

(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2016-503286

(P2016-503286A)

(43) 公表日 平成28年2月4日(2016.2.4)

(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 O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-517188 (P2015-517188)
 (86) (22) 出願日 平成25年6月14日 (2013.6.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年2月16日 (2015.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2013/005272
 (87) 国際公開番号 W02013/187724
 (87) 国際公開日 平成25年12月19日 (2013.12.19)
 (31) 優先権主張番号 61/659, 654
 (32) 優先日 平成24年6月14日 (2012.6.14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 PCT/KR2012/008618
 (32) 優先日 平成24年10月19日 (2012.10.19)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

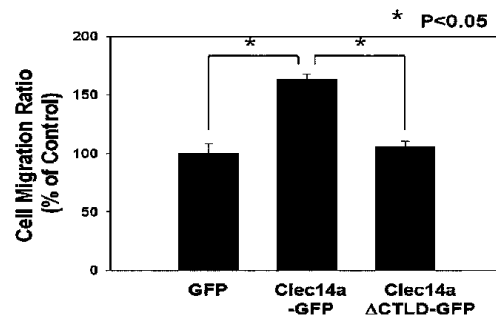
(71) 出願人 514319696
 スクリップス コリア アンチボディ イ
 ンスティテュート
 SCRIPPS KOREA ANTIB
 ODY INSTITUTE
 大韓民国, 200-701, カンウォン
 ド, チュンチョンシ, カンウォンデハク
 ーギル, 1
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
 (74) 代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎
 (74) 代理人 100185915
 弁理士 長山 弘典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C L E C 1 4 A に特異性を持つ新規な抗体及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA) に特異的に結合する新規な抗体に関するものである。より詳細には、本発明は c l e c 1 4 a の C T L D (C - タイプレクチン様ドメイン) に特異的に結合する抗体、前記抗体を製造する方法、前記抗体を含む血管新生抑制用組成物、前記抗体または前記組成物を投与して、血管新生を抑制する方法、前記抗体を含む癌予防または治療用組成物、前記抗体または前記組成物を投与して癌を治療する方法、前記抗体を含む癌診断用組成物、前記組成物を含む癌診断用キット、前記組成物を用いて癌を診断する方法、c l e c 1 4 a の発現を抑制する物質を含む血管新生抑制用組成物、前記組成物を含む血管新生用キット、前記組成物を用いて血管新生を抑制するか癌を治療する方法、及び血管新生を抑制する抗体のためのエピトープとしての c l e c 1 4 a の C T L D の用途に関するものである。前記抗体は c l e c 1 4 a - 媒介性癌進行を効果的に抑制することができる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー 1 4、メンバー A) に特異的に結合することを特徴とする抗体。

【請求項 2】

前記抗体は、c l e c 1 4 a の C T L D (C - タイプレクチン様ドメイン) に特異的に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体は、c l e c 1 4 a の C T L D の N - 末端または C - 末端に特異的に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体は、c l e c 1 4 a の C T L D 内の 1 番目のアミノ酸から 4 2 番目のアミノ酸までのアミノ酸切片または c l e c 1 4 a の C T L D 内の 4 2 番目のアミノ酸から 1 2 2 番目のアミノ酸までのアミノ酸切片を含む部位に特異的に結合することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗体は、ヒト、チンパンジー及びネズミの c l e c 1 4 a - C T L D に特異的に結合する、交差反応性を持つことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 6】

新生血管生成を抑制することを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記 C T L D は、c l e c 1 4 a のアミノ酸配列上で 3 1 - 1 7 2 番目のアミノ酸残基を含むポリペプチドであることを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 8】

配列番号 1 4 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 1 6 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 4 4 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 4 6 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 9】

配列番号 2 1 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 2 3 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 5 1 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 1 0】

配列番号 2 8 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 3 0 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 5 6 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 5 8 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 6 0 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 1 1】

配列番号 3 5 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 3 7 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 3 9 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 6 3 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 6 5 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 6 7 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含むことを特徴とする請求項 2 に記載の抗

10

20

30

40

50

体。

【請求項 1 2】

前記抗体は、配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含む抗体；配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 0 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含む抗体；配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含む抗体；及び配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含む抗体；で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

細胞移動を抑制する機能を行うことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

チューブ形成を抑制する機能を行うことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

細胞間接触を抑制する機能を行うことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

c l e c 1 4 a C T L D - C T L D 複合体の形成を抑制する機能を行うことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

動脈血管内皮細胞の表面上で c l e c 1 4 a の下向き調節を誘導する機能を行うことを特徴とする請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の抗体をコードする核酸。

【請求項 1 9】

前記核酸は、配列番号 7 0 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 7 2 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 7 4 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 7 7 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 7 9 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 8 1 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むことを特徴とする請求項 1 8 に記載の核酸。

【請求項 2 0】

前記核酸は、配列番号 8 4 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 8 6 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 8 8 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 9 1 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 9 3 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 9 5 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むことを特徴とする請求項 1 8 に記載の核酸。

【請求項 2 1】

前記核酸は、配列番号 9 8 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 0 0 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 0 2 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 1 0 5 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 0 7 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 0 9 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むことを特徴とする請求項 1 8 に記載の核酸。

【請求項 2 2】

前記核酸は、配列番号 1 1 2 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 1 4 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 1 6 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 1 1 9 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 2 1 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 2 3 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むことを特徴とする請求項 1 8 に記載の核酸。

【請求項 2 3】

前記核酸は、重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 3 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 3 4 の核酸配列を含む核酸；重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 5 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 3 6 の核酸配列を含む核酸；重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 7 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 3 8 の核酸配列を含む

10

20

30

40

50

核酸；及び重鎖可変部位に対する配列番号 139 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 140 の核酸配列を含む核酸；で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 18 に記載の核酸。

【請求項 24】

請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 25】

請求項 20 に記載のベクターまたは請求項 18 ~ 23 のいずれか一項に記載の核酸を含む宿主細胞。

【請求項 26】

前記抗体を産生するために核酸が発現するように請求項 21 に記載の宿主細胞を培養することを、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体を製造する方法。

10

【請求項 27】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体と薬物が結合した抗体 - 薬物結合体。

【請求項 28】

前記薬物は、毒素、化学治療剤、抗癌剤、抗生剤、ADP - リボシルトランスフェラーゼ、放射性同位元素及び核酸分解酵素で構成された群から 1 種選択されたことを特徴とする請求項 27 に記載の抗体 - 薬物結合体。

【請求項 29】

前記抗体 - 薬物結合体は、細胞内に内在化できることを特徴とする請求項 27 に記載の抗体 - 薬物結合体。

20

【請求項 30】

前記細胞は、癌細胞であることを特徴とする請求項 29 に記載の抗体 - 薬物結合体。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体を含む血管新生関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物。

【請求項 32】

前記血管新生関連疾患は、癌、転移、糖尿網膜病症、未熟児網膜病症、角膜移植拒否、黄斑変性、血管新生緑内障、全身紅色症、増殖性網膜症、乾癬、血友病性股関節炎、動脈硬化性プラークの毛細血管形成、ケロイド、創傷肉芽、血管癒着、リウマチ関節炎、退行性関節炎、自己免疫疾患、クローン病、再狭窄、粥状動脈硬化症、腸狭窄、猫引っかき病、潰瘍、肝硬変症、腎臓炎、糖尿病性腎臓疾患、真性糖尿病、炎症疾患及び神経変性疾患で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 31 に記載の薬剤学的組成物。

30

【請求項 33】

前記癌は、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、睾丸癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、すい臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳腫瘍、甲状腺癌、白血病、ホジキンリンパ腫瘍、リンパ腫及び多発性骨髄血液癌で構成された群から選択されることを特徴とする請求項 31 に記載の薬剤学的組成物。

【請求項 34】

請求項 1 に記載の抗体または請求項 31 に記載の薬剤学的組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法。

40

【請求項 35】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体を含む血管新生抑制用組成物。

【請求項 36】

請求項 1 に記載の抗体または請求項 31 に記載の薬剤学的組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生を抑制する方法。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗体を含む血管新生関連疾患診断用組成物。

【請求項 38】

50

前記血管新生関連疾患は、癌、転移、糖尿網膜病症、未熟児網膜病症、角膜移植拒否、黄斑変成、血管新生成緑内障、全身紅色症、増殖性網膜症、乾癬、血友病性股関節炎、動脈硬化性プラークの毛細血管形成、ケロイド、創傷肉芽、血管癒着、リウマチ関節炎、退行性関節炎、自己免疫疾患、クローン病、再狭窄、粥状動脈硬化症、腸狭窄、猫引っかき病、潰瘍、肝硬変症、腎臓炎、糖尿病性腎臓疾患、真性糖尿病、炎症疾患及び神経変成疾患で構成された群から選択されたことを特徴とする請求項 37 に記載の血管新生関連疾患診断用組成物。

【請求項 39】

前記癌は、c l e c 1 4 a を発現することを特徴とする請求項 38 に記載の診断用組成物。

10

【請求項 40】

請求項 37 に記載の診断用組成物を含む血管新生関連疾患診断用キット。

【請求項 41】

血管新生関連疾患が疑われる個体から分離した生物学的試料内の抗原 - 抗体反応を介して c l e c 1 4 a を検出する工程を含む、血管新生関連疾患の診断方法。

【請求項 42】

血管新生を抑制する抗体の生成を誘導できるエピトープとして作用する、c l e c 1 4 a の単離 C T L D を含むポリペプチド。

【請求項 43】

血管新生を抑制する抗体の生成を誘導できるエピトープとして作用する、c l e c 1 4 a の C T L D の N - 末端または C - 末端を含むポリペプチド。

20

【請求項 44】

血管新生を抑制する抗体の生成を誘導できるエピトープとして作用して、c l e c 1 4 a の C T L D 内の 1 番目のアミノ酸から 42 番目のアミノ酸までのアミノ酸切片または c l e c 1 4 a の C T L D 内の 122 番目のアミノ酸から 142 番目のアミノ酸までのアミノ酸切片を含むポリペプチド。

【請求項 45】

請求項 42 ~ 44 のいずれか一項に記載のポリペプチドをエピトープとして用いてバイオパニングする工程を含む、c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー 14、メンバー A) に特異的に結合する抗体を製造する方法。

30

【請求項 46】

c l e c 1 4 a の発現を抑制する物質を含む血管新生抑制用組成物。

【請求項 47】

前記物質は、c l e c 1 4 a の C T L D の発現を抑制する物質であることを特徴とする請求項 46 に記載の血管新生抑制用組成物。

【請求項 48】

前記物質は、c l e c 1 4 a に特異的な、アンチセンスオリゴヌクレオチド、s i R N A s、アプタマー及び抗体で構成された群から選択されたことを特徴とする請求項 46 に記載の組成物。

【請求項 49】

血管新生を抑制することによって血管新生関連疾患を治療することを特徴とする請求項 46 に記載の組成物。

40

【請求項 50】

請求項 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の組成物を含む血管新生抑制用キット。

【請求項 51】

請求項 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生を抑制する方法。

【請求項 52】

請求項 46 ~ 49 のいずれか一項に記載の組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法。

50

【請求項 5 3】

c l e c 1 4 a の C T L D 及び F c の融合タンパク質を含む、血管新生関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物。

【請求項 5 4】

前記血管新生関連疾患は、癌、転移、糖尿網膜病症、未熟児網膜病症、角膜移植拒否、黄斑変成、血管新生緑内障、全身紅色症、増殖性網膜症、乾癬、血友病性股関節炎、動脈硬化性プラークの毛細血管形成、ケロイド、創傷肉芽、血管癒着、リウマチ関節炎、退行性関節炎、自己免疫疾患、クローン病、再狭窄、粥状動脈硬化症、腸狭窄、猫引っかけ病、潰瘍、肝硬変症、腎臓炎、糖尿病性腎臓疾患、真性糖尿病、炎症疾患及び神経変成疾患で構成された群から選択されたことを特徴とする請求項 5 3 に記載の薬剤学的組成物

10

【請求項 5 5】

c l e c 1 4 a の C T L D 及び F c の融合タンパク質または請求項 5 3 に記載の薬剤学的組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C - タイプレクチンドメインファミリー 1 4、メンバー A (c l e c 1 4 a) に特異的に結合する新規な抗体及びその用途に関する。より詳細には、本発明は c l e c 1 4 a の C - タイプレクチン様ドメイン (C T L D) に特異的に結合する抗体、前記抗体を製造する方法、前記抗体を含む血管新生抑制用組成物、前記抗体または前記組成物を投与して血管新生を抑制する方法、前記抗体を含む癌予防または治療用組成物、前記抗体または前記組成物を投与して癌を治療する方法、前記抗体を含む癌診断用組成物、前記組成物を含む癌診断用キット、前記組成物を用いて癌を診断する方法、c l e c 1 4 a の発現を抑制する物質を含む血管新生抑制用組成物、前記組成物を含む血管新生用キット、前記組成物を用いて血管新生を抑制するか癌を治療する方法、及び血管新生を抑制する抗体作製のためのエピトープとしての c l e c 1 4 a の C T L D の用途に関する。

20

【背景技術】

【0002】

組換え抗体技術は、急激に発展して最近まで約 3 0 個の抗体が承認されて、ヒト治療に用いられて、広範囲な病気治療のために世界的に 2 7 0 個を超える抗体に対する臨床研究が進行中である。しかし、従来の抗体スクリーニングは、時間及び手間がかかり、高費用の短所がある。一般にターゲットタンパク質の細胞外の部分が、抗体をスクリーニングするのに用いられる。結果的に多くのスクリーニングされた抗体は、細胞には結合するが、治療潜在力を持つ機能性抗体ではない場合が多い。最近では、分子生物学及びタンパク質生化学技術の発展により細胞機能と繋がるタンパク質ドメイン及びモチーフ上の多量の情報の活用が可能になっている。機能性ドメイン (functional domain) を組換え抗体スクリーニングに使用する用途は、機能性抗体を確認して根本的な作用機序 (mode of action) を調べる効果的な手段でありうる。

30

40

【0003】

腫瘍血管新生は、腫瘍進行に重要な役割を果たす。血管内皮成長因子 (vascular endothelial growth factor、V E G F) 及び上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor、E G F R) は、血管新生で重要な因子であり、血管新生は癌治療において非常に有望なターゲットである。抗 - V E G F 抗体 (anti-VEGF antibody) のベバシズマブ (bevacizumab) は、転移性大腸癌 (metastatic colorectal cancer)、腎臓癌 (renal cell carcinoma)、非小細胞性肺癌 (non-small cell lung cancer)、及び悪性脳神経膠腫 (malignant brain glioma) 疾患を持つ患者の治療に用いられている。抗 - E G F R 抗体 (anti-EGFR antibody) であるセツキシマブ (cetuximab) は、内皮細胞間接触を阻害して、V E G F、インターロイキン - 8 (interleukin-8) 及び基本繊維芽細胞成長因子 (f

50

ibroblast growth factor) のような血管新生因子の発現を抑制することができる。

【 0 0 0 4 】

しかし、胎盤成長因子 (placental growth factor)、アンジオポエチン (angiopoietin)、基本繊維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor)、及び肝細胞生長因子 (hepatocyte growth factor) を含む腫瘍 - 分泌血管新生因子の多様かつ過剰な存在によって、これらの薬剤に対する腫瘍の抵抗性 (resistant phenotype) が現れる (Kopetz S, et al., Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *Journal of Clinical Oncology*. 28(3): 453-9; Lucio-Eterovic AK, et al., Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clinical Cancer Research*. 2009; 15(14): 4589-99)。

10

【 0 0 0 5 】

現在ヒト V E G F 特異的抗体であるベバシズマブは、多様な癌患者の治療に用いられている。しかし、V E G F 受容体 (V E G F R) は、正常細胞でも発現するため、これの使用は高血圧、蛋白尿、及び胃腸管穿孔 (gastrointestinal perforation) を含む副作用と関連があると見られる。また、副作用によって V E G F R - 2 及びアンジオポエチン - 2 (angiopoietin-2) のような血管新生前駆因子 (pro-angiogenic factors) に対する多くの治療用途に制限が生じる。結果的に、新生血管生成 (angiogenesis) を抑制することによって、癌患者を治療する新しい癌 - 特異的ターゲットの確認は、より副作用が少ない治療用抗体の開発において決定的である。

20

【 0 0 0 6 】

また、ベバシズマブ及びセツキシマブは、溶解性新生血管成長因子 (angiogenic growth factors) 及びその受容体の相互作用を阻害することによって、新生血管生成を抑制する治療用抗体である。しかし、これらの薬剤を長期間服用する場合、腫瘍細胞が分泌する様々な血管新生前駆成長因子 (pro-angiogenic growth factors) によって腫瘍の薬剤に対する抵抗性が現れる。これにより、長期間の治療を必要とする患者において溶解性成長因子に対する抗体を用いることは、大きな問題を引き起こすことになりうる。

【 0 0 0 7 】

C l e c 1 4 a は、上皮成長因子様ドメインである C - タイプレクチン - 様ドメイン (C T L D) 及びスシ - 様ドメイン (sushi-like domain) を構成する細胞外ドメインであるタイプ I 膜貫通タンパク質である。いくつかの報告で、腫瘍新生血管生成にあたり、c l e c 1 4 a が役割を果たすことが示された。ロー等は、c l e c 1 4 a が血管内皮細胞特異的であり、新生血管生成において細胞間接触で重要な役割を果たすことができると報告した (Rho SS, et al., Clec14a is specifically expressed in endothelial cells and mediates cell to cell adhesion. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 404(1): 103-8)。ミュラー等は、c l e c 1 4 a が糸状仮足 (filopodium) 形成、細胞移動 (cell migration)、及び血管内皮細胞チューブ形成 (endothelial tube formation) と関連した血管新生前駆表現型 (pro-angiogenic phenotypes) を調節するのに決定的であると報告し、このグループも c l e c 1 4 a が正常組織の内皮では発現しなかった腫瘍内皮細胞特異的マーカーである点を確認した (Mura M, et al., Identification and angiogenic role of the novel tumor endothelial marker CLEC14A. *Oncogene*. 31(3): 293-305)。

30

40

【 0 0 0 8 】

この数年の間 c l e c 1 4 a に対して関心が高まるにもかかわらず、その分子メカニズムは明確に確認されていない。臨床的に活用可能な抗体を発掘して開発するためには、新生血管生成に関連した c l e c 1 4 a の機能性の部分またはドメインに対する研究は必ず実行されなければならない。これと関連して、前臨床及び臨床研究のためにマウス及びヒト c l e c 1 4 a に特異的に結合してヒト化された、抗体またはヒト抗体に変換されることができるモノクローナル抗体が強く求められている。好ましくは、腫瘍新生血管生成の

50

阻害に臨床的に適用可能で、究極的に癌を治療できる抗体が必要である。また、新生血管生成を抑制することを確認して、癌を治療するためには腫瘍新生血管生成を抑制する新しい薬剤が必要である。

【0009】

前記内容は、本発明の背景に対する理解を助けるためのものであって、本発明が属する技術分野において当業者にはすでに知らされた公示技術に該当しない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明者等は、まず新生血管生成において重要な細胞移動及び糸状仮足形成でCTLD機能を確認した。ファージディスプレイ法を利用して、本発明者等は、ヒト及びマウスc1ec14a CTLDsに特異的な組換えヒト抗体を開発した。機能アッセイ結果は、抗体が生存力または活性化に影響を及ぼさず、内皮細胞移動及びチューブ形成を特異的に阻害することを見せた。

10

【0011】

そこで、本発明者等は、CTLD-媒介細胞間相互結合を調節して、内皮細胞表面上のc1ec14a発現を下向き調節(down-regulating)することで、新生血管生成を抑制できる作用機序を提案する。この結果は、新生血管生成でのCTLDの機能的重要性及びc1ec14a媒介腫瘍新生血管生成を防止するためのCTLD-特異的ヒト抗体の潜在力を立証する。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

前記目的を解決するために、本発明はc1ec14a(C-タイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA)に特異的に結合する抗体を提供する。

本発明はまた、前記抗体をエンコードする核酸を提供する。

本発明はまた、前記核酸を含むベクターを提供する。

本発明はまた、前記ベクターまたは前記核酸を含む宿主細胞を提供する。

本発明はまた、前記抗体を産生するために前記核酸が発現するように前記宿主細胞を培養することを含む、前記抗体を製造する方法を提供する。

本発明はまた、前記抗体が前記薬物に結合した抗体-薬物結合体を提供する。

30

本発明はまた、前記抗体を含む血管新生関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物を提供する。

本発明はまた、血管新生関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物の製造のための前記抗体の用途を提供する。

本発明はまた、血管新生関連疾患の予防または治療用抗体を提供する。

本発明はまた、前記薬剤学的組成物を必要とする患者に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法を提供する。

本発明はまた、前記抗体を含む血管新生抑制用組成物を提供する。

本発明はまた、血管新生抑制用組成物の製造のための抗体の用途を提供する。

本発明はまた、血管新生抑制用抗体を提供する。

40

本発明はまた、前記抗体または前記薬剤学的組成物を必要とする患者に投与する工程を含む、血管新生を抑制する方法を提供する。

本発明はまた、前記抗体を含む血管新生関連疾患診断用組成物を提供する。

本発明はまた、前記血管新生関連疾患の生体外診断のための抗体の用途を提供する。

本発明は、前記診断用組成物を含む血管新生関連疾患診断用キットを提供する。

本発明はまた、血管新生関連疾患が疑われる患者から分離した生物学的試料内の抗原-抗体複合体を介してc1ec14aを検出する工程を含む、血管新生関連疾患の診断方法を提供する。

本発明はまた、血管新生を抑制する抗体の生成を誘導できるエピトープとして作用する、c1ec14aの単離CTLDを含むポリペプチドを提供する。

50

本発明はまた、血管新生を抑制する抗体の生成を誘導できるエピトープとして作用する、c l e c 1 4 a の C T L D の N - 末端または C - 末端を含むポリペプチドを提供する。

本発明はまた、血管新生を抑制する抗体の生成を誘導できるエピトープとして作用して、c l e c 1 4 a の C T L D 内の 1 番目のアミノ酸から 4 2 番目のアミノ酸までのアミノ酸切片または c l e c 1 4 a の C T L D 内の 1 2 2 番目のアミノ酸から 1 4 2 番目のアミノ酸までのアミノ酸切片を含むポリペプチドを提供する。

本発明はまた、前記ポリペプチドをエピトープとして用いてバイオパンニング (biopanning) する工程を含む、c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー 1 4 、メンバー A) に特異的に結合する抗体を製造する方法を提供する。

本発明はまた、c l e c 1 4 a の発現を抑制する物質を含む血管新生抑制用組成物を提供する。 10

本発明はまた、前記組成物を含む血管新生抑制用キットを提供する。

本発明はまた、前記組成物を必要とする患者に投与する工程を含む、血管新生を抑制する方法を提供する。

本発明はまた、前記組成物を必要とする患者に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法を提供する。

本発明はまた、血管新生抑制用組成物の製造のために c l e c 1 4 a の発現を抑制する物質の用途を提供する。

本発明はまた、血管新生抑制用 c l e c 1 4 a の発現を抑制する物質を提供する。

本発明はまた、c l e c 1 4 a の C T L D 及び F c の融合タンパク質を含む、血管新生関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物を提供する。 20

本発明はまた、前記血管新生関連疾患の予防または治療用 c l e c 1 4 a の C T L D 及び F c の融合タンパク質を提供する。

本発明はまた、c l e c 1 4 a の C T L D 及び F c の融合タンパク質または前記薬剤学的組成物を必要とする患者に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法を提供する。

本発明の他の特徴及び具現例は、以下の詳細な説明及び添付された特許請求範囲からより一層明白になる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【図 1】細胞移動での c l e c 1 4 a C T L D の効果を示した図面である。A . 創傷治療アッセイ (wound healing assay) で G F P 、 c l e c 1 4 a - G F P 、または c l e c 1 4 a C T L D - G F P でトランスフェクションされた C O S - 7 細胞の移動を光学顕微鏡を利用して調べた。イメージは、0 時間 (上) 及び 2 0 時間 (下) にキャプチャーした。B . 移動距離は、コントロール移動のパーセントで示した。三つの独立的な実験中一つから測定した平均値 ± S D の 3 重測定値である。 30

【図 2】糸状仮足形成での c l e c 1 4 a C T L D の効果を示した図面である。G F P 、 c l e c 1 4 a - G F P 及び c l e c 1 4 a C T L D - G F P でトランスフェクションされた (A) C O S - 7 細胞及び (B) H U V E C s を固定させた後、ローダミンパロイジン (rhodamine-phalloidin) 及びヘキスト (Hoechst) で染色して蛍光顕微鏡 (fluorescence microscopy 1000X) で調べた。矢印は、糸状仮足が形成された部位を示す。結果は三つの独立的な実験を代表するもので示す。 40

【図 3】ヒト及びマウス C T L D s に特異的な s c F v クローンの単離を示した図面である。A . ヒト合成 s c F v 抗体ライブラリーは、F c バインダーを事前に除去し、組換え h C T L D - F c または m C T L D - F c で選択的なバイオパンニングを行って、スクリーニングした。B - D . s c F v を表示する 9 6 個のファージクローン (1 - 9 6) を無作為で選択して、上澄液をファージ E L I S A で分析した。選択された s c F v クローンのヒト及びマウス C T L D s に対する反応性は 4 5 0 n m での吸光度を測定して調べた。矢印は、h C T L D - F c (、黒色) 及び m C T L D - F c (、灰色) に反応する s c F v クローンを示し、F c () 、B S A (、斜線) に反応しないのは、バックグラ 50

ウンド調整に用いた。

【図4】ヒト及びマウスCTLDSに対するclec14a-CTLDIgGsの交差-種反応性を示した図面である。hCTLDFc(、黒色)及びmCTLDFc(、灰色)でコートされた96-ウェルマイクロタイプレート上での精製、選択されたscFvクローン(クローン1-4)でELISAを実施して、Fc()及びBSA(、斜線)でバックグラウンド調整した。三つの独立的な実験中の一つから測定した平均値±SDの3重測定値である。

【図5】血管内皮細胞移動及びチューブ形成でのclec14a-CTLDIgGsの効果を示した図面である。A.傷を負った後、clec14a-CTLDIgG(クローン1-4)またはセツキシマブの不在(MOCK)または存在下にインキュベーションされたHUVECsの移動を顕微鏡を利用して調べた。イメージは、0時間(上)及び9時間(下)にキャプチャーした。B.移動距離は、コントロール(MOCK)移動のパーセントで示した。三つの独立的な実験中一つから測定した平均値±SDの3重測定値である。C.clec14a-CTLDIgG(クローン1-4)またはセツキシマブの不在(MOCK)または存在下でチューブ形成を調べた。D.チューブ形成の程度は、コントロール(MOCK)チューブ形成のパーセントで示した。三つの独立的な実験中一つから測定した平均値±SDの3重測定値である。

【図6】血管内皮細胞増殖及び活性に対するclec14a-CTLDIgGsの効果を示した図面である。A.clec14a-CTLDIgGs、セツキシマブ、または、5-FU(ポジティブコントロール)の不在(MOCK)または存在下でHUVECsを2日間インキュベーションした。450nmで吸光度を測定することによって細胞の生存力を調べた。二つの独立的な実験中一つから測定した平均値±SDの3重測定値である。B.hTNF、clec14a-CTLDIgGsまたはセツキシマブの部材(鎖線)または存在(実線)下にHUVECsを培養して;抗-VCAM-1(anti-VCAM-1、上)またはICAM-1(下)ポリクローナル抗体で染色して;フローサイトメトリーで分析した。hTNFは内皮細胞活性に対するポジティブコントロールとして用いた。結果は、三つの独立的な実験を代表するものとして示す。

【図7】clec14a-媒介性細胞間接触上のclec14a-CTLDIgGsの効果を示した図面である。A.GFP及びclec14a-GFPでトランスフェクションされたHEK293F細胞をclec14a-CTLDIgGsまたはセツキシマブの不在(MOCK)または存在下で8時間インキュベーションした。細胞凝集体(mass>4cells、矢印頭)を光学顕微鏡を利用してカウントした。フィールド当たり凝集体の数はBに示した。B.三つの独立的な実験中一つから測定した平均値±SDの3重測定値である。

【図8】CTLDCTLD相互結合でのclec14a-CTLDIgGの効果を示した図面である。A.抗-GFPまたは抗-アクチン抗体で免疫プロットングすることで、GFP、clec14a-GFPまたはclec14aCTLDCGFPでトランスフェクションされたCOS-7細胞の溶解物を分析した。B.GFP(白色)、clec14a-GFP(黒色)またはclec14aCTLDCGFP(明るい灰色)を発現するCOS-7細胞を0.15µgのhCTLDFcまたはFcと共にインキュベーションとELISAを利用してCTLDCTLD相互結合を測定した。C.GFPまたはclec14a-GFPでトランスフェクションされたCOS-7細胞の溶解液をclec14a-CTLDIgG(クローン1)の濃度を増加させながら予備インキュベーションさせたhCTLDFcでインキュベーションさせた。三つの独立的な実験中一つから測定した平均値±SDの3重測定値である。

【図9】血管内皮細胞の表面でclec14aの下向き調節に対するclec14a-CTLDIgGの効果を示した図面である。A.clec14a-CTLDIgG(クローン1)の存在(点線)または不在(実線)下に固定及び固定しなかったHUVECsをインキュベーションして、フローサイトメトリーで分析した。B.指定時間clec14a-CTLDIgG(白色)またはFc(黒色)と共にインキュベーションされたH

10

20

30

40

50

U V E C s の表面の c l e c 1 4 a を細胞 E L I S A 方法で調べた。三つの独立的な実験中一つから測定した平均値 ± S D の 3 重測定値である。

【図 10】 c l e c 1 4 a C T L D の部分切片に対する c l e c 1 4 a - C T L D I g G s の特異性を示した図面である。A . F c 及び c l e c 1 4 a C T L D の部分切片の融合タンパク質。B . F c 及び c l e c 1 4 a C T L D の部分切片の融合タンパク質、w t C T L D - F c 及び F c に対するクローン 1 (上側グラフ) 及びクローン 2 (下側グラフ) に対する c l e c 1 4 a - C T L D I g G s の特異性を各々示したグラフである。

【図 11】チューブ形成に対する h C T L D - F c の抑制効果を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

10

【0014】

一観点において、本発明は、c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー 14、メンバー A) に特異的に結合する抗体に関する。

好ましくは、本発明の抗体は、c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー 14、メンバー A) の C T L D (C - タイプレクチン様ドメイン) に特異的に結合する抗体であってもよい。

【0015】

本発明で用いられた用語「抗体」とは、抗原を特異的に認識して特定抗原に免疫学的に反応する免疫グロブリンと分子を含むタンパク質分子を意味し、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、全抗体及び抗体切片を含む。また、キメラ抗体(例えば、ヒト化されたネズミ抗体)、2 価または 2 重特異性分子 (bispecific molecules) (例えば、2 重特異性抗体)、ダイアボディ (diabodies)、トリアボディ (triabodies) 及びテトラボディ (tetrabodies) は、本発明に用いられる抗体の範囲に属する。

20

【0016】

全抗体は、軽鎖と重鎖との間に二硫化結合 (disulfide bond) に結合した二つの全体の長さの重鎖から構成されている。哺乳類では、I g A、I g D、I g E、I g M、及び I g G で知らされた五つの抗体亜型があって、I g G 1、I g G 2、I g G 3 及び I g G 4 の四つの亜型にさらに分類される。

【0017】

用語「抗体切片」とは、少なくとも抗原 - 結合性能を維持する切片を示して、F a b、F (a b ')、F (a b ')₂、及び F v を含んでもよい。F a b は、抗原結合部位を持つ、重鎖及び軽鎖の各々の可変部位、軽鎖の不変ドメイン、及び重鎖の第 1 不変ドメイン (C H 1) で構成されている。F a b ' は、重鎖の C H 1 ドメインの C - 末端に少なくとも一つのシステイン残基を追加で含む点で、F a b とは異なる。F (a b ')₂ は、ヒンジ部位 (hinge region) のシステイン残基の間の二硫化結合を持つ二つの F a b ' 分子で構成される。重鎖及び軽鎖各々の可変部位で構成された F v (可変切片) は、親免疫グロブリンの本来の特異性を含む最も小さい抗体切片である。二硫化 - 安定化された F v (Disulfide-stabilized Fv、d s F v) は、二硫化結合を介して軽鎖の可変部位に重鎖の可変部位を結合させることによって形成される。単鎖 F v (s c F v) は、重鎖と軽鎖の各々の可変部位でペプチドリンカーによって共有結合的に連結された F v である。プロテアーゼ (例えば、F a b または F (a b ')₂ を提供するパパイインまたはペプシンで全抗体をプロテアーゼ処理して、これらの抗体切片を得ることができ、好ましくは遺伝子組換え技術によって構築することができる。

30

40

【0018】

一般に、抗体スクリーニングは、ターゲットタンパク質の全体細胞外部位を利用して実施するので、抗体の分離に問題が生じる。本発明では、抗体スクリーニングのターゲットタンパク質の機能性ドメインを用いてより迅速に抗体を生成するようにする。本発明の一実施例で、c l e c 1 4 a C T L D が血管新生に重要な役割を果たすことを確認して、抗体スクリーニングに用いた。抗体スクリーニングの工程を図 3 A に図式的に示した。

【0019】

50

ここに用いられた用語「モノクローナル抗体 (monoclonal antibody)」とは、実質的に同じ集団の抗体から取得して、単一エピトープに対する結合特異性及び親和性を示す、均一な分子組成を持つ抗体分子を意味する。

【0020】

一般に、免疫グロブリンは、一つの重鎖及び二つの軽鎖で構成された基本構造単位を持つ。各重鎖は、一つの可変部位(「部位 (region)」として知られる)及び三つの不変ドメインで構成されているのに対して、各軽鎖は、一つの可変部位及び一つの不変ドメインで構成されている。重鎖及び軽鎖における各々の可変部位は、三つの相補性-決定部位 (complementarity-determining regions、以後、「CDRs」と称する)及び四つのフレームワーク部位を含む。CDRsは、抗体のエピトープに結合するために機能する。各鎖上のCDRsはN末端から始めてCDR1、CDR2及びCDR3の順に配列される。これらは位置した鎖によって区別される。

10

【0021】

ここに用いられた用語「ヒト抗体 (human antibody)」とは、CDRs、フレームワーク部位などを含み、全体的にヒト免疫グロブリンのすべての成分のアミノ酸配列で構成された分子である。ヒト疾患の治療法で、ヒト抗体は少なくとも三つの潜在的な長所を有している。第一に、ヒト抗体は、ヒト免疫体系とより好ましく相互作用してより効果的にターゲット細胞を破壊するが、例えば、補体依存性細胞毒性反応 (complement-dependent cytotoxicity、CDC) または抗体依存性細胞-媒介細胞毒性反応 (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity、ADCC) がある。また他のメリットは、ヒト免疫体系がヒト抗体を外部分子として認識しないことである。さらにヒト抗体の半減期は、より少量または少ない回数で投与される時でさえ、ヒト循環系で自然に発生する抗体と似ている。従って、本発明に係る抗体は、好ましくはヒトモノクローナル抗体であって、clec14a、好ましくはclec14a-媒介血管新生を効果的に抑制するヒト内皮細胞上に発現したclec14a-CTLDに対する強力な親和力を持つと共に、全重鎖及び軽鎖はヒトから由来するので、低い免疫原性を持つため、血管新生関連疾患または癌の治療に有用に用いられる。

20

【0022】

ここに用いられた用語「clec14a (C-タイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA)」とは、C-タイプレクチン/C-タイプレクチン-様ドメイン (CTL/CTLD) 上科 (superfamily) のメンバーを意味する。clec14aは、一連の上皮細胞成長因子様ドメインであるC-タイプレクチン-様ドメイン (CTLD) 及びスシ-様ドメインを構成する細胞外ドメインであるタイプI膜貫通タンパク質である。clec14aに対する情報は、NCBI GenBankのような公認データベースから得られる。例えば、ヒトclec14aは、Gene ID No 161198を持つことができるが、これに限定されるのではない。clec14aは、細胞間融合及び血管新生に関連すると知られているが、その具体的なメカニズム及び血管新生の実質的なドメインはまだ確認されていない。本発明者等は、clec14aのアミノ酸配列上で31番目のアミノ酸から172番目のアミノ酸を含むドメインが血管新生に重要な役割を行うことを初めて発見した。

30

40

【0023】

ここに用いられた用語「clec14a (C-タイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA) のC-タイプレクチン様ドメイン (C-type lectin-like domain、CTLD)」とは、「clec14a-CTLD」または「clec14a CTLD」とも記されて、いずれも同じ意味である。

【0024】

他の観点において、本発明は、血管新生の抑制に有用なエピトープとしてのclec14a (C-タイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA) -CTLD (C-タイプレクチン様ドメイン) の単離ポリペプチドに関するものである。好ましくは、clec14aはヒト、チンパンジーまたはマウスから由来してもよい。

50

【0025】

ここに用いられた用語「エピトープ」とは、抗原特異性を決める部位で、抗原決定基または抗原決定部位も同じ意味で用いられる。本発明の目的の達成のために、エピトープは、c l e c 1 4 aのアミノ酸配列上で31番目のアミノ酸から172番目のアミノ酸を含むアミノ酸配列を持つCTL Dを示すが、これは血管新生の抑制に有用であるかCTL Dを持つ同じ機能を有したポリペプチドを示す。従って、CTL Dの追加部位を含んでもよい。CTL Dと同じ役割を果たしさえすれば、すべてのポリペプチド、例えばアミノ酸配列と80%、85%、90%、95%、98%または99%以上の相同性を持つ場合エピトープとして用いることができる。ヒト、マウス及びチンパンジーCTL Dsの31番目のアミノ酸から172番目のアミノ酸のアミノ酸配列を表1に示して、各々SEQ ID NOS: 9、10及び133で表した。本発明者等は、SEQ ID NOS: 9、10及び133のアミノ酸配列が血管新生を抑制する抗体を産生するに当たり用いられることができるエピトープとして作用できることを初めて確認した。

10

【0026】

また、本発明の一実施例で、CTL DのN-末端またはC-末端部位は、血管新生を抑制する抗体を生成するに当たり用いられることができるエピトープとして作用できることを示唆している(図10B)。好ましくは、CTL DのN-末端部位はCTL D内の1番目のアミノ酸から42番目のアミノ酸までのアミノ酸切片またはCTL D内の1番目のアミノ酸から62番目のアミノ酸までのアミノ酸切片を含む部位でありうる。好ましくは、CTL DのC-末端部位は、CTL D内の82番目のアミノ酸から142番目のアミノ酸までのアミノ酸切片、CTL D内の62番目のアミノ酸から142番目のアミノ酸までのアミノ酸切片またはCTL D内の122番目のアミノ酸から142番目のアミノ酸までのアミノ酸切片を含む部位でありうる。

20

【0027】

抗体は、c l e c 1 4 a - CTL Dまたは血管新生を抑制するために有効切片に特異的に結合することができ、本発明者等は、c l e c 1 4 a - CTL Dが、CTL D - CTL D相互結合依存的な方式で血管新生を調節する唯一のドメインであることを示唆する。第一に、c l e c 1 4 a - CTL D、特に31 - 172のアミノ酸は、アクチン細胞骨格再配列を調節することによって、c l e c 1 4 a - 媒介細胞移動で重要な役割を果たす。第二に、c l e c 1 4 a - CTL D I g Gが、c l e c 1 4 a - 媒介細胞間接触を特異的に抑制するとの結果と一致する。第三に、c l e c 1 4 a - CTL D I g Gによるc l e c 1 4 a 媒介は、H U V E C 移動及びチューブ形成を特異的に抑制する。最後に、c l e c 1 4 a CTL D - CTL D複合体の形成は、c l e c 1 4 a - CTL D I g Gによって特異的に抑制された。

30

【0028】

高親和性c l e c 1 4 a - CTL D I g G sは、血管内皮細胞生存能力及び活性に影響を及ぼさず、血管内皮細胞の移動及びチューブ形成を特異的に抑制した。c l e c 1 4 aは、血管内皮細胞上に排他的に発現して、腫瘍血管内皮細胞特異的なマーカーでありうる。c l e c 1 4 a - CTL D抗体は、腫瘍血管内皮上に排他的に発現するc l e c 1 4 aを標的にして正常血管内皮では少ない副作用を招いて、c l e c 1 4 a - 媒介腫瘍進行時血管新生を抑制すると考えられる。

40

【0029】

また、ベパシズマブ及びセツキシマブは、溶解性血管新生誘発成長因子(soluble angiogenic growth factors)及びその受容体の相互作用を抑制することによって、血管新生を抑制する治療用抗体である。しかし、前記薬剤の長期利用は、腫瘍細胞 - 分泌血管新生誘発前駆成長因子の過剰によって腫瘍に対する耐性を示す。これにより長期治療を要する患者に溶解性成長因子に対する抗体を使用することは、最大の課題として残っている。c l e c 1 4 aは、内皮細胞間接触のために決定的なタイプI膜貫通タンパク質である。ここで開発されたc l e c 1 4 a - CTL D I g Gは、濃度依存的な方式でCTL D - CTL D相互作用を特異的に抑制して、I g Gによって架橋結合されたc l e c 1 4 aは、

50

内皮細胞膜上に c l e c 1 4 a 下向き調節を誘導した。架橋結合 2 時間、c l e c 1 4 a - C T L D I g G は、H U V E C s 内部の点類似パターンを見せるが、これは抗体 - 誘導内包作用 (antibody-induced endocytosis) を示す。それで、c l e c 1 4 a - C T L D I g G は、血管新生を抑制するに当たり 2 段階に亘る作用機序を持つ。

【 0 0 3 0 】

従って、前記抗体は、好ましくは細胞移動、チューブ形成または細胞間接触を抑制することによって、好ましくは c l e c 1 4 a - 媒介細胞移動、チューブ形成または血管内皮細胞の表面上で c l e c 1 4 a の下向き調節を誘導することによって、血管新生を抑制することができる。

【 0 0 3 1 】

血管内皮細胞の生存能力及び活性に対する影響がなく (図 6 A 及び 6 B)、本発明の抗体は、治療用抗体として用いられる。

【 0 0 3 2 】

本発明の一実施例で、本発明の c l e c 1 4 a - C T L D I g G は、血管内皮細胞移動 (図 5 A 及び 5 B) 及びチューブ形成 (図 5 C 及び 5 D) を抑制して、c l e c 1 4 a - 媒介細胞間接触 (図 7 A 及び 7 B) を特異的に抑制するを確認されて、これは前記抗体が腫瘍血管新生時血管内皮細胞間接触を抑制できることを示す。また、c l e c 1 4 a C T L D - C T L D 相互作用は、c l e c 1 4 a - C T L D I g G によって抑制された (図 8 A、8 B 及び 8 C)。さらに本発明の抗体は、H U V E C の表面上で c l e c 1 4 a の下向き調節を誘導することが明らかになった (図 9 A 及び 9 B)。これらの結果は、本発明の抗体が c l e c 1 4 a - 媒介血管新生を効果的に抑制して、血管新生関連疾患または癌を治療するに当たり適用されることができると示唆している。

【 0 0 3 3 】

好ましくは、本願発明の抗体は、配列番号 1 4 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 1 6 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 1 8 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 4 4 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 4 6 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含み、より好ましくは配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含むが、これに限定されるのではない。

【 0 0 3 4 】

前記抗体をコードする核酸は、前記核酸は配列番号 7 0 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 7 2 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 7 4 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 7 7 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 7 9 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 8 1 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。

【 0 0 3 5 】

一実施例で、本発明のヒトモノクローナル抗体は、配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位で構成され、これをクローン 1 と定める。前記抗体をコードする核酸は、重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 3 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 3 4 の核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。

【 0 0 3 6 】

好ましい一実施例で、本発明の抗体は、配列番号 2 1 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 2 3 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 5 1 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含み、より好ましくは配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 0 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含むが、これに限定されるのではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

前記抗体をコードする核酸は、配列番号 8 4 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 8 6 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 8 8 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 9 1 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 9 3 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 9 5 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。本発明の一実施例で、ヒトモノクローナル抗体は、配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 0 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含む抗体；配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含む抗体；及び配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位で構成されて、これをクローン 2 と定める。前記抗体をコードする核酸は、重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 5 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 3 6 の核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。

10

【 0 0 3 8 】

他の好ましい実施例で、本発明の抗体は、配列番号 2 8 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 3 0 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 3 2 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 5 6 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 5 8 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 6 0 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含み、より好ましくは配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含むが、これに限定されるのではない。前記抗体をコードする核酸は、配列番号 9 8 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 0 0 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 0 2 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 1 0 5 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 0 7 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 0 9 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。本発明の一実施例で、ヒトモノクローナル抗体は、配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位で構成されて、これをクローン 3 と定める。前記抗体をコードする核酸は、重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 7 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 3 8 の核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。

20

30

【 0 0 3 9 】

さらに他の一実施例で、本発明の抗体は、配列番号 3 5 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 1、配列番号 3 7 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 2、及び配列番号 3 9 のアミノ酸配列で定義される重鎖 C D R 3 を含む重鎖可変部位、及び配列番号 6 3 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 1、配列番号 6 5 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 2、及び配列番号 6 7 のアミノ酸配列で定義される軽鎖 C D R 3 を含む軽鎖可変部位を含み、より好ましくは配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位を含むが、これに限定されるのではない。前記抗体をコードする核酸は、配列番号 1 1 2 の重鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 1 4 の重鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 1 6 の重鎖 C D R 3 核酸配列を含む重鎖核酸配列、及び配列番号 1 1 9 の軽鎖 C D R 1 核酸配列、配列番号 1 2 1 の軽鎖 C D R 2 核酸配列及び配列番号 1 2 3 の軽鎖 C D R 3 核酸配列を含む軽鎖核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。本発明の一実施例で、ヒトモノクローナル抗体は、配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を持つ重鎖可変部位及び配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を持つ軽鎖可変部位で構成されて、これをクローン 4 と定める。前記抗体をコードする核酸は、重鎖可変部位に対する配列番号 1 3 9 の核酸配列及び軽鎖可変部位に対する配列番号 1 4 0 の核酸配列を含むが、これに限定されるのではない。

40

【 0 0 4 0 】

前記の通り、c l e c 1 4 a - C T L D を特異的に認識する限り、異種配列で構成された抗体が、血管新生を抑制することが明らかになった。従って、血管新生関連疾患または

50

癌の予防または治療に効果的に作用することを確認した。本発明の抗体が一定のドメインを含む場合、I g G、I g A、I g D、I g E、I g Mまたはこれらの組み合わせまたはハイブリッドから由来してもよい。

【0041】

ここに用いられた「組み合わせ」とは、同じ起源の単鎖免疫グロブリンとFc切片をコードするポリペプチドが異なる起源の単鎖ポリペプチドに結合してダイマーまたはマルチマーを生成することを意味する。これはダイマーまたはマルチマーは、I g G、I g A、I g D、I g E及びI g Mの不変ドメインで構成された群から選択された二つまたはそれ以上の不変ドメインから形成されることができるとを示す。

【0042】

ここに用いられた用語「ハイブリッド」とは、異なる起源の二つまたはそれ以上の重鎖不変ドメインをコードする配列が単鎖免疫グロブリンと重鎖不変ドメイン内に存在することを意味する。例えば、ドメインハイブリッドは、CH1、CH2、CH3 and CH4 of I g G、I g A、I g D、I g E及びI g Mで構成された群から選択された一つ～四つのドメインで構成されてもよい。また、ハイブリッドの組み合わせは、I g G亜型であるI g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4の重鎖不変ドメインから生成されてもよい。ハイブリッドの組み合わせは、前記定義したとおりである。

【0043】

また、本発明の抗体は、軽鎖不変部位をさらに含んでもよく、ラムダ()またはカッパ()軽鎖から由来してもよい。

【0044】

好ましくは、前記抗体は、ヒトc l e c 1 4 a - C T L Dだけでなくネズミ科のc l e c 1 4 a - C T L Dに特異的に結合して、血管新生を抑制できるヒトモノクローナル抗体であってもよい。ヒト及びマウスのいずれにおいても機能するヒト抗体の能力、言い換えると、交差反応性(cross-reactivity)は、ヒト抗体がマウス内で臨床前研究を可能にするメリットを提供する。

【0045】

また他の観点において、本発明は、前記核酸を含むベクター、及び前記ベクターまたは前記核酸を含む宿主細胞に関する。

【0046】

また他の観点において、本発明は、c l e c 1 4 a (C - タイプレクチンドメインファミリー14、メンバーA)、好ましくは、ヒトc l e c 1 4 aのC T L D (C - タイプレクチン様ドメイン)またはヒト及びネズミ科c l e c 1 4 a - C T L D)に特異的に結合する抗体を製造する方法に関する。好ましくは、前記抗体は、ヒトモノクローナル抗体であってもよい。前記抗体を製造する方法は、機能性ドメインを用いてバイオパンニングという工程を含んでもよい。また、本発明は、前記抗体を産生するために核酸が発現するように宿主細胞を培養することを含む、前記抗体を製造する方法に関する。

【0047】

本発明によるモノクローナル抗体は、公示の技術を利用して容易に製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、免疫化された動物のBリンパ球(Koeher and Milstein, 1976, Nature, 256:495)で作製したハイブリドーマ、または、ファージディスプレイ技術によって製造することができるが、これに限定されるのではない。

【0048】

好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、ファージディスプレイ技術を用いて製造することができる。本発明による方法は、例えば、Barbas et al. (METHOD S: A Companion to Methods in Enzymology 2: 119, 1991 and J. Virol. 2001 Jul; 75(14): 6692-9)、及びWinter et al. (Ann. Rev. Immunol. 12:433, 1994)を参考にして、工程別実施されることができる。抗体ライブラリーを作製するに当たり有用なファージは、繊維状ファージであってもよく、例えば、fd、M13、f1、If1、Ike、Zj/Z、Ff、Xf、Pf1及びPf3があるが、これに限定されるので

10

20

30

40

50

はない。繊維状ファージの表面上に外来遺伝子 (exogenous genes) を発現するために使用できるベクターの例としては、f U S E 5、f A F F 1、f d C A T 1 及び f d t e t D O G のようなファージベクター、または p H E N 1、p C o m b 3、p C o m b 8 及び p S E X のようなファージミドベクターを含むが、これに限定されるのではない。増幅用組換えファージの成功的な再感染のために必要なコートタンパク質の野生型バージョンを供給するのにヘルパーファージを用いて、M 1 3 K 0 7 及び V S C M 1 3 が挙げられるが、これに限定されるのではない。

【 0 0 4 9 】

本発明に係るハイブリドーマ - 由来モノクローナル抗体またはファージディスプレイクローンをコードするポリヌクレオチドは、一般的な工程によって容易に単離及びシーケンシングすることができる。例えば、ハイブリドーマまたはファージテンプレート DNA の重鎖及び軽鎖コード部位を特異的に増幅させるために設計されたオリゴヌクレオチドプライマーが用いられる。一旦単離されると、ポリヌクレオチドは発現ベクター内に挿入できて、以後宿主細胞内に導入されることができる。その結果、製造された宿主細胞 (即ち、形質転換体) は、目的とするモノクローナル抗体を生成することができる。従って、本発明の抗体の製造方法は、前記抗体のために、ポリヌクレオチドコードを行う発現ベクターを増幅させる工程を含んでもよい。好ましくは組換え抗体は、ヒト s c F v ライブラリーから F c バインダーを先除去 (pre-clearing) して、機能性ドメインでバイオパニング技術を行うことによって、特定クローンを選択して製造することができる。

10

【 0 0 5 0 】

本発明は、前記エピトープまたは前記抗体用ポリヌクレオチドコード、前記ポリヌクレオチドを伝達する発現ベクター、及び前記ベクター内に固定させる形質転換体に関する。

20

【 0 0 5 1 】

抗体は、前記で記述したとおりである。

本発明によって前記エピトープまたは前記抗体を伝達する発現ベクターは、哺乳細胞 (例えば、ヒト、猿、ウサギ、ネズミ、ハムスター、マウスなど)、植物細胞、イースト、昆虫細胞及びバクテリア細胞 (例えば、E . c o l i) のような真核または原核細胞内にポリヌクレオチドの複製及び/または発現するようにするベクターを含むが、これに限定されるのではない。好ましくは、ベクターは、関心遺伝子の発現を誘導するようにするために、ポリヌクレオチドで使用可能に連結された適切なプロモーター、及び少なくとも一つ以上の選択マーカーを有してもよい。例えば、前記ポリヌクレオチドは、ファージ、プラスミド、コスミド、ミニ - 染色体 (mini-chromosome)、ウイルスまたはレトロウイルスベクター内に導入されることができる。

30

【 0 0 5 2 】

抗体に対するポリヌクレオチドコードを行う発現ベクターは、前記抗体の重鎖及び前記抗体の軽鎖の各々に対するポリヌクレオチドコードを行う発現ベクター、または前記抗体の重鎖及び前記抗体の軽鎖に対するポリヌクレオチドコードを伝達する発現ベクターの組み合わせであってもよい。

【 0 0 5 3 】

本発明に係る発現ベクターの導入で生成された形質転換体の例としては、大腸菌、ストレプトマイセス (streptomyces)、ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) のようなバクテリア細胞; イースト; ピキア酵母 (Pichia pastoris) のような菌類; ショウジョウバエ (drosophila)、スポドプテラ S f 9 (spodoptera Sf9) のような昆虫細胞; C H O (中国ハムスター卵巣細胞株、Chinese hamster ovary cells)、S P 2 / 0 (マウス骨髄腫、mouse myeloma)、ヒトリンパ芽球性 (human lymphoblastoid)、C O S、N S O (マウス骨髄腫)、2 9 3 T、悪性黒色腫細胞 (melanoma cells)、H T - 1 0 8 0、B H K (子ハムスター腎臓細胞、baby hamster kidney cells)、H E K (ヒト胚芽腎臓細胞、human embryonic kidney cells)、及び P E R C . 6 (ヒト網膜細胞、human retina cell) のような動物細胞; 及び植物細胞を含むが、これに限定されるのではない。

40

【 0 0 5 4 】

50

ここに用いられた用語「導入」とは、細胞内に前記エピトープまたは前記抗体をコードするポリヌクレオチドを伝達することを意味する。カルシウムホスフェート - DNA 共沈法 (calcium phosphate-DNA co-precipitation)、DEAE - デキストリン - 媒介トランスフェクション (DEAE-dextran-mediated transfection)、ポリブレン - 媒介トランスフェクション (polybrene-mediated transfection)、電気穿孔法 (electroporation)、微細注入法 (microinjection)、リポソーム融合法 (liposome fusion)、リポフェクタミントランスフェクション (Lipofectamine transfection) 及び原形質融合法 (protoplast fusion) を含む本分野での様々な公示技術を用いて導入を実施することができる。形質導入 (transduction) は、外来 DNA が感染を根拠にウイルスベクターを介して他の細胞に伝達される工程を示す。また、宿主細胞内へのベクターの伝達は、遺伝子衝撃 (gene bombardment) によって達成されることができる。本発明で、導入は形質転換 (transformation) に代わって使用できる。

10

【0055】

他の観点において、本発明は、前記抗体を含む血管新生抑制用組成物に関する。

【0056】

本発明による抗体が、血管新生を効果的に抑制できるので、前記抗体を有効成分として含む組成物も血管新生を抑制するのに有用で、追加で血管新生関連疾患を予防または治療するのに有用である。

【0057】

ここに用いられた用語「血管新生の抑制 (suppression of angiogenesis)」とは、以前に存在した血管から新しい血管の形成または成長を抑制することを意味する。本発明の目的のために、血管新生の抑制は、細胞移動、細胞間接触を抑制、より好ましくは c l e c 1 4 a - 媒介細胞移動、c l e c 1 4 a - 媒介細胞間接触、H U V E C 移動、または、チューブ形成、c l e c 1 4 a C L T D - C L T D 複合体形成を抑制することによって達成される。

20

【0058】

ここに用いられた用語「血管新生関連疾患 (angiogenesis-related disease)」とは、血管新生の発生または進行に関連した疾患を意味する。前記抗体で治療できるならば、その疾患は限定されることなく血管新生関連疾患の範囲に含まれる。血管新生関連疾患の例としては、癌、転移 (metastasis)、糖尿網膜病症 (diabetic retinopathy)、未熟児網膜病症 (retinopathy of prematurity)、角膜移植拒否 (corneal graft rejection)、黄斑変成 (macular degeneration)、血管新生成緑内障 (neovascular glaucoma)、全身紅色症 (erythrosis)、増殖性網膜症 (proliferative retinopathy)、乾癬 (psoriasis)、血友病性股関節炎 (hemophilic arthritis)、動脈硬化性プラーク (atherosclerotic plaques) の毛細血管形成、ケロイド (keloid)、創傷肉芽 (wound granulation)、血管癒着 (vascular adhesion)、リウマチ関節炎 (rheumatoid arthritis)、退行性関節炎 (osteoarthritis)、自己免疫疾患 (autoimmune diseases)、クローン病 (Crohn's disease)、再狭窄 (restenosis)、粥状動脈硬化症 (atherosclerosis)、腸狭窄 (intestinal adhesions)、猫引っかき病 (cat scratch disease)、潰瘍 (ulcer)、肝硬変症 (liver cirrhosis)、腎臓炎 (nephritis)、糖尿病性腎臓疾患 (diabetic nephropathy)、真性糖尿病 (diabetes mellitus)、炎症疾患 (inflammatory diseases) 及び神経変成疾患 (neurodegenerative diseases) を含むが、これに限定されるのではない。また、前記癌は、食道癌 (esophageal cancer)、胃癌 (stomach cancer)、大腸癌 (large intestine cancer)、直腸癌 (rectal cancer)、口腔癌 (oral cancer)、咽頭癌 (pharynx cancer)、喉頭癌 (larynx cancer)、肺癌 (lung cancer)、結腸癌 (colon cancer)、乳癌 (breast cancer)、子宮頸部癌 (uterine cervical cancer)、子宮内膜癌 (endometrial cancer)、卵巣癌 (ovarian cancer)、前立腺癌 (prostate cancer)、睾丸癌 (testis cancer)、膀胱癌 (bladder cancer)、腎臓癌 (renal cancer)、肝臓癌 (liver cancer)、すい臓癌 (pancreatic cancer)、骨癌 (bone cancer)、結合組織癌 (connective tissue cancer)、皮膚癌 (skin cancer)、脳腫瘍 (brain cancer)、甲状腺

30

40

50

癌 (thyroid cancer)、白血病 (leukemia)、ホジキンリンパ腫瘍 (Hodgkin's lymphoma)、リンパ腫 (lymphoma) 及び多発性骨髄血液癌 (multiple myeloid blood cancer) で構成された群から選択されるが、これに限定されるのではない。

【0059】

ここに用いられた用語「予防 (prevention or prophylaxis)」とは、本発明の抗体または組成物を投与して、関心疾患の開始を抑制または遅延するようにするいずれの措置を示す。用語「治療 (treatment or therapy)」とは、本発明の抗体または組成物を投与して、関心疾患の症状が改善されたり好転するようにするいずれの措置を示す。

【0060】

本発明の抗体を含む組成物は、好ましくは薬剤学的組成物で、本分野で典型的に用いられる適切なビークル、賦形剤または、希釈剤をさらに含んでもよい。

10

【0061】

薬剤学的に許容可能なビークルを含む薬剤学的組成物は、錠剤、丸剤、粉末、顆粒剤、カプセル剤、懸濁液、内服液、エマルジョン、シロップ、滅菌水溶液、非水溶液、凍結乾燥物及び座薬のような多様な経口または非経口服用形態であってもよい。本発明の薬剤学的組成物は、フィラー、増粘剤、バインダー、湿潤剤、精製分解物質 (disintegrant)、界面活性剤などのような希釈剤または賦形剤で組み合わせて製剤化されることができる。経口投与のための個相調剤は、錠剤、丸剤、粉末、顆粒剤、カプセル剤などのような形態であってもよい。これらの個相製剤と関連して、本発明の化合物は、澱粉、カルシウムカーボネート、スクロース、ラクトース、またはゼラチンのような一つ以上の賦形剤を組み合わせて製剤化されることができる。簡単な賦形剤、マグネシウムステアレート、タルクなどのような潤滑剤を追加で用いても良い。経口投与のための液体助剤は、懸濁液、内服液、エマルジョン、シロップなどであってもよい。水または液体パラフィンのような簡単な希釈剤、湿潤剤、甘味剤、芳香族、防腐剤などのような多様な賦形剤を液体助剤内に含ませることができる。また、本発明の薬剤学的組成物は、滅菌水溶液、非水溶性溶媒、懸濁液、エマルジョン、凍結乾燥物、座薬などのような非経口服用形態であってもよい。注入可能なプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物性油及びエチルオレエートのようなエステルが、非水溶性溶媒及び懸濁液に適合することができる。座薬の基本物質は、ウィテップゾール、マクロゴール、ツイン61、カカオバター、ラウリンバター及びグリセロゼラチンを含む。

20

30

【0062】

本発明の組成物は薬剤学的に有効な量で投与される。

ここに用いられた用語「薬剤学的に有効な量 (pharmaceutically effective amount)」とは、すべての医学的治療に適用可能な妥当な危険度と受益度との割合 (benefit/risk ratio) で、十分な疾患治療用薬剤学的組成物の量を示す。有効量は、治療しなければならない疾患の重症度、患者の年齢及び性別、疾患の種類、薬剤の活性度、薬剤に対する敏感度、投与時間、投与経路、分泌速度、治療期間、薬剤の共投与及び本分野で知らされた他のパラメーターを含んだ多様な要因によって変わる。本発明の組成物は、単独でまたは他の治療法と組み合わせて投与されてもよい。このような場合に、従来の治療法と共に順にまたは同時に投与されてもよい。また、前記組成物は、1回量または、多数回容量で分けて投与されてもよい。これらの要因を完全に考慮すると、副作用なしに最大効果を得るのに十分な最小量を投与することが重要で、この服用量は、分野の専門家によって容易に決定される。本発明の薬剤学的組成物の服用量は、特に限定されないが、患者の健康状態及び体重、疾患の重症度、薬剤の種類、投与経路及び投与時間を含んだ多様な要因により変わる。組成物は一日に1回量または、多数回容量でラット、ネズミ、家畜、ヒトなどを含む哺乳類内に典型的に許された経路、例えば、経口に、直腸に、静脈に (intravenously)、皮下に (subcutaneously)、子宮内に (intrauterinely) または脳血管内に (intracerebrovascularly) 投与されてもよい。

40

【0063】

他の観点において、本発明は、前記抗体または前記薬剤学的組成物を必要とする個体に

50

投与する工程を含む、血管新生を抑制する方法に関する。

【0064】

前記抗体、前記組成物及び血管新生抑制は、前記に記述した通りである。

詳細に説明すると、本発明の抑制方法は、血管新生の抑制を必要とする個体に薬剤学的に有効な量の薬剤学的組成物を投与する工程を含む。

【0065】

前記個体は、犬、牛、馬、ウサギ、マウス、ラット、鶏及びヒトのような哺乳類であってもよいが、これに限定されるのではない。薬剤学的組成物は、非経口的に (parenterally)、皮下に、腹腔内に (intraperitoneally)、肺内に (intrapulmonarily) または、鼻内に (intranasally)、必要ならば、局所治療のために病変内 (intralesional) 投与を含む適切な方法によって投与されてもよい。本発明の薬剤学的組成物の好ましい服用量は、個体の健康状態及び体重、疾患の重症度、薬剤の種類、投与経路及び投与時間を含んだ多様な要因により変わり、本分野の当業者によって容易に決定される。

10

【0066】

他の観点において、本発明は、前記抗体を含む、癌予防または治療用薬剤学的組成物に関する。

用語「抗体」、「予防」及び「治療」は、前記に言及した通りである。

本発明のペプチドで治療可能ならば、癌は制限されない。c1e c14 a - 媒介腫瘍進行が発生する癌が好ましい。詳細には、本発明の抗体は、血管新生を抑制することによって、癌の発生または進行を予防することができる。前記癌の例では、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、口腔癌、咽頭癌、喉頭癌、肺癌、結腸癌、乳癌、子宮頸部癌、子宮内膜癌、卵巣癌、前立腺癌、睾丸癌、膀胱癌、腎臓癌、肝臓癌、すい臓癌、骨癌、結合組織癌、皮膚癌、脳腫瘍、甲状腺癌、白血病、ホジキンリンパ腫瘍、リンパ腫及び多発性骨髄血液癌を含むが、これに限定されるのではない。

20

【0067】

また、本発明の抗体は、他の抗体または生物学的活性剤または多様な目的のための物質と組み合わせて用いることができる。

【0068】

本発明の一実施例で、本発明の抗体は、血管新生を抑制して癌の発生または進行を遅延させたり予防することが明らかになった。そのために、本発明の抗体は、癌の予防または治療に効果的に適用可能である。

30

【0069】

他の観点において、本発明は、抗体または薬剤学的組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法に関する。

【0070】

抗体、組成物及び癌は、前記に言及した通りである。

治療法で、前記薬剤学的組成物は、癌の疑いのある個体に薬剤学的に有効な量で投与されてもよい。前記個体は、犬、牛、馬、ウサギ、マウス、ラット、鶏及びヒトのような哺乳類であってもよいが、これに限定されるのではない。薬剤学的組成物は、非経口的に、皮下に、腹腔内に、肺内にまたは、鼻内に、必要ならば、局所治療のために病変内投与を含む適切な方法によって投与されてもよい。本発明の薬剤学的組成物の好ましい服用量は、個体の健康状態及び体重、疾患の重症度、薬剤の種類、投与経路及び投与時間を含んだ多様な要因により変わり、本分野の当業者によって容易に決定される。

40

【0071】

他の観点において、本発明は、前記抗体を含む癌診断用組成物に関する。

前記抗体及び癌は、前記に記述した通りである。

c1e c14 a が特異的に発現した癌が好ましい。

【0072】

ここに用いられた用語「診断 (diagnosis)」とは、病理的状态の存在または性質の評価を示す。本発明の目的と関連して診断は、癌の発生を決めるものである。

50

【0073】

他の観点において、本発明は、前記診断用組成物を含む癌診断用キットに関する。

【0074】

本発明のキットは、癌、c l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a C T L Dのマーカ-を検出することができる。本発明の検出キットは、分析法に適合した一つまたはそれ以上の組成物、溶液、または、機器だけでなく、前記マーカ-を選択的に認識する抗体を含んでもよい。

【0075】

好ましくは、診断キットは、マトリックス、適切なバッファ-溶液、発色酵素 (coloring enzyme) または蛍光物質でラベリングされた2次抗体、抗体の免疫学的検出のための発色基質などを含んでもよい。前記マトリックスに対しては、ニトロセルロ-スメンブレン、ポリビニル樹脂で製造された96ウェルプレート、ポリステレン樹脂で製造された96ウェルプレート、及びスライドガラスが用いられてもよい。発色酵素に対しては、ペルオキシダーゼ及び塩基性ホスファターゼが用いられてもよい。蛍光物質に対しては、F I T C及びR I T Cが用いられてもよく、発色基質溶液に対しては、A B T S (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid))、O P D (o-phenylenediamine)、またはT M B (tetramethyl benzidine) が用いられてもよい。

10

【0076】

他の観点において、本発明は、癌が疑われる個体から分離した生物学的試料内の抗原 - 抗体複合体を介してc l e c 1 4 a、好ましくは、c l e c 1 4 a - C T L Dを検出する工程を含む、癌を診断する方法に関する。

20

抗体、癌、及び診断は、前記に記述した通りである。

より詳細には、生物学的試料からタンパク質を単離することは、公示の方法を用いて達成することができる。

【0077】

ここに用いられた用語「生物学的試料」とは、癌マーカ-c l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a - C T L Dの発現程度での差を表示する試料を含み、例えば組織、細胞、血栓、血清、プラズマ、唾、痰、脳脊髄液 (cerebrospinal fluid) または小便であってもよいが、これに限定されるのではない。

【0078】

検出法に対しては正常対照群と癌の疑いのある患者のc l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a - C T L D発現程度を比較することによって、癌の発生を診断することができる。これは、正常細胞と癌の疑いのある細胞で本発明に係るマーカ-の発現程度を比較するものである。もし癌の疑いのある細胞でマーカ-発現程度が非常に増加すると確認されたとすれば、推測された癌は、癌として診断することができる。

30

【0079】

タンパク質レベルを測定する分析法としては、ウェスタンブロッティング (Western blotting)、E L I S A、放射性免疫測定法 (radioimmunoassay)、放射性免疫拡散法 (radial immunodiffusion)、オクタロニ免疫拡散法 (Ouchterlony immunodiffusion)、ロケット免疫電気泳動法 (rocket immunoelectrophoresis)、免疫組織染色 (immunohistostaining)、免疫沈降反応分析法 (immunoprecipitation assay)、補体固定分析法 (complement fixation assay)、F A C S及びタンパク質チップ分析法 (protein chip assay) を含むが、これに限定されるのではない。分析法に対しては、形成された抗原 - 抗体複合体の量に対して正常コントロールと癌の疑いのある患者を比較して、癌マーカ-遺伝子のタンパク質の発現程度において相当増加したものを評価することによって癌の疑いのある患者を診断する。

40

【0080】

ここに用いられた「抗原 - 抗体複合体 (antigen-antibody complexes)」とは、そこに特異的な抗体に癌マーカ-タンパク質の生成物が結合するものを示す。検出ラベルの信号強度を測定することによって、形成された抗原 - 抗体複合体の量を定量的に決めることが

50

できる。

【0081】

前記検出ラベルは、酵素、蛍光物質、リガンド、発光物質、マイクロ粒子、レドクス分子及び放射線同位元素で構成された群から選択されるが、本発明は前記実例に限定されるのではない。検出ラベルとして使用可能な酵素の例では、 α -グルクロニダーゼ、 β -D-グルコシダーゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、ペルオキシダーゼまたは塩基性ホスファターゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコースオキシダーゼ、ヘキソキナーゼ及びGDPase、RNase、及びルシフェラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、ホスホエノールピルビン酸脱炭酸酵素及び β -ラクタマーゼを含むが、これに限定されるのではない。蛍光物質の例では、フルオレセイン、イソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オクタアルデヒド及びフルオレサミンを含むが、これに限定されるのではない。リガンドの例では、ピオチン誘導体を含むが、これに限定されるのではない。発光物質は、アクリジウムエステル(acridinium esters)、ルシフェリン及びルシフェラーゼを含むが、これに限定されるのではない。マイクロ粒子の例では、金コロイド及び有色ラテックスを含むが、これに限定されるのではない。レドクス分子の例では、フェロセン、光電荷発生体、ピオロゲン、キノン、Tiイオン、Csイオン、ジアミド、1,4-ペンゾキノン、ヒドロキノン、 $K_4W(CN)_8$ 、 $[Os(bpy)_3]^{2+}$ 、 $[Ru(bpy)_3]^{2+}$ 、及び $[MO(CN)_8]^{4-}$ を含むが、これに限定されるのではない。放射性同位元素は、 3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{125}I 、 ^{131}I 及び ^{186}Re を含むが、これに限定されるのではない。

10

20

【0082】

好ましくは、タンパク質発現程度は、ELISAによって測定される。ELISAの例では、固相支持体上に固定化された抗原を認識するラベリングされた抗体を利用する直接ELISA、固相支持体上に固定化された抗原と複合体を形成するキャプチャー抗体を認識するラベリングされた抗体を利用する間接ELISA、固相支持体上に固定化された抗原-抗体複合体の抗原を認識する他のラベリングされた抗体を利用する直接サンドイッチELISA、及び固相支持体上に固定化された抗原-抗体複合体の抗原を認識する他のラベリングされた抗体を反応させて、他のラベリングされた抗体を認識する2次ラベリングされた抗体を使う間接サンドイッチELISAを含む。より好ましくは、タンパク質発現程度は、サンドイッチELISAによって検出されるが、試料が固相支持体上に固定化された抗体と反応して、製造された抗原-抗体複合体は、抗原に特異的なラベリングされた抗体を添加した後、酵素発色(enzymatic color development)するか、抗原-抗体複合体の抗原を認識する抗体に特異的な2次ラベリングされた抗体を添加した後、酵素発色して検出される。癌マーカータンパク質及びこれに対する抗体の複合体形成程度を測定することによって、癌の発生を診断することができる。

30

【0083】

また、タンパク質の発現程度は、好ましくは一つまたはそれ以上の抗体を前記癌マーカーに用いるウェスタンブロッティングによって測定される。総タンパク質は、試料から単離されて、電気泳動下でサイズ別で分離して、ニトロセルロースメンブレン上に移動させた後、抗体と反応させる。遺伝子発現によって生成されるタンパク質の量は、ラベリングされた抗体を用いて生成された抗原-抗体複合体の量を測定することによって決めて、癌の発生を診断する。検出法は、コントロールのマーカー遺伝子と癌が発生する細胞の発現程度を評価する方法で構成されている。mRNAまたはタンパク質程度は、マーカータンパク質の量において絶対的な(例えば、 $\mu g/mL$)または相対的な(例えば、信号の相対的な強度)差で示すことができる。

40

【0084】

また、タンパク質発現程度は、癌マーカーに対する一つまたはそれ以上の抗体を用いる免疫組織染色によって好ましく測定される。正常内皮組織及び癌疑い組織を収集して固定

50

させて、パラフィン包埋ブロックを公示の方法によって準備した。ブロックを小さいセクション（数 μm の厚さ）で切って、公示の方法により選択された一つまたはそれ以上の抗体と反応するガラススライドに付着させた。

【0085】

続いて、未反応の抗体を洗浄して、反応した抗体を前記言及されたラベルで選択された検出ラベルでラベリングして顕微鏡で観察した。

【0086】

癌マーカーに対する一つまたはそれ以上の抗体が配列されて、基質上に予定された位置で高密度に固定されるタンパク質チップを利用して、タンパク質レベルを分析することも好ましい。これと関連して、タンパク質を試料から分離して、タンパク質チップでハイブリダイゼーションして抗原-抗体複合体を形成して、関心タンパク質の存在または発現程度を検査するために解読して癌の発生を診断する。

10

【0087】

他の観点において、本発明は、c1ec14aの発現を抑制する物質を含む血管新生抑制用組成物に関する。

好ましくは前記物質は、c1ec14a CTLDの発現を抑制する物質であってもよい。

【0088】

本発明の一実施例で、細胞移動及びチューブ形成（例えば、糸状仮足形成）を抑制するに当たり重要な役割を果たすことが確認された（図1A、1B、2A及び2B）。このような結果は、c1ec14a、好ましくはc1ec14a CTLDの発現を抑制する物質が血管新生を抑制することを示唆する。

20

【0089】

c1ec14a、好ましくはc1ec14a CTLDの発現を抑制する物質は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNAオリゴヌクレオチド、抗体、アプタマー、単鎖可変部位切片（single chain variable region fragments）、ペプチド、低分子量化合物及び自然抽出物を含むが、これに限定されるのではない。

【0090】

好ましくはc1ec14a、好ましくはc1ec14a CTLDの発現を抑制する物質は、c1ec14a遺伝子、好ましくはc1ec14a CTLD遺伝子の発現を抑制する物質に特異的に結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAオリゴヌクレオチドである。

30

【0091】

ここに用いられた用語「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、特定mRNA配列に対し相補的な核酸配列を含むDNAまたはRNAまたはこれの誘導体を意味して、mRNA内の相補的な配列に結合してmRNAでタンパク質への翻訳を抑制する。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、c1ec14a、好ましくはc1ec14a-CTLD mRNAに相補的なDNAまたはRNA配列であってもよく、c1ec14a、好ましくはc1ec14a-CTLD mRNAに結合することができ、c1ec14a、好ましくはc1ec14a-CTLD mRNAの翻訳、細胞質電位（cytoplasmic translocation）または成熟または全体生物学的機能に対して必須の他の全ての活性を抑制することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、6～100塩基、好ましくは8～60塩基、さらに好ましくは10～40塩基の長さを持つ。

40

【0092】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、効率を向上させるために一つまたはそれ以上の塩基、糖または、バックボーン位置で変形されうる（De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3): 343-55 (1995)）。オリゴヌクレオチドバックボーンは、例えば、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、メチルホスホネート、単鎖アルキル、シクロアルキルまたは、単鎖ヘテロ原子またはヘテロシクロ糖内結合に変形されることができる。また、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一つまたはそれ以上の置き換えられた糖官能基

50

を含んでもよい。アンチセンスオリゴヌクレオチドはさらに、変形された塩基を含んでもよい。変形塩基の例では、ヒポキサンチン、6 - メチルアデニン、5 - メチル - ピリミジン (特に、5 - メチルシトシン)、5 - ヒドロキシメチルシトシン (5-hydroxymethylcytosine、HMC)、グリコシルHMC、ゲンチオピオシルHMC、2 - アミノアデニン、2 - チオウラシル、2 - チオチミン、5 - プロモウラシル、5 - ヒドロキシメチルウラシル、8 - アザグアニン、7 - デアザグアニン、N6 (6 - アミノヘキシル) アデニン、及び2, 6 - ジアミノプリンを含む。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、一つまたはそれ以上の官能基またはアンチセンスオリゴヌクレオチドの活性及び細胞取り込みを増強させるコンジュゲートに化学的に結合することができる。例えば、親油性官能基 (lipophilic moieties) は、コレステロール官能基 (cholesterol moiety)、コレステリル官能基 (cholesteryl moiety)、コール酸)、チオエーテル、チオコレステロール、脂肪鎖、リン脂質、ポリアミン鎖、ポリエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル官能基 (palmityl moiety)、オクタデシルアミン官能基 (octadecylamine moiety) 及びヘキシルアミノ - カルボニル - オキシコレステロール官能基 (hexylamino-carbonyl-oxysterol moiety) を含むが、これらに限定されるのではない。官能基を含むオリゴヌクレオチドを製造する方法は、本分野で公示されている (米国特許第 5 1 3 8 0 4 5 号明細書、第 5 2 1 8 1 0 5 号明細書及び第 5 4 5 9 2 5 5 号明細書)。変形されたオリゴヌクレオチドは、ヌクレアーゼの存在下に増強された安定性及びターゲット mRNA に対する増強された結合親和度を持つことができる。

10

20

【0093】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、一般的な方法で生体外で合成されて、身体に投与され、生体内で合成されることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを生体外で合成する方法は、RNAポリメラーゼIを利用する。アンチセンスRNAを生体内で合成する方法は、反対方向にマルチクローニング部位 (multicloning site、MCS) を含むベクターを利用して、アンチセンスRNAの転写を実施することを含む。前記アンチセンスRNAは、好ましくはペプチド配列内への翻訳を遮断するために、その配列内に翻訳停止コドンを含む。

【0094】

本発明で有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドのデザインは、c1ec14a、好ましくはc1ec14a - CTLDのヌクレオチド配列を参考にして、本分野の公示の方法によって容易に実行できる (Weiss, B. (ed.): Antisense Oligodeoxynucleotides and Antisense RNA: Novel Pharmacological and Therapeutic Agents, CRC Press, Boca Raton, FL, 1997; Weiss, B., et al., Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. Cell. Mol. Life Sci., 55: 334-358 (1999))。

30

【0095】

ここに用いられた用語「siRNA」はRNA干渉または、遺伝子サイレンシング (gene silencing) を媒介できる核酸分子を示す (参考文献: 国際公開第00/44895号、国際公開第01/36646号、国際公開第99/32619号、国際公開第01/29058号、国際公開第99/07409号 及び 国際公開第00/44914号)。siRNAは、ターゲット遺伝子の発現を抑制できるので、遺伝子ノックダウンまたは遺伝子治療の効果的な方法を提供する。植物、虫、ショウジョウバエ及び寄生虫で初めて発見されたsiRNAは、最近開発されて哺乳類細胞の研究に用いられている。

40

【0096】

本発明のsiRNA分子が用いられる場合に、センスストランド (c1ec14a、好ましくはc1ec14a - CTLD mRNA配列に対応する配列) 及びそのアンチセンス鎖 (c1ec14a、好ましくはc1ec14a - CTLD mRNA配列に相補的な配列) が、二重鎖を形成する構造を持つ。そうでなければ、自己 - 相補的なセンス及びアンチセンス鎖を持つ一本鎖構造を持つことができる。

【0097】

siRNAは、二重鎖RNA官能基が完全な対を構成することに限定されず、ミスマッ

50

チ (mismatch、相補的でない塩基に対応する)、バルジ (bulge、一つの鎖内の塩基に対応しない) のような対を形成しない官能基を含む。s i R N A の総長は、10 ~ 100 塩基、好ましくは15 ~ 80 塩基、さらに好ましくは20 ~ 70 塩基である。

【0098】

s i R N A の末端は、R N A 干渉 (R N A i) を介して c l e c 1 4 a、好ましくは c l e c 1 4 a - C T L D 遺伝子の発現を抑制できるならば、末端が鈍かったり凝集性であってもよい。凝集性末端は、3' - または 5' - 凝集性末端の中一つであってもよい。

【0099】

本発明で、s i R N A 分子は、自己 - 相補的なセンス及びアンチセンス鎖の間に挿入された短いヌクレオチド配列 (例えば、約 5 - 15 個のヌクレオチド) を持つことができる。この場合、ヌクレオチド配列の発現から形成された s i R N A 分子は、分子間ハイブリダイゼーションを介して、ヘアピン構造を形成して、結果的に全体的にステム - ループ構造を形成する。ステム - ループ構造は、生体外または生体内で加工されて R N A i を調節できる活性化した s i R N A 分子を生成する。

【0100】

ここに用いられた用語「アプタマー」とは、特定ターゲット分子に対して結合親和度を持つ核酸分子を示す。また、アプタマーは、特定ターゲット分子に結合することによって特定ターゲット分子の活性を抑制することができる。本発明のアプタマーは、R N A、D N A、変形核酸またはその混合物であってもよい。本発明のアプタマーはさらに、線形または環状型であってもよい。本発明のアプタマーは、特にその長さ限定されない。典型的に、約 15 ~ 200 個、例えば、約 100 個以下のヌクレオチド、好ましくは約 80 個以下のヌクレオチド、さらに好ましくは約 60 個以下のヌクレオチド、最も好ましくは約 45 個以下のヌクレオチドの長さを持つ。本発明のアプタマーはさらに、約 18、20 または 25 個以上のヌクレオチドの長さを持つ。ヌクレオチドの合計数が少ないほど、化学合成及び大量産生がより容易で、費用面でも主要な長所がある。化学変形も容易で、体内の安定性が高く毒性は低い。

【0101】

本発明のアプタマーは、S E L E X 法またはその改訂版を利用して製造することができる (例えば、Ellington et al., Nature, 1990 346, 818-822; Tuerk et al., Science, 1990 249, 505-510)。S E L E X 法は、10 ~ 14 個の異なるヌクレオチド配列を持つオリゴヌクレオチドプールからターゲット分子に特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択する方法である。用いられたオリゴヌクレオチドは、約 40 残基の無作為配列を持って、プライマー配列の側面に位置している (flanked by)。このオリゴヌクレオチドプールは、ターゲット分子と混合されるようになって、ターゲット分子に結合した R N A だけがフィルターなどを利用して収集される。収集されたオリゴヌクレオチドは、R T - P C R によって増幅されて、これは次回のためにテンプレートとして用いられる。前記操作を約 10 回繰り返すことによって、ターゲット分子に特異的に結合したアプタマーを得ることができる。ラウンド数を増加させたり競争物質を用いることによってターゲット分子に対して強力な結合ポテンシャルを見せるアプタマーは、濃縮及び選択される。そうして、S E L E X のラウンド数を調節する及び / 又は、競争条件を調節させることによって、異なる結合力または結合モードを持つアプタマー、及び同じ結合力または結合モードを持つが、異なる塩基配列を持つアプタマーをいくつかの場合で得ることができる。S E L E X 法は、P C R による増幅工程を含む ; 工程のうちにマンガンイオンなどを利用して突然変異を起こすことによってより高い多様性を持つ S E L E X を行うことが可能である。

【0102】

公示の S E L E X 法に加えて、複合体ターゲット、生細胞または組織に対するアプタマー細胞 - セレックス方法 (Cell-SELEX method) を利用して、アプタマーもまた得ることができて (Guo et al. Int. J. Mol. Sci., 9(4): 668, 2008)、細胞 - セレックス方法は、表面上のターゲット分子の過去の知識がなくても疾患に対しアプタマーを直接選択する長所がある。さらに単離される際に、固有の性質を示さないことがあるので、選択過程

10

20

30

40

50

中に生理学的状態でのターゲットタンパク質に対する機能的なアプローチが可能であるとの側面から細胞 - セレックス方法は従来のセレックス方法に比べて有利である。

【0103】

一方、アプタマーは、ホスフェート基の負電荷を基にしたイオン結合、リボースを基にした水素結合及び核酸塩基を基にした水素結合及び積層結合 (stacking interaction) のような多様な結合モードで、ターゲット分子と結合する。特に、ホスフェート基の負電荷を基にしたイオン結合は、構成ヌクレオチドの数と同じ数で存在して、強く、タンパク質の正電荷表面に存在するリジン及びアルギニンと結合する。このような理由から、核酸は置き換えられるターゲット分子に直接結合することには関与しない。特に、幹構造の部位は、塩基対を既に形成して、二重らせん構造の内面に直面して、核酸塩基は、ターゲット分子に直接結合しないものと見られる。従って、塩基対が異なる塩基対と交替させられる時でさえも時々アプタマーの活性は減少しない。ループ構造のように塩基対が形成されない構造では、核酸塩基がターゲット分子に直接結合するのに関与せず、塩基置換は可能である。例えば、リボースの 2' - 位置でヒドロキシ基はすべての元素または官能基で置き換えられる。元素または官能基の例では、水素原子、フッ素原子または - O - アルキル基 (例えば、- O - CH₃)、- O - アシル基 (例えば、- O - CHO)、及びアミノ基 (例えば、- NH₂) を含むことができる。ターゲット分子に直接結合するのに関与する官能基が置き換えられたり除去されないならば、アプタマーは通常その活性を維持する。

10

【0104】

また、アプタマーは、化学合成を許容するので、容易に変形可能である。アプタマーに対して M F O L D プログラムを利用して 2 次構造を予測したり、X 線分析または N M R 分析で立体構造を予測することによって、ヌクレオチドが置き換えられたり除去できる程度で予測することが可能である。新しい配列を持つ予測されたアプタマーは、容易に化学的に合成でき、現存するアッセイシステムを利用して、アプタマーが活性を維持するか否かを定めることができる。

20

【0105】

本発明のアプタマーは、各ヌクレオチドの糖残基 (例えば、リボース) が変形されて結合活性、安定性、薬剤伝達性などを増加させるものであってもよい。糖の残基での変形の例としては、糖の残基の 2' - 位置、3' - 位置及び / または 4' - 位置で酸素を他の原子に置換させることなどが挙げられる。変形の種類として、フッ素化、O - アルキル化 (例えば、O - メチル化、O - エチル化)、O - アリール化、S - アルキル化 (例えば、S - メチル化、S - エチル化)、S - アリール化、及びアミノ化 (例えば、- NH) が挙げられる。前記糖の残基での変更 (alterations) は、公示方法それ自体によって実行されることができる (例えば、Sproat et al., Nucle. Acid. Res. 1991 19, 733-738; Cotton et al., Nucl. Acid. Res. 1991 19, 2629-2635; Hobbs et al., Biochemistry 1973 12, 5138-5145)。

30

【0106】

本発明のアプタマーはさらに、核酸塩基 (例えば、プリンまたは、ピリミジン) を持っても良く、結合活性を増加させるために変形されてもよい (例えば、化学置換によって)。前記変形の例としては、5' - 位置でのピリミジン変更、6 - 及び / または 8 - 位置でのプリンの変更、エキストラサイクリックアミンに変更、4 - チオウリジンに置換、及び 5 - プロモまたは 5 - ヨード - ウラシルに置換が挙げられる。

40

【0107】

本発明のアプタマーに含まれたホスフェート基は、核酸加水分解酵素及び加水分解に耐性を与えるために変形される。例えば、P (O) O 官能基は、P (O) S (チオエート)、P (S) S (ジチオエート)、P (O) NR₂ (アミデート)、P (O) R、R (O) OR'、CO or CH₂ (ホルムアセタール) または 3' - アミン (- NH - CH₂ - CH₂ -) [ここで R または R' の各々のユニットは、独立して H または置換若しくは非置換のアルキル基である (例えば、メチル、エチル)] で置き換えられてもよい。連結基 (joining group) は、例えば - O - 、- N - または - S - 及びこれらの連結基を介して隣接

50

するヌクレオチドに結合できるヌクレオチドである。

【0108】

また、変形は、3'及び5'でのキャップのような変形を含んでもよい。変形は、末端にポリエチレングリコール、アミノ酸、ペプチド、逆d T (inverted dT)、核酸、ヌクレオシド、ミリストイル (Myristoyl)、リトコール酸 - オレイル (Lithocholic-oleyl)、トコサニル (Docosanyl)、ラウロイル (Lauroyl)、ステアロイル (Stearoyl)、パルミトイル (Palmitoyl)、オレオイル (Oleoyl)、リノレオイル (Linoleoyl)、その他脂質、ステロイド、コレステロール、カフェイン、ビタミン、顔料、蛍光物質、抗癌剤、毒素、酵素、放射性物質、ピオチンなどを添加することによって追加で実施できる。

【0109】

前記変形に対しては、例えば、米国特許第5660985号明細書及び第5756703号明細書を参考にする。

またアプタマーは、リポソームまたはナノ粒子の表面に結合して、抗癌剤、毒素、腫瘍抑制遺伝子、及び前記リポソームまたはナノ粒子内にカプセル化された siRNA (低分子干渉RNA) をターゲット細胞に伝達する。

【0110】

本発明で、c l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a - C T L Dの発現、特にその活性を抑制する物質は、c l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a - C T L Dに特異的に結合する抗体、ペプチド、低分子量化合物、または、自然抽出物である。

【0111】

c l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a - C T L Dに特異的に結合できる抗体は、前記に記述した通りである。

【0112】

c l e c 1 4 a、好ましくはc l e c 1 4 a - C T L Dに特異的に結合して、その活性を抑制するペプチドは、本分野で公示された典型的な方法、例えば、ファージディスプレイ (phage display) によって得ることができる (Smith GP, "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". Science 228 (4705): 1315-1317 (1985); Smith GP, Petrenko VA, "Phage display". Chem. Rev. 97(2): 391-410 (1997))。

好ましくは血管新生抑制用組成物は、血管新生を抑制することによって癌を治療することができる。

【0113】

好ましくは血管新生抑制用組成物は、血管新生を抑制することによって血管新生関連疾患を治療することができる。

【0114】

他の観点において、本発明は、c l e c 1 4 a、好ましくは、c l e c 1 4 a - C L T Dの発現を阻害する物質を含む組成物を含む血管新生抑制用キットに関する。

【0115】

他の観点において、本発明は、c l e c 1 4 a、好ましくは、c l e c 1 4 a - C L T Dの発現を阻害する物質を含む組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、血管新生関連疾患を治療する方法に関する。

【0116】

他の観点において、本発明は、c l e c 1 4 a、好ましくは、c l e c 1 4 a - C L T Dの発現を阻害する物質を含む組成物を必要とする個体に投与する工程を含む、癌を治療する方法に関する。

【0117】

他の観点において、本発明は、請求項1~17のいずれか一項に記載の抗体と薬物が結合した抗体 - 薬物結合体に関する。前記薬物は、毒素、化学治療剤 (chemotherapeutic agent)、抗癌剤、抗生剤、ADP - リボシルトランスフェラーゼ (ADP-ribosyl transferase)、放射性同位元素及び核酸分解酵素 (nucleolytic enzyme) で構成された群から選

10

20

30

40

50

扱された一つであってもよいが、これに限定されるのではない。

【0118】

好ましくは、前記抗体 - 薬物結合体は、細胞内に内在化できる (internalized)。本発明の一実施例で、c l e c 1 4 a - C T L D I g G が、癌細胞のような c l e c 1 4 a を発現する細胞内に内在化できる (図 9 A、9 B)。

【0119】

他の観点において、本発明は、c l e c 1 4 a の C T L D 及び F c の融合タンパク質を含む、血管新生関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物に関する。

【0120】

本発明の一実施例で、h C T L D - F c は、濃度依存的にチューブ形成を抑制した (図 11)。

10

【実施例】

【0121】

以下、実施例を通して、本発明をより一層詳細に説明する。この実施例は単に本発明を例示するためのものであり、本発明の範囲がこの実施例によって制限されると解釈されないことは当業界の通常の知識を有する者には自明である。

【0122】

実施例 1 : 細胞培養及びトランスフェクション

H U V E C (Human umbilical vein endothelial cells, Lonza, Baltimore, MD, USA) を E G M - 2 (endothelial growth medium-2) に置いた。M A E C (Mouse aortic endothelial cells) 及び C O S - 7 細胞は、10% (v/v) F B S (fetal bovine serum) 及び 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシンを含んだ D M E M (Dulbecco's modified Eagle medium) 中で培養した。細胞を 37 °C 及び 5% C O₂ で湿度及び C O₂ が調節されたインキュベーター (Sanyo, Panasonic Healthcare Company, Secaucus, NJ, USA) に維持した。H E K 2 9 3 F 細胞は、湿度調節された M u l t i t r o n インキュベーション振とう機 (Infors HT, Bottmingen (Switzerland)) 中に 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシンを添加した F r e e s t y l eTM 2 9 3 発現培地 (Invitrogen) で 37 °C 及び 8% C O₂ で維持した。L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて製造者の指示に従って、G F P、c l e c 1 4 a - G F P (野生型 c l e c 1 4 a) または c l e c 1 4 a C T L D - G F P (c l e c 1 4 a C T L D 欠失変異体) をコードするベクターで H U V E C s 及び C O S - 7 細胞をトランスフェクションした。

20

30

【0123】

実施例 2 : ヒト及びマウス C T L D F c 融合タンパク質の構築及び作製

プライマー 5' - T C G C G C G G C C G C T G C T C G G C C T C G G G G G C C T G C - 3' (配列番号 1) 及び 5' - T C G C C T C G A G C T T G C A C A G G T A G C C G T T G G - 3' (配列番号 2) を用いて h C T L D の 31 - 172 番アミノ酸残基をコードする DNA を増幅した。m C T L D の同じ残基をコードする DNA は、プライマー 5' - T C G C G G C C C A G G C G G C C T G T T C G G C C T C G G G G G C T T G - 3' (配列番号 3) 及び 5' - T C G C G G C C G G C C T G G C C C T T G C A T A G G T A G C C A T C G G - 3' (配列番号 4) を用いて増幅した。S f i I (NEB, Ipswich, MA, USA) を処理して P C R 断片を作製して、ヒンジ及びヒト I g G 1 の C H 2 - C H 3 ドメインをコードする変形哺乳動物発現ベクター p C E P 4 (Invitrogen) の 3' 部位のクローニングサイトにクローニングした (gift of Dr. Chung, Seoul National University, Seoul, South Korea)。ライゲーションされた産物を反応性 E s c h e r i c h i a c o l i D H 5 細胞に形質転換し、プラスミド DNA を作製した。1.5 mg ポリエチレンイミン (polyethylenimine: Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) を用いて、各 DNA 0.75 mg で H E K 2 9 3 F 細胞 (6 × 10⁸ cells) をトランスフェクションした。トランスフェクションされた細胞を 1% (v/v) ペニシリン/ストレプトマイシンが添加された F r e e s t y l eTM 2 9 3 発現培地に維持した

40

50

。7日間培養した後、培養培地を回収して、タンパク質Aセパロード (RepliGen, Waltham, MA, USA) の親和度クロマトグラフィーを介して融合タンパク質を精製した。

NanoDrop分光光度計 (Wilmington, DE, USA) を用いてタンパク質濃度を定量した。サンプルをPBSで透析してSDS-PAGE及びクマシーブリリアントブルー染色 (Coomassie brilliant blue staining) を介して分析した。最終収集された分画の分液 (aliquot) を -80 に保管した。

【0124】

実施例3：ヒト合成scFvライブラリーの事前除去

ヒト合成scFvライブラリー (Barbas CF. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001) を再増幅した。Fcバインダーを事前除去するために、タンパク質Aセパロード上にヒトイムノグロブリン-G (Green Cross Pharma Derivatives Corp, Yong-in, Korea) を固定させて、37 で抗体-タンパク質A複合体を2時間インキュベーションした。簡単な遠心分離後、上澄液を収集して、ペレットは除去した。このような過程を2回繰り返した。最終上澄液をファージELISAで分析して除去の程度を評価した。

10

【0125】

実施例4：ファージディスプレイを用いたCTL D特異的scFvの選別

4 µg組換えヒト (hCTL D - Fc) またはマウス (mCTL D - Fc) 融合タンパク質でコートされたイムノチューブ (Immuno™ tube maxisorp, Nunc, Rochester, NY, USA) または、マグネチックビーズ (Dynabeads M-270 epoxy, Invitrogen) で3回のパイオパニングを行って、Barbas CF. Phage display: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001; Vestweber D. Lymphocyte trafficking through blood and lymphatic vessels: more than just selectins, chemokines and integrins. European Journal of Immunology. 2003; 33(5): 1361-4に記述された通り、種交差反応性を持つクローンを選別した。アウトプレートで育ったコロニーから無作為で96個のファージクローンを選別して、ファージ酵素免疫アッセイを介してヒトとマウスCTL Dに対する反応性をテストした。最終scFvクローンのDNAをシーケンスして、異なる相補性決定領域配列を持つと確認された四つのscFvクローンに分類した。

20

【0126】

実施例5：clec14a - CTL D IgGの作製

プライマー5' - CGGGAATTCGCCCGCCACCAATGGAAATGGAGCTGGGTCTTCTCTTCTTCTTCTGCTGTCAAGTAACCTACAGGTGTCTCTCTCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTG - 3' (配列番号5) 及び5' - GGCGGGCCCTTGGTGGAGGCTGAGCTCACGGTGAACAAGTGCCCTTGGCCCC - 3' (配列番号6) を用いて選別されたscFvクローン (クローン1 - 4) の重鎖可変領域 (V_H) 遺伝子を増幅した。クローンの軽鎖可変領域 (V_L) は、プライマー5' - CCCAAGCTTGGCCGCCACCAATGGAGACACATTCCTCAGGTCTTGTATACATGTTGCTGTGGTGTCTGGTGTGAGGACCAGTCTGTGCTGACTCAGCC - 3' (配列番号7) 及び5' - GGCCGTACGTAGGACCAGCTTGGTGGCTCCGCCCTAAGACATAACCAACC - 3' (配列番号8) を用いて増幅した。5'及び3'両末端にEcoRI及びApaI制限酵素サイトを追加して、V_H プライマーを設計した。両末端にHindIII及びBsiWIサイトを追加して、V_L プライマーを設計した。PCR断片を適切な制限酵素 (NEB, Ipswitch, MA, USA) で処理して、ヒンジ及びヒトIgG1のCH2 - CH3ドメインをコードするpCDNA3.1 (bicistronic mammalian expression vector, Invitrogen) (gift of Dr. Hong, Kangwon National University, Chuncheon, Kangwon, South Korea) の3'V_H クローニングサイトにクローニングした (Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001)。C

30

40

50

l e c 1 4 a - C T L D I g Gを産生して、Kim HY, Tsai S, Lo SC, Wear DJ, Izadjo o MJ. Production and characterization of chimeric monoclonal antibodies against Burkholderia pseudomallei and B. mallei using the DHFR expression system. PLoS O NE [Electronic Resource]. 6(5): e19867に記述された通り精製した。

【 0 1 2 7 】

実施例 6 : 創傷治癒及び細胞移動性アッセイ

製造者の指示に従って、C y t o S e l e c t ^{T M} 2 4 - w e l l 創傷治癒アッセイキット (wound healing assay kit: Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, USA) を用いた。簡単に、創傷治癒挿入口の一番上に開放された末端を介してピペットチップを注意深く挿入して、G F PでトランスフェクションされたC O S - 7細胞、c l e c 1 4 a - G F P またはc l e c 1 4 a C T L D - G F Pを各ウェルに入れた。細胞が育って合流すれば、挿入口をウェルから除去して、細胞をP B S (phosphate-buffered saline) で2回洗浄した。損傷20時間が過ぎた後、イメージをキャプチャーした。

10

内皮細胞移動性を分析するために、単一層が形成されるまでH U V E Cを挿入口で培養して、20 μ g / mLのc l e c 1 4 a - C T L D I g Gまたはセツキシマブの存在あるいは不在で9時間の間37 でインキュベーションした。細胞を2回P B Sで洗浄して、クリスタルバイオレット (Sigma, St. Louis, MO, USA) で染色した。定量分析のために、光学顕微鏡 (Nikon TS 100, Melville, NY, USA) 下でプレート当たり5個のフィールドを撮影して、移動距離をマニュアルに従って測定した。

20

【 0 1 2 8 】

実施例 7 : 免疫細胞化学

Lee S, et al., Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NFkappaB-dependent up-regulation of VCAM-1. Int Immunol. 2007 Dec; 19(12): 1349-5926に記述された通り、免疫細胞化学を行った。簡単に、G F P、c l e c 1 4 a - G F P、またはc l e c 1 4 a C T L D - G F Pでトランスフェクションされて、1日間コラーゲンでコートされたカバースリップで成長したC O S - 7細胞及びH U V E Cを30分間37 で4% (w / v) パラホルムアルデヒドで固定した。細胞をP B Sで2回洗浄して、5% (w / v) B S A (bovine serum albumin) 及び0.1% T X - 1 0 0を含んだP B Sで1時間37 でインキュベーションして遮断した。0.1 unit / wellローダミンパロイジン及び2 μ g / mLヘキストと共に1時間細胞をインキュベーションして、蛍光顕微鏡 (Leica DM2500, Wetzlar, Germany) 下で観察した。

30

【 0 1 2 9 】

実施例 8 : E L I S A

P B Sに含まれた25 nMの組換えh C T L D - F c、m C T L D - F cまたはI g G 1のF c断片をマイクロタイタープレートの96ウェルに入れた。37 で一夜インキュベーションした後、0.05% (v / v) T w e e n 2 0 (P B S T) を含んだP B Sで3回洗浄して、P B S Tに3% (w / v) B S Aを含んで1時間37 でインキュベーションした。以後、プレートを3% (w / v) B S Aを含んだP B S Tに67 nM c l e c 1 4 a - C T L D I g Gを含み、3時間37 でインキュベーションした。プレートをP B S Tで2回洗浄して、3% (w / v) B S Aを含むP B S T中でH R P (horseradish peroxide) が接合された抗 - ヒトラムダ軽鎖抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) (1 : 1000に希釈) と1時間37 でインキュベーションした。

40

【 0 1 3 0 】

C T L D - C T L D相互作用を測定するために、G F P、c l e c 1 4 a - G F Pまたはc l e c 1 4 a C T L D - G F PでトランスフェクションされたC O S - 7細胞の溶解物 (20 μ g) を96 - w e l lプレートのウェルに入れて、3% (w / v) B S Aを含んだP B S Tで1時間37 でインキュベーションした後、同じバッファーに0.15 μ gのh C T L D - F cまたはF cを添加して、2時間37 でインキュベーションした。c l e c 1 4 a - C T L D I g Gとの競争の有無をアッセイするために、3% (w /

50

v) BSAを含むPBST中clec14a-CTLD IgGの濃度を増加させて、hCTLD-Fcと2時間37°Cで予めインキュベーションした。以後、タンパク質複合体をウェルに入れて2時間37°Cでインキュベーションした。ウェルをPBSTで3回洗浄して、HRPが接合されたロバ抗-hCTLD IgG (1:5000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA)を入れて、1時間37°Cでインキュベーションした。ウェルをPBSTで3回洗浄して、100 µL TMB基質溶液 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を各ウェルに入れた。マイクロタイタープレートリーダー (microtiter plate reader: VICTOR™ X4, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)を用いて450 nmで光学密度を測定した。

【0131】

実施例9：フローサイトメトリー

6-wellマイクロタイタープレートで育ったHUVEC (3×10^5)を20 ng/mL hTNF (Millipore, Billerica, MA, USA)、または、20 µg/mL clec14a-CTLD IgGまたはセツキシマブの存在または不在で24時間インキュベーションした。細胞を収穫して、フローサイトメトリーバッファー中で1時間37°Cで20 µg/mL抗-VCAM-1またはICAM-1ポリクローナル抗体と共に染色した。細胞をフローサイトメトリーバッファーで3回洗浄して、1000 X gで10分間遠心分離して、フローサイトメトリーバッファー中でAlexa Fluor 488でラベリングされた抗-ウサギ抗体 (1:1000; Jackson ImmunoResearch)と1時間37°Cでインキュベーションした。

【0132】

6ウェルマイクロタイタープレートで育ったHUVEC (3×10^5)を4% (w/v)パラホルムアルデヒドで固定した。固定された細胞と固定されなかった細胞をPBSで2回洗浄して、20 µg/mL clec14a-CTLD IgG存在または不在で2時間37°Cでインキュベーションした。7.5 µg/mLヒツジ抗-clec14aポリクローナル抗体で2時間37°Cで細胞を染色した。細胞をフローサイトメトリーバッファーで3回洗浄して、フローサイトメトリーバッファー中でNL493 (Northern Lights™ 493 Fluorochrome)でラベリングされた抗-ヒツジ抗体 (1:200; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)と共にインキュベーションした後、フローサイトメトリー (BD FACSCalibur, BD Bioscience, Miami, FL, USA)で分析した。

【0133】

実施例10：チューブ形成

Rho SS, et al., Clec14a is specifically expressed in endothelial cells and mediates cell to cell adhesion. Biochemical & Biophysical Research Communications. 404(1): 103-8に記述された通り、チューブ形成アッセイを行った。簡単に、250 µL Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA)を24-wellプレートのウェルに入れて、37°Cで20分間重合されるようにした。EGM-2で培養されたHUVECを収穫して、EGM-2に再懸濁した後、Matrigel (1×10^5 cells/well)に接種した。培養物をclec14a-CTLD IgGまたはセツキシマブの存在または不在で37°Cでインキュベーションして、21時間後撮影した。チューブはマニュアルに従ってカウントした。

【0134】

実施例11：HUVEC細胞生存能アッセイ

HUVEC (10^4)を96-wellマイクロタイタープレートに接種して、20 µg/mL clec14a-CTLD IgG、セツキシマブまたは5-FU (Sigma)と2日間37°Cでインキュベーションした。細胞生存能は、セルカウティングキット-8 (Cell Counting Kit-8: Dojindo, Kumamoto, Japan)を用いて製造者の指示に従って測定した。VICTOR™ X4分光光度計 (Perkin Elmer)を用いて450 nmで吸光度を測定した。

【0135】

10

20

30

40

50

実施例 12 : 細胞 - 細胞接触測定

細胞 - 細胞接触法を Rho SS, et al., Clec14a is specifically expressed in endothelial cells and mediates cell to cell adhesion. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 404(1): 103-8 に記述された通り行った。簡単に、懸濁液のうち 1.5×10^7 HEK293F 細胞を GFP、Clec14a-GFP 及び Clec14a CTLD-GFP を発現するプラスミドでトランスフェクションして、FreeStyle™ 293 発現培養液で一夜の間培養した後、6 ウェルプレートに接種した (5×10^5 cells/well)。20 µg/mL clec14a-CTLD IgG または セツキシマブの存在または不在で 8 時間細胞を維持した。細胞凝集体 (mass > 4 cells) を 10 個以上のフィールドでカウントして、平均 ± 標準偏差 (SD) を計算した。

10

【0136】

実施例 13 : 免疫プロット分析

Van Meter KE, et al., A monoclonal antibody that inhibits translation in Sf21 cell lysates is specific for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Archives of Insect Biochemistry & Physiology*. 2008; 69(3): 107-17 に記述された通り免疫プロット分析を行った。簡単に、12% ポリアクリルアミドゲルを介して電気泳動して GFP、clec14a-GFP、または clec14a CTLD-GFP を分離した。ウェットトランスファーシステム (wet transfer system: GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA, USA) を用いてタンパク質をニトロセルロース膜に移動した。5% (w/v) 脱脂乳を含み、10 mM Tris/HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、及び 0.05% (v/v) Tween 20 (TTBS) で 1 時間室温でインキュベーションした後、同じ溶液で抗-GFP 単クローン抗体 (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) または、抗- α -アクチン単クローン抗体 (1:5000; Applied Biological Materials, Richmond, BC, Canada) と共に 4 時間でインキュベーションした。TTBS で膜を洗浄して、5% (w/v) 脱脂乳を含む TTBS で HRP-接合されたアフィニピュアヤギ抗-マウス IgG (HRP-conjugated Affinipure goat anti-mouse IgG) (1:5000; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) と共に 1 時間室温でインキュベーションした。TTBS で数回洗浄した後、製造者の指示に従って、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) を用いてタンパク質バンドを視覚化した。

20

30

【0137】

実施例 14 : 細胞 ELISA

96 ウェルプレートに置かれた HUVECs (10^4) を 20 µg/mL clec14a-CTLD IgG または Fc と共に 0、10、30、60、120、または、180 分間 37 °C でインキュベーションした。細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄して、1 時間 4 °C で 3% (w/v) BSA 含む PBS で遮断した後、遮断溶液中でヒツジ抗-clec14a ポリクローナル抗体 (1:1000) と 2 時間 4 °C でインキュベーションした。氷冷 PBS で細胞を 3 回洗浄して、HRP と接合された抗-ヒツジ IgG (1:5000; Santa Cruz Biotechnology) と 1 時間 4 °C でインキュベーションした。PBS で数回洗浄後、100 µL TMB 基質溶液を各ウェルに追加した。マイクロタイタープレートリーダーを用いて、450 nm で光学密度を測定した。

40

【0138】

実施例 15 : エピトープマッピングに対する ELISA

PBS にある 10 µg/mL hCTLDFc、Fc または hCTLDFc の N-末端または C-末端断片の各々を 96 ウェルプレートに入れた。プレートを 37 °C で一夜でインキュベーションして、0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) を含む PBS で 3 回洗浄した後、3% (w/v) BSA を含んだ PBST と 1 時間 37 °C でインキュベーションした。3% (w/v) BSA を含む PBST 中 10 µg/mL clec14a-CTLD IgG と共に 2 時間 37 °C でプレートをインキュベーションした。PB

50

STで2回洗浄した後、3% (w/v) BSAを含むPBST中HRPで接合された抗-ヒトラムダ軽鎖抗体 (1:1000; Bethyl Laboratories, TX, USA) を1時間37°Cでインキュベーションした。

【0139】

実施例16: hCTLD-Fcの存在または不在下でのチューブ形成アッセイ

250 µLのMatrigel (BD Biosciences) を24ウェルプレートに入れて、20分間37°Cで重合されるようにした。EGM-2で培養されたHUVECを収穫して、EGM-2に再懸濁した後、Matrigelに接種した (1×10^5 cells/well)。10 µg/mL及び25 µg/mL hCTLD-FcまたはFcの存在または不在下で培養物を37°Cでインキュベーションして、8時間後撮影した。

10

【0140】

試験例1: Clec14a-CTLDは細胞移動及びフィロポジウム形成に重要な役割を果たすことができる

clec14a媒介細胞移動でのCTLDの役割を説明するために、COS-7細胞をGFP、clec14a-GFP (wild-type clec14a fused to GFP) またはclec14a-CTLD-GFP (clec14a CTLD deletion mutant fused to GFP) でトランスフェクションして、0時間及び20時間となった時創傷治癒アッセイでの移動を分析した。野生型clec14aを発現する細胞の移動程度は、GFP単独発現細胞に比べて約1.6倍高い反面、clec14a-CTLD欠失変異体の発現は、移動にほとんど影響を与えなかった (図1A及び1B)。

20

細胞移動は、アクチン細胞骨格再配列によって精巧に調節されるので、免疫細胞化学を用いてGFP、clec14a-GFPまたはclec14a-CTLD-GFPを発現するCOS-7細胞及びHUVECでのアクチンネットワーク組織を調べた。二つの細胞類型で共に、clec14a-GFP発現は、顕著にフィロポジウム形成を増加させた反面、GFPまたはclec14a-CTLD-GFPは最小の影響を示した (図2A及び2B)。

まとめると、このような結果は、アクチン細胞骨格再配列を介してCTLDが内皮細胞移動に重要な役割を果たすことができることを示す。

【0141】

試験例2: CTLD特異的scFv (single-chain variable fragments) の分離

ヒト、マウスまたはチンパンジーclec14a (表1) のCTLDは、Fc融合タンパク質であるため、ヒト合成scFvライブラリーからFcバインダーを除去するために、2工程の連続的事前除去過程を行った; ファージ酵素結合免疫吸着法によって約90%が除去されたことを確認した。

30

【0142】

【表 1】

clec14a-CTLDのアミノ酸配列		
ヒトclec14a-レクチン (a. a 31-172)	CSASGACYSLHHATMKRQAAEEACILRGGALSTVRAGAEL RAVLALLRAGPGPGGGSKDLLFWVALERRRSHCTLENEPL RGFSWLSSDPGGLESIDLQWVEEPQRSCTARRCAVLQATG GVEPAGWKEMRCHLRANGYLCK	配列番号9
マウスclec14a-レクチン (a. a 31-172)	CSASGACYSLHHATFKRRAAEEACSLRGGTLSTVHSGSEF QAVLLLLRAGPGPGGGSKDLLFWVALERSISQCTQEKEPL RGFSWLHPDSEDSPLPWVEEPQRSCTVRKCAALQATR GVEPAGWKEMRCHLRDTGYLCK	配列番号10
チンパンジーclec14a- レクチン(a. a 31-172)	CSASGACYSLHHATMKRQAAEEACILRGGALSTVRAGAEL RAVLALLRAGPGPGGGSKDLLFWVALERRRSHCTLENEPL RGFSWLSSDPGGLESIDLQWVEEPQRSCTARRCAVLQATG GVEPAGWKEMRCHLRANGYLCK	配列番号133
clec14a-CTLDのヌクレオチド配列		
ヒトclec14a-レクチン (nt 91-516)	tgctcggcctcggggcctgctacagcctgcaccacgcta ccatgaagcggcaggcggccgaggaggcctgcatcctgcg aggtagggcgctcagcaccgtgcgtgcggcgccgagctg cgcgctgtgctcgcgctcctgcgggcaggcccaggccccg gagggggctccaaagacctgctgttctgggtcgcactgga gcgcaggcgttcccactgcaccctggagaacgagcctttg cggggtttctcctggtgtcctccgacccccggcggctcctg aaagcgacacgctgcagtgggtggaggagccccaacgctc ctgcaccgcggagatgcgcggtactccaggccaccggt ggggtcgagcccgcaggctggaaggagatgcgatgccacc tgcgcgccaacggctacctgtgcaag	配列番号11
マウスclec14a-レクチン (nt 91-516)	tgttcggcctcggggccttgcctacagccttaccacgcta ccttcaagagaaggcggcggaggaggcctgcagcctaag gggcgggactctcagcaccgtgcactcaggctcggagttt caagctgtgctcctgctcttgcgctgcaggctccgggctg gcggaggctccaaagatcttctgttctgggtggctctgga acgcagcatctcacagtgcactcaggagaaagaccttta aggggttctcctggtgcacccggactcagaagactcag aggacagcccactaccgtgggtggaagagccacaacgttc ctgtacagtgcagaaagtgcgctgcgctccaggccaccagg ggagtggagcctgctggttggaggagatgcgctgcatc tgcgcaccgatggctacctatgcaag	配列番号12
チンパンジーclec14a- レクチン(nt 91-516)	tgctcggcctcggggcctgctacagcctgcaccacgcta ccatgaagcggcaggcggccgaggaggcctgcatcctgcg aggtagggcgctcagcaccgtgcgtgcggcgccgagctg cgcgctgtgctcgcgctcctgcgggcaggcccaggccccg gagggggctccaaagacctgctgttctgggtcgcactgga gcgcaggcgttcccactgcaccctggagaacgagcctttg cggggtttctcctggtgtcctccgacccccggcggctcctg aaagcgacacgctgcagtgggtggaggagccccaacgctc ctgcaccgcggagatgcgcggtactccaggccaccggt ggggtcgagcccgcaggctggaaggagatgcgatgccacc tgcgcgccaacggctacctgtgcaag	配列番号134

10

20

30

40

本発明で用いられたアミノ酸配列に対するアミノ酸残基はIUPAC-IUB命名法に従って略字で表される：

Alanine: A Arginine: R
 Asparagine: N Aspartic acid: D
 Cysteine: C Glutamic acid: E
 Glutamine: Q Glycine: G
 Histidine: H Isoleucine: I
 Leucine: L Lysine: K
 Methionine: M Phenylalanine: F
 Proline: P Serine: S
 Threonine: T Tryptophane: W
 Tyrosine: Y Valine: V

10

【0144】

以後、CTLD-Fcコードされた免疫チューブ及びマグネチックビーズを用いて、ヒト(hCTLD-Fc)またはマウス(mCTLD-Fc)CTLD融合タンパク質とライブラリーを選択的にバイオパンニングすることで、種交差CTLD反応性を持つクローンを分離した(図3A)；このようないくつかのクローンをビーズだけで区別した(図3B-3D)。96個のファージクローンを無作為的に選別して、ファージ酵素免疫アッセイで選別した。クローンDNAをシーケンスして、ヒト及びマウスCTLD二つ共に認識しながら他の相補性決定領域配列を持つ四つのクローン(クローン1-4)を選別した(表2-9)。一方、四つのクローンは、チンパンジーCTLDを特異的に認知して、チンパンジーc1ec14a-レクチンのアミノ酸配列は、ヒトc1ec14a-レクチンのアミノ酸配列と同じであるため、交差反応性を持つ。

20

【0145】

【表2】

c1ec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン1	FR1	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAAS	配列番号13
	CDR1	GFTFSGYDMS	配列番号14
	FR2	WVRQAPGKGLEWVS	配列番号15
	CDR2	GIYPDGGNTYYADSVKG	配列番号16
	FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR	配列番号17
	CDR3	GATWWVLGPFDY	配列番号18
	FR4	WGQGTLTVSS	配列番号19

30

【0146】

【表3】

c1ec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン2	FR1	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLS CAAS	配列番号20
	CDR1	GFTFSSYDMS	配列番号21
	FR2	WVRQAPGKGLEWVS	配列番号22
	CDR2	VISPSSSSTYYADSVKG	配列番号23
	FR3	RFTISRDN SKNTLHLQMN SLRAEDTAVYYCAR	配列番号24
	CDR3	HTGWQSRPHTYYDYGM DV	配列番号25
	FR4	WGQGTLTVSS	配列番号26

40

【0147】

【表4】

clec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン3	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	配列番号27
	CDR1	GFTFSDYYMS	配列番号28
	FR2	WVRQAPGKGLEWVS	配列番号29
	CDR2	LISYDGGSTYYADSVKG	配列番号30
	FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	配列番号31
	CDR3	SNDWFDY	配列番号32
	FR4	WGQGTLVTVSS	配列番号33

10

【0148】

【表5】

clec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン4	FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	配列番号34
	CDR1	GFTFSGYYMS	配列番号35
	FR2	WVRQAPGKGLEWVS	配列番号36
	CDR2	VIYSGDGSTYYADSVKG	配列番号37
	FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	配列番号38
	CDR3	GLNSSLALPFDY	配列番号39
	FR4	WGQGTLVTVSS	配列番号40

20

【0149】

【表6】

clec14a-CTLD IgGのV _L ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン1	FR1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	配列番号41
	CDR1	TGSSSNIGNNSVT	配列番号42
	FR2	WYQQLPGTAPKLLIY	配列番号43
	CDR2	ADSHRPS	配列番号44
	FR3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	配列番号45
	CDR3	GAWDDSLSGYV	配列番号46
	FR4	FGGGTKLTVL	配列番号47

30

【0150】

【表7】

clec14a-CTLD IgGのV _L ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン2	FR1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	配列番号48
	CDR1	SGSSSNIGNNAVT	配列番号49
	FR2	WYQQLPGTAPKLLIY	配列番号50
	CDR2	SDNHRPS	配列番号51
	FR3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	配列番号52
	CDR3	GTWDASLSGYV	配列番号53
	FR4	FGGGTKLTVL	配列番号54

40

【0151】

【表 8】

clec14a-CTL D IgGのV _L ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン3	FR1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	配列番号55
	CDR1	SGSSSNIGSNNVY	配列番号56
	FR2	WYQQLPGTAPKLLIY	配列番号57
	CDR2	YDSQRPS	配列番号58
	FR3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	配列番号59
	CDR3	GAWDDSL SAYV	配列番号60
	FR4	FGGGTKLTVL	配列番号61

10

【 0 1 5 2 】

【表 9】

clec14a-CTL D IgGのV _L ドメインに対するアミノ酸配列			
クローン4	FR1	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC	配列番号62
	CDR1	SGSSSNIGSNAVN	配列番号63
	FR2	WYQQLPGTAPKLLIY	配列番号64
	CDR2	ADSNRPS	配列番号65
	FR3	GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC	配列番号66
	CDR3	GSWDYSL SAYV	配列番号67
	FR4	FGGGTKLTVL	配列番号68

20

【 0 1 5 3 】

また、クローン 1 - 4 の核酸配列は、表 10 - 17 の通りである。

【表 10】

clec14a-CTL D IgGのV _H ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン1	FR1	gaggtgcagctgttgagctctgggggaggtcttggtacagcctg gggggtccctgagactctcctgtgcagcctct	配列番号69
	CDR1	ggattcaccttttagcggttatgatgatgagc	配列番号70
	FR2	tgggtccgccaggctccaggggaaggggctggagtgggtctca	配列番号71
	CDR2	gggatctatcctgatggtggttaatacatattacgctgattctg taaaagg	配列番号72
	FR3	cggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatc tgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtatta ctgtgcgaga	配列番号73
	CDR3	ggtgctacgtgggtgggtgcttggctccttttgaactac	配列番号74
	FR4	tggggccagggtacactggteaccgtgagctca	配列番号75

30

40

【 0 1 5 4 】

【表 1 1】

clec14a-CTLD IgGのV _L ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン1	FR1	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccg ggcagagggtcaccatctcttgt	配列番号76
	CDR1	actggctcttcatctaataattggcaataattctgtcacc	配列番号77
	FR2	tggtagcagcagctcccaggaacggcccccaactcctcatct at	配列番号78
	CDR2	gctgatagtcateggccaagc	配列番号79
	FR3	gggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag cctcctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctga ttattactgt	配列番号80
	CDR3	ggtgcttgggatgatagcctgagtggttatgtc	配列番号81
	FR4	ttcggcggaggcaccaggctgacggtccta	配列番号82

10

【 0 1 5 5 】

【表 1 2】

clec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン2	FR1	gaggtgcagctgttggagtctggggaggcttggtagcagcctg gggggtccctgagactctcctgtgcagcctct	配列番号83
	CDR1	ggattcaccttttagcagttatgatatgagc	配列番号84
	FR2	tgggtccgcccaggctccaggaagggctggagtgggtctca	配列番号85
	CDR2	gtgatctctcctgatagtagtagtacatattacgctgattctg taaaagg	配列番号86
	FR3	cggtcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgcatc tgcaatgaacagcctgagagccgaggacacggcctgtatta ctgtgcgaga	配列番号87
	CDR3	catactggttggcagagtcggcctcatacgtattatgattatg gtatggacgtc	配列番号88
	FR4	tggggccagggtacactggtcaccgtgagctca	配列番号89

20

30

【 0 1 5 6 】

【表 1 3】

clec14a-CTLD IgGのV _L ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン2	FR1	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccg ggcagagggtcaccatctcttgt	配列番号90
	CDR1	agtggctcttcatctaataattggcaataatgctgtcacc	配列番号91
	FR2	tggtagcagcagctcccaggaacggcccccaactcctcatct at	配列番号92
	CDR2	tctgataateateggccaagc	配列番号93
	FR3	gggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag cctcctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctga ttattactgt	配列番号94
	CDR3	ggtacttgggatgctagcctgagtggttatgtc	配列番号95
	FR4	ttcggcggaggcaccaggctgacggtccta	配列番号96

40

【 0 1 5 7 】

【表 14】

clec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン3	FR1	gaggtgcagctggttgagctctgggggagggcttggtacagcctg gggggtccctgagactctcctgtgcagcctct	配列番号97
	CDR1	ggattcacctttagcgttattatgagc	配列番号98
	FR2	tgggtccgcccaggctccaggggaaggggctggagtggtctca	配列番号99
	CDR2	ttgatctcttatgatggtggtagtagtacatattacgctgattctg taaaaggt	配列番号100
	FR3	cggttcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatc tgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtatta ctgtgcgaga	配列番号101
	CDR3	agtaatgattggttcgactac	配列番号102
	FR4	tggggccagggtacactggtcaccgtgagctca	配列番号103

10

【0158】

【表 15】

clec14a-CTLD IgGのV _L ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン3	FR1	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccg ggcagagggtcaccatctctgt	配列番号104
	CDR1	agtggctcttcatctaatattggcagtaataatgtctac	配列番号105
	FR2	tgggtaccagcagctcccaggaacggctcccaaactcctcatct at	配列番号106
	CDR2	tatgatagtcagcggccaagc	配列番号107
	FR3	gggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag cctcctggccatcagtgggctccggctccgaggatgaggctga ttattactgt	配列番号108
	CDR3	ggtgcttgggatgatagcctgagtgttatgtc	配列番号109
	FR4	ttcgggaggagcaccagctgacggctcta	配列番号110

20

30

【0159】

【表 16】

clec14a-CTLD IgGのV _H ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン4	FR1	gaggtgcagctggttgagctctgggggagggcttggtacagcctg gggggtccctgagactctcctgtgcagcctct	配列番号111
	CDR1	ggattcacctttagcgttattatgagc	配列番号112
	FR2	tgggtccgcccaggctccaggggaaggggctggagtggtctca	配列番号113
	CDR2	gtgatctattctggtgatggtagtagtacatattacgctgattctg taaaaggt	配列番号114
	FR3	cggttcaccatctccagagacaactccaagaacacgctgtatc tgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtgtatta ctgtgcgaga	配列番号115
	CDR3	ggtcttaattcgtcttcggctctgccgttcgactac	配列番号116
	FR4	tggggccagggtacactggtcaccgtgagctca	配列番号117

40

【0160】

【表 17】

clec14a-CTL D IgGのV _L ドメインに対するヌクレオチド配列			
クローン4	FR1	cagtctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccg ggcagagggtcaccatctcttgt	配列番号118
	CDR1	agtggctcttcatctaataattggcagtaatgctgtcaac	配列番号119
	FR2	tggtaccagcagctcccaggaacggcccccaactctctcatct at	配列番号120
	CDR2	gctgatagtaatcgccaagc	配列番号121
	FR3	ggggtccctgaccgattctctggctccaagtctggcacctcag cctccctggccatcagtgggctccggtccgaggatgaggctga ttattactgt	配列番号122
	CDR3	ggttcttgggattatagcctgagtggttatgtc	配列番号123
	FR4	ttcggcggaggtaccaagctgacggctcta	配列番号124

10

【0161】

試験例3：ヒト及びマウスclec14a-CTL Dを特異的に認知するCle c 1 4 a - CTL D I g G

s c F vクローンをI g Gに変換して、HEK 293 F (human embryonic kidney 293 F)細胞で発現した後、精製した。四つのI g Gクローンは、SDS-PAGE及びクマシー染色によって90%超の純度であることを示した。ELISAは、精製されたCTL D特異的I g G (clec14a-CTL D I g G s)がヒト及びマウスCTL D-Fc二つに共に特異的に結合するが、Fc単独はそうでないことを示した。クローン1及び2は、クローン3及び4よりはるかに大きい親和度を示した(図4)。

20

【0162】

試験例4：Cle c 1 4 a - CTL D I g Gは内皮細胞移動及びチューブ形成を特異的に抑制する

clec14a-CTL D I g Gが内皮細胞移動に阻害作用をするか否か調べるために、HUVECと共にclec14a-CTL D I g Gの存在または不在で創傷治癒アッセイを行った。セツキシマブ、抗-EGFR抗体を対照I g Gとして用いた。選別されたclec14a-CTL D I g G中、クローン1及び2は、各々約44%及び54%でHUVEC細胞移動を顕著に抑制した反面、クローン3及び4とセツキシマブ単独は、ほとんど効果がなかった(図5A及び5B)。

30

clec14a-CTL D I g Gがチューブ形成に及ぼす影響を確認するために、clec14a-CTL D I g G及びセツキシマブの存在または不在でチューブ形成をアッセイした。クローン1及び2とセツキシマブは、前述の通りHUVECチューブ形成を顕著に遮断する反面、残りのクローンは大きな影響がなかった(図5C及び5D)。

このような結果は、clec14a-CTL D I g Gが腫瘍血管新生を顕著に抑制することを強く示す。

【0163】

40

試験例5：Cle c 1 4 a - CTL D I g Gの内皮細胞生存能及び活性への影響

clec14a-CTL D I g Gが、内皮細胞生存能に及ぼす影響を調べるために、clec14a-CTL D I g G、セツキシマブまたは5-FU (5-fluorouracil)、アポトーシス誘導剤存在または不在で2日間HUVECを培養して、細胞カウティングキットを用いて細胞生存の可能性を確認した。抗体は、HUVEC生存能に影響をほとんど及ぼさない反面、5-FUは特異的に生存能を減少させた(図6A)。

内皮細胞活性にclec14a-CTL D I g Gが及ぼす影響を確認するために、clec14a-CTL D I g G s、セツキシマブまたはhTNF (human tumor necrosis factor alpha)の存在または不在でHUVECを培養した。活性は、フローサイトメトリーによって測定されたVCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)及

50

び ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) の発現に基づいて決定された。細胞を hTNF で処理して陽性対照群で VCAM-1 及び ICAM-1 の上向き調節を誘導した。抗体及びセツキシマブは、HUVEC 活性に影響が殆どなかった (図 6 B)。

まとめると、このような結果は、clec14a-CTLD IgG が内皮細胞生存能または活性に影響をほとんど及ぼさないことを示す。

【0164】

試験例 6 : Clec14a-CTLD IgG は特異的に clec14a によって媒介された細胞-細胞接触を抑制する

内皮細胞-細胞接触で clec14a-CTLD IgG の役割を確認するために、GFP または clec14a-GFP でトランスフェクションされた HEK293F 細胞によって形成されて、clec14a-CTLD IgG またはセツキシマブの存在または不在で培養されて、clec14a 媒介細胞-細胞接触のマーカーである細胞凝集体の数を測定した。細胞凝集体の数は、GFP 単独発現細胞より clec14a-GFP 発現細胞で約 4 倍以上多かった (図 7 A 及び 7 B)。さらに、クローン 1 及び 2 は、clec14a-GFP でトランスフェクションされた細胞の凝集を大きく抑制した反面、他のクローン及びセツキシマブはほとんど影響がなかった。

まとめると、このような結果は、clec14a-CTLD IgG は、腫瘍血管新生の間 clec14a 媒介内皮細胞-細胞接触で阻害作用を行うことができることを示す。

【0165】

試験例 7 : Clec14a-CTLD IgG は clec14a CTLD-CTLD 相互作用を特異的に遮断する

免疫分析を用いて、トランスフェクションされた COS-7 細胞の溶解物中で GFP、clec14a-GFP 及び clec14a CTLD-GFP の発現を確認した (図 8 A)。以後、溶解物を hCTLD-Fc または Fc と共にインキュベーションして、CTLD の間の相互作用を観察した。hCTLD-Fc が、COS-7 細胞溶解物中でいくつかの他のタンパク質と相互作用できても、clec14a CTLD-GFP でない clec14a-GFP に強く結合しており、これは内皮細胞で特異的 CTLD-CTLD 相互作用を示す (図 8 B)。

clec14a-CTLD IgG が、CTLD-CTLD 相互作用を遮断するのかが否かを定めるために、hCTLD-Fc は増加する濃度の clec14a-CTLD IgG (クローン 1) とインキュベーションして、タンパク質複合体は、GFP-または clec14a-GFP-トランスフェクションされた細胞の溶解物とインキュベーションした。競争的 ELISA を介して、clec14a-CTLD IgG が、濃度依存的な方式で CTLD-CTLD 相互作用を特異的に阻害することを示し (図 8 C)、これは clec14a-CTLD IgG が内皮細胞で clec14a CTLD-CTLD を特異的に遮断できることを示す。

【0166】

試験例 8 : HUVEC 表面で clec14a-CTLD IgG で下向き調節された clec14a に交差結合する

新生血管形成表現型 (pro-angiogenic phenotype) を抑制するのに、clec14a-CTLD IgG の可能な役割を調べるために、フローサイトメトリー法を用いて clec14a-CTLD IgG (クローン 1) で処理前後に HUVEC 膜で clec14a 発現レベルを比較した。IgG 処理時生細胞で clec14a は顕著に減少したが、パラホルムアルデヒドに固定された細胞はそうではなかった (図 9 A)。

clec14a-CTLD IgG によって HUVEC 膜での clec14a 下向き調節を確認するために、細胞を IgG (クローン 1) または Fc で処理して、clec14a 膜を細胞 ELISA で測定した。Clec14a-CTLD IgG は、HUVEC 膜で clec14a を時間依存的な方式で下向き調節した (図 9 B)。

このような結果は、clec14a に対する clec14a-CTLD IgG の交差

10

20

30

40

50

反応が内皮細胞膜での c l e c 1 4 a を特異的に下向き調節することを強く示す。また、このような結果は、c l e c 1 4 a - C T L D I g G が癌細胞のような c l e c 1 4 a 発現細胞に内在化できることを示す。

【 0 1 6 7 】

試験例 9 : エピトープの細部マッピング

エピトープの細部マッピングのために、E L I S A で C l e c 1 4 a w t C T L D 及び h C T L D - F c 断片に対する c l e c 1 4 a - C T L D I g G の特異度 (図 1 0 A) を試験した。

その結果、図 1 0 B に示した通り、クローン 1 及び 2 二つ共に c l e c 1 4 a - C T L D I g G は、w t h C T L D だけでなく、h C T L D の N - 末端及び C - 末端に結合した。

10

このような結果は、C T L D の N - 末端または C - 末端に、例えばクローン 1 及び 2 における全ての c l e c 1 4 a - C T L D I g G のように、h C T L D で 1 番アミノ酸 ~ 4 2 番アミノ酸のアミノ酸断片を含む融合タンパク質、h C T L D で 1 番アミノ酸 ~ 6 2 番アミノ酸のアミノ酸断片を含む融合タンパク質、h C T L D で 8 2 番アミノ酸 ~ 1 4 2 番アミノ酸のアミノ酸断片を含む融合タンパク質、h C T L D で 6 2 番アミノ酸 ~ 1 4 2 番アミノ酸のアミノ酸断片を含む融合タンパク質に特異的に結合して、エピトープとして用いられる可能性があることを強く示す。

20

【 0 1 6 8 】

試験例 1 0 : C T L D - F c がチューブ形成を抑制するか否かを観察するための試験

血管新生に h C T L D - F c の抑制効果を確認するために、実施例 1 6 により h C T L D - F c または F c の存在下でチューブ形成をアッセイした。

その結果、図 1 1 に示した通り、h C T L D - F c が濃度依存的な方式でチューブ形成を抑制した。

このような結果は確かに h C T L D - F c が腫瘍血管新生を特異的に抑制することを示している。

【 産業上の利用可能性 】

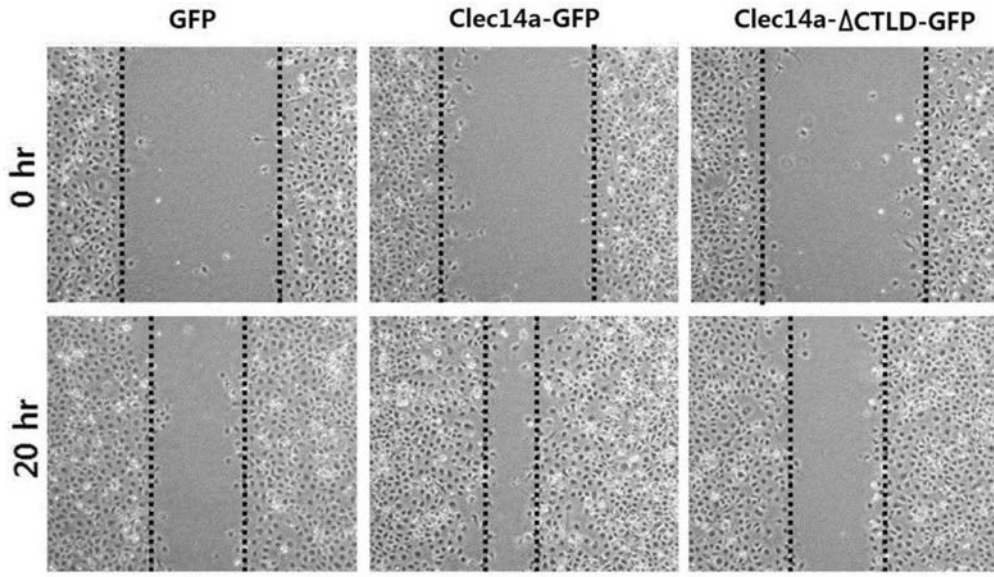
【 0 1 6 9 】

c l e c 1 4 a の C T L D が細胞移動及びフィロポジウム形成に重要な役割を果たす新規発見に基づいて、本発明では血管新生を抑制する、C T L D に対する新規抗体機能を確認した。従って、本発明は血管新生を抑制するのに利用可能な新規ターゲットドメインを提供する。さらに、本発明の抗体は、血管新生関連疾患または c l e c 1 4 a 媒介癌を予防または治療するのに効果的でありうる。

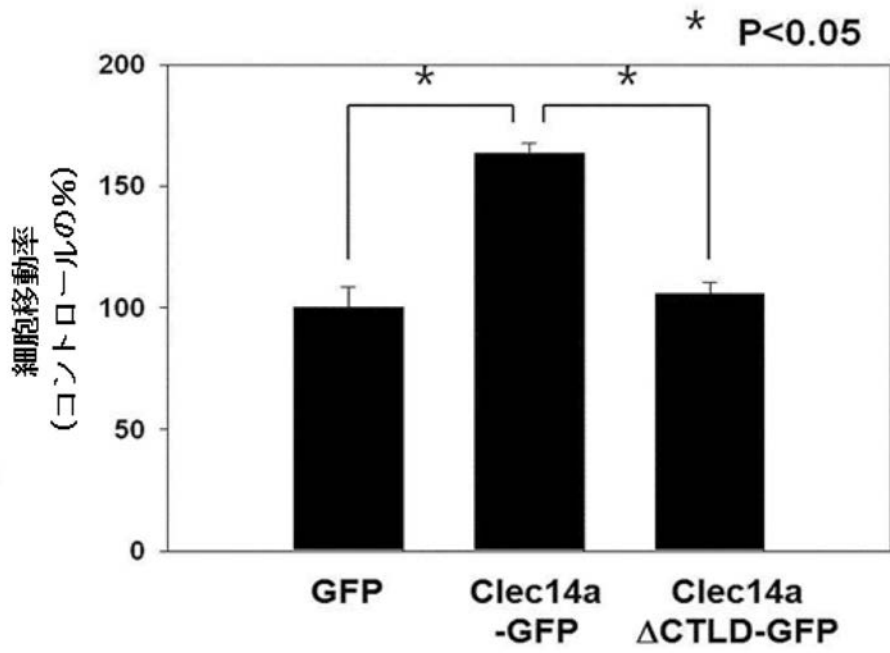
30

具体的な構成を参照して本発明を詳細に記載したが、このような記載は、好ましい具現例に関しており、発明の範囲を制限しないことは、当業者にとっては自明である。よって、本発明の実質的範囲は、出願された請求項及びその等価物によって定義される。

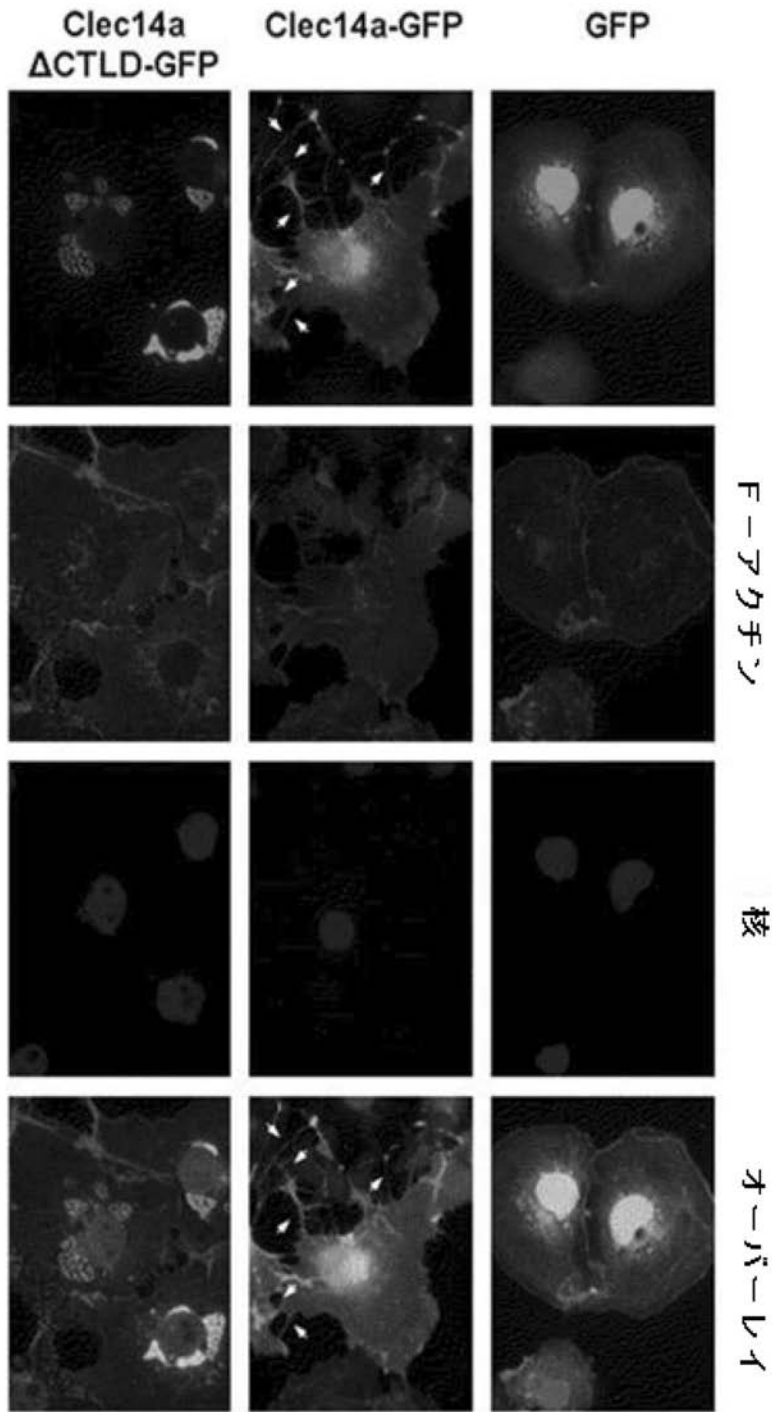
【 図 1 A 】



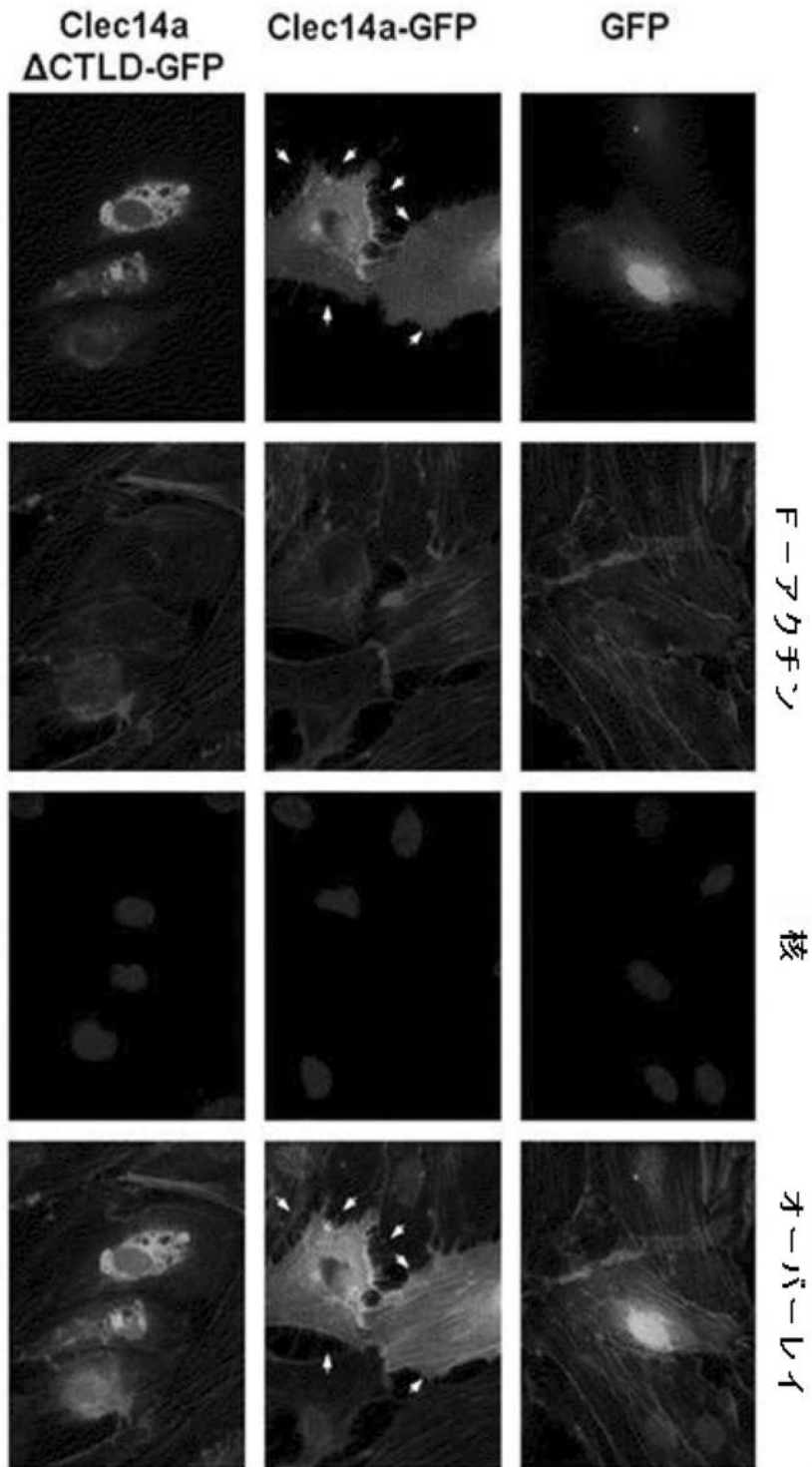
【 図 1 B 】



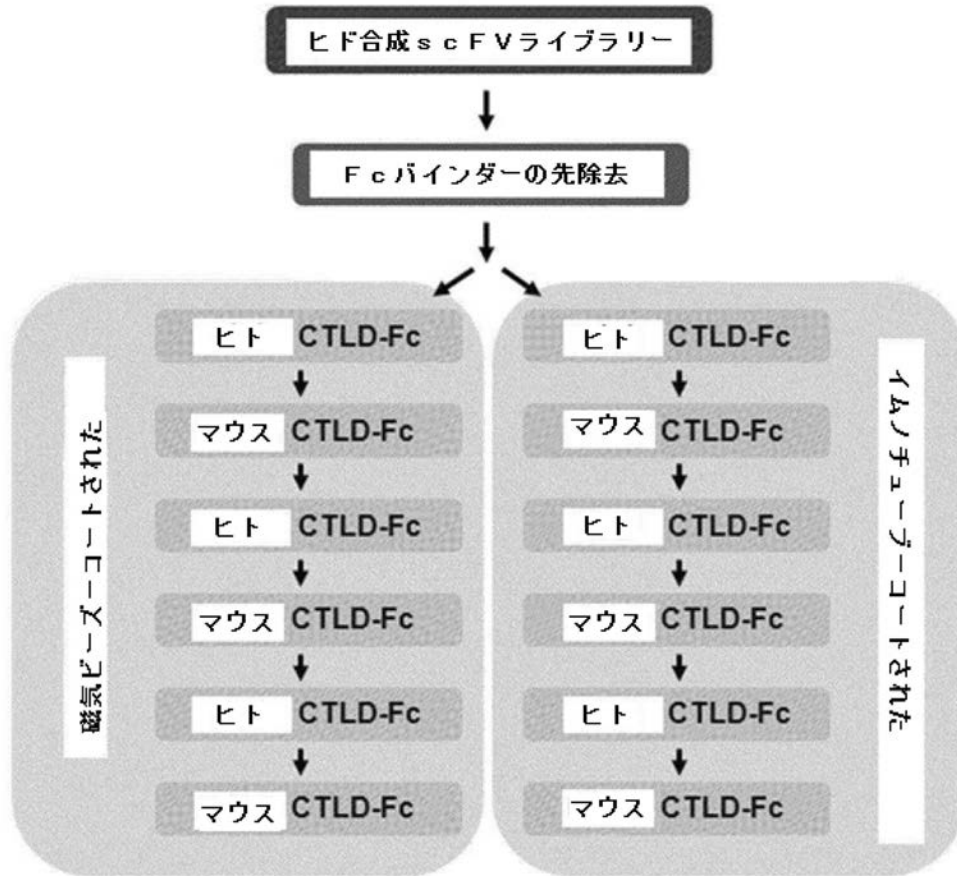
【 図 2 A 】



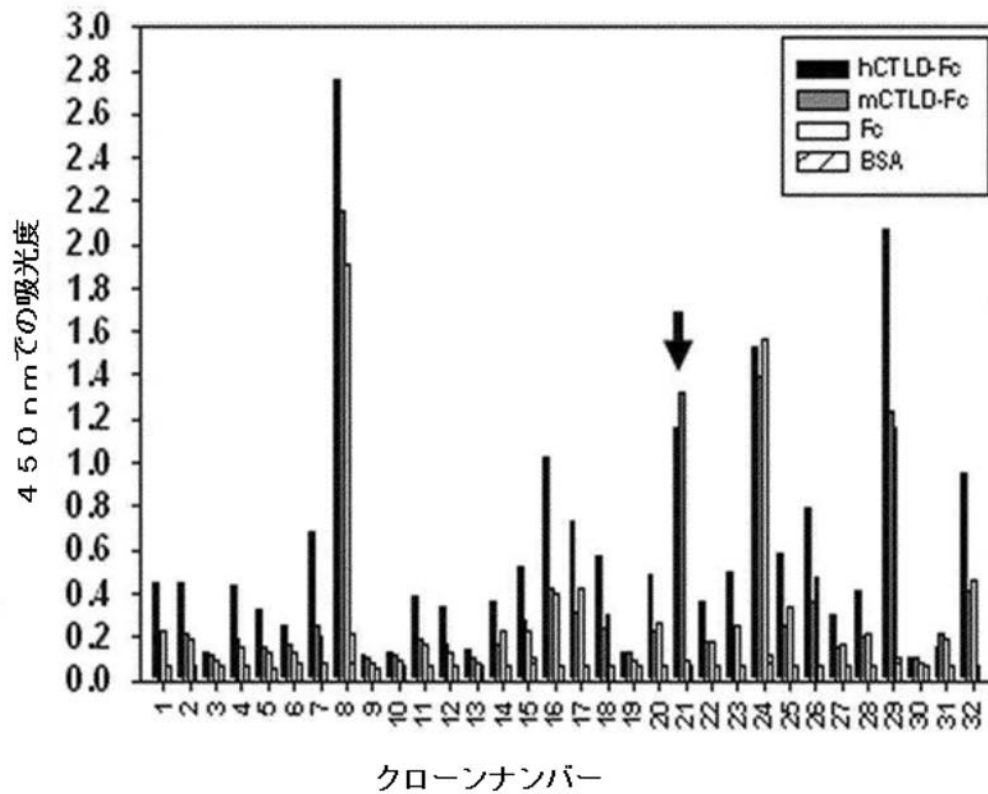
【 図 2 B 】



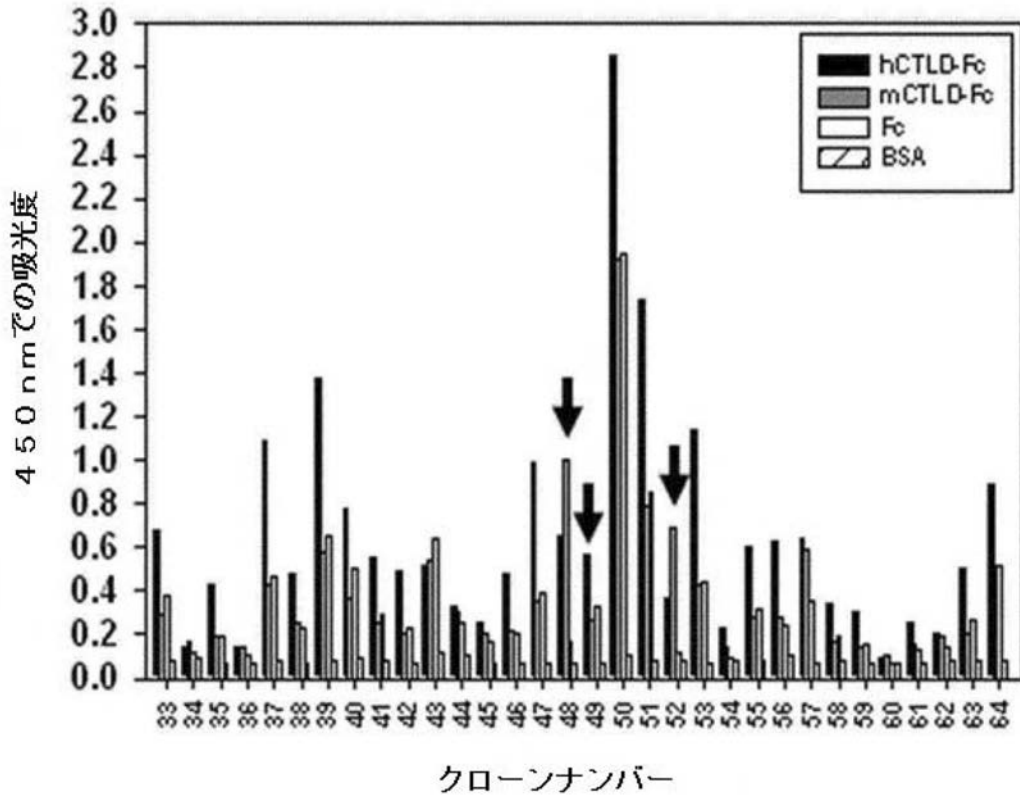
【図 3 A】



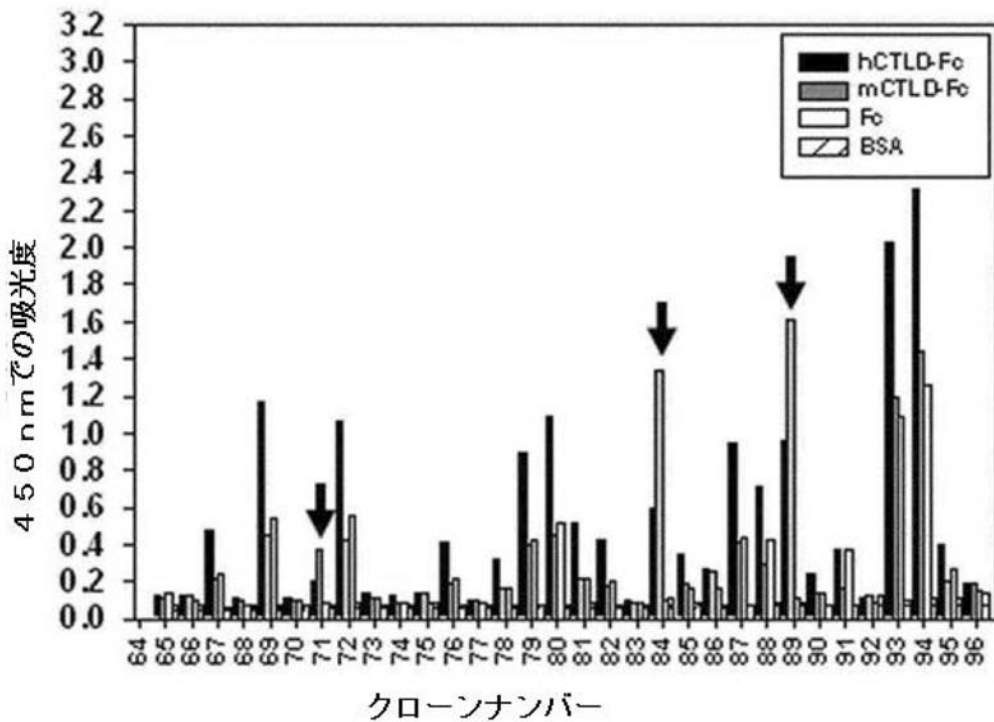
【図 3 B】



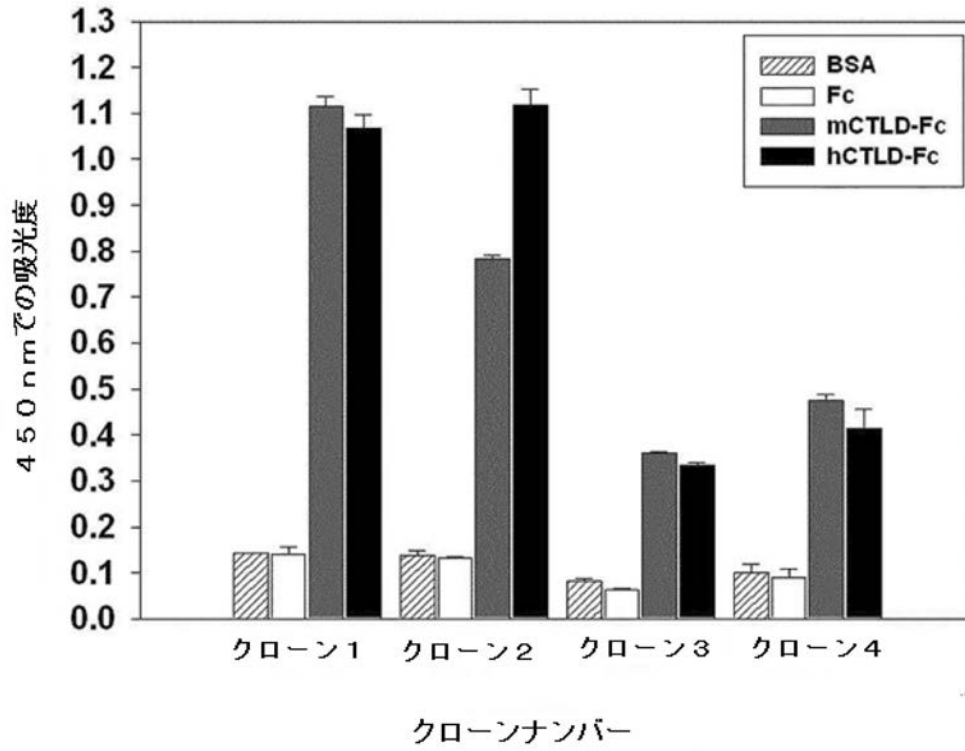
【 図 3 C 】



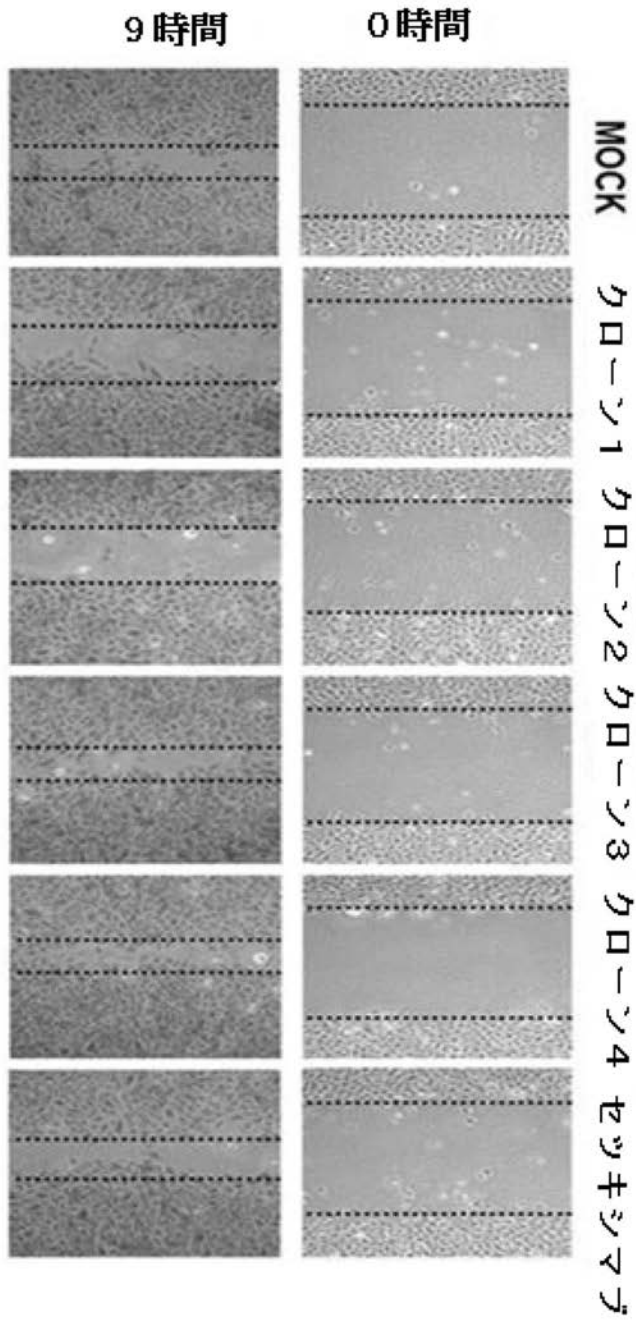
【 図 3 D 】



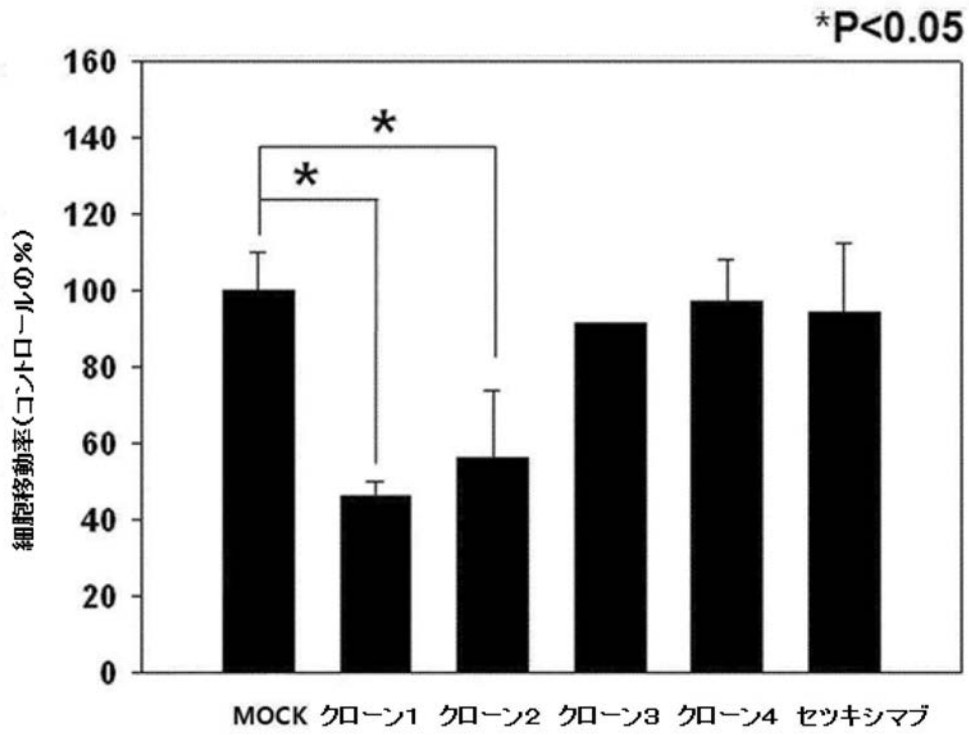
【 図 4 】



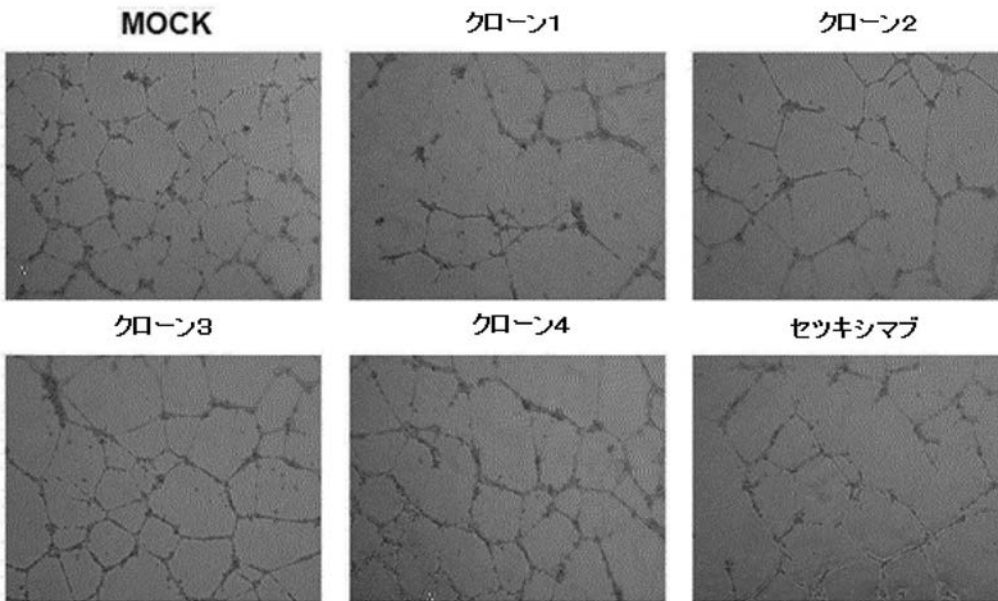
【図 5 A】



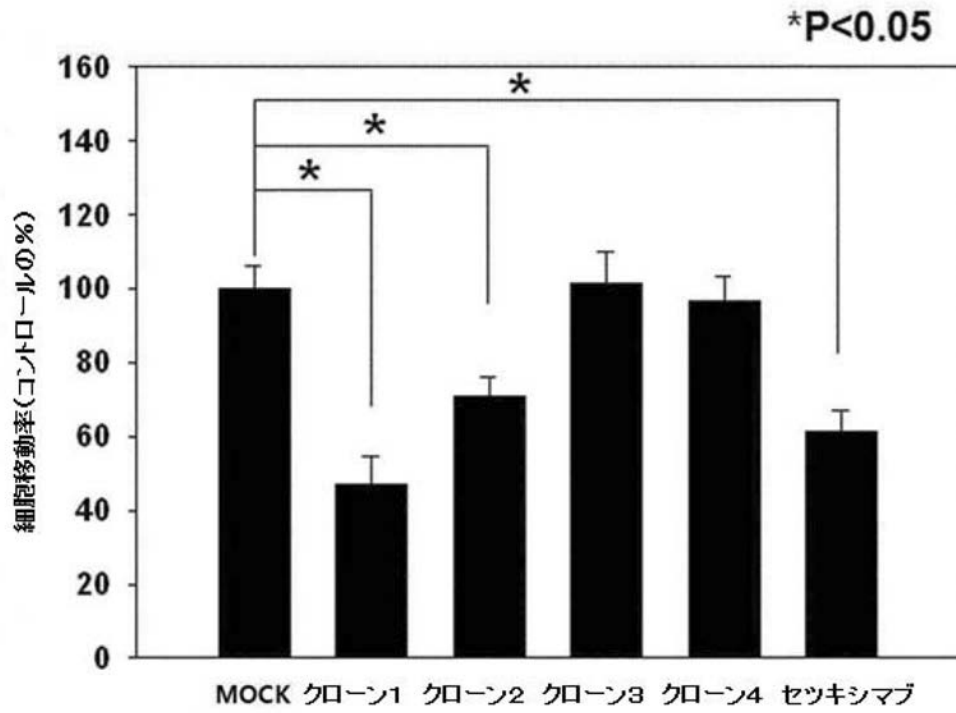
【 図 5 B 】



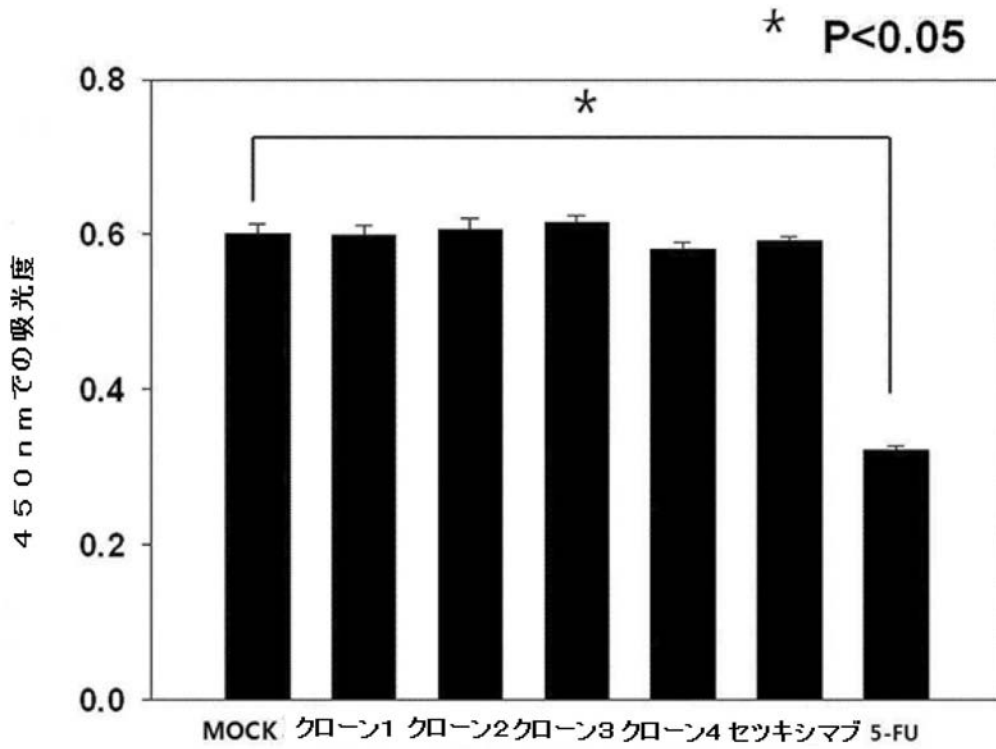
【 図 5 C 】



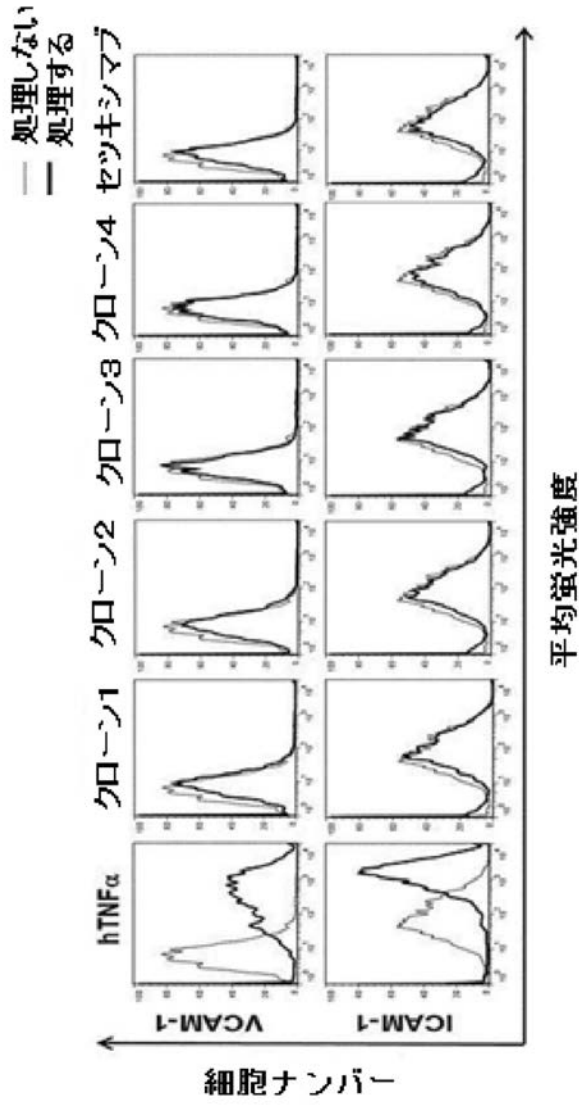
【 図 5 D 】



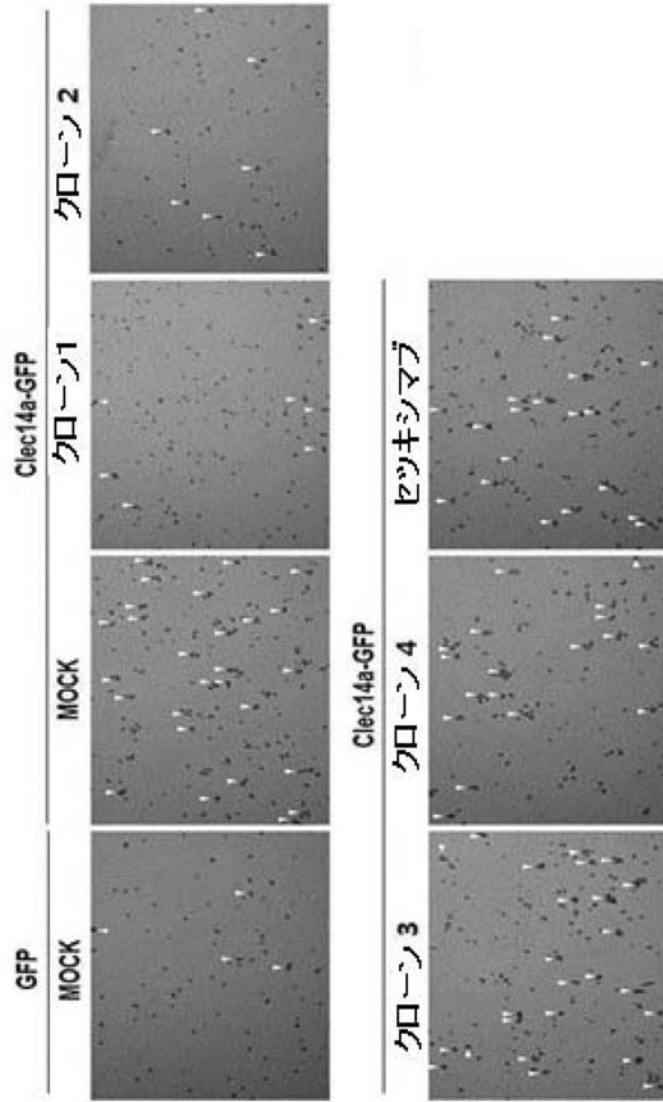
【 図 6 A 】



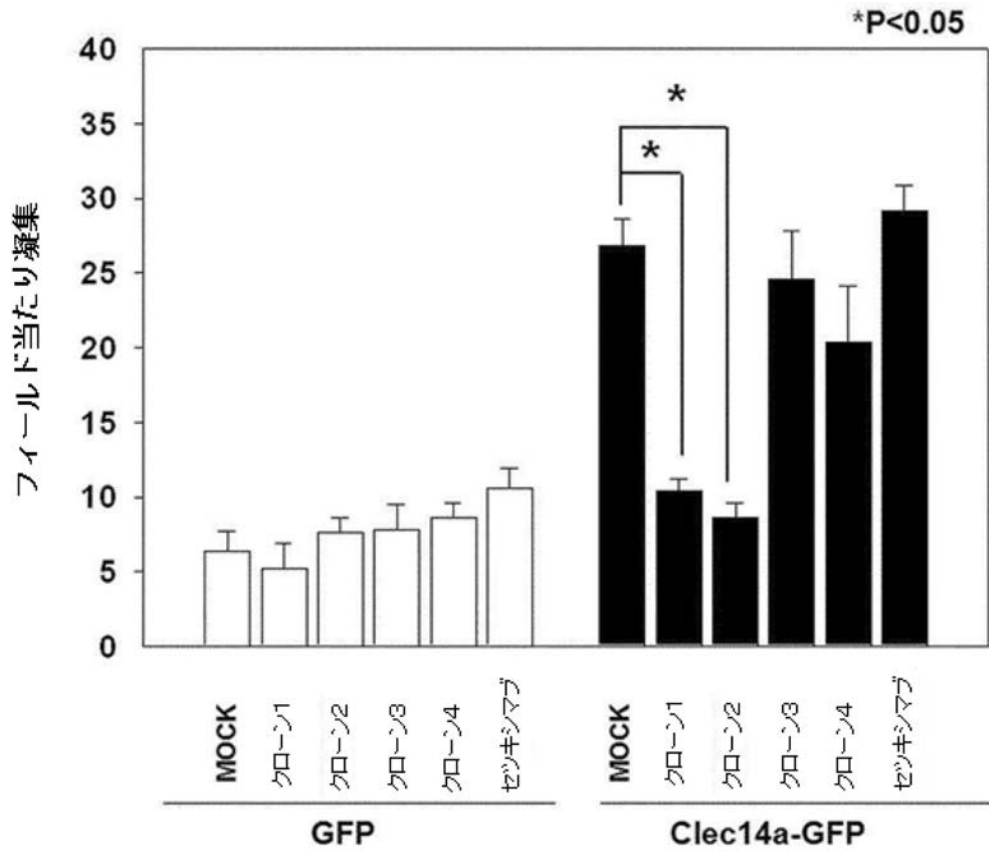
【図 6 B】



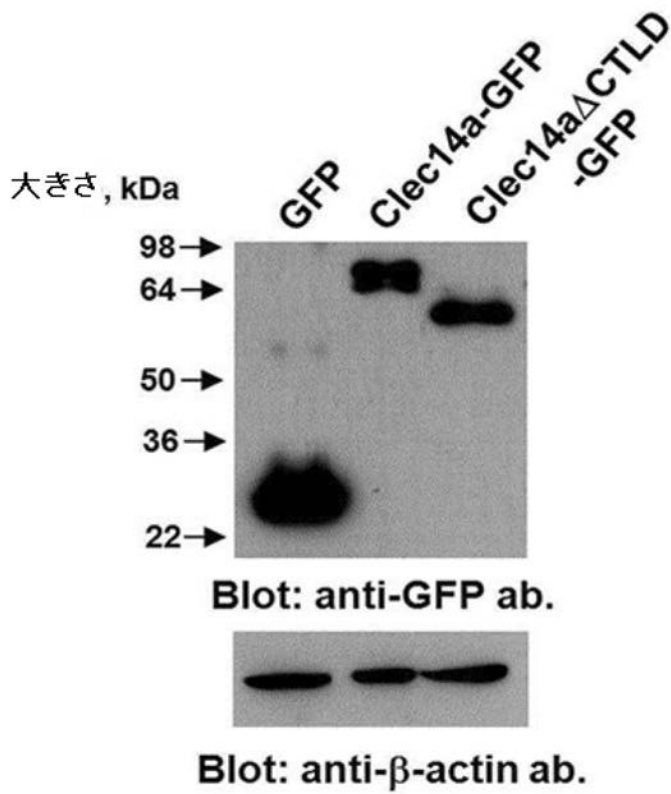
【 図 7 A 】



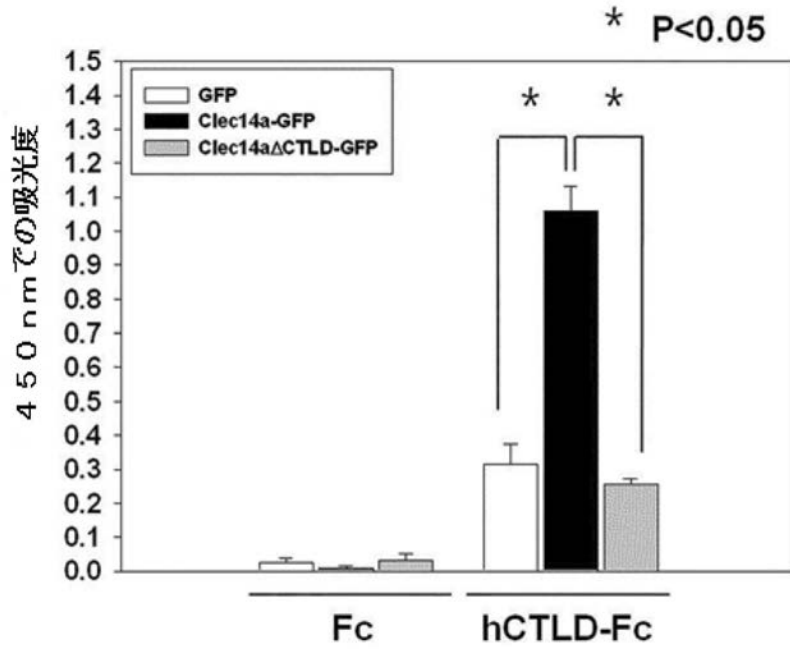
【 図 7 B 】



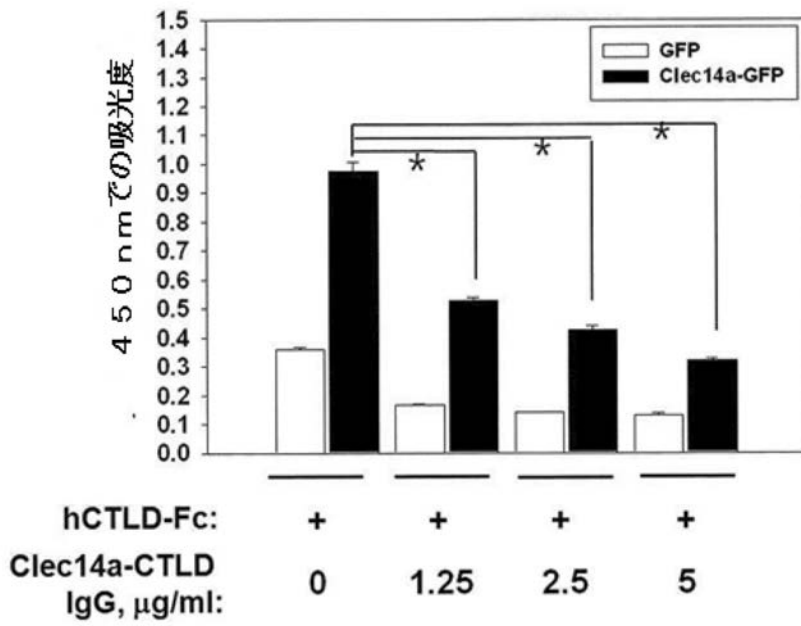
【 図 8 A 】



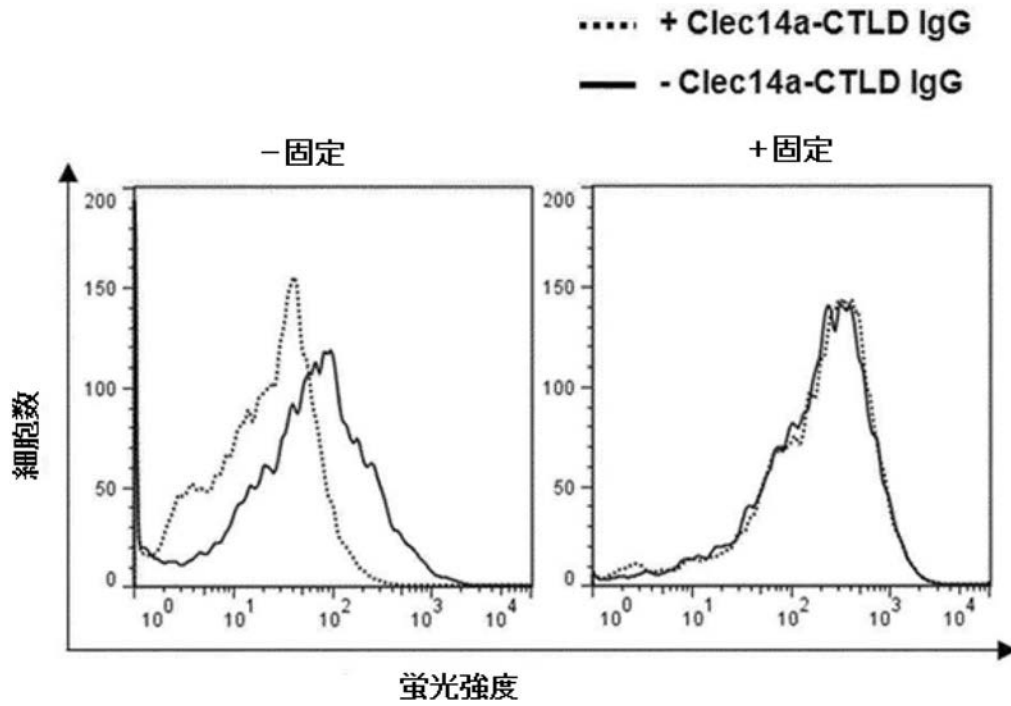
【 図 8 B 】



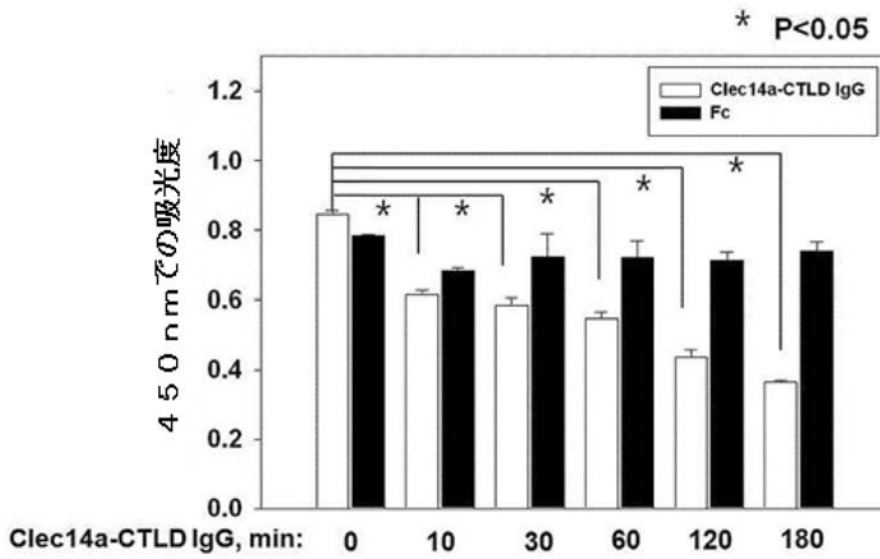
【 図 8 C 】



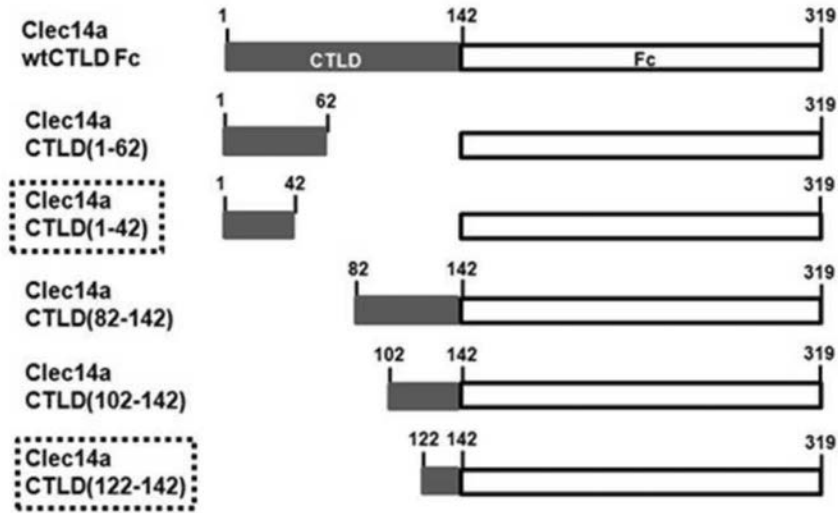
【 図 9 A 】



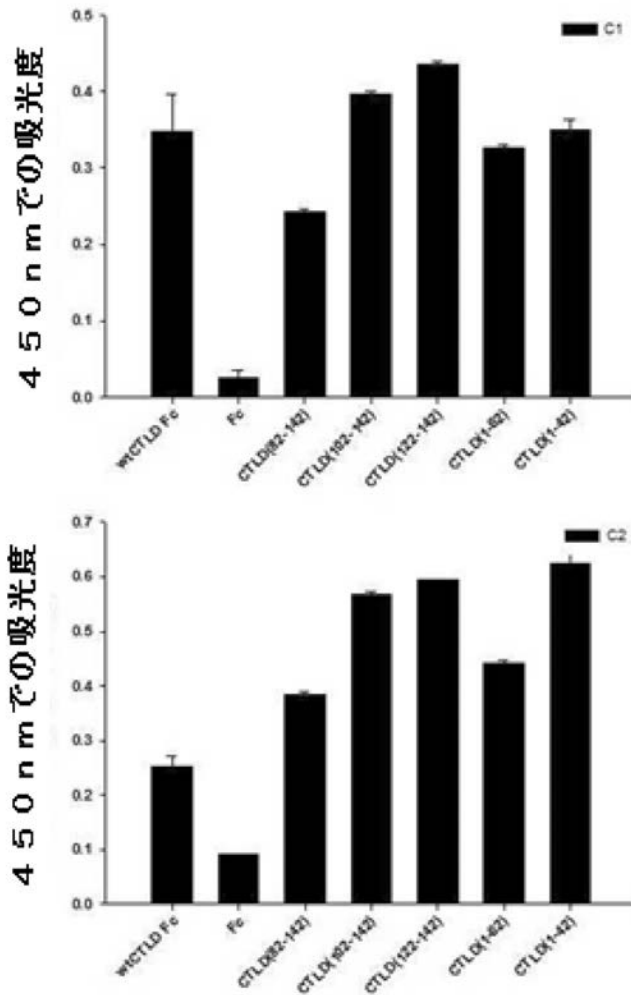
【 図 9 B 】



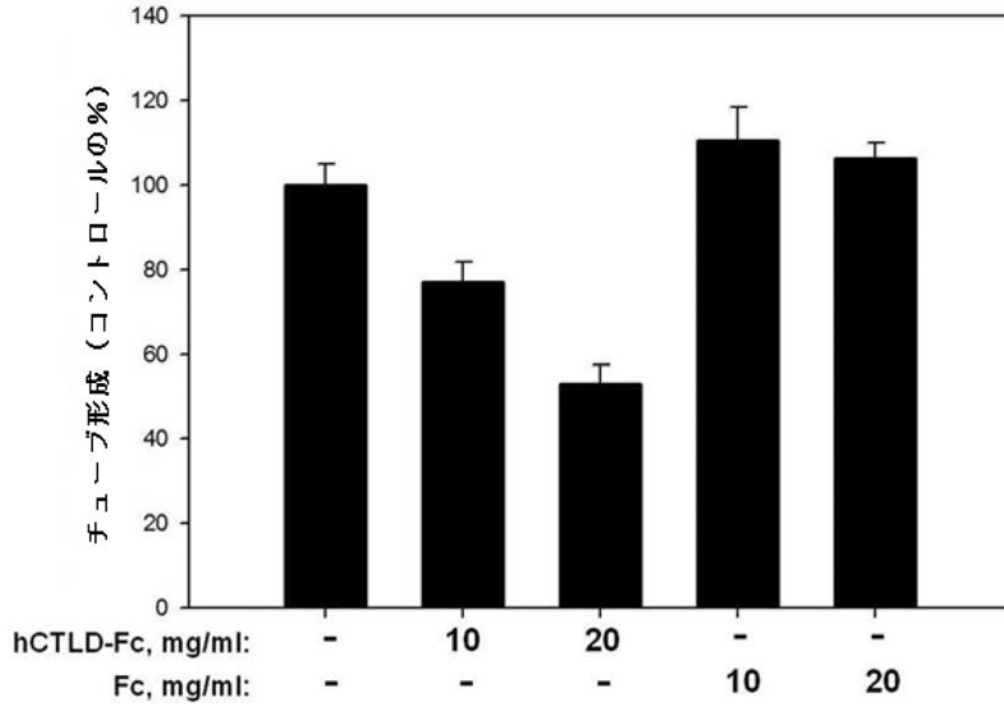
【 図 1 0 A 】



【 図 1 0 B 】



【 図 1 1 】



【 配列表 】

[201650328600001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2013/005272
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
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 16/28; A61K 39/395; G01N 33/53; C12Q 1/68; C12N 15/13; A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: clec14a, C-type lectin domain family 14 member A, CTLD, C-type lectin like domain, antibody, angiogenesis		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011-027132 A1 (CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED) 10 March 2011 See abstract; pages 2, lines 25-29; page 4, lines 19-30; page 7, lines 16-20; page 8, lines 16-25; page 10, lines 4-5; page 18, lines 11-26; pages 32-33; page 35, lines 10-15; and page 36, lines 21-35; claims 1-3, 10, 17-18 and 29.	1-3,5,6,13-15,17,18,27-33,35,37-40,42,43,45-50,53,54
A		4,7-12,16,19-22,44
X	MURA, M. et al., `Identification and angiogenic role of the novel tumor endothelial marker CLEC14A`, Oncogene, 27 June 2011, Vol. 31, No. 3, pp. 293-305, ISSN 0950-9232. See abstract; page 294, column left; page 298, column left, paragraphs 3-5.	1-3,6,18,42,43
A		4,5,7-17,19-22,27-33,35,37-40,44-50,53,54
X	RHO, SEUNG-SIK et al., `Clec14a is specifically expressed in endothelial cells and mediates cell to cell adhesion`, Biochemical and Biophysical Research Communications, 21 November 2010, Vol. 404, No. 1, pp. 103-108, ISSN 0006-291X. See abstract; page 105, column right; page 106, column left, paragraph 2.	1-3,6,18,42,43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 23 September 2013 (23.09.2013)		Date of mailing of the international search report 24 September 2013 (24.09.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2013/005272

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		4, 5, 7-17, 19-22 , 27-33, 35, 37-40 , 44-50, 53, 54
A	ZELENSKY, ALEX N. et al., `The C-type lectin-like domain superfamily` The FEBS Journal, December 2005, Vol. 272, No. 24, pp. 6179-6217, ISSN 1742-464X. See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	WO 2011-119980 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 29 September 2011 See abstract; claims 11 and 18.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. CAL05539.1 (14 November 2006) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. CAC43215.1 (1 July 2001) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. CAE45477.1 (1 June 2004) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. ABI50652.1 (28 August 2007) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. AAT84384.1 (1 April 2007) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. JN577822.1 (11 January 2012) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. XM_002115467.1 (12 August 2008) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
A	NCBI, GenBank accession no. AY423191.1 (24 May 2004) See the whole document.	1-22, 27-33, 35 , 37-40, 42-50, 53-54
PX	KI, M-K et al., `Human antibodies targeting the C-type lectin-like domain of the tumor endothelial cell marker clecl4a regulate angiogenic properties in vitro`, Oncogene, 6 May 2013, ISSN 0950-9232. See abstract; pages 2-7; Supplementary figure 1.	1-11, 13-18, 27-33 , 35, 37-40, 42-50 , 53-54
PA		12, 19-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/005272

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

on paper

in electronic form

b. time of filing or furnishing

contained in the international application as filed

filed together with the international application in electronic form

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/KR2013/005272

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 34,36,41,51,52,55
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 34, 36, 41, 51, 52 and 55 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: 23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
See Extra Sheet.
3. Claims Nos.: See Extra Sheet.
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/005272

Continuation of Box No. II:

- 2. Claim No.: 23

: Claim 23 relates to nucleotide sequences of SEQ ID NOs: 133-140. However, SEQ ID NO: 133 in the Sequence Listing is not a nucleotide sequence, but an amino acid sequence. Also, SEQ ID NOs: 135-140 are not listed in the Sequence Listing, nor are they disclosed in the description of the present invention. Therefore, claim 23 is unclear to make a meaningful search.

- 3. Claims Nos.: 24-26, 34, 36

NOTE: Claim 25 is worded in reference to "the vector of claim 20", but said vector has not been worded in claim 20. And claim 26 is worded in reference to "a host cell of claim 21", but said host cell has not been worded in claim 21. Judging from the description and claims, said vector and host cell have been worded in claims 24 and 25, respectively. Therefore, the International Search Report and the Written Opinion were established on the assumption that claims 25 and 26 refer to claims 24 and 25, respectively.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/005272

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011-027132 A1	10/03/2011	AU 2010-290989 A1	15/03/2012
		CA 2810119 A1	10/03/2011
		EP 2473529 A1	11/07/2012
		JP 2013-503842 A	04/02/2013
		US 2012-0276000 A1	01/11/2012
WO 2011-119980 A1	29/09/2011	CA 2794255 A1	29/09/2011
		EP 2550371 A1	30/01/2013
		US 2013-0143755 A1	06/06/2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
	A 6 1 P 9/00	
	G 0 1 N 33/53	D
	C 0 7 K 19/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, 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, PA, 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

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 イ スクムク

大韓民国, 1 3 4 - 0 3 0, ソウル, カンドン - グ, ソンネ - ドン, ソンアンマウル チョング
アパートメント, 1 0 2 - 1 2 0 6

(72)発明者 キ ミンギョン

大韓民国, 1 5 0 - 8 1 0, ソウル, ヨンドンポ - グ, タンサンドン 6カ, 3 4 7 - 4

(72)発明者 チュン ミヒョン

大韓民国, 2 0 0 - 1 1 2, カンウォン - ド, チュンチョン - シ, ソヤンノ 2 - ガ, 1 7 7 - 1
1

(72)発明者 チョイ ジョンリブ

大韓民国, 2 0 0 - 9 3 6, カンウォン - ド, チュンチョン - シ, ソクサ - ドン, 7 4 8 - 4

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA12 BA43 BA53 BA63 CA02 CA09 DA03 EA04

GA11

4B064 AG27 AG28 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13 DA14

4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C085 AA13 AA14 AA21 AA25 AA26 AA27 BB01 BB11 CC23 DD62

EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA50 DA76 EA28 EA50 EA51 FA74

专利名称(译)	具有CLEC14A特异性的新型抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2016503286A	公开(公告)日	2016-02-04
申请号	JP2015517188	申请日	2013-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	以股代息矿渣反身研究所 斯克里普斯抗体研究所		
申请(专利权)人(译)	斯克里普斯韩国反身研究所		
[标]发明人	イスクムク キミンギョン チュンミヒョン チョイジョンリップ		
发明人	イスクムク キミンギョン チュンミヒョン チョイジョンリップ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K14/705 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P9/00 G01N33/53 C07K19/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P13/12 A61P17/02 A61P17/06 A61P27/06 A61P29/00 A61K47/6843 C07K14/7056 C07K16/2851 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/30 C07K2317/565 G01N2333/7056 C07K7/08 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/53		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/08 C07K14/705 A61K39/395.T A61K39/395.L A61K39/395.C A61K39/395.E A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P9/00 G01N33/53.D C07K19/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA43 4B024/BA53 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B064/AG27 4B064/AG28 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	森田健一 山口健次郎		
优先权	61/659654 2012-06-14 US PCT/KR2012/008618 2012-10-19 WO		
其他公开文献	JP6129305B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及特异性结合clec14a (C型凝集素结构域家族14, 成员A) 的新型抗体。 更具体地, 本发明涉及与clec14a的CTLD (C型凝集素样结构域) 特异性结合的抗体, 该抗体的制造方法, 包含该抗体的血管生成抑制组合物, 该抗体或组合物。 给予抑制血管生成的物质, 用于预防或治疗含有该抗体的癌症的组合物, 通过给予该抗体或该组合物治疗癌症的方法以及用于诊断含有该抗体的癌症的组合物, 包含该组合物的癌症诊断试剂盒, 使用该组合物的癌症诊断方法, 包含抑制clec14a表达的物质的用于抑制血管生成

的组合物，包含该组合物的血管生成试剂盒，用该组合物抑制血管生成或治疗癌症的方法技术领域本发明涉及使用该组合物抑制血管生成或治疗癌症的方法，以及clec14a的CTLD作为抑制血管生成的抗体的表位的用途。该抗体可有效抑制cle14a介导的癌症进展。

(21) 出願番号	特願2015-517188 (P2015-517188)	(71) 出願人	514319696
(86) (22) 出願日	平成25年6月14日 (2013. 6. 14)		スクリップス コリア アンチボディ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月16日 (2015. 2. 16)		SCRIPPS KOREA ANTIBODY INSTITUTE
(86) 国際出願番号	PCT/KR2013/005272		大韓民国, 200-701, 칸웅온드, चुन्छुन्छुन्छु, 칸웅온드하ク-ギル, 1
(87) 国際公開番号	WO2013/187724		
(87) 国際公開日	平成25年12月19日 (2013. 12. 19)		
(31) 優先権主張番号	61/659, 654		
(32) 優先日	平成24年6月14日 (2012. 6. 14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100090251
(31) 優先権主張番号	PCT/KR2012/008618		弁理士 森田 憲一
(32) 優先日	平成24年10月19日 (2012. 10. 19)	(74) 代理人	100139594
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		弁理士 山口 健次郎
		(74) 代理人	100185915
			弁理士 長山 弘典

最終頁に続く