

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5744012号
(P5744012)

(45) 発行日 平成27年7月1日(2015.7.1)

(24) 登録日 平成27年5月15日(2015.5.15)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 9 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-511742 (P2012-511742)	(73) 特許権者	511280973
(86) (22) 出願日	平成21年7月22日 (2009.7.22)		ファームアブサイン インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2012-527234 (P2012-527234A)		大韓民国 テジョン-シ ユソン-グ ジョンミンドン 461-8 テジョン
(43) 公表日	平成24年11月8日 (2012.11.8)		バイオ ベンチャー タウン 412
(86) 国際出願番号	PCT/KR2009/004084	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02010/134666		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成22年11月25日 (2010.11.25)	(74) 代理人	100102118
審査請求日	平成23年11月18日 (2011.11.18)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	10-2009-0044032	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成21年5月20日 (2009.5.20)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	(74) 代理人	100119507
前置審査			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な形態の二重標的抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】
V E G F R - 2 / K D R に対する中和抗体の軽鎖の N - 末端にアンジオポエチン 2 の T i e - 2 に対する結合ドメインがリンカーを介して融合された、二重標的抗体。

【請求項 2】
請求項 1 に記載の二重標的抗体をコードする、D N A。

【請求項 3】
請求項 2 に記載の D N A を含む、組換え発現ベクター。

【請求項 4】
請求項 3 に記載の組換え発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項 5】
請求項 4 に記載の宿主細胞を培養する段階；および
前記宿主細胞の培養液から二重標的抗体を単離する段階
を含む、請求項 1 に記載の二重標的抗体を製造する方法。

【請求項 6】
二重標的抗体が、プロテイン A 親和性カラム、S P - セファロースカラム、およびサイズ排除クロマトグラフィによる高速液体クロマトグラフィ (F P L C) を用いてさらに精製される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】
請求項 1 に記載の二重標的抗体を含む、血管新生関連疾患治療用薬学的組成物。

【請求項 8】

血管新生関連疾患が、癌である、請求項 7 に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

癌が、胃癌、肝癌、肺癌、甲状腺癌、乳癌、子宮頸部癌、大腸癌、膵臓癌、直腸癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、黒色腫、前立腺癌の骨転移癌、卵巣癌および血液癌からなる群より選択される、請求項 8 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は、抗体の重鎖または軽鎖の N - 末端に水溶性リガンドが融合された新規な形態の二重標的抗体、この二重標的抗体をコードする DNA、この DNA を含む組換え発現ベクター、この組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞、この宿主細胞を培養して二重標的抗体を製造する方法、および前記二重標的抗体を含む薬学的組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

背景技術

血管新生 (a n g i o g e n e s i s) とは、内皮細胞の成長、分裂、移動などによって既存の血管から新たな血管が生成される機序であり、傷の治癒や女性の生理周期を含む正常的な成長過程で重要な役割を果たしており (R i s a u , N a t u r e , 3 8 6 : 6 7 1 , 1 9 9 7) 、のみならず、異常に過剰な血管新生は腫瘍の成長と転移 (m e t a s t a s i s) 、老人性黄斑変性 (a g e - r e l a t e d m a c u l a r d e g e n e r a t i o n ; A R M D) 、糖尿病性網膜症 (d i a b e t i c r e t i n o p a t h y) 、乾癬 (p s o r i a s i s) 、関節リウマチ (r h e u m a t o i d a r t h r i t i s) 、および慢性炎症 (c h r o n i c i n f l a m m a t i o n) などの疾患に決定的な役割を果たすことが知られている (C a r m e l i e t a n d J a i n , N a t u r e , 4 0 7 : 2 4 9 , 2 0 0 0) 。

【0003】

1971年に J . F o l k m a n 博士によって、腫瘍の成長と転移は血管新生に依存的であり、このため、抗血管新生に焦点をあてた治療法は固形癌に対する新規な治療剤になり得るという仮説が提起されて以来、過剰な血管新生機序の抑制に関する研究は多数の研究者の関心を集めている (F e r r a r a a n d K e r b e l , N a t u r e , 4 3 5 : 9 6 7 , 2 0 0 5) 。血管新生過程の進行パターンは、血管新生誘発因子と血管新生阻害因子の総合的なバランスによって決められ、多段階に亘っての複雑で且つ順次的な過程によってなされる。その過程を述べると、まず、腫瘍または傷を有する組織から分泌される血管内皮成長因子 (V a s c u l a r E n d o t h e l i a l G r o w t h F a c t o r ; V E G F) をはじめとする様々な血管新生誘発因子が既存の血管内皮細胞の周囲の対応する受容体に結合することにより、血管内皮細胞を活性化させて血管内皮細胞の透過性を増大させ、マトリックスメタロプロテイナーゼ (m a t r i x m e t a l l o p r o t e i n a s e ; M M P) などの蛋白質分解酵素を分泌することにより、血管内皮細胞の周りの基底膜と細胞外基質を分解して、血管内皮細胞が既存の毛細血管から外れて血管新生誘発因子を分泌する組織に向けて移動・増殖することとなる。移動・増殖した血管内皮細胞は血管内で管状構造をなし、この管状構造に、血管内皮細胞の構造的な支持体である周皮細胞 (p e r i c y t e) が流入することに伴い、安定して且つ成熟した血管が形成される。このとき、血管内皮細胞から分泌されるアンジオポエチン 1 (a n g i o p o i e t i n 1 ; A n g 1) は、その受容体である T i e - 2 と結合することにより、周皮細胞の流入と血管の安定化に重要な役割を果たすことが知られている (S u r i e t a l . , C e l l , 8 7 : 1 1 7 1 , 1 9 9 6) 。一方、A n g 1 と T i e - 2 との相互作用を阻害するアンタゴニスト (a n t a g o n i s t) として知られているアンジオポエチン 2 (a n g i o p o i e t i n 2 ; A n g 2) は、T i e - 2 に対して A

10

20

30

40

50

Ang 1 とほとんど同じレベルの親和度を示しているため、Ang 1 によって誘導される Tie - 2 のリン酸化過程を競合的に阻害することができる (Maisonpierre et al., Science, 277: 55, 1997)。しかしながら、Ang 2 の機能は、細胞の形態や実験方式によって、Tie - 2 のリン酸化を誘導することもあるということが報告されており (Kim et al., Oncogene, 19: 4549, 2000)、血管新生の初期段階で血管内皮細胞と周皮細胞との間の相互作用を阻害することにより、血管を不安定化させ、VEGF などの刺激に対して血管内皮細胞を敏感化させることも報告されている (Klagsbrun and Moses, Chem. Biol., 6: R217, 1999; Veikkola and Alitalo, Semin Cancer Biol., 9: 211, 1999; Carmeliet and Jain, Nature, 407: 249, 2000)。特に、Ang 1 の場合、正常組織で比較的広範に発現され (Maisonpierre et al., Science, 277: 55, 1997)、腫瘍組織では発現が高くない傾向 (Hayes et al., Br. J. Cancer, 83: 1154, 2000) を示すのに対し、Ang 2 は、血管新生の度合いが大きな癌組織や血管リモデリングが活発な正常組織である胎盤、子宮、卵巣などで過発現様相を示すということは (Kong et al., Cancer Res., 61: 6248, 2001; Ahmad et al., Cancer, 92: 1138, 2001)、相対的に Ang 2 が Ang 1 よりも高くなる場合、結果的に腫瘍血管新生を開始するものと推認可能にする。このため、Ang 2 が Tie - 2 シグナル伝達機序においてアゴニスト (agonist) としての役割も果たすことが可能であるものと推測されており、そこで検討するに、アンジオポエチンと Tie - 2 のシグナル伝達機序は未だ判明しておらず、さらなる研究が行われる必要があると認められる。しかし、Ang 1 と Ang 2 は血管新生に重要でありながらも、互いに異なる役割を果たすものと解釈されている。

【0004】

アンジオポエチンは、約 50 個のアミノ酸からなる N - 末端ドメイン (N - ドメイン) と、215 個のアミノ酸からなるコイルドコイルドメイン (C - ドメイン) と、約 215 個のアミノ酸からなるフィブリノーゲン様ドメイン (F - ドメイン) と、から構成されており、これらのうち、N - および C - ドメインは、アンジオポエチンの多重体の形成に関与しており、F - ドメインは、受容体である Tie - 2 結合に関与している (Davis et al., Nat. Struct. Biol., 10: 38, 2003)。Tie - 2 のシグナルを引き起こすために必要とされるリン酸化は、他のチロシンキナーゼ受容体と同様に受容体の二重化 (dimerization) を通じて行われ、このためには、アンジオポエチンが多重化 (multimerize) される必要があるということ (Procopio et al., J. Biol. Chem., 274: 30196, 1999; Schlessinger, Cell, 103: 211, 2000) は、これらのリガンドが、血管新生の阻害を用いる新薬開発戦略の標的として利用可能であることを示唆している。特に、Davis 等は、Tie - 2 のリン酸化のためのアンジオポエチンの最小モジュールは、遺伝子工学的な方法を通じて確認したところ、テトラマー (tetramer) であり、ダイマー (dimer) からモジュールを構成した場合、アンタゴニストとして使用可能であることを主張している (Davis et al., Nat. Struct. Biol., 10: 38, 2003)。他の研究でも、Ang 1 ダイマー変異体は Tie - 2 に対するシグナル伝達を有効に行えないということが報告されている (Cho et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 101: 5547, 2004)。換言すれば、Ang 1 のアンタゴニストとしての役割が報告されていないにも拘わらず、この分子のオリゴマーパターンを変形することにより、Tie - 2 に対するシグナル伝達を阻害したことは、結局のところ、アンジオポエチンの多重化を防ぐ戦略が Tie - 2 シグナル伝達機序を妨げるのに使用し得ることを示唆している。報告されたアンジオポエチンと Tie - 2 との結合構造によれば、アンジオポエチン内の Tie - 2 結合部位を確認することができ、Ang 1 と Tie - 2 との間の結合構造が An

10

20

30

40

50

g 2 と Tie - 2 との間の結合構造と類似していることを確認することができる (Barton W. A. et al., Nat. Struct. Biol., 13: 524, 2006)。このため、本発明者らは、アンジオポエチン、特に、本発明においては、Ang 2 の Tie - 2 結合部位を既存の抗体に融合させた二重標的抗体を構築することにより、血管新生を有効に抑えようとした。

【 0 0 0 5 】

一方、血管新生を抑えるための他の標的として、本発明においては、VEGF / VEGFR シグナル伝達機序に着目した。血管新生過程のほとんどの段階において大きな影響を及ぼすものと知られている VEGF は、腫瘍組織領域の低酸素 (hypoxia) 部位で広範に分泌される。VEGF は、1989 年にジェネンテック (Genentech) 社の N. Ferrara 博士らのグループによって蛋白質の分離・精製および cDNA クローニングが行われた (Leung et al., Science, 246: 1306, 1989)。VEGF - A とも呼ばれる VEGF は、これまで 4 つのアイソタイプ (VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆) が存在することが知られており、これらの中で、VEGF₁₆₅ は、胎盤を除く全てのヒト組織で最も豊富であることが報告されている (Tisher et al., J. Biol. Chem., 266: 11947, 1991)。VEGF は、その受容体である VEGFR - 1 と VEGFR - 2 に極めて高い親和度をもって結合するが、主として VEGFR - 2 を介してそのシグナルを伝達することにより、血管内皮細胞の増殖と移動などの血管新生と関連する機序を誘導するものと知られている。この理由から、VEGF および VEGFR - 2 は、VEGF によって誘導される血管新生機序を抑えるための主な標的となっており、これに関する多数の論文がこれらを扱っている (Ellis and Hicklin, Nature Rev. Cancer, 8: 579, 2008; Youssoufian et al., Clin. Cancer Res., 13: 5544s, 2007)。例えば、ジェネンテック社のアバスチン (Avastin) は、VEGF - A を標的とするヒト化抗体 (Ferrara et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 333: 328, 2005) として、2004 年に転移性大腸癌 (metastatic colon cancer)、2006 年に非小細胞性肺癌 (non - small cell lung cancer)、そして 2008 年に Her - 2 陰性転移性乳癌 (metastatic breast cancer) に対してそれぞれ米国食品医薬品局 (FDA) の承認を得て市販されており、現在も、適応症を拡大するために、様々な固形癌腫に対して臨床試験を行っている。さらに、同社で販売しているルセンチス (Lucentis) は、老人性黄斑変性の主な様相である黄斑周囲の過剰な血管新生を抑えるために、網膜に注射したときに、その透過性を良好にするために、アバスチンから Fab 断片のみを切り出して製造された抗体であって (Eter et al., Biodrugs, 20: 167, 2006)、湿性老人性黄斑変性 (wet - AMD) に対する治療薬として 2006 年に米国 FDA の承認を獲得している。VEGF を標的とする他の治療用抗体としては、リジェネロン (Regeneron) 社の VEGF - trap が挙げられる (Holash et al., PNAS, 99: 11393, 2002)。これは、VEGFR - 1 の 2 番目の免疫グロブリンドメインと VEGFR - 2 の 3 番目の免疫グロブリンドメインをヒトの Fc に融合した形態の水溶性「デコイ受容体 (decoy receptor)」であり、未だ米国 FDA の承認を得てはいないものの、転移性乳癌、転移性肺癌および転移性大腸癌、並びにホルモン不応性前立腺癌 (hormone refractory prostate cancer) などについて、現在、第 I I 相試験を進めている。

【 0 0 0 6 】

一方、VEGF 受容体である VEGFR - 2 を標的とする血管新生抑制抗体には、イムクローン (Imclone) 社の IMC - 1121B (EP1916001A2) と UC B 社の CDP - 791 (PCT / GB02 / 04619)、そして本発明者らが開発した TTAC - 0001 (PCT / KR07 / 003077) などがある。IMC - 1121

10

20

30

40

50

Bは、完全ヒトFabライブラリーから選別されたモノクローナル抗体であり、現在、転移性乳癌について第III相治験を進めており、2009年に胃癌について第III相治験を行う計画である。UCB社のCDP-791は、ヒト化抗体であり、PEG化Di-Fabの形態で非小細胞性肺癌について、現在、第II相治験を進めている。この抗体は、Fcを有していないため、抗体依存的な細胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)や補体依存的細胞毒性(complement-dependent cytotoxicity)を期待することができない。最後に、本発明者らが開発して、現在、前臨床段階において研究中的TTAC-0001は、完全ヒトScFvライブラリーから選別されたモノクローナル抗体であり、VEGFR-2を標的とし、且つ、マウスやラット由来のflk-1(VEGFR-2相同体)に対しても反応性を有する唯一の抗体であり、これは、イムクロン社のIMC-1121Bと区別される重要な特徴の一つである(PCT/KR07/003077)。とりわけ、TTAC-0001が示す異種間交差反応性(cross-species cross reactivity)は、動物疾患モデルに関する研究を可能にすることにより、今後、特定の癌腫に対する抗癌剤の開発を段階的に進めて関連研究をなお一層容易に完成させる上で役立つものである。

10

【0007】

このようにVEGFおよびVEGFR-2を標的とする研究は、最近5年間に亘って飛躍的に発展して、多数の治療剤が市場および臨床研究を通じて開発されている。血管新生の抑制を通じた治療用抗体を開発する他にも、疾患別の単一標的に対する多数の抗体治療剤がFDA許可を得て市販されているが、例えば、上皮細胞成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor; EGFR)を標的とする、転移性大腸癌治療剤として販売中のイムクロン社のEribituxや、Her-2/neuを標的とする、転移性乳癌治療剤として販売中のジェネンテック社のHerceptin、そしてCD-20を標的とする、非ホジキンリンパ腫治療剤として使用されているRituxan(商標)などは、全世界のモノクローナル抗体市場を主導する重要な抗体治療剤である。

20

【0008】

一方、最近の抗体市場の動向は、単一標的に対して機能性を有する抗体を開発することに加えて、二種類またはそれ以上の標的を同時に取得する、いわゆる、二重標的抗体(二重特異性抗体)または多重標的抗体(多重特異性抗体)に関する研究が盛んに行われている(Van Spruiel et al., Immunol. Today, 21:391, 2000; Kufer et al., Trend in Biotechnol., 22:238, 2004; Marvin and Zhu, Curr. Opin. Drug Discovery Dev., 9:184, 2006)。この部類に属する抗体の中で、FDAの承認を得て商品化がなされたケースは未だないものの、持続的な関心と潜在力を元に実験室および臨床レベルで絶えず研究・開発がなされている。この部類に属する抗体は、大きく、1) ScFv基盤の抗体、2) Fab基盤の抗体、3) IgG基盤の抗体などに分けられる。

30

【0009】

まず、第一に、ScFvを基盤とする多重標的抗体の場合、異なるScFvのV_LとV_Hをそれぞれ組み合わせ得た、ハイブリッドScFvをヘテロ二量体の形態にしたダイアボディ(diabody)がある(Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90:6444, 1993)。しかしながら、この形態の抗体は、ヘテロダイマーの結合力が弱くて安定性に劣るという欠点がある。また、異なるScFvを互いに連結して得たタンデムScFv(Kipriyanov et al., J. Mol. Biol., 293:41, 1999; Robinson et al., Brit. J. Cancer, 99:1415, 2008)、異なるScFv末端に相互間の結合能があるJunおよびFosをそれぞれ発現させて得たヘテロ二量体のScFv(De Kruijf and Logtenberg, J. Biol. Ch

40

50

em., 271:7630, 1996)、Fabの C_{H1} と C_L をそれぞれのScFvの末端に発現させて得たヘテロ二量体のミニ抗体(miniantibody)(Muller et al., FEBS lett., 432:45, 1998)、そして、Fcのホモ二量体のドメインである C_{H3} ドメインの一部のアミノ酸を置換して、「ノブ・イントゥ・ホール(knob into hole)」の形態のヘテロ二量体の構造に変更させて、これらの変更された C_{H3} ドメインを異なるそれぞれのScFv末端に発現させることにより、ヘテロ二量体のScFv形態のミニボディ(minibody)を製造する方法などが報告されている(Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677, 1998)。これらに加えて、ScFvを基盤とする様々な類似体が学術的に報告されており(Kipriyanov and Le Gall, Curr. Opin. Drug Discovery Dev., 7:233, 2004)、トリアボディ(triobody)を用いた三重標的ScFvまたはテトラボディ(tetraobody)を用いた四重標的ScFvも科学文献に報告されている(Hudson and Kortt, J. Immunol. Methods, 231:177, 1999)。

10

【0010】

第二に、Fabを基盤とする多重標的抗体の場合、特定の抗原に対する個別のFab'をジスルフィド結合または媒介物を用いて組み合わせて得たヘテロ二量体のFab(Brennan et al., Science, 229:81, 1985; Kostelný et al., J. Immunol., 148:1547, 1999)の形態がほとんどを占める。一方、特定のFabの重鎖または軽鎖の末端に異なる抗原に対するScFvを発現させることにより、抗原結合価(antigen valency)を2つにしたリ(Schoonjans et al., J. Immunol., 165:7050, 2000; Lu et al., J. Immunol. Methods, 267:213, 2002)、FabとScFvとの間にヒンジ領域(hinge region)を設けることにより、ホモ二量体の形態で4つの抗原結合価を有するようにした二重標的抗体も報告されている(Coloma and Morrison, Nat. Biotechnol., 15:159, 1997)。また、Fabの軽鎖末端と重鎖末端に異なる抗原に対するScFvを融合させることにより、抗原に対する結合価を3つにした二重標的バイボディ(bibody)と、Fabの軽鎖末端と重鎖末端に異なるScFvをそれぞれ融合させることにより、抗原に対する結合価を3つ有するようにした三重標的バイボディもまた科学文献に報告されており(Schoonjans et al., J. Immunol., 165:7050, 2000)、異なる3つのFabを化学的に結合することにより得られる簡単な形態の三重標的抗体 $F(ab')_3$ も報告されている(Tutt et al., J. Immunol., 147:60, 1991)。

20

30

【0011】

第三に、IgGを基盤とする多重標的抗体の場合、トリオンファーマ(Trion Pharma)社がマウスとラットのハイブリドーマをハイブリダイズすることにより、二重標的抗体を産生するハイブリッドハイブリドーマ、別名、クアドローマ(quadromas)を得た。同社の二重標的抗体Ertumaxomab(抗原:Her-2/neu、CD3)は、転移性乳癌について第II相治験に進んでおり(Kiewe and Thiel, Expert Opin. Investig. Drugs, 17:1553, 2008)、Catumaxomab(抗原:EpCAM、CD3)は、胃癌と卵巣癌について第II相治験、悪性腹水(malignant ascites)について第II相治験に進んでいる(Shen and Zhu, Curr. Opin. Mol. Ther., 10:273, 2008)。但し、これらの抗体は、繰り返し投与によるヒト抗マウス抗体(HAMA:human anti-mouse antibody)またはヒト抗ラット抗体(HARA:human anti-rat antibody)反応を排除することができない。一方、軽鎖部分は共有しつつ、異なる重鎖に対してFcの C_{H3} ホモ二量体のドメインの一部のアミノ酸を変形させてヘテロ二量体の形態にした、

40

50

いわゆる、「ホールズ・アンド・ノブ (Holes and Knob)」の形態の二重標的抗体も報告されている (Merchant et al., Nat. Biotechnol., 16:677, 1998)。ヘテロ二量体の形態の二重標的抗体の他に、異なる2種のScFvをIgGの軽鎖と重鎖の可変ドメインの代わりに、定常ドメインにそれぞれ融合発現させてホモ二量体の形態の $(\text{ScFv})_4$ -IgG (抗原: EGFR、IGF-1R) として発現させるケースが報告されている (Luet al., J. Biol. Chem., 279:2856, 2004)。しかしながら、この抗体の場合、生産性が格段に低いことが問題点として取り上げられており、このため、同研究グループでは $(\text{ScFv})_4$ -IgGを補完して同じ標的に対して生産性を向上させたジ-ダイアボディ (di-diabody) を製作してその可能性を確認した (Luet al., J. Biol. Chem., 280:19665, 2005)。しかしながら、この形態の抗体は、ジ-ダイアボディそのものの問題点である安定性が劣るという欠点を克服することはできなかった。また、イムクロン社のShen等がヒトVEGFR-2に対するキメラモノクローナル抗体であるIMC-1C11を基盤として、この抗体の軽鎖N-末端にマウス血小板由来成長因子受容体- (Platelet-derived Growth Factor Receptor-; PDGFR-) に対する単一の可変ドメインのみを融合させて二重標的抗体を製作してその可能性を報告している (Shen et al., J. Biol. Chem., 281:10706, 2006; Shen et al., J. Immunol. Methods, 318:65, 2007)。最近、Rossi等は、プロテインキナーゼA (protein kinase A; PKA) Rサブユニットの二量体化およびドッキングドメイン (dimerization and docking domain; DDD) とPKAのアンカリングドメイン (anchoring domain) を用いたいわゆる「ドック・アンド・ロック (dock and lock; DNL)」と呼ばれる方法を用いてCD20に対する多数の抗原結合価を有する抗体を開示しており (Rossi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 103:6841, 2006; Rossi et al., Cancer Res., 68:8384, 2008)、同研究グループにおいてそのような技術に基づく二重標的抗体を報告している (Chang et al., Clin. Cancer Res., 13:5586, 2007)。DNL方法を用いる抗体は、適用が簡単であり、モジュール形式であるため、様々な組み合わせが可能であり、生体内安定性に優れているというメリットを有するが、生体内蛋白質分解酵素による分解が起こり得、しかも、免疫原性に関連する問題があり得ることが知られている。

【0012】

これまでに学術的に報告された二重標的または多重標的抗体は多数存在し、それらの抗体はその使用目的に応じた形態学的な特徴によって各々機能上の長短所を有する。特に、癌を治療するための治療用二重標的および多重標的抗体の開発に関する研究は盛んに行われているのが現状である。しかしながら、このような研究を通じて得られた抗体が正常にその機能を発揮するためには、何よりも抗体が標的とする抗原の選択が極めて重要である。

【発明の概要】

【0013】

発明の開示

発明が解決しようとする技術的課題

そこで、本発明者らは、血管新生の抑制を通じた抗癌治療用の二重標的抗体の開発のために、血管新生機序に密接に関わる2つの受容体VEGFR-2およびTie-2を同時に中和させることのできる二重標的抗体を、これまで報告されていない新たな形態にて製作することにより、前記抗体が、VEGFR-2またはTie-2に対する単一標的抗体に比べて、細胞レベルだけではなく、生体内でも同等あるいはより優れた抗癌効果を示すということを見出し、本発明を完成するに至った。

【0014】

本発明の目的は、抗体の重鎖または軽鎖のN - 末端に水溶性リガンドが融合された新規な形態の二重標的抗体を提供するところにある。

【0015】

本発明の他の目的は、前記二重標的抗体をコードするDNAを提供するところにある。

【0016】

本発明のさらに他の目的は、前記DNAを含む組換え発現ベクターを提供するところにある。

【0017】

本発明のさらに他の目的は、前記組換え発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供するところにある。

【0018】

本発明のさらに他の目的は、前記宿主細胞を培養することで二重標的抗体を製造する方法を提供するところにある。

【0019】

本発明のさらに他の目的は、前記二重標的抗体を含む薬学的組成物を提供するところにある。

【0020】

課題を解決するための手段

本発明は、抗体の重鎖または軽鎖のN - 末端に水溶性リガンドが融合された新規な形態の二重標的抗体に関する。

【0021】

本発明の明細書において用いられる用語「抗体」とは、様々な種類の抗原を特異的に認識するようにB細胞によって生成され、B細胞の抗原受容体の役割を果たす蛋白質分子のことをいう。この分子は、Y字状であり、2つの同じ軽鎖と2つの同じ重鎖とから構成される。軽鎖と重鎖はすべて、可変領域および定常領域を含む。4つの鎖は、ヒンジ領域と呼ばれる重鎖のフレキシブル領域(flexible region)に位置しているジスルフィド結合によって一緒に固定されている。重鎖と軽鎖のすべての可変領域は互いに結合して2つの同じ抗原 - 結合部位を形成する。抗体は、重鎖定常領域によってA(IgA)、D(IgD)、E(IgE)、G(IgG)およびM(IgM)といった5つの部類に分けられる。それぞれの部類は、アイソタイプとも呼ばれ、独特な構造的特徴と異なる生物学的特性を有している。本発明は、全てのアイソタイプの抗体を含み、好ましくは、IgGを用いる。

【0022】

本発明の抗体は、これに制限されるものではないが、腫瘍細胞(neoplastic cell)、癌間質細胞(cancer stromal cell)、腫瘍関連内皮細胞(tumor associated endothelial cell)、腫瘍関連内皮前駆細胞(tumor associated endothelial progenitor cell)、腫瘍関連循環内皮細胞(tumor associated circulating endothelial cell)、循環腫瘍細胞(circulating tumor cell)、癌幹細胞(cancer stem cell)などにおいて特異的に発現する抗原に対する抗体であることが好ましい。

【0023】

より具体的には、本発明の抗体は、VEGFR - 1(血管内皮細胞成長因子受容体 - 1)、VEGFR - 2(血管内皮細胞成長因子受容体 - 2)、VEGFR - 3(血管内皮細胞成長因子受容体 - 3)、FLT3(FMS様チロシンキナーゼ3)、c - FMS / CSF1R(コロニー刺激因子1受容体)、RET(トランスフェクション時に再構成)、c - Met(間葉上皮転換因子)、EGFR(上皮成長因子受容体)、Her2/neu、HER3、HER4、FGFR(線維芽細胞成長因子受容体)、IGFR(インスリン様成長因子受容体)、PDGFR(血小板由来成長因子受容体)、c - KIT(幹細胞因子受容体)、BCR(切断点クラスター領域)、インテグリン、MMP(マトリックスメタ

10

20

30

40

50

ロプロテイナーゼ)などの細胞の表面に発現する蛋白質に対する抗体であるが、これに制限されることはない。

【0024】

本発明において、抗体は、「ポリクローナル」抗体であっても「モノクローナル」抗体であってもよいが、モノクローナル抗体であることがより好ましい。モノクローナル抗体とは、実質的に均質な抗体集団から得られた抗体のことをいい、すなわち、このような集団を構成する個々の抗体は、わずかに存在し得る自然発生の突然変異を除いては、同一である。モノクローナル抗体は、単一の抗原性領域に対して高度に特異的である。さらに、異なるエピトープに対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体とは逆に、それぞれのモノクローナル抗体は抗原上の単一のエピトープに対して誘導される。モノクローンは、任意の特定の方法により抗体を生成することを必要とするという意味として解釈されてはならない。例えば、本発明において有用なモノクローナル抗体は、文献[Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)]に記載のハイブリドーマ法により製造するか、あるいは、組換えDNA法[米国特許第4、816、567号公報参照]により製造することができる。また、モノクローナル抗体は、例えば、文献[Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]に記載の技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

10

【0025】

本発明の抗体は、「ヒト化抗体」であることが好ましい。ヒト化抗体とは、非ヒト相補性決定領域(CDR)を保有する抗体の配列を変更することにより、一部または全体がヒト抗体生殖細胞系(germline)に由来するアミノ酸配列から構成された抗体を意味する。このような変更法として最も簡単な方法は、単にマウス定常領域をヒト抗体の定常領域で置換することであり、これにより、製薬上の用途に許容可能な程度に免疫原性が十分に低いヒト/マウスキメラが生成される。しかしながら、抗体の可変領域および、さらには、CDRも、現在当業界における公知の技術を用いてヒト化させることが好ましい。非ヒトCDRを実質的にインタクトに維持するか、CDRをヒトゲノムに由来する配列に取り替えると同時に、可変領域のフレームワーク領域を対応するヒトフレームワーク領域に置き換える。インタクトなヒト抗体は、免疫システムがヒト免疫システムに対応するように改変された遺伝的に改変されたマウスから生成される。

20

30

【0026】

本発明の抗体は、「ヒト抗体」であることが特に好ましい。ヒト抗体は、ヒトによって産生された抗体またはヒト抗体を製造するための技術のうちの任意の技術を用いて製造した抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体は、当業界で知られている様々な技術を用いて製造することができる。一態様において、ヒト抗体は、ヒト抗体を発現するファージライブラリーから選別する(Vaughan et al., Nature Biotechnology 14: 309-314 (1996); Sheets et al., PNAS (USA) 95: 6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991))。ヒト抗体は、形質転換動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的にまたは完全に不活性化されたマウスに、ヒト免疫グロブリン座位を導入することにより製造することもできる。抗原投与時に、遺伝子再配列、アセンブリーおよび抗体レパートリーをはじめとするあらゆる点でヒトに見られるのと極めて類似するヒト抗体の生成が認められる。この方法は、例えば、米国特許第5、545、807号;第5、545、806号;第5、569、825号;第5、625、126号;第5、633、425号;第5、661、016号および文献[Marks et al., Biotechnology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., Nature Biote

40

50

chnology 14:845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14:826(1996);Lonberg and Huszar,Intem.Rev.Immunol.13:65-93(1995)]に記載されている。別の方法として、ヒト抗体は、標的抗原に対して誘導された抗体を産生するヒトBリンパ球(例えば、Bリンパ球は個体から回収するか、あるいは、試験管内において免疫化させることができる)の不死化を通じて製造することができる(Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R Liss, p.77(1985);Boerner et al. J. Immunol., 147(1):86-95(1991);および米国特許第5、750、373号)。

10

【0027】

本発明の明細書において用いられる用語「水溶性リガンド」は、細胞に存在する、特に、細胞の表面に存在する受容体に特異的に結合する蛋白質であり、水に溶解可能な水溶性特性を示す蛋白質の全体または一部を意味する。水溶性リガンドとしては、例えば、VEGF(血管内皮成長因子)、EGF(上皮成長因子)、PLGF(胎盤成長因子)、FGF(線維芽細胞成長因子)、PDGF(血小板由来成長因子)、HGF(肝細胞成長因子)、アンジオポエチンなどが挙げられるが、これらに制限されることはない。

【0028】

本発明の新規な形態の二重標的抗体において、抗体とリガンドは、それぞれの固有な役割をそのまま発揮する。

20

【0029】

但し、二重標的抗体の場合、二つのシグナルを同時に抑制または増幅させることができるので、一つのシグナルを抑制/増幅する場合に比べて一層効果的であり、それぞれのシグナルをそれぞれのシグナル抑制剤で処理した場合と比較したとき、低用量投薬が可能であり、同じ時間および空間における二つのシグナルを抑制/増幅させることができる。

【0030】

本発明においては、抗体と水溶性リガンドをリンカーを介して融合させることが好ましい。本発明において、「リンカー」とは、融合蛋白質の二つの部分を連結するペプチド断片のことをいう。本発明において好適なリンカーは、5~25個のアミノ酸、好ましくは、10~20個のアミノ酸、さらに好ましくは、10~15個のアミノ酸を有するペプチドを含む。

30

【0031】

本発明の二重標的抗体を製造するために、この二重標的抗体をコードする核酸配列を作製する。前記核酸配列は、抗体の重鎖または軽鎖をコードする核酸配列の5'末端に水溶性リガンドをコードする核酸配列の3'末端を融合させることにより作製することができる。一態様として、リンカーを介して融合された二重標的抗体をコードする核酸配列は、プライマーにリンカーの核酸配列が含まれるように設計した後、PCRを行うことにより得られる。

【0032】

このようにして製造された二重標的抗体のコード遺伝子をベクターに挿入して組換え発現プラスミドを製造した後、このプラスミドを宿主細胞に導入して形質移入体または形質転換細胞を製造し、この宿主細胞を増幅および培養し、生成された二重標的抗体を分離および精製することにより、目的とする二重標的抗体が得られる。

40

【0033】

本発明において、二重標的抗体の発現に用いられる宿主細胞は、原核生物であっても真核生物であってもよい。また、通常、DNAの導入効率が高く、導入されたDNAの発現効率が高い宿主が用いられる。使用可能な宿主細胞の例としては、大腸菌(E.coli)、シュードモナス種(Pseudomonas spp.)、バチルス種(Bacillus spp.)、ストレプトミセス種(Streptomyces spp.)、細菌および酵母などの周知の真核および原核宿主、スポドプテラ・フルギペルダ9(SF9

50

）などの昆虫細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）およびマウス細胞などの動物細胞、COS1、COS7、ヒト胎児腎臓293細胞（human embryonic kidney 293 cell）、BSC1、BSC40およびBMT10などのアフリカミドリザル細胞、および組織培養されたヒト細胞が挙げられる。

【0034】

本発明において、二重標的抗体を発現するために極めて多岐に亘る発現宿主／ベクターの組み合わせが使用可能である。真核宿主に適した発現ベクターには、例えば、SV40、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（adeno-associated virus）、サイトメガロウイルスおよびレトロウイルスが含まれる。細菌宿主に使用可能な発現ベクターには、pBluescript、pGEX2T、pUC、pCR1、pBR322、pMB9およびこれらの誘導体などの細菌プラスミド、RP4などの一層広い宿主範囲を有するプラスミド、gt10、11、NM989などの極めて様々なファージラムダ（phage lambda）誘導体に代表されるファージDNA、ならびにM13および繊維状単鎖DNAファージなどのその他のDNAファージが含まれる。酵母細胞において好適な発現ベクターは、2μプラスミドおよびその誘導体である。昆虫細胞において好適なベクターは、pVL941である。

【0035】

組換え発現ベクターの宿主細胞への形質転換には、例えば、DEAE-デキストランを介した形質転換（DEAE-dextran mediated transfection）、電気穿孔法（electroporation）、形質導入（transduction）、リン酸カルシウム法（calcium phosphate transfection）、カチオン脂質を介した形質転換（cationic lipid-mediated transfection）、スクレープローディング（scrape loading）及び感染（infection）などが含まれる。

【0036】

本発明において、宿主細胞は、適切な培地中で、かつ二重標的抗体の発現および／または分離を許容する条件下で、実験室用または産業用発酵機において小規模あるいは大規模発酵およびシェークフラスコ培養によって培養可能である。培養は、公知の技術を用いて、炭素、窒素供給源および無機塩を含む好適な培養培地において行う。好適な培地は、商業的に入手可能であり、例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関（ATCC：American Type Culture Collection）のカタログなどに記載の成分およびこれらの組成比に応じて作成可能である。

【0037】

このような培養物から、二重標的抗体は、当業界における公知の方法によって単離可能である。例えば、二重標的抗体は、これに制限されるものではないが、遠心分離、ろ過、抽出、噴霧乾燥、蒸発または沈殿をはじめとする通常の方法によって培養物から単離可能である。さらには、二重標的抗体は、クロマトグラフィ（例えば、イオン交換、親和性、疎水性およびサイズ排除）、電気泳動、分画（例えば、硫酸塩析）、SDS-PAGEまたは抽出をはじめとする当業界における公知の様々な方法によって精製可能である。

【0038】

本発明の組成物は、適切な任意の経路によって特定の分子に投与することができる。本発明の組成物は、任意の適切な手段を用いて、ヒトをはじめとする動物に直接的に（例えば、注射、皮下注入または組織位置への局所的な投与など局所的に）または全身的に（例えば、非経口または経口的に）提供可能である。本発明に係る組成物が、非経口、例えば、静脈、皮下、眼、腹腔、筋肉内、口腔、直腸、膣、眼窩内、大脳内、脊髄内、心室内、鞘内、槽内、嚢内、鼻腔内、または噴霧投与によって提供される場合、組成物は、水性または生理適合性である流体懸濁液または溶液を含むことが好ましい。このため、担体または賦形剤は、生理的に許容可能なものとするため、所望の組成物を患者に送達することに加えて、患者の電解質および／または体積バランスに不利な影響を及ぼさないことが求められる。

【 0 0 3 9 】

本発明の二重標的抗体を含有する薬学的組成物は、通常の方法に従い、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、乳化剤、シロップ、エアロゾールなど経口投与用の剤形、滅菌注射溶液、坐剤および経皮投与用製剤に調製して使用可能である。組成物に含まれ得る担体、賦形剤および希釈剤としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、キシリトール、エリスリトール、マルチトール、澱粉、アカシアゴム、アルジネート、ゼラチン、リン酸カルシウム、ケイ酸カルシウム、セルロース、メチルセルロース、微晶質セルロース、ポリビニルピロリドン、水、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、タルク、ステアリン酸マグネシウムおよび鉱物油が挙げられる。必要に応じて、充填剤、増量剤、結合剤、湿潤剤、崩壊剤、界面活性剤などの希釈剤または賦形剤を用いて調製する。

10

【 0 0 4 0 】

一態様として、本発明の二重標的抗体は、経口投与用固体製剤に調製することができる。経口投与のための固体製剤には、製剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤などが含まれるが、このような固体製剤は、前記抽出物に少なくとも一種以上の賦形剤、例えば、澱粉、炭酸カルシウム、スクロースまたはラクトース、ゼラチンなどを混合して調製される。なお、単なる賦形剤の他に、ステアリン酸マグネシウム、タルクなどの潤滑剤も使用可能である。

【 0 0 4 1 】

他の態様として、本発明の二重標的抗体を含有する薬学的組成物を経口投与用液体製剤に調製することもできる。経口投与のための液体製剤としては、懸濁剤、耐溶液剤、乳化剤、シロップ剤などが挙げられるが、このような液体製剤には、通常的に用いられる不活性希釈剤（例えば、精製水、エタノール、液状パラフィン）の他に、様々な賦形剤、例えば、湿潤剤、甘味剤、芳香剤、保存剤などが含まれ得る。

20

【 0 0 4 2 】

さらに他の態様として、本発明の二重標的抗体を含有する薬学的組成物は、非経口、好ましくは、腹腔内投与のための製剤に調製することもできる。非経口投与のための製剤には、滅菌された水溶液、非水性溶剤、懸濁剤、乳化剤、凍結乾燥製剤、坐剤が含まれる。滅菌された水溶液としては、ハンクス溶液（Hank's solution）、リンガー溶液（Ringer's solution）または物理的に緩衝された塩水などの適切な緩衝溶液が使用可能であり、非水性溶剤の懸濁剤としては、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性油脂、エチルオレートなどの注射可能なエステルなどが使用可能である。必要に応じて、防腐剤、安定化剤、湿潤剤または乳化剤、浸透圧の調節のための塩および/または緩衝剤を用いることもできる。一方、坐剤の場合には、通常の基剤であるウィテップゾール（Witepsol）、マクロゴール、ツイーン（Tween）61、カカオ脂、ラウリン脂、グリセロゼラチンなどが使用可能である。

30

【 0 0 4 3 】

本発明の二重標的抗体としては、本発明の一実施形態に従って得られたDIG 0001が最も好ましい。

40

【 0 0 4 4 】

本発明の二重標的抗体DIG 0001は、国際特許出願第PCT/KR07/003077号に開示されたTTAC0001に基づいて、特定のリンカーを介してTie-2と結合するAng2の結合ドメインをこの抗体の軽鎖アミノ末端部位に融合させることにより完成した（実施例1および2）。

【 0 0 4 5 】

このようにして完成された二重標的抗体DIG 0001は、SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングにより同定し、より詳細な研究のために、プロテインA親和性カラム、SP-セファロースカラム、およびサイズ排除カラムを用いた液体クロマトグラフィ（FPLC）を用いて純度95%以上に精製された抗体のみを確保した（実施例3）

50

。

【0046】

このようにして精製された二重標的抗体DIG 0001は、ELISAを用いた結合アッセイを通じてVEGFR-2D1~D3-FcとTie-2-Fcとの結合能を確認し、且つ、ELISAを用いてVEGF165およびAng2に対する競合アッセイを行うことにより、二重標的抗体としての機能性を確認した（実施例4）。

【0047】

本発明においては、初代培養したHUVEC細胞に対する細胞生存能アッセイを通じて、DIG 0001二重標的抗体がVEGFまたはAng1のいずれかによって誘導されるHUVEC細胞の生存能を阻害し得ることを確認し、且つ、VEGFおよびAng1が協同して誘導するHUVEC細胞の生存能もまた効果的に阻害し得ることを確認した（実施例5）。

10

【0048】

本発明のDIG 0001二重標的抗体は、細胞移動アッセイを通じて、VEGFとAng1のいずれかによって誘導されるHUVEC細胞の移動性を阻害し得ることを確認し、且つ、VEGFおよびAng1が協同して誘導するHUVEC細胞の移動性を効果的に阻害し得ることを確認した（実施例6）。

【0049】

本発明のDIG 0001二重標的抗体は、Ang1によって誘導されるTie-2のシグナル伝達機序を阻害し、VEGFによるVEGFR-2のシグナル伝達機序を阻害し得ることをウエスタンブロッティングにより確認し、且つ、Ang1とVEGFによるシグナル伝達機序を同時に阻害し得ることもウエスタンブロッティングにより確認した（実施例7）。

20

【0050】

特に、本発明のDIG 0001二重標的抗体を膠芽細胞腫の動物モデルに投与したところ、腫瘍の体積が大幅に減少されていることを確認した（実施例8）。

【0051】

上記の抗体は、下記に示す方法により製造された。まず、Tie-2に対してアンタゴニストとして作用し得るAng2のTie-2に対する結合ドメインDNA配列を、PCRを通じて増幅した。このとき、増幅されたDNA断片の3'-末端にはリンカーDNAが含まれるように抗体を設計した。この断片をリンカーDNAの一部を含むTTAC0001の軽鎖DNA配列5'-末端にSOE-PCRを通じて融合させることにより、VEGFR-2およびTie-2に対して特異的に結合し得る二重標的抗体を完成した。

30

【0052】

本発明のDIG 0001二重標的抗体は、血管新生を抑制することにより、血管新生関連疾患を治療するのに使用可能である。

【0053】

本発明において、「血管新生関連疾患」は、癌、老人性黄斑変性、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、乾癬および慢性炎症を含むが、これらに限定されることはない。

【0054】

本発明において、前記癌は、胃癌、肝癌、肺癌、甲状腺癌、乳癌、子宮頸部癌、大腸癌、膵臓癌、直腸癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、黒色腫、前立腺癌の骨転移癌、卵巣癌および血液癌を含むが、これらに限定されることはない。

40

【0055】

本発明の二重標的抗体は、癌患者の治療的措置のために腫瘍の進行、例えば、腫瘍の成長、浸潤、転移および（または）再発を防止、抑制または減少させるのに十分な量で投与可能である。前記目的を達成するための適正量を治療有効量として定義する。前記用途に有効な量は、疾病の重症度および患者自身の免疫系の全体的な状態によるものである。

【0056】

本発明の好ましい用量は、0.01mg/kg~100mg/kgであり、さらに好ま

50

しくは、 $0.1 \text{ mg/m}^2 \sim 10 \text{ mg/m}^2$ である。

【0057】

しかしながら、最適投与量は、治療する疾患と副作用の存否に応じて異なり、通常の実験により決めることができる。抗体の投与は、周期的な丸剤投入、または外部貯蔵容器（例えば、静脈袋（vein bag））または内部貯蔵容器（例えば、生体分解性インプラント）からの連続した静脈または腹腔注射で行うことができる。また、本発明の抗体蛋白質は、多数の異なる生物学的活性分子と共に投与可能である。しかしながら、抗体蛋白質およびその他の分子の最適な組み合わせ、投与方式、投与量は、当業者の技術レベルにおける通常の実験によって決めることができる。

【0058】

本発明に係る組成物は、当該疾患と関連する他の治療剤と併用または混用することができる。

【0059】

ヒト腫瘍を含む腫瘍を、本発明の二重標的抗体を化学療法剤、放射線、またはさらなる受容体アンタゴニストまたはこれらの組み合わせと併用して治療する場合、相乗作用が得られる。換言すれば、本発明の二重標的抗体による腫瘍成長の抑制は、化学療法剤、放射線、またはさらなる受容体アンタゴニストまたはこれらの組み合わせと併用する場合に予想以上に増強可能である。相乗作用は、例えば、本発明の二重標的抗体および化学療法剤、放射線、またはさらなる受容体アンタゴニストによる治療の効果から予想されるものより、併用治療法の利用によってさらに大きな腫瘍成長抑制効果が示されることによって例示される。好ましくは、相乗作用は、本発明の二重標的抗体と化学療法剤、放射線、またはさらなる受容体アンタゴニストとの組み合わせを用いた治療からは緩和が期待されない癌の緩和によって裏付けられる。

【0060】

本発明の二重標的抗体は、化学療法または放射線療法の着手前、これらの療法の着手後、およびこれらの組み合わせ、すなわち、化学療法および/または放射線療法の着手前および着手間、これらの療法の着手前および着手後、これらの療法の着手間および着手後、またはこれらの療法の着手前、着手間、および着手後に投与される。例えば、DIG 0001 抗体の場合、一般的に、抗体は、放射線療法および/または化学療法の着手1日から30日前、好ましくは、3日から20日前、さらに好ましくは、5日から12日前に投与される。

【0061】

このため、本発明の抗体は、当業界における周知の研究、予防または治療方法のために生体内および試験管内において使用可能である。もちろん、当業界における熟練者は本明細書に開示された本発明の原理を変動させることができ、このような変形は本発明の範囲に含まれるものであることはいうまでもない。

【0062】

発明の効果

本発明は、血管新生に関わる VEGFR - 2 および Tie - 2 受容体を同時に中和させることにより、血管新生関連シグナル伝達機序を効果的に抑制し得るヒトモノクローナル抗体由来の二重標的抗体と、前記二重標的抗体を含有する血管新生抑制用および癌治療用組成物を提供する。本発明に係る二重標的抗体は、血管新生に関わる二種類の標的を同時に中和させることにより、既存の単一標的抗体に比べて優れた中和能を示すだけでなく、癌治療にも極めて有効である。なお、相互関連性のある二種類の標的に対して、本発明者によって発明された形態の二重標的抗体を構築することにより、単一標的抗体の措置による実益よりも遥かに優れた効果を期待することができる。

[本発明1001]

抗体の重鎖または軽鎖の N - 末端に水溶性リガンドが融合された、二重標的抗体。

[本発明1002]

前記抗体が、腫瘍細胞、癌間質細胞、腫瘍関連内皮細胞、腫瘍関連内皮前駆細胞、腫瘍

10

20

30

40

50

関連循環内皮細胞、循環腫瘍細胞および癌幹細胞からなる群より選ばれた細胞で特異的に発現する抗原に対する抗体である、本発明1001の二重標的抗体。

[本発明1003]

前記抗原が、V E G F R - 1、V E G F R - 2、V E G F R - 3、F L T 3、c - F M S / C S F 1 R、R E T、c - M e t、E G F R、H e r 2 / n e u、H E R 3、H E R 4、F G F R、I G F R、P D G F R、c - K I T、B C R、インテグリンおよびMMPからなる群より選択される、本発明1002の二重標的抗体。

[本発明1004]

前記抗体が、V E G F R - 2 / K D Rに対する中和抗体T T A C 0 0 0 1である、本発明1001の二重標的抗体。

10

[本発明1005]

前記水溶性リガンドが、V E G F、E G F、P L G F、F G F、P D G F、H G Fおよびアンジオポエチンからなる群より選択される、本発明1001の二重標的抗体。

[本発明1006]

前記水溶性リガンドが、アンジオポエチン2のT i e - 2に対する結合ドメインである、本発明1001の二重標的抗体。

[本発明1007]

前記水溶性リガンドが、リンカーを介して前記抗体の重鎖または軽鎖のN - 末端に融合される、本発明1001の二重標的抗体。

[本発明1008]

本発明1001から本発明1007のいずれかの二重標的抗体をコードする、D N A。

20

[本発明1009]

前記抗体の軽鎖および水溶性リガンドが、配列番号：6に示す塩基配列からなる、本発明1008のD N A。

[本発明1010]

本発明1008のD N Aを含む、組換え発現ベクター。

[本発明1011]

図2に示す切断地図を有するp I g G L D - m A n g 2 - T T A C 0 0 0 1 L g tを含む、本発明1010の組換え発現ベクター。

[本発明1012]

本発明1010の組換え発現ベクターで形質転換された、宿主細胞。

30

[本発明1013]

本発明1012の宿主細胞を培養する段階；および

前記宿主細胞の培養液から二重標的抗体を単離する段階を含む、二重標的抗体を製造する方法。

[本発明1014]

二重標的抗体が、プロテインA親和性カラム、S P - セファロースカラム、およびサイズ排除クロマトグラフィによる高速液体クロマトグラフィ(F P L C)を用いてさらに精製される、本発明1013の方法。

[本発明1015]

本発明1001から本発明1007のいずれかの二重標的抗体を含む、薬学的組成物。

40

[本発明1016]

血管新生関連疾患の治療に用いられる、本発明1015の薬学的組成物。

[本発明1017]

血管新生関連疾患が、癌、老人性黄斑変性、関節リウマチ、糖尿病性網膜症、乾癬および慢性炎症からなる群より選択される、本発明1016の薬学的組成物。

[本発明1018]

癌が、胃癌、肝癌、肺癌、甲状腺癌、乳癌、子宮頸部癌、大腸癌、膵臓癌、直腸癌、結腸直腸癌、前立腺癌、腎臓癌、黒色腫、前立腺癌の骨転移癌、卵巣癌および血液癌からなる群より選択される、本発明1017の薬学的組成物。

50

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】図1は、pIgGLD-mAng2-TTAC0001 lgtベクターに挿入された遺伝子のDNA配列（配列番号：6）および機能を示すものである。

【図2】図2は、本発明に係るpIgGLD-mAng2-TTAC0001 lgtベクターの構築のための方法を図式化して示すものである。

【図3】図3は、本発明に係るベクターをCHO-DG44細胞中でランダムに発現させた後、二重標的抗体DIG 0001の産生をウエスタンブロッティングを通じて確認した結果である。

【図4】図4は、本発明に係る高生産性細胞株の確立のために、MTX繰り返し処理（700nMまで）を通じた高生産性クローンの選別結果を示すものである。

【図5】図5は、精製されたDIG 0001のSDS-PAGE結果を示すものである。

【図6】図6は、DIG 0001を用いたVEGFおよびAng-2-Fcについての競合アッセイをELISAによって分析した結果を示すものである。

【図7】図7は、本発明に係るDIG 0001のHUVECに対する生存性を表す生存率アッセイの結果を示すものである。

【図8】図8は、本発明に係るDIG 0001のHUVECに対する移動性を表す移動性アッセイの結果を示すものである。

【図9】図9は、本発明に係るDIG 0001のVEGFによるVEGFR-2およびERKのリン酸化抑制能と同抗体のAng1によるTie-2、ERK、並びにAKTのリン酸化抑制能をウエスタンブロッティングを通じて確認した結果である。

【図10】図10は、本発明に係るDIG 0001の膠芽細胞腫マウスモデルにおける腫瘍成長抑制効果を示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0064】

発明を実施するための最良の態様

以下に掲げる実施例は、単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の要旨を逸脱しない限り、本発明の範囲がこれらの実施例によって制限されないということは本発明が属する技術分野において通常の知識を持った者にとって自明である。

【実施例】

【0065】

実施例1：DIG 0001産生用発現ベクターの構築

Tie-2と結合するAng2の結合ドメイン関連DNAをPCRを通じて増幅した。このための鋳型として用いられたDNAは、米国メモリアル・スローン・ケタリング 癌センターのDimitar B. Nikolov博士からヒトAng2-RBDを産生するHEK293細胞株を(Barton et al., Structure, 13: 825, 2005) 贈与されて、ゲノムDNAを抽出して鋳型として用いた。抽出されたDNAから、Ang2結合ドメイン(F281-F496)のみを増幅するために、下記の条件下でPCRを行った：94 で4分1回、(94 で45秒/50 で45秒/72 で1分) 30回、72 で7分1回、4 で 。このときに用いられた反応物の組成は、下記の通りである：BstXI制限酵素認識部位を有するプライマー

F-ksw001 (5'-CAC TCC AGC GGT GTG GGT TCC TTC AGA GAC TGT GCT

GAA GTA TTC, 配列番号: 1)

と逆方向プライマー

R'-ksw001 (5'-ACT ACC TCC

GCC TCC TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, 配列番号: 2)

のそれぞれ2 μl (10 pmole / μl)、鋳型DNAとしてのゲノムDNA 1 μl (50

100 ng / μ l)、ポリメラーゼとしての i - Max (商標) II Taq 2.5 U (Intron #25261、大韓民国)、10Xバッファ5 μ l、dNTP 2 μ l (それぞれ2.5 mM)、および蒸留水37.5 μ l。PCRにより得られた産物は、1%アガロースゲル中で電気泳動に供し、この後、700 bpに達しない微かなバンドを Hi Yield (商標) Gel / PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300、台湾) を用いて単離した。単離したDNAを鋳型として用いて、さらにPCRを行うことにより、リンカーが融合された Ang 2 結合ドメイン断片を得た (「mAng 2」と命名)。このときに用いられたPCR法は、逆方向プライマーとして

R-ksw001 (5'-GGA GCC TCC TCC GCC ACT ACC TCC GCC TCC

10

TGA GAA ATC TGC TGG TCG GAT CAT CAT GGT TG, 配列番号: 3)

を用いた以外は、上述した方法と同様である。

【0066】

一方、Ang 2 結合ドメインを融合させる TTAC0001 の軽鎖部分を下記の条件下でPCRを通じて増幅させた：94 で4分1回、(94 で30秒/50 で30秒/72 で30秒) 30回、72 で5分1回、4 で。このときに用いられたPCR反応物の組成は、下記の通りである：リンカーの一部が添加されたプライマー

F-ksw002 (5'-AGT GGC GGA GGA GGC TCC GGT TCC AAT

20

TTT ATG CTG ACT CAG, 配列番号: 4)

と Bst XI 制限酵素認識部位を含有するプライマー

R-ksw002 (5'-CAG ATC TTT CCA CGA GGC TGG CTC CTC, 配列番号: 5)

のそれぞれ2 μ l (10 pmole / μ l)、鋳型DNAとしての pIGLD - TTAC0001 Lgt 10 ng (PCT/KR07/003077)、ポリメラーゼとしての i - Max (商標) II Taq 2.5 U (Intron #25261、大韓民国)、10Xバッファ5 μ l、dNTP 2 μ l (それぞれ2.5 mM)、および蒸留水37.5 μ l。PCRにより得られた産物は、1%アガロースゲル中で電気泳動に供し、約350 bpに相当する TTAC0001 軽鎖断片を Hi Yield (商標) Gel / PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300、台湾) を用いて単離した (「TTAC0001 lgt」と命名)。

30

【0067】

PCRを通じて得た Ang 2 断片部分 (mAng 2) と TTAC0001 軽鎖部位 (TTAC0001_lgt) のそれぞれを融合させるために、SOE-PCRを行った。このときのPCR条件は、下記の通りである：94 で4分1回、(94 で45秒/50 で45秒/72 で1分) 30回、72 で7分1回、4 で。また、このときに用いられたPCR反応物の組成は、下記の通りである：Bst XI 制限酵素認識部位を有するプライマー F - ksw001 および R - ksw002 のそれぞれ2 μ l (10 pmole / μ l)、鋳型DNAとしての mAng 2 および TTAC0001_lgt のそれぞれ10 ng、ポリメラーゼとしての i - Max (商標) II Taq 2.5 U (Intron #25261、大韓民国)、10Xバッファ5 μ l、dNTP 2 μ l (それぞれ2.5 mM)、および蒸留水37.5 μ l。PCRにより得られた産物は、1%アガロースゲル中で電気泳動に供し、約1 kbに相当する mAng 2 - TTAC0001_lgt 融合PCR産物を Hi Yield (商標) Gel / PCR DNA Extraction Kit (RBC Bioscience #YDF300、台湾) を用いて単離した (mAng 2 - TTAC0001_lgt と命名)。分離したPCR産物は、TOPcloner TAクローニングキット (Enzymonics #EZ111、大韓民国) を用いてT-ベクターに挿入させた後、大腸菌DH5 に形質転換してミニプレップおよび制限酵素Bst XI処理後、約1 kbの標的DNAを含有するベクターに対してDNA塩基

40

50

配列を確認するために外注および配列決定した（図1および配列番号：6）。

【0068】

DIG 0001二重標的抗体の発現のための軽鎖発現ベクターの構築方法は、下記の通りである（図2）。まず、本発明者らが保有しているTTAC0001軽鎖発現ベクター-pIgGLD-TTAC0001Lgt（PCT/KR07/003077）をBstXIで消化し、ベクターとして使用可能な断片のみを電気泳動により1%アガロースゲルから分離した。また、mAng2-TTAC0001Lgtが挿入されたT-ベクターを同様にBstXIで消化し、消化された断片のみを電気泳動により1%アガロースゲルから分離した。この後、分離された両断片をT4DNAリガーゼ（Enzynomics #M001S、大韓民国）の存在下で4℃で約12時間維持して、一つのインタクトなベクターを構築した。構築されたベクターで大腸菌DH5αを形質転換し、ミニプレップ後にBstXI消化して、構築されたベクターへのmAng2-TTAC0001Lgtの挿入有無を確認した。確認された組換えベクターは、「pIgGLD-mAng2-TTAC0001Lgt」と命名した。

【0069】

実施例2：DIG 0001の産生および同定

構築された軽鎖発現ベクター-pIgGLD-mAng2-TTAC0001Lgtと既存の重鎖発現ベクター-pIgGHD-TTAC0001Hvy（PCT/KR07/003077）をCHO-DG44（dhfr-欠失CHO）細胞に同時形質導入して任意発現を誘導した後、SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングを用いてその発現有無を確認した。形質導入は、lipofectamine（商標）2000（Invitrogen #11668-019、米国）を用いて行い、その方法は製造業者の指示に従った。略述すれば、MEM培地（Wegene、大韓民国）入りの6-ウェルプレートに1ウェルあたりに 5×10^5 個のCHO-DG44細胞を播種した後、加湿が保たれたCO₂（5%）インキュベーターを用いて37℃で24時間維持することにより、細胞密度が80~90%程度になるように稠密に培養した。組換えベクター3μg（pIgGHD-TTAC0001HvyとpIgGLD-mAng2-TTAC0001Lgtのそれぞれ1.5μgずつ）と6μlのlipofectamin（商標）2000をそれぞれ250μlの無血清MEM培地に希釈して、室温で5分間維持した。DNA希釈液とlipofectamin（商標）2000希釈液とを混ぜ合わせて室温で20分間反応させて、DNA-lipofectamin（商標）2000複合体を形成した。培養された細胞から既存の培地を除去した後、DNA-lipofectamin（商標）2000複合体500μlと無血清MEM培地500μlを各ウェルに付加して、37℃で6時間CO₂インキュベーターにおいて培養した。透析されたウシ胎児血清を20%含むMEM培地1mlを追加して48~72時間培養した後、その上澄み液だけを分離して抗体の発現有無をSDS-PAGEとウエスタンブロッティングを用いて確認した（図3）。SDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングは、当業界における通常の方法に従い行い、用いられた試料は、下記の通りである：12%SDSポリアクリルアミドゲル、PVDF膜（Millipore #IPVH00010、米国）、HRP共役ヤギ抗ヒトIgG（ ）抗体、およびHRP共役ヤギ抗ヒトIgG（Fc）抗体（Pierce、米国）。

【0070】

実施例3：DIG 0001産生のための細胞株確立ならびに抗体の分離および精製

CHO-DG44（dhfr-欠失CHO）細胞を用いてDIG 0001産生細胞株を構築した。組換え抗体発現CHO-DG44細胞株を確立するための形質導入過程は、上述の通りである。形質導入されたCHO-DG44細胞（dhfr-陽性）の選別のために、ヒポキサンチンおよびチミジンが除去されたMEM培地を使用し、選別マーカーとして、500μg/mlのG418（Sigma-aldrich社、米国）と400μg/mlのゼオシン（Invitrogen、米国）を用いて、形質導入されたCHO-DG44細胞を一次的に選別した。組換え抗体が発現されるモノクローナルコロニーを

10

20

30

40

50

得るために、一次的に選別された細胞を10細胞/mlの密度に希釈して96-ウェルプレート(Nunc、米国)に播種して2週間培養し、単細胞から分化した単一コロニーを分離して母細胞クローンを確立した。高発現細胞株を得るために様々な濃度(40 nM、80 nM、160 nM、320 nM、700 nM)のメトトレキサート(MTX)が添加された培地で母細胞クローンを段階的に3~5回継代培養し、発現の度合いはELISAを用いて確認した。このために、96-ウェルプレートに1次抗体として、2 µg/mlのヤギ抗ヒトIgG(Fc)(Pierce、米国)を100 µlずつ添加し、4で12時間維持することによりコーティングを終えた。この後、各ウェル中に残留している溶液を捨てた後、1xPBSに2%脱脂乳を含有するブロッキング液を200 µlずつ添加し、37で1時間維持した。1xPBSに0.05%のTween-20を含有する洗10
浄緩衝液で各ウェルを3回繰り返し洗浄した後、抗体発現CHO-DG44細胞株から得た細胞培養液100 µlずつを添加して室温で1時間反応させた。さらに洗浄緩衝液で各ウェルを3回繰り返し洗浄した後、2次抗体としてのHRP共役抗ヒトIgG()を洗20
浄緩衝液に1:5、000の割合にて希釈して100 µlずつ添加し、室温で1時間反応させた。さらに洗浄緩衝液で各ウェルを3回繰り返し洗浄した後、TMB基質液(BD biosciences、米国)を100 µlずつ添加し、5~10分間反応させた後、2N硫酸(H₂SO₄)溶液を50 µlずつ添加して発色反応を止めた。マイクロプレートリーダー(Tecan、スイス)を用いて吸光度O.D_{450-650nm}値を得た。この方法と同様にして1次抗体としてVEGFR-2およびTie-2を使用し、2次抗体としてHRP共役抗ヒトIgG()を用いてELISAを行うことにより、結果を再20
確認した。最終的に、MTX700 nMで高い発現率を示すクローンを高発現細胞株として確立した(図4)。高発現細胞株の培養は、10%の透析されたウシ胎児血清(KDR、大韓民国)、100単位/mlのペニシリン(Hyclone、米国)、および100 µg/mlのストレプトマイシン(Hyclone、米国)を添加したMEM培地(Welgene、大韓民国)を用いて行い、細胞培養は、37のインキュベーターを用いて加湿された5%CO₂混合空気の条件下で行われた。

【0071】

高発現細胞株の培養から得た二重標的抗体DIG 0001は、一層詳細な研究のために、プロテインA親和性カラムおよびSP-セファロースカラムまたはサイズ排除カラムを有するFPLCを用いて純度95%以上の精製された抗体のみを確保した(図5)。まず、培養液を遠心分離を通じて細胞塊と培地とに分離し、分離された培地内のDIG 0001を、分子量カットオフ値(molecular weight cut-off)が10、000 Da以下であるUF膜(Millipore、米国)を通じて濃縮した。UF膜を通った培地は、プロテインA親和性クロマトグラフィを用いて1次精製した。その過程を簡略に説明すれば、下記の通りである。20 mMのリン酸ナトリウム(pH 7.0)で安定化された、0.1 M NaCl含有のプロテインAカラムに、UF膜を通った培地を入れた後、未結合蛋白質を同じバッファを用いて洗い流し、さらに0.5 M NaCl含有の20 mMリン酸ナトリウム(pH 7.0)バッファ溶液を用いて、非特異的に30
プロテインAレジンに結合した蛋白質を洗い流した。プロテインAに特異的に結合する蛋白質は、0.1 M NaCl含有の0.1 Mグリシン-Cl(pH 3.5)バッファを用40
いて溶出し、1 M トリス溶液を用いて試料をpH 6.0に中和させた。この後、親和性カラムを通じて分画された試料内に残存するかもしれないDNA、エンドトキシン、プロテインAの汚染を防ぐために、陽イオン交換クロマトグラフィを次の手順に従って行った。まず、プロテインAカラムから溶出された試料は、同じ体積の20 mMリン酸ナトリウム(pH 6.0)バッファと混ぜておく。この後、50 mMのNaCl含有の10 mMリン酸ナトリウム(pH 6.0)バッファでSP-セファロース(5 ml、GEヘルスケア)カラムを安定化させた後、試料を添加して、未結合のDNA、エンドトキシンなどを洗浄した。レジンに結合された抗体分子は、pH値、塩勾配(50 mMリン酸ナトリウム(pH 7.0)、1 M NaCl)を用いて溶出した。最後に、多量体抗体を除去するために、試料を、PBSで安定化させたSuperdex 200(16 mm x 60 cm、GEヘ50

ルスケア) カラムに入れて、サイズ排除クロマトグラフィに供した。上記の精製過程を終えた抗体を用いて細胞分析および生体内分析を行った。

【0072】

実施例4: DIG 0001の競合アッセイ

二重標的抗体DIG 0001がVEGFR-2およびTie-2に関してVEGFおよびAng2と競合可能であるかどうかを調べる競合アッセイをELISAを用いて行った。このために、96-ウェルプレートにVEGF165とAng2-RBDをそれぞれ200ngずつウェルに分注して室温で一晩中コーティングした後、2%脱脂乳/PBSを用いて37℃で2時間反応させた。反応の終わった96-ウェルプレートをPBSで洗浄した後、室温で1時間予め反応させた混合液グループA(100ngのFcが切断された形態のVEGFR-2(ECD1-3)に様々な濃度(0~250nM)のDIG 0001を混ぜたもの)をVEGF165がコーティングされたウェルに入れ、室温で2時間反応させた。この方法と同様にして、Ang2-RBDがコーティングされたウェルには、室温で1時間予め反応させた混合液グループB(500ngのTie-2-Fcに様々な濃度(0~250nM)のDIG 0001を混ぜたもの)を入れ、室温で2時間反応させた。2時間の反応が終わった後、PBSを用いて96-ウェルプレートの洗浄を行い、VEGF165がコーティングされたウェルに対して1次反応抗体として、5μg/mlの抗-VEGFR-2マウス抗体(Reliatech、ドイツ)を添加した後、37℃で1時間反応させた。Ang2-RBDがコーティングされたウェルに対しても同様に、PBSを用いて洗浄した後、1次抗体として5μg/mlの抗Tie-2マウス抗体(Abcam、英国)を添加し、37℃で1時間反応させた。この後、2次抗体として、HRP共役ヤギ抗マウスIgG抗体(Abcam、英国)を1:5000に希釈して、VEGF165およびAng2-RBDがコーティングされたウェルの両方に添加し、37℃で1時間反応させた後、TMB基質液(BD Biosciences #555214、米国)を用いて発色反応を誘導し、2N硫酸(H₂SO₄)溶液50μlずつを添加して発色反応を止めた。発色反応の測定は、マイクロプレートリーダー(Tecan、スイス)を用いて、吸光度450nmと650nmにおいて行った(図6)。

【0073】

実施例5: DIG 0001処理後のHUVECの生存アッセイ

DIG 0001処理後、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC)の生存率の変化を確認するために、細胞生存率の分析を行った。HUVECの培養は、20%ウシ胎児血清(Hyclone、米国)、ペニシリン100単位/ml(Hyclone、米国)、ストレプトマイシン100μg/ml(Hyclone、米国)、繊維芽細胞成長因子(Upstate Biotechnology、米国)3ng/ml、ヘパリン5単位/ml(Sigma-Aldrich、米国)を添加したフェノールレッド不含のM199培地(Invitrogen、米国)を用い、細胞培養は、加湿された5%CO₂混合空気条件の37℃インキュベーターにおいて培養した。血管内皮細胞の生存率の分析のために、これらの細胞を24-ウェルプレートに2×10⁴細胞/ウェルの密度で入れ、24時間培養した。この後、24-ウェルプレートをM199培地で2回洗い流した後、1%ウシ胎児血清(Hyclone、米国)含有のM199培地中、低い血清濃度条件下で6時間培養した。様々な濃度の抗体で細胞を30分間前処理した後、10ng/mlのVEGF(R&D systems、米国)と100ng/mlのAng1(R&D systems、米国)で処理した。48時間培養後、WST-8(株式会社同仁化学研究所、日本)で2時間処理して、450nm波長における吸光度を測定することにより、各条件下での細胞生存率を比較した(図7)。

【0074】

実施例6: DIG 0001処理後のHUVECの移動アッセイ

DIG 0001のHUVECに対する移動性(走化性)の抑制を確認するために、細胞移動性の分析を行った。HUVECの移動性の分析のために、8μm孔径のポリカーボ

ネットフィルタートランスウェル (C o r n i n g、米国) を用い、使用前にフィルターの下面を $10 \mu\text{g}$ ゼラチンでコーティングした後、乾燥して用いた。下側のウェルには 1% ウシ胎児血清を含む M 1 9 9 培地に 10 ng/ml の V E G F と 100 ng/ml の A n g 1 を添加した。低い血清濃度で 6 時間培養した血管内皮細胞をトリプシン処理して分離した後、 1×10^6 細胞 / ml の密度で 1% ウシ胎児血清を含む M 1 9 9 培地に懸濁した。様々な濃度の抗体で 30 分間前処理した細胞を上側トランスウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ均一に散布した後、細胞インキュベーターにおいて 37 で 3 . 5 時間培養した。細胞をヘマトキシリン・エオジン (S i g m a、米国) またはクリスタルバイオレット (S i g m a、米国) で染色し、フィルターの上面についている未移動細胞は、綿棒を用いて除去して、フィルターの下面の移動した細胞のみを残しておいた。デジタルカメラ付き光学顕微鏡 (O l y m p u s、I X 7 1、日本) で 100 倍率にて撮像を行い、移動した細胞数を比較し、各条件別に 10 個の画像を計数および分析した (図 8)。

10

【 0 0 7 5 】

実施例 7 : 免疫沈降法とウエスタンブロッティング法を用いた、細胞内における V E G F R - 2 および T i e - 2 のリン酸化の阻害の分析

二重標的抗体 D I G 0 0 0 1 の V E G F R - 2 および T i e - 2 に対するリン酸化阻害を確認するために、免疫沈降法とウエスタンブロッティング法を行った。24 時間培養された血管内皮細胞を 1% ウシ胎児血清を含む M 1 9 9 培地の条件下で 6 時間培養後、 $26.7 \mu\text{g/ml}$ の D I G 0 0 0 1 抗体で 30 分間前処理した。この後、 10 ng/ml の V E G F と 100 ng/ml の A n g 1 で 15 分間処理した。免疫沈降法を用いた分析を行うために、冷却された P B S で洗い流し、免疫沈降用緩衝液 (1% T r i t o n X - 100、 0.5% N o n i d e t P - 40、 50 mM T r i s / H C l (p H 7 . 4)、 150 mM N a C l、 2 mM バナジン酸ナトリウム、 2 mM E G T A、 2 mM E D T A、 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、および 1 mM フッ化ナトリウム) で $500 \mu\text{l}$ 処理した。スクラッパーで掻き集めた溶質を 26 ゲージの注射器に数回通させて、十分に溶解させた後、 $12,000 \text{ g}$ で 10 分間遠心分離して、上澄み液を回収した。 $300 \mu\text{g}$ の溶質に $2 \mu\text{g}$ の抗 T i e - 2 (R & D s y s t e m s、米国) 免疫沈降用抗体を添加して 8 時間以上反応させた後、プロテイン A / G プラスアガロース (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y、米国) を添加して結合させた。プロテイン A / G プラスアガロースに結合された免疫複合体を遠心分離し、緩衝液で 3 ~ 5 回繰り返し洗浄し、S D S サンプルバッファを加えて沸騰させた後、遠心分離を通じてアガロース沈殿物を除去した。

20

30

【 0 0 7 6 】

ウエスタンブロッティング法を用いた分析のために、溶解緩衝液 (1% (w / v) S D S、 10 mM T r i s (p H 7 . 4)、 2 mM バナジン酸ナトリウム、 2 mM E G T A、 2 mM E D T A、 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、および 1 mM フッ化ナトリウム) で処理して溶質を得、この溶質を沸騰させた後、4 で 5 分間 $10,000 \text{ g}$ で遠心分離して非溶解性沈殿物を除去した。上澄み液を S D S サンプルバッファと混ぜて 10 分間沸騰させた。S D S - P A G E およびウエスタンブロッティングは、当業界における通常の方法に従い行い、用いられた試料は、下記の通りである : 12% S D S ポリアクリルアミドゲル、P V D F 膜 (M i l l i p o r e # I P V H 0 0 0 10、米国)、T i e - 2 リン酸化阻害活性の分析のための 1 次抗体としての抗 T i e - 2 抗体 (a b c a m、英国) と抗ホスホチロシン抗体 (U p s t a t e B i o t e c h n o l o g y、米国) ; 抗 p 4 4 / 4 2 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y、米国) と抗ホスホ p 4 4 / 4 2 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y、米国) ; 抗 A K T 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y、米国) と抗ホスホ A K T 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y、米国)、V E G F R - 2 リン酸化阻害活性の分析のための 1 次抗体としての抗 V E G F R - 2 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y、米国) と抗ホスホ V E G F R - 2 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y、米

40

50

国) ; 抗 A K T 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y 、 米 国) と 抗 ホ ス ホ A K T 抗体 (C e l l S i g n a l i n g t e c h n o l o g y 、 米 国) 、そして、化学発光法のために 1 次抗体と結合する 2 次抗体としての H R P 共役ヤギ抗マウス I g G 抗体 (S a n t a C r u z e B i o t e c h n o l o g y 、 米 国) および H R P 共役ヤギ抗ウサギ I g G (S a n t a C r u z e B i o t e c h n o l o g y 、 米 国) (図 9) 。

【 0 0 7 7 】

実施例 8 : 膠芽細胞腫 (g l i o b l a s t o m a) 動物モデルにおける D I G - 0 0 0 1 による腫瘍成長の抑制

同所移植膠芽細胞腫の成長のために、特定の病原体が除去された雄性 B a l b / c - n u マウス (J a p a n S L C) が用いられた。U - 8 7 M G 膠芽細胞腫 (2×10^5 細胞、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n) の脳内移植が公知の方法に従い行われた。膠芽細胞腫の脳内移植の翌日に、マウスを 2 つのグループ ($n = 4$) に分けて以下の処置を行った : (a) P B S の腹膜内注入、(b) 0 . 5 m g / k g の D I G - 0 0 0 1 の腹膜内注入。全ての処置は、5 回 (腫瘍細胞の播種後の 1 5 、 1 8 、 2 1 、 2 4 および 2 7 日目) に亘って行われた。腫瘍細胞の移植後の 2 9 日目にマウスを屠殺し、脳を取り出して冠状に切断した。一つの断片は 1 0 % 緩衝ホルマリンで固定し、ホルマリンで包埋し、残りの断片は O C T 化合物に包埋した。腫瘍の体積は、最も大きな腫瘍部分を有する断片の体積を測定し、次式を適用することにより計算した :

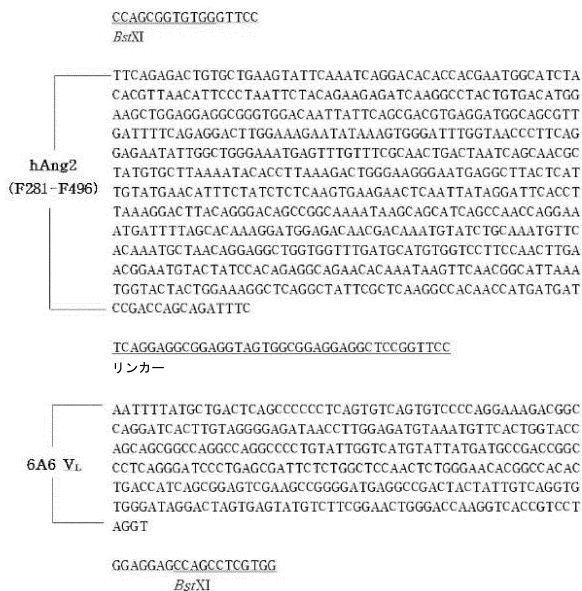
幅² × 長さ × 0 . 5 (図 1 0) 。

【 0 0 7 8 】

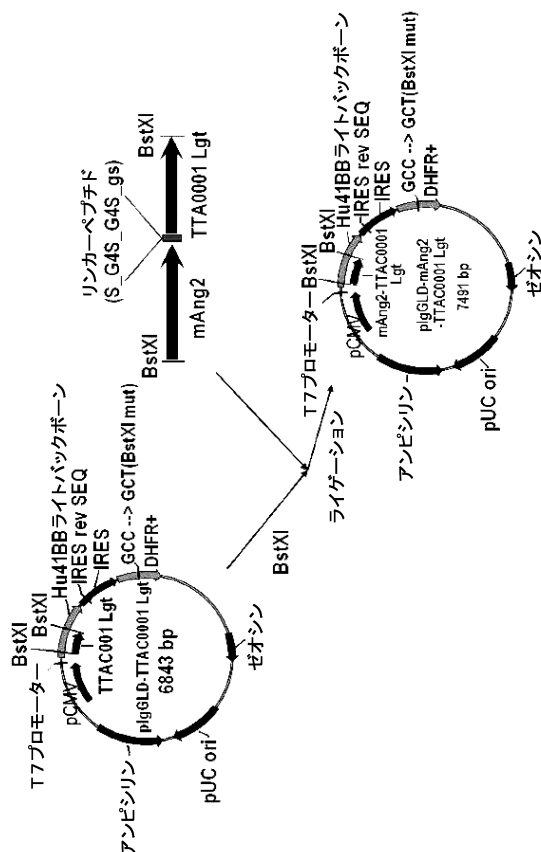
産業上の利用可能性

本発明の組成物は、血管新生関連疾患、特に、癌を治療するのに利用可能である。

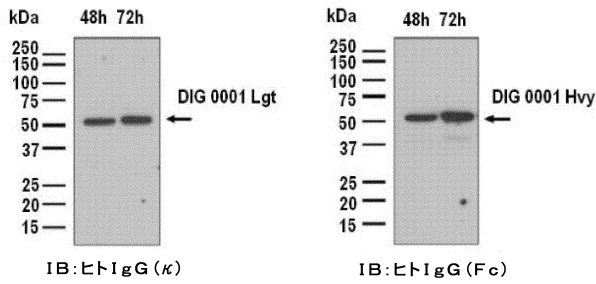
【 図 1 】



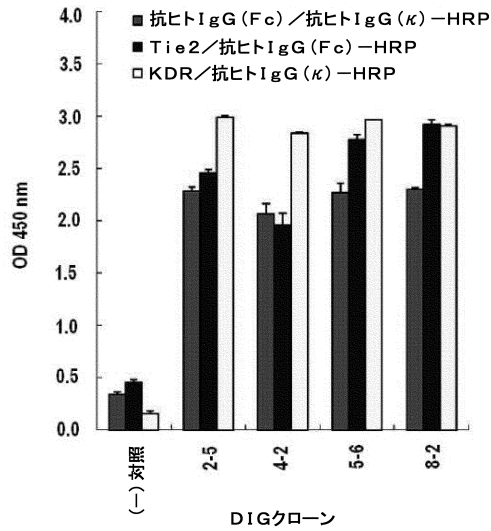
【 図 2 】



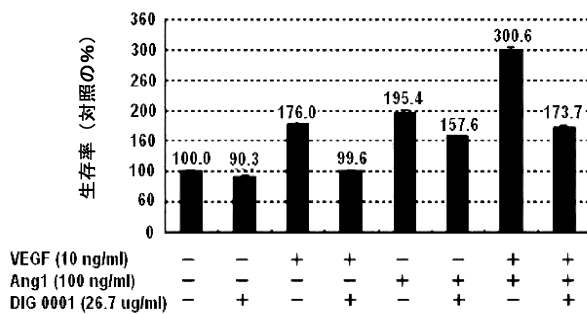
【図 3】



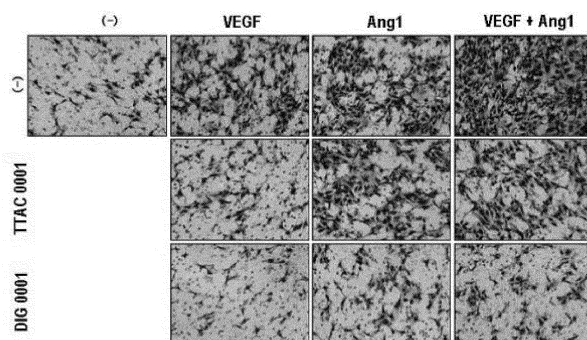
【図 4】



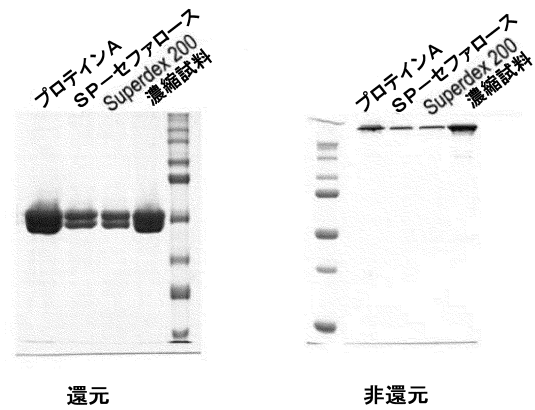
【図 7】



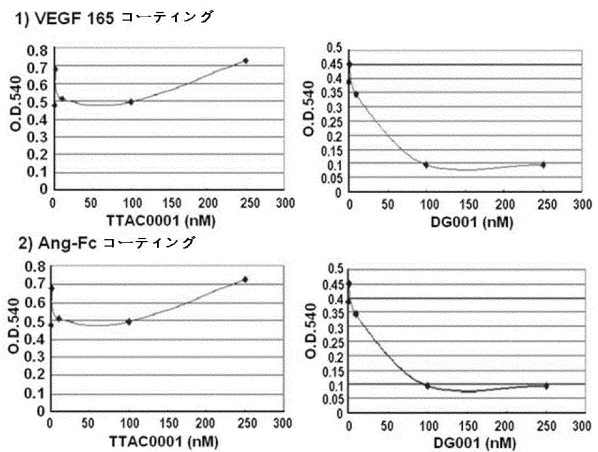
【図 8】



【図 5】

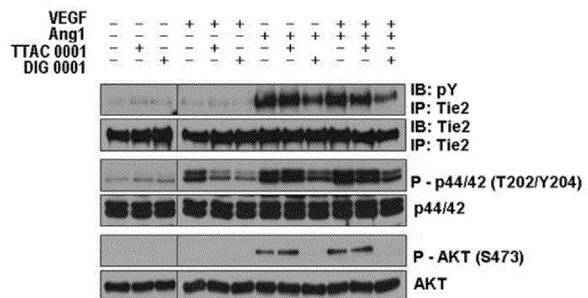


【図 6】

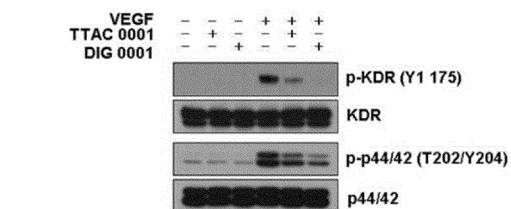


【図 9】

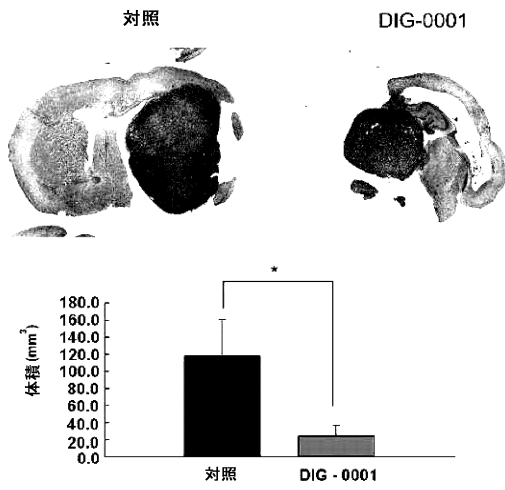
1) Tie-2リン酸化阻害分析



2) KDRリン酸化阻害分析



【図 10】



【配列表】

0005744012000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヨー ジンサン
大韓民国 テジョン - シ ユソン - グ ウォンチョン - ドン 2 5 7 - 2 2 サイエンスビル 2
- 1 0 1

(72)発明者 リー ウェオン サブ
大韓民国 テジョン - シ ユソン - グ シンソン - ドン デーリム デュレ アpartment 1
0 6 - 6 0 6

(72)発明者 キム スン ウー
大韓民国 テジョン - シ ユソン - グ シンソン - ドン デーリム デュレ アpartment 1
0 6 - 5 0 3

(72)発明者 シム サン リョル
大韓民国 テジョン - シ ユソン - グ シンソン - ドン 1 4 0 - 7 1 0 2

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 国際公開第2008/153237(WO, A1)
特表平07-508178(JP, A)
国際公開第2005/024027(WO, A1)
国際公開第2008/090958(WO, A1)
J. Biol. Chem., 2006, 281(16), pp.10706-10714
J. Biol. Chem., 2003, 278(48), pp.47812-47819
Methods Mol. Med., 2005, 109, pp.347-373
Biochim. Biophys. Acta., 2009, 1793(5), pp.772-780 (Epub 2009 Feb 10)
小澤美奈子、"生化学辞典"、第3版第5刷、株式会社東京化学同人、2002年、1472頁

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq