組織学的切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンを用いて染色したか、または免疫組織化学的な性質決定のために調製した。ウサギ抗Ki67(DAKO)

10

20

30

40

50

のモノクローナル抗体を用いた染色によって、腫瘍細胞の増殖活性を分析し、ウサギのポリクローナル抗活性カスパーゼ 3 (R&D) を用いて、アポトーシスを起こした細胞を検出し、特異的なラットのモノクローナル抗体 (Abcam) を用いた内皮細胞における CD 3 4 を染色することによって、新たな血管新生を測定し、ウサギのポリクローナル抗 L Y V E 1 (Abcam) を用いて染色することによって、リンパ管を標識した。3, 3-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド p l u s (DAKO) を用いて、すべての切片を可視化し、ヘマトキシリンを用いて対比染色した。AxioVision システム (Zeiss) によって、ポジティブな細胞をカウントした。

【0118】

(実施例 5：インビボにおける腫瘍塊の生体分布および部位)

動物における抗体の分布を解析し、腫瘍進行の領域における局在を確認するために、腫瘍細胞（ここでは H 4 6 0 肺がん細胞）を用いて異種移植したマウスを、近赤外発光する蛍光色素を標識した抗体 AlexaFluor (登録商標) 750 (Molecular Probes) を用いて処理する実験を設計した。腫瘍塊の位置を確かめるために、蛍光タンパク質 m C h e r r y を発現している細胞を使用した。胸腺欠損の n u / n u マウスの背側領域の皮下に H 4 6 0 細胞を移植した。腫瘍が約 0.3 cm^3 の体積に達したとき、AlexaFluor (登録商標) 750 と結合した抗体の $15 \mu\text{l}$ を血管内に投与した。投与の 0.5、2、6、24 および 48 時間後に、腹側領域および背側領域から画像を撮影した。マウスの腹側画像の調査は、投与の半時間後 (図 12 A) から、6 時間 (図 12 B) にピークを有している腫瘍塊における抗体の位置の確認に役立った。6 時間に抗体 B 1 1 によって発せられている腫瘍における蛍光の強度は、抗体 2 B 1 によって示される強度より明らかに優れており、B 1 1 が、2 B 1 より効率的に、腫瘍に位置することを示していた。30 分後において、膀胱および腎臓におけるシグナルは非常に強く、抗体の腎への急速かつ能動的な排出を示していた。48 時間において、シグナルは、これらの領域において自己蛍光と近い値を有して非常に弱く、ほぼすべての抗体が完全に排出されていることを示していた。さらに、動物は、上腹部領域において最初の数時間の間に、肝胆道経路による抗体の一定の除去に起因する蛍光シグナルを示し、この事実は、臓器を分けて分析したときに証明され、6 時間において肝臓は約 $1 \times 10^8 \text{ p/s/cm}^2/\text{sr}$ (光子/秒/平方センチメートル/エステルジアン (esterdian)) の蛍光を示すことが分かった。

【0119】

生体分布

s c F v 分布の実験のために、蛍光タンパク質 m C h e r r y を安定して発現している肺がん細胞株 H 4 6 0 を用いて異種移植されたヌードマウスを使用した。腫瘍における位置を確実に決定するために、蛍光マーカーを有している細胞を使用した。 5×10^6 細胞を皮下に注入し、腫瘍塊が約 500 mm^3 のサイズに達するまで放置した。同様に、製造者の指示にしたがって、SAIVI (商標) Rapid Antibody Labeling Kit (Invitrogen) によって蛍光色素 AlexaFluor (登録商標) 750 に s c F v を結合させた。腫瘍が期待されるサイズに達すると、 $15 \mu\text{g}$ の標識した抗体を各マウスに注入した。インビボ画像化システム IVIS Spectrum 200 (Caliper Life Sciences) を用いて、標識した s c F v の投与後の 0.5、2、6、24 および 48 時間に、 749 nm に対して蛍光色素を励起しながらインビボ蛍光画像を撮影した。自己蛍光を除いた後に、シグナル強度のプロファイルにしたがったカラースケールを示す処理を行った。

【図面の簡単な説明】

【0120】

【図 1】選択されたクローンの、E. coli における発現を示す図である。

【図 2】クローン 2 B 1 および B 1 1 が大量に精製されていることを示す図である。

【図 3】クローン B 1 1 および 2 B 1 がより特異的であることを示す図である。

【図 4】Biacore (商標) による s c F v 抗エフリン B 2 の親和性分析の結果を示す図である。

【図 5】E p h B 4 に対するエフリン B 2 の結合を遮断する試験の結果を示す図であ

る。

【図 6】マトリゲルにおける内皮細胞 H U V E C によるインビトロの管状構造形成に対する B 1 1 および 2 B 1 の阻害作用を示す図である。

【図 7】インビトロの傷治癒アッセイによる細胞の側方遊走の分析結果を示す図である。

【図 8】インビボにおける管状構造形成の阻害作用の分析結果を示す図である。

【図 9】膵臓がん細胞 (B x P C 3) を用いて異種移植片され、B 1 1 または 2 B 1 を用いて処理したマウスにおける腫瘍成長の阻害を示す図である。

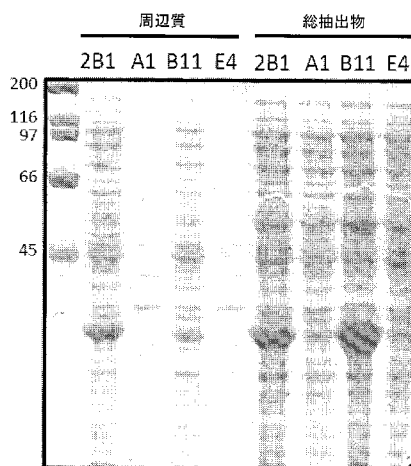
【図 10】膵臓がん細胞 (B x P C 3) を異種移植し、B 1 1 または 2 B 1 を用いて処理した腫瘍の組織病理学的な分析結果を示す図である。

【図 11】B 1 1 が、大腸がん細胞 (S W 6 2 0) (A) および肺がん細胞 (H 4 6 0) (B) を用いて異種移植したマウスにおける腫瘍成長を阻害可能であることを示す図である。

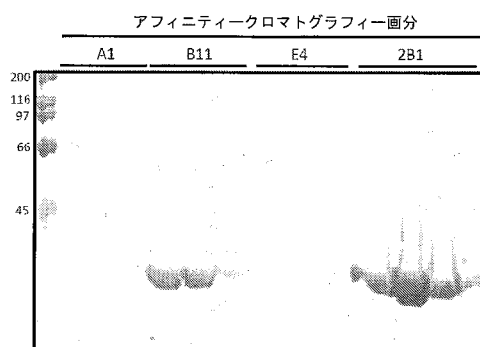
【図 12】B 1 1 および 2 B 1 の体内分布分析、ならびに腫瘍塊の位置を示す図である。

10

【図 1】

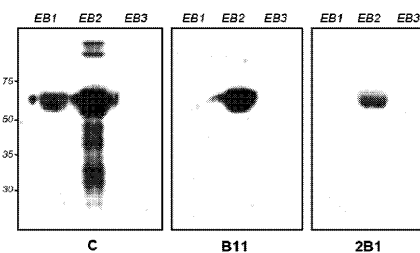


【図 2】

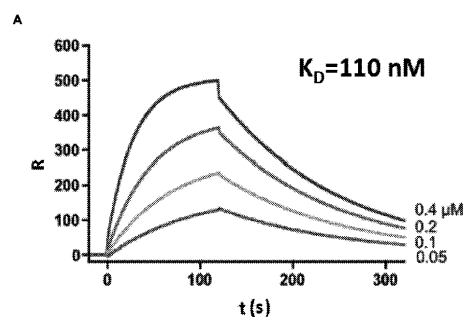


【図 3】

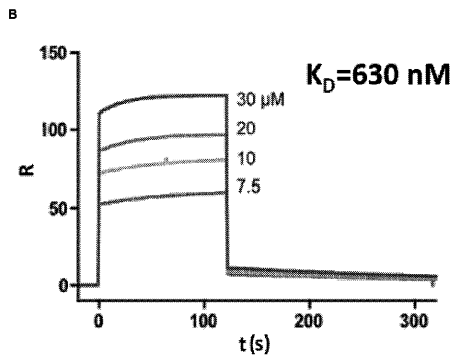
FIG. 3



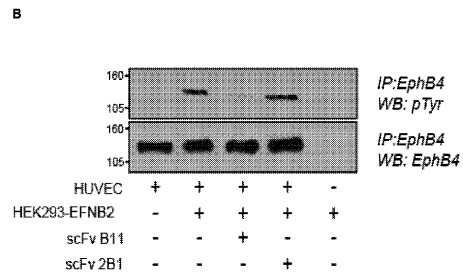
【図 4 A】



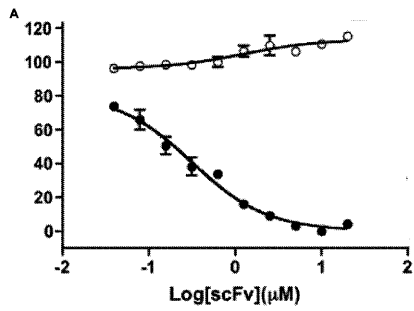
【図 4 B】



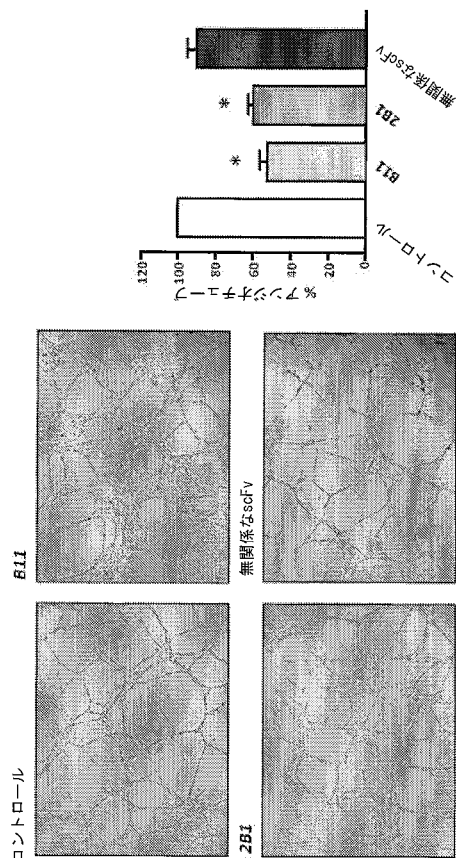
【図 5 B】



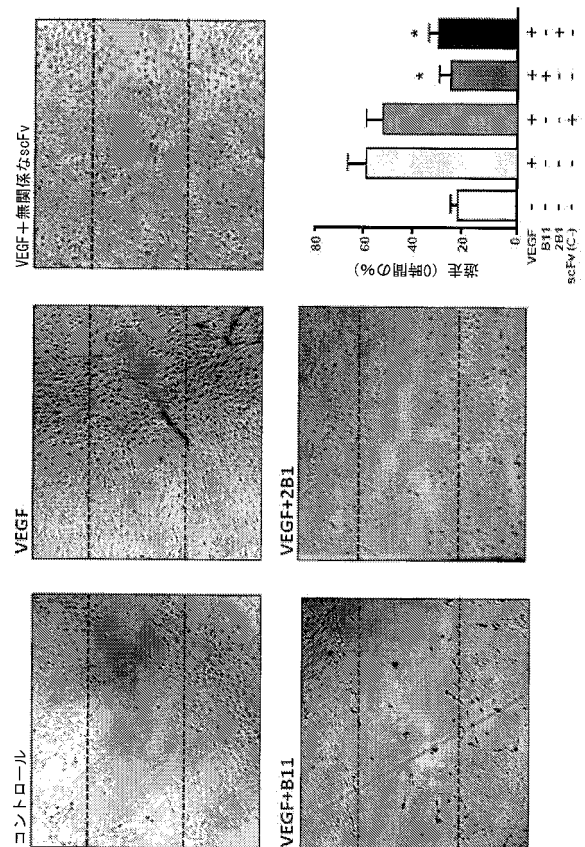
【図 5 A】



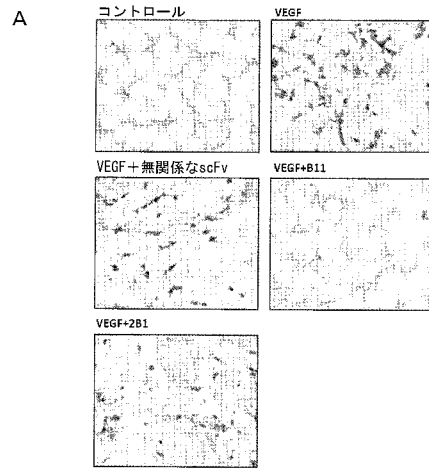
【図 6】



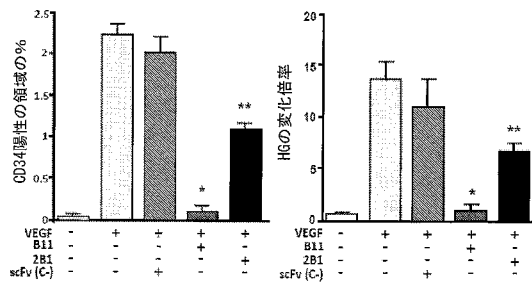
【図 7】



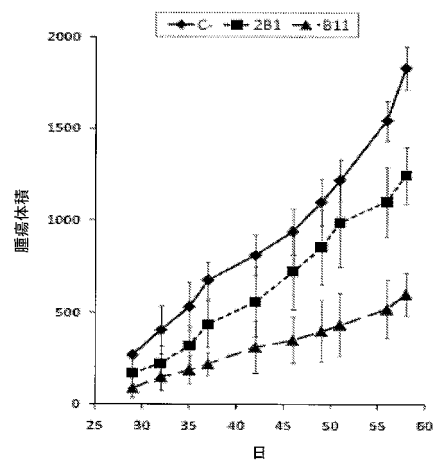
【図 8】



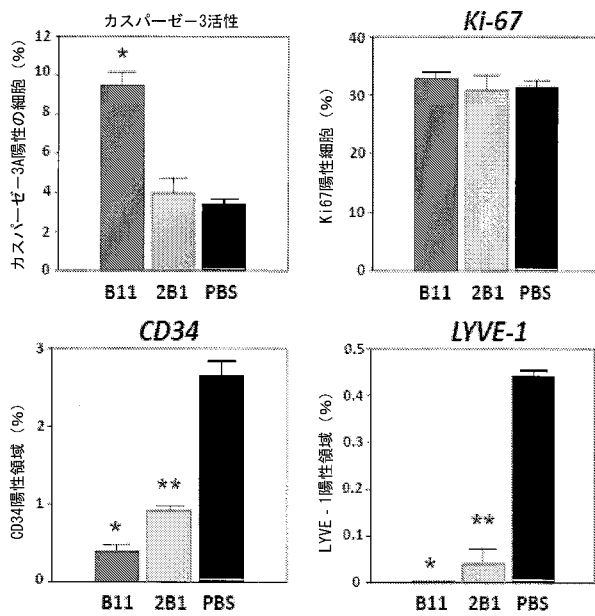
B



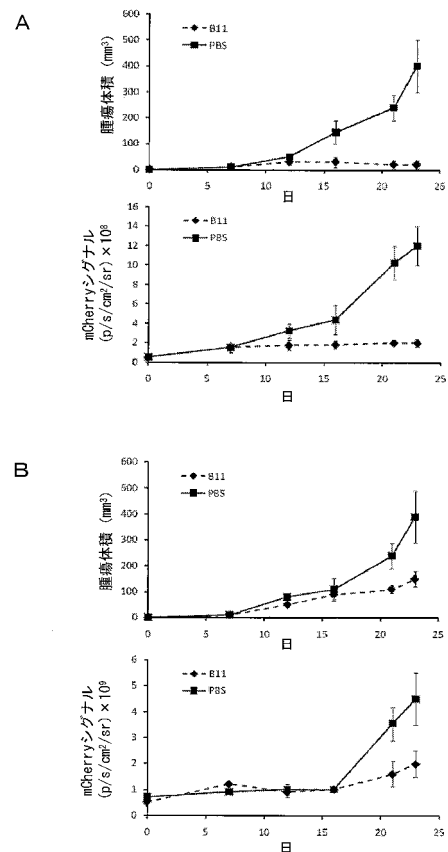
【図 9】



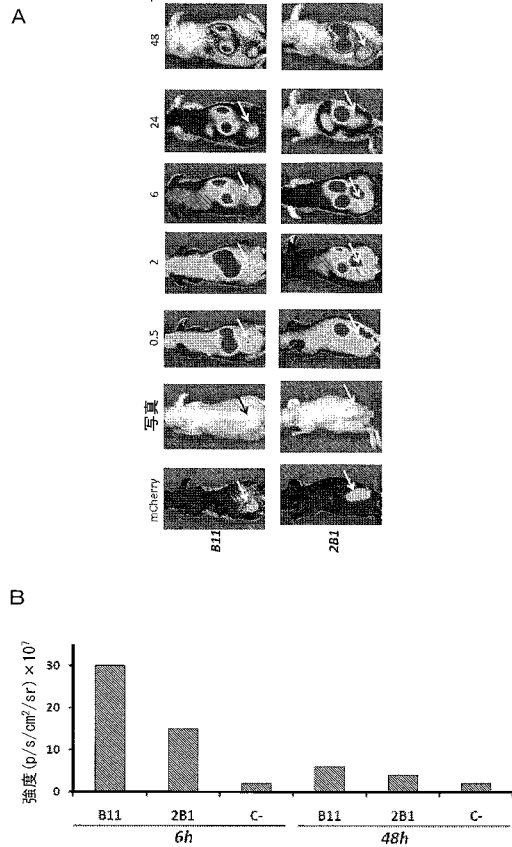
【図 10】



【図 11】



【図 1 2】



【配列表】

2013542720000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成25年5月21日(2013.5.21)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 3】

発明者らによって証明されている通り、本明細書に記載の B 1 1 抗体は、E p h B 4 受容体との結合を阻害するようにエフリン B 2 を特異的に認識する。当該結合の阻害は、インビトロアッセイにおいて、細管形成および内皮細胞 (H U V E C) の遊走能を阻害し、膀胱がん、大腸がんおよび肺がんの細胞を用いたインビボアッセイにおいて、腫瘍における血管およびリンパ管の数を著しく減少させる。本発明者らは、本発明の抗体が腫瘍の増殖を著しく遅らせ、腫瘍のサイズを著しく低下させ得ることを、さらに見出した。本発明者らは、エフリン B 2 の、E p h B 4 との相互作用を B 1 1 抗体が遮断したことを示しており、当該抗体がその受容体を介したエフリンシグナル伝達をどのように阻害可能であるかをも示している (本明細書における図 5 を参照)。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 8】

ベクターは、細胞に遺伝物質を運ぶために使用される核酸分子である。また、ベクターは、上述した遺伝物質の他に、種々の機能要素（転写を制御する要素（例えば、プロモータもしくはオペレータ、エンハンサまたは転写因子の結合のための領域、ならびに翻訳を開始させる制御エレメントおよび翻訳を終結させる制御エレメント）が挙げられる）を含み得る。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組換え発現カセットおよびトランスポゾンが挙げられるが、これらに限定されない。あるベクターは、いったんそれらが宿主細胞に導入されると、自発的に複製または分裂可能である（例えば、細菌の複製開始点を有している細菌ベクターまたはエピソードの哺乳類ベクター）。他のベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれ得、細胞性のゲノムとともに複製され得る。発現ベクターは、作動可能に連結されている遺伝子の発現を導き得るベクターの1つである。発現ベクターは、所望の遺伝子の転写および翻訳に使用され、通常、プロモータに制御されている。プロモータは、所望の遺伝子の転写を制御するヌクレオチドの配列である。プロモータは、所望の遺伝子と作動可能に連結されている。“作動可能に連結されている”は、所望の遺伝子に関する、プロモータ配列の機能的な関連性および位置を指し、例えば、プロモータまたはエンハンサは、コード配列の転写に影響する場合に当該コード配列と作動可能に連結されている。一般的に、作動可能に連結されているプロモータは、所望の配列の直前にある。しかし、エンハンサは、その発現を制御するための所望の配列と近接している必要はない。

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

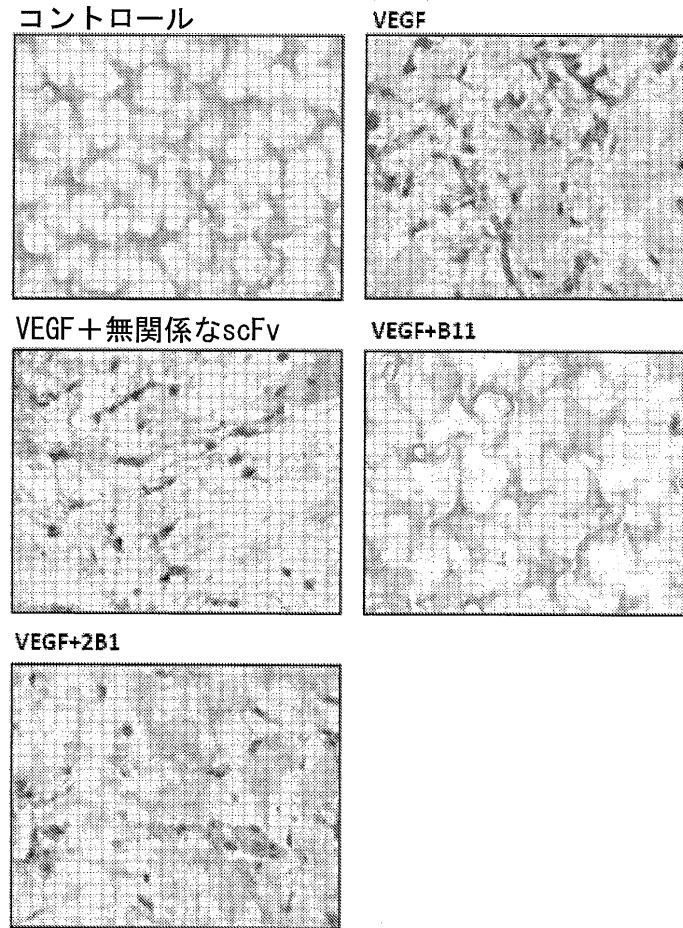
【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

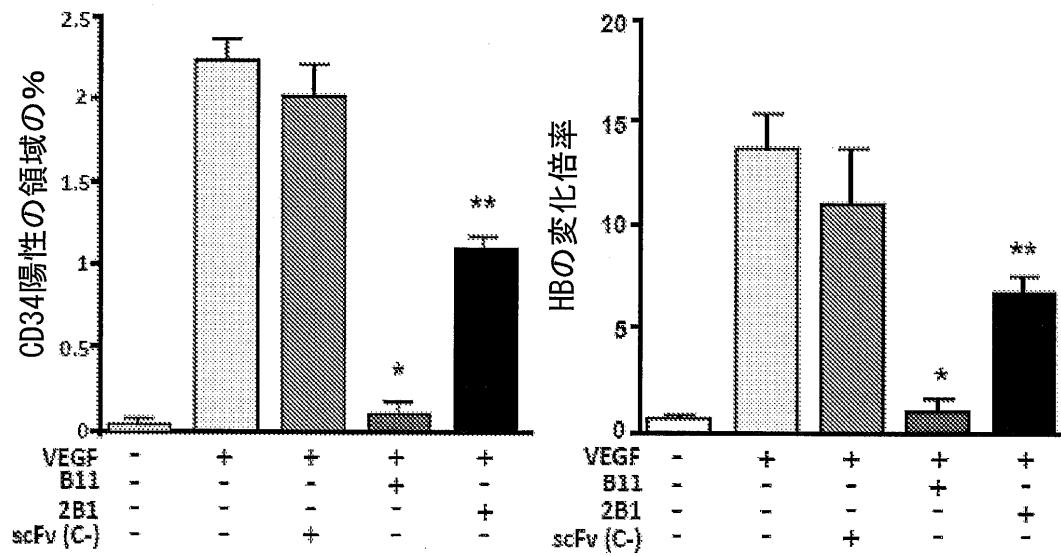
【補正の内容】

【図 8】

A



B



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2011/070655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007053718 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV) 10.05.2007, page 95, SEQ ID NO: 39	1-41
A	EP 1972637 A1 (UNIV STUTTGART) 24.09.2008, SEQ ID NO: 9	1-41
A	WO 2010019565 A2 (MEDLMMUNE LLC) 18.02.2010, the whole document. Cited in the application.	1-41
A	WO 2007127506 A2 (GENENTECH INC) 08.11.2007, the whole document. Cited in the application	1-41
A	WO 2006022295 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 02.03.2006, the whole document.	1-41

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ 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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other 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
22/12/2011Date of mailing of the international search report
(14/02/2012)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04Authorized officer
M. Hernandez Cuellar

Telephone No. 91 3498409

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2011/070655

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2007053718 A	10.05.2007	CA2627890 A AU2006308648 A EP1954720 A EP20060827329 JP2009513147 A US2009252750 A US8039593 B	10.05.2007 10.05.2007 13.08.2008 31.10.2006 02.04.2009 08.10.2009 18.10.2011
EP1972637 AB	24.09.2008	EP20070005603 CA2680085 A WO2008113515 A EP2121759 A EP20080716529 CN101679520 A US2010150916 A JP2010521508 A AT514714 T ES2368764 T	19.03.2007 25.09.2008 25.09.2008 25.11.2009 13.03.2008 24.03.2010 17.06.2010 24.06.2010 15.07.2011 22.11.2011
WO2010019565 A	18.02.2010	NONE	
WO2007127506 A	08.11.2007	CA2638133 A AU2007243132 A AR059096 A EP1976884 A EP20070797087 NO20083593 A KR20080099274 A CN101410413 A JP2009523828 A US2009214564 A ZA200806187 A RU2008134117 A BRPI0706935 A	08.11.2007 08.11.2007 12.03.2008 08.10.2008 19.01.2007 17.10.2008 12.11.2008 15.04.2009 25.06.2009 27.08.2009 28.10.2009 27.02.2010 19.04.2011
WO2006022295 A	02.03.2006	JP2007320850 A	13.12.2007

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2011/070655

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 2007053718 A1 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV) 10.05.2007, página 95, SEQ ID NO: 39	1-41
A	EP 1972637 A1 (UNIV STUTTGART) 24.09.2008, SEQ ID NO: 9	1-41
A	WO 2010019565 A2 (MEDLMUNE LLC) 18.02.2010, todo el documento. Citado en la solicitud.	1-41
A	WO 2007127506 A2 (GENENTECH INC) 08.11.2007, todo el documento. Citado en la solicitud	1-41
A	WO 2006022295 A1 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 02.03.2006, todo el documento.	1-41

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos
 ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
22/12/2011Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
14 de febrero de 2012 (14/02/2012)Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04Funcionario autorizado
M. Hernandez Cuellar
Nº de teléfono 91 3498409

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2011/070655

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2007053718 A	10.05.2007	CA2627890 A AU2006308648 A EP1954720 A EP20060827329 JP2009513147 A US2009252750 A US8039593 B	10.05.2007 10.05.2007 13.08.2008 31.10.2006 02.04.2009 08.10.2009 18.10.2011
EP1972637 AB	24.09.2008	EP20070005603 CA2680085 A WO2008113515 A EP2121759 A EP20080716529 CN101679520 A US2010150916 A JP2010521508 A AT514714 T ES2368764 T	19.03.2007 25.09.2008 25.09.2008 25.11.2009 13.03.2008 24.03.2010 17.06.2010 24.06.2010 15.07.2011 22.11.2011
WO2010019565 A	18.02.2010	NINGUNO	
WO2007127506 A	08.11.2007	CA2638133 A AU2007243132 A AR059096 A EP1976884 A EP20070797087 NO20083593 A KR20080099274 A CN101410413 A JP2009523828 A US2009214564 A ZA200806187 A RU2008134117 A BRPI0706935 A	08.11.2007 08.11.2007 12.03.2008 08.10.2008 19.01.2007 17.10.2008 12.11.2008 15.04.2009 25.06.2009 27.08.2009 28.10.2009 27.02.2010 19.04.2011
WO2006022295 A	02.03.2006	JP2007320850 A	13.12.2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		A
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		D
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 K 39/395		N
		A 6 1 P 35/00		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 110000338

特許業務法人原謙三国際特許事務所

(72)発明者 マルティネス トレクアドラダ, ホルヘ ルイス
スペイン, エー 2 8 0 2 9 マドリード, 3, セ／メルチョル フェルナンデス アルマグロ, フ
ンダシオン セントロ ナシオナル デ インベスティガシオネス オンコロヒカス (セエネイオ
)

(72)発明者 アベンゴザール インファンテス, マリア アンヘレス
スペイン, エー 2 8 0 2 9 マドリード, 3, セ／メルチョル フェルナンデス アルマグロ, フ
ンダシオン セントロ ナシオナル デ インベスティガシオネス オンコロヒカス (セエネイオ
)

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA06 EA04 GA11
HA01 HA11
4B064 AG26 CA02 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA26X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 BB01 CC23 DD63 EE01
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA74