

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5838486号
(P5838486)

(45) 発行日 平成28年1月6日(2016.1.6)

(24) 登録日 平成27年11月20日(2015.11.20)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/44 (2006.01)	C O 7 K 16/44 Z N A
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 L
請求項の数 13 (全 45 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2014-505086 (P2014-505086)	(73) 特許権者	513246872
(86) (22) 出願日	平成24年4月16日(2012.4.16)		ソウル大学校産学協力団
(65) 公表番号	特表2014-517819 (P2014-517819A)		S N U R & D B F O U N D A T I O N
(43) 公表日	平成26年7月24日(2014.7.24)		大韓民国 1 5 1 - 0 1 5 ソウル クア
(86) 国際出願番号	PCT/KR2012/002873		ナック クアナックロ 1
(87) 国際公開番号	W02012/141554	(74) 代理人	100121728
(87) 国際公開日	平成24年10月18日(2012.10.18)		弁理士 井関 勝守
審査請求日	平成25年11月20日(2013.11.20)	(74) 代理人	100129997
(31) 優先権主張番号	61/476,018		弁理士 田中 米藏
(32) 優先日	平成23年4月15日(2011.4.15)	(72) 発明者	チョン ジュンホ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		大韓民国 4 6 3 - 8 6 2 ギョンギド
			ソンナムシ ブンダング ソヒョンロ17
			O ティー1801
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コチニンと接合物質との接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体であって、
前記接合物質がペプチド、アプタマー、抗体、ホルモン、および化学物質からなる群より選択されることを特徴とする複合体。

【請求項 2】

前記接合物質は、W K Y M V m - N H ₂ ペプチド、A S 1 4 1 1 アプタマー、ペガブタニブ、アブシキシマブおよびインスリンからなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 3】

前記接合物質は、コチニンと P E G リンカーまたはアミノ C 6 リンカーで接続されることを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 4】

前記接合体は、抗-コチニン抗体の抗原結合部位に結合されたことを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 5】

前記抗-コチニン抗体は、前記抗体と、F a b、S c F v およびドメイン抗体から選択される抗体分節と、前記抗体および抗体分節とを構成成分として含んでいる複合タンパク質 (f u s i o n p r o t e i n) からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 6】

前記接合物質の生体内半減期 (in vivo half-life) を増加させることを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 7】

補体依存性毒性 (complement-mediated cell cytotoxicity、CDC) を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 8】

抗体依存性細胞毒性 (antibody-dependent cell cytotoxicity、ADCC) を有することを特徴とする、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 9】

生体外生物学的分析方法 (in vitro biological assay) において、コチニンと接合物質との接合体を分析ツールとして用いることを特徴とする方法であって、

前記接合物質がペプチド、アプタマー、抗体、ホルモン、および化学物質からなる群より選択されることを特徴とする方法。

【請求項 10】

前記生体外の生物学的分析方法は、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット分析法、免疫沈降分析法および酵素-リンクされた免疫化学分析法からなる群より選択されることを特徴とする、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

コチニンと接合物質との接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体の製造方法であって、

前記接合物質をコチニンと結合させた複合体に前記抗-コチニン抗体を結合させることを含み、

前記接合物質がペプチド、アプタマー、抗体、ホルモン、および化学物質からなる群より選択されることを特徴とする、製造方法。

【請求項 12】

前記接合物質の生体内半減期 (in vivo half-life) を増加させることを特徴とする、請求項 11 に記載の製造方法。

【請求項 13】

前記接合物質は、WKYMVm-NH₂、ペプチド、AS1411 アプタマー、ペガブタニブ、アブシキシマブおよびインスリンからなる群より選択されることを特徴とする、請求項 11 に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体およびその用途に関するものである。

【背景技術】

【0002】

数多いペプチドおよびアプタマーバイオ医薬品は、候補薬物 (drug candidate) として有望な特性を持っているが、タンパク質分解酵素 (proteinase)、ペプチド分解酵素 (peptidase) および核酸分解酵素 (nuclease) などによって体内で容易に分解されるか、または腎臓を介して急速に排出されるため、数分乃至数時間程度と、体内半減期が短いことが知られている (非特許文献 1)。このような不安定性および短い薬効持続時間による問題点を解決するために、一般的にポリエチレングリコール (polyethylene glycol、PEG) を結合させ (非特許文献 2)、体内の酵素による分解を阻害し、腎臓と血管における吸収を抑制して、血中滞留時間を延長する技術が実施されている。しかし、このようなペグ化は時間が長くなり、接合物質に応じて特定の最適化 (specific optimization) を必要

10

20

30

40

50

とするだけでなく、PEGが非常に異質的(heterogeneous)に接合するため、様々な分子結合体が生成されるという問題がある。

【0003】

新規の伝達プラットフォーム(Novel delivery platform)として使用するための目的に照らしてみると、ハプテン(hapten)は、動物とヒトに必ず無毒でなければならず、生理的活性があってはならないという条件を満たさなければならない。コチニン(cotinine)は、ニコチンの主要代謝産物であって、人類は長い間ニコチンにさらされてきた。したがって、コチニンは、新規の伝達プラットフォームに適用するのに適したハプテンである。また、コチニンは、マウスにおけるLD₅₀が2g/kg - 4g/kg程度と、比較的安全性の高い物質であり(非特許文献3)、1日に1.8gずつ4日間服用した場合でも、特別な副作用は報告されなかった(非特許文献4)。また、哺乳動物においてコチニンの代謝過程は明らかにされており、血清半減期が約16時間であることもよく知られている(非特許文献5)。加えて、人間にとってコチニンは生理活性を示さず、3日間、最大160mgのコチニンを吸収しても、生理的および行動の如何なる変化も報告されたことがない(非特許文献6)。

【0004】

一方、アプタマーは、特異的で三次元的な形で組むことができ、抗体のように、ターゲットと親和性高く特異的結合が可能なので、様々な分析や実験に使用されてきた。アプタマーを用いた抗体との複合体を調製する従来の方法は、主にアプタマーをビオチン(biotin)およびジグオキシゲニン(digoxigenin)に接合させることによりアビジン(avidin)および抗-ジグオキシゲニン抗体と複合体を構成する方式であった。

【0005】

本発明者らは、コチニンをハプテンとして用いて接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体を調製し、前記複合体が結合物質の特異的反応性および生物学的機能と、抗体の固有特性である、補体媒介細胞毒性(complement-mediated cell cytotoxicity、CDC)、抗体依存性細胞毒性(antibody-dependent cell cytotoxicity、ADCC)および長い生体内半減期を保持することを発見し本発明を完成した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Sato A.K. et al., Curr Opin Biotechnol, 17, 638-642, 2006

【非特許文献2】Veronese, F.M. & Pasut G., Drug Discov Today, 10, 1451-1458, 2005

【非特許文献3】Riah O. et al., Toxicol.Lett., 109, 21-29, 1999

【非特許文献4】Bowman, E.R. & Mc, K.H., Jr., J. Pharmacol. Exp. Ther., 135, 306-311, 1962

【非特許文献5】Benowitz N.L. et al., 3rd Handb. Exp. Pharmacol., 29-60, 2009

【非特許文献6】Benowitz N.L. et al., 3rd Handb. Exp. Pharmacol., 29-60, 2009

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、本発明の目的は、接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体を提供することである。

【0008】

本発明の他の目的は、生体外の生物学的分析方法(in vitro biological assay)において、コチニンと接合物質との接合体を分析ツールとして使用することを特徴とする方法を提供することである。

【0009】

本発明のまた他の目的は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗-コチニン抗体

を結合させることにより、前記接合物質の生体内半減期を増加させる方法を提供することである。

【 0 0 1 0 】

本発明のまた他の目的は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質が結合する細胞に補体依存性の毒性を引き起こす方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明のまた他の目的は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質が結合する細胞に抗体依存性細胞毒性を引き起こす方法を提供することである。

10

【 0 0 1 2 】

本発明のまた他の目的は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質の体内分布を一般的な抗体の体内分布の様相に変化させることを特徴とする方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 3 】

前記目的を達成するために、本発明は、接合物質とコチニンとの接合体に抗 - コチニン抗体が結合した複合体を提供する。

【 0 0 1 4 】

前記他の目的を達成するために、本発明は、生体外の生物学的分析方法において、コチニンと接合物質との接合体を分析ツールとして使用することを特徴とする方法を提供する。

20

【 0 0 1 5 】

前記また他の目的を達成するために、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質の生体内半減期を増加させる方法を提供する。

【 0 0 1 6 】

前記また他の目的を達成するために、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質が結合する細胞に補体依存性毒性を引き起こす方法を提供する。

30

【 0 0 1 7 】

前記また他の目的を達成するために、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質が結合する細胞に抗体依存性細胞毒性を引き起こす方法を提供する。

【 0 0 1 8 】

前記また他の目的を達成するために、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質の体内分布を一般的な抗体の体内分布の様相に変化させることを特徴とする方法を提供する。

【 0 0 1 9 】

本発明における上述のものおよび他の目的並びに特徴は、添付の図面とともに以下の説明から明らかになることである。

40

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 0 】

【図 1】図 1 は、実施例 2 で精製された抗 - コチニン抗体に対してクーマシー染色を行ったゲルの写真である。

【図 2】図 2 は、実施例 (3 - 1) で合成したコチニン - W K Y M V m - N H ₂ 接合体の構造式を示す。

【図 3】図 3 は、実施例 (3 - 2) で合成したコチニン - A S 1 4 1 1 およびコチニン - ペガプタニブ接合体の構造式を示す。

【図 4】図 4 は、試験例 1 で行ったコチニンに対する抗 - コチニン I g G 抗体の親和性を

50

分析したグラフを示す。

【図5】図5は、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の F P R 2 細胞受容体に対する特異的結合力を示すグラフを示す。

【図6】図6は、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の細胞内カルシウム濃度変化の分析結果を示す。

【図7】図7は、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体のスーパーオキシド発生程度の分析結果を示す。

【図8】図8は、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の走化性分析の結果を示す。

【図9】図9は、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ 接合体およびコチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の、マウスにおける体内半減期を比較したグラフとヒストグラムを示す。

10

【図10】図10は、抗 - コチニン I g G の血清中の体内半減期を示したグラフである。

【図11】図11は、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の敗血症モデルにおける改善された治療効果を示すグラフである。

【図12】図12は、マウスにおいて、コチニン - ペガプタニブ接合体およびコチニン - ペガプタニブ / 抗 - コチニン I g G 複合体の体内半減期を比較したグラフである。

【図13】図13は、コチニン - A S 1 4 1 1 / 抗 - コチニン I g G 複合体の、ヌクレオリン細胞受容体に対する特異的結合力の試験結果を示す。

【図14】図14は、コチニン - A S 1 4 1 1 / 抗 - コチニン I g G 複合体の、ヌクレオリン細胞受容体に対する特異的結合力の試験結果を示す。

20

【図15】図15は、コチニン - A S 1 4 1 1 / 抗 - コチニン I g G 複合体をウェスタンブロッティングした結果である。

【図16】図16は、コチニン - A S 1 4 1 1 / 抗 - コチニン I g G 複合体を利用したヌクレオリンの免疫沈降試験の結果を示す。

【図17】図17は、コチニン - ペガプタニブ / 抗 - コチニン I g G 複合体の、V E G F に対する結合性を示すグラフである。

【図18】図18は、アブシキシマブ、アブシキシマブ - コチニン接合体、およびコチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン I g G 複合体のインテグリンアルファ2 b ベータ3 に対する反応性を示したグラフである。

30

【図19】図19は、コチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン I g G 複合体の、血小板に対する結合力の試験結果を示す。

【図20】図20は、コチニン - インスリン / 抗 - コチニン抗体複合体の、M C F - 7 および S K - B r - 3 細胞に対する結合力の試験結果を示す。

【図21】図21は、コチニン - インスリン / 抗 - コチニン抗体複合体の補体依存性毒性の分析結果を示す。

【図22】図22は、接合物質とコチニンとの接合体に抗 - コチニン抗体が結合した複合体を示すものである。

【図23】図23は、細胞培養液から、ヒト補体 C 5 の S c F v 抗体を精製するためにプロテインA アガロースを用いた親和性クロマトグラフィーを行った結果を示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下、本発明についてより詳細に説明する。

【0022】

本明細書において「抗体」は、免疫系内の抗原の刺激によって作られる物質を意味するもので、その種類は特に限定されない。本明細書中において抗体は、動物抗体、キメラ (chimeric) 抗体、ヒト化抗体または完全ヒト抗体の全てを含む。また、本明細書中において抗体とは、抗原結合能を有する抗体の断片、例えば、F a b も含む。

【0023】

本明細書において「キメラ抗体」とは、抗体の可変領域 (variable regi

50

on) またはその相補性決定領域 (complementarity-determining region、CDR) が抗体の残りの部分と異なる動物から由来した抗体を指す。このような抗体は、例えば、抗体可変領域はヒト以外の動物 (例えば、マウス、ウサギ、家禽類など) に由来し、抗体不変領域 (constant region) は、ヒトに由来する抗体であり得る。このようなキメラ抗体は、当業界に公知の遺伝子組換えなどの方法で調製することができる。

【0024】

本明細書において「重鎖」は、抗原に対する特異性を付与するために十分な可変領域のアミノ酸配列を含む可変領域ドメイン V_H および3つの不変領域ドメインである CH_1 、 CH_2 および CH_3 を含む完全長重鎖およびその断片すべてを指す。

10

【0025】

本明細書において「軽鎖」は、抗原に特異性を付与するために十分な可変領域のアミノ酸配列を含む可変領域ドメイン V_L および不変領域ドメイン C_L を含む完全長軽鎖およびその断片すべてを指す。

【0026】

本明細書において「相補性決定領域」は、抗体の可変領域中の抗原との結合特異性を付与する部位を意味する。

【0027】

本明細書において「接合体」とは、異種性分子として、ポリマー分子、親油性化合物、炭水化物部分または有機誘導体化剤 (derivatizing agent) のような一つ以上の非ポリペプチド部分、特にポリマー部分に1つ以上のポリペプチド、典型的には一つのポリペプチドを共有結合的に付着させて作ることができる。さらに、接合体は、一つ以上の炭水化物部分に、特にN-またはO-グリコシル化を利用して付着できる。共有結合的に付着させるという意味は、ポリペプチドおよび非ポリペプチド部分を互いに直接共有結合させたり、リンキングブリッジ (linking bridge)、スペース、リンキングパート (linking part)、または仲介部分などを介して、互に間接的に共有結合的に結合されることを意味する。例えば、本明細書に開示された接合物質をコチニンと接合させた接合体がこの定義に含まれる。

20

【0028】

本発明は、接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体を提供する (図22)。

30

【0029】

また、本発明は、生体外生物学的分析方法 (in vitro biological assay) において、コチニンと接合物質との接合体を分析ツールとして使用することを特徴とする方法を提供する。前記生体外生物学的分析方法は、フローサイトメトリー、ウェスタンブロット分析法、免疫沈降分析法および酵素-リンクされた免疫化学分析法からなる群より選択されることを特徴とする。

【0030】

本発明による接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体は、コチニンをハプテンとして利用することにより、接合物質および抗体固有の特性全てを保持することができる。具体的に前記複合体は、分子の特異的反応性および機能と、抗体の特性である、補体-媒介細胞毒性 (CDC)、抗体-依存性細胞毒性 (ADCC) および長い生体内半減期を保持することができる。

40

【0031】

したがって、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗-コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質の生体内半減期を増加させる方法を提供する。

【0032】

また、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗-コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質が結合する細胞に補体依存性毒性を引き起こす方法を提供する。

50

【0033】

また、本発明は、コチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質が結合する細胞に抗体依存性細胞毒性を引き起こす方法を提供する。

【0034】

また、本発明は、接合物質をコチニンと接合させた接合体に抗 - コチニン抗体を結合させることにより、前記接合物質の体内分布を一般的な抗体の体内分布の様相に変化させることを特徴とする方法を提供する。

【0035】

本発明の複合体は、一種の抗体とコチニンからなるため、単に短い配列の接合物質をコチニンに接合させることにより調製することができるので、高集約的であり、開発が容易で簡単な形態の伝達プラットフォームとして作用することができる。

10

【0036】

したがって、本発明による複合体は、コチニンに接合された接合物質によって抗原反応性 (antigenic reactivity) が決定される新規抗体であり、分子固有の生物学的または化学的機能を示す治療用抗体として使用することができる。

【0037】

コチニンは、タバコの煙の主成分であるニコチンの主要代謝産物であり、人間が長年タバコの煙に長時間さらされてきたにもかかわらず、非常に少量の即時毒性のみがこれまで報告されてきたため、非常に安定した分子として知られている。コチニンのこのような相対的非毒性特徴は、コチニンが生体内 (in vivo) で使用される理想的分子用接合体になるように働く。本発明では、コチニンを接合物質と接合させることにより、前記接合物質の短い半減期をはるかに向上させることができる。

20

【0038】

本発明において接合物質とは、特定の治療活性または結合反応性等を示す様々な生物学的、化学的物質であり得る。

【0039】

前記接合物質は、例えば、ペプチド、アプタマー、ホルモン、タンパク質および化学物質からなる群より選択することができ、好ましくは、WKYVMV_m-NH₂ ペプチド (WKYVMV_m-NH₂)、wkymvm-NH₂ ペプチド (wkymvm-NH₂)、AS1411 アプタマー、ペガプタニブ (pegaptanib)、アブシキシマブ (abciximab) およびインスリンからなる群より選択することができる。

30

【0040】

本発明において、接合物質として使用することができるアブシキシマブ (ReoPro (登録商標)) は、血小板の表面にて広範囲に発現されるインテグリンアルファ2bベータ3 (integrin alpha2b beta3) に反応性を示すマウス/ヒトキメラFabである。

【0041】

本発明の一実施態様によると、前記アブシキシマブをコチニンと接合させて調製したコチニン - アブシキシマブ接合体、および抗 - コチニン抗体を含む複合体 (以下、コチニン - アブシキシマブ/抗 - コチニン抗体複合体) を調製することができ、前記複合体は、インテグリンアルファ2bベータ3および血小板に対してアブシキシマブと同じレベルで反応性を維持することが分かる (本願試験例9、図18および図19を参照)。

40

【0042】

本発明において接合物質として使用することができるインスリンは、生体内において炭水化物と脂肪の物質代謝を調節するのに重要なホルモンである。インスリンは、2種のポリペプチド鎖で構成され、21個のアミノ酸残基で構成されるA鎖内に一つの細胞間分子ジスルフィド結合 (intra molecular disulfide bond)、および30個のアミノ酸残基で構成されるB鎖にA鎖を接続する2つの細胞内分子ジスルフィド結合 (inter-molecular disulfide bond) を持つ (Nicoll DS、Smith、LF、Nature 1960 Aug 6、1

50

87:483-5、PubMed PMID:14426955)。

【0043】

本発明の一実施態様によると、前記インスリンをコチニンと接合させて調製したコチニン-インスリン接合体、および抗-コチニン抗体を含む複合体(以下、コチニン-インスリン/抗-コチニン抗体複合体)を調製することができ、前記複合体がインスリン受容体を発現する細胞に対して、インスリンの受容体結合力を維持することが分かる(本願試験例10、図20および図21を参照)。

【0044】

本発明において、接合物質として使用することができるWKYMVm-NH₂ペプチドは、抗-敗血症の治療学的ペプチドとして、ホルミルペプチド受容体(Formyl peptide receptors、FPRs)に対する拮抗剤であり、貪食細胞(phagocyte)にて化学走性移動(chemotactic migration)を誘導し、単核細胞(monocyte)と好中球(neutrophil)のスーパーオキシド(superoxide)の発生を増加させ抗生作用をする。

【0045】

本発明の一実施態様によると、前記WKYMVm-NH₂ペプチドをコチニンと接合させて調製したコチニン-WKYMVm-NH₂接合体(図2)および抗-コチニン抗体を含む複合体(以下、コチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニン抗体複合体)を調製することができる。具体的には、前記のWKYMVm-NH₂ペプチド(文献[Baek SH、et al.、J Biol Chem.、1996 Apr 5、271(14):8170-5。PubMed PMID:8626507]および[Kim SD、et al.、J Immunol、2009 Nov 1、183(9):5511-7。PubMed PMID:19843937]参照)は、PEG(mini-PEG)をリンカーとして用いてコチニンと結合する。以後、抗-コチニン抗体(Park S、et al.、Clin Chim Acta 2010 Sep 6、411(17~18):1238-42。Epub 2010 May 11 PubMed PMID:20438723)と複合体を形成することができる。

【0046】

このように調製された本発明の複合体は、フローサイトメトリー分析(flow cytometry analysis)においてホルミルペプチド受容体を発現する細胞に対して反応性を示し、これによりWKYMVm-NH₂の結合力が保持されたことが分かる(図5参照)。また、コチニン-WKYMVm-NH₂接合体が細胞からカルシウムを正常に放出することから、コチニンと接合した後も、WKYMVm-NH₂の生物学的機能は保持されたことが分かる(図6~図8を参照)。さらに、敗血症マウスモデルにおいて、前記コチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニン抗体複合体を投与した群は、服用-依存的な方法(dose-dependent manner)で敗血症からマウスを回復させたことに対し、コチニン-WKYMVm-NH₂接合体のみを単独で投与した群では効果を示さなかった。このような結果は、前記複体内においてWKYMVm-NH₂ペプチドの生物学的治療効果が保持されているだけでなく、前記抗-コチニン抗体の生体内における長い半減期によってコチニン-WKYMVm-NH₂接合体の半減期が延長されたことを示す(図9参照)。

【0047】

本発明において、接合物質として使用することができるペガブタニブは、PEG化された抗-VEGFアプタマーとして、血管新生に重要な役割を果たすVEGF165に結合する。

【0048】

本発明の一実施態様によると、前記ペガブタニブの核酸部分をコチニンと接合させて調製したコチニン-ペガブタニブの接合体(図3参照)、および抗-コチニン抗体を含む複合体(以下、コチニン-ペガブタニブ/抗-コチニン抗体複合体)を調製することができ、前記複合体は、生体内半減期が非常に向上することが分かる(本願試験例7を参照)。

【0049】

本発明において接合物質として使用することができるAS1411アプタマーは、G-richオリゴヌクレオチドであって、がん細胞の表面に発現するヌクレオリン(nucleolin)に結合してがん細胞内に吸収(uptake)され、DNAの複製や細胞増殖などのヌクレオリンの正常な機能を破壊する特徴がある。

【0050】

本発明では、前記アプタマーの5'にコチニンを接合させることにより、抗体と安定した複合体とを形成することができる。本発明の一実施態様によると、前記AS1411をコチニンと接合させて調製したコチニン-AS1411の接合体(図3参照)、および抗-コチニン抗体を含む複合体(以下、コチニン-AS1411/抗-コチニン抗体複合体)を調製することができ、前記複合体はAS1411アプタマーと同様、VEGFに対する結合力を保持することが分かる(本願試験例8を参照)。

10

【0051】

本発明において前記接合物質は、コチニンとPEGリンカー(ミニPEG-12)またはアミノC6リンカーで接続されることを特徴とする。

【0052】

前記コチニンと接合物質との接合体は、抗-コチニン抗体に結合することにより、本発明の複合体を形成するが、この際、接合体は、抗体の重鎖または軽鎖に結合することができ、特に抗-コチニン抗体の抗原結合部位に結合することが望ましい。

【0053】

一方、本発明において抗-コチニン抗体は、高親和性の抗-コチニンFab抗体(米国特許US8,008,448 B2参照)をIgGの形態で調製および発現した抗体を使用することができる。

20

【0054】

例えば、前記抗-コチニン抗体は、以下のような方法によって調製することができる。前記米国特許US8,008,448号に記載された方法を変えることによって調製した軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子をそれぞれ発現ベクター(例えば、pcDNA3.1)に挿入する。続いて、哺乳動物細胞に形質転換させることによって抗体タンパク質を発現させた後、通常の方法で培養液を精製することにより、本発明による抗-コチニンIgG抗体を得ることができる。

30

【0055】

このとき、前記哺乳動物細胞として、哺乳動物CHO-DG44細胞(インビトロジェン社、米国)を使用することができ、精製方法としては、培養液を濃縮した後、タンパク質Aカラム(protein A column; Repligen、米国)で精製することが望ましい。

【0056】

本発明において、前記抗-コチニン抗体は、前記抗体、Fab、ScFvおよびドメイン抗体から選択される抗体フラグメントと、前記抗体および抗体フラグメントを構成成分として含む複合タンパク質(fusion protein)とからなる群より選択されることを特徴とする。

40

【0057】

接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体は、
1) 接合物質をコチニンと接合させた接合体を調製する段階と、
2) 抗-コチニン抗体を調製する段階と、
3) 前記で調製した接合物質をコチニンと接合させた接合体および抗-コチニン抗体を結合させる段階とを含む方法によって調製することができる。

【0058】

具体的に、前記方法は、
a) 接合物質とコチニンとの接合体に抗-コチニン抗体が結合した複合体をコードする核酸分子をベクターに挿入するステップと、

50

- b) 前記ベクターを宿主細胞に導入するステップと、
c) 前記宿主細胞を培養するステップとを含むことができる。

【0059】

接合物質とコチニンとの接合体に抗 - コチニン抗体が結合した複合体を調製することは、臨床段階において抗 - コチニン抗体の生産システムを設定する際、治療学的抗体を作り出す有効な方法となり得る。新しい治療学的抗体を新たに (de novo) 開発するには相当の時間を要するが、本発明の複合体の調製方法を用いると、臨床段階において高速大量の方式で迅速かつ容易に合成することができる小分子の形で治療学的抗体を調製することができる。

【0060】

本発明では、コチニンと接合物質を接合させると、調製された接合体に抗 - コチニン抗体が結合され複合体を形成する。前記抗体の抗原反応性は、コチニンに接合された接合物質によって生産することができる。このように調製された本発明の複合体は、補体 - 媒介細胞毒性、抗体 - 依存性細胞毒性、および長い生体内半減期を含む、前記抗体の全ての特徴を保持する。

【0061】

接合分子を直接抗体と結合させる従来の分子 - 抗体接合体と比較して、本発明の複合体は、免疫学的面において追加の利点を示すことが予想される。

【0062】

具体的に、従来の治療学的分子と抗体の接合体は、ハプテン - キャリア (hapt en - carrier) として利用することができ、抗体に直接結合された分子に対して免疫学的反応が直ちに発生し得る。前記分子 - 抗体接合体が抗原提示細胞 (antigen presenting cell) によって囲まれると、前記抗体は短いペプチドに分解されることになる。このような状況下で数多い治療学的分子は、依然として前記短いペプチドに化学的にクロスリンクされることとなる。仮に、前記治療学的分子にリンクされたペプチドのいずれかが特定の MHC 分子に高い親和性を持つとなると、抗原提示細胞の細胞表面に十分現われることであろう。これは、治療学的分子の免疫性を効率的に誘導することになる。

【0063】

しかし、本願発明の複合体の場合では、抗原提示細胞によって囲まれることになると、抗体が短いペプチドに分解されるため、コチニンと接合物質の接合体は、抗 - コチニン抗体から直ちに分離されることになる。これは、コチニン接合された治療的分子に対する免疫原性反応の発達を難しくさせ、利点として作用することができる。

【0064】

以下、本発明を下記の実施例に基づいてさらに詳細に説明する。下記実施例は、本発明を例示するためのもののみであり、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0065】

(実施例 1: 抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ Ig G 遺伝子の調製)

(1 - 1) 抗 - コチニンウサギ scFv から抗体可変領域の増幅

ウサギの抗体可変領域 (V_L および V_H) を増幅するために、抗 - コチニンウサギ scFv 遺伝子 (米国特許第 8,008,448 号参照) を鋳型とし、それぞれ 60 pmol の V_L 用の順方向および逆方向プライマー (配列番号: 11 および 12)、および V_H 用の順方向および逆方向プライマー (配列番号: 13 および 14) を使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。

【0066】

具体的に、PCR 反応を実行するために、米国特許第 8,008,448 号において合成した cDNA (約 0.5 μ g) 1 μ l、それぞれ 60 pmol の順方向プライマーと逆方向プライマー、10 μ l の 10 $\times$ PCR バッファー、8 μ l 2.5 mM の dNTP 混合物および 0.5 μ l の Taq ポリメラーゼ (polymerase) を混合し、これに蒸留水 100 μ l を添加した。前記混合物を 94 で 10 分間変性 (denaturat

10

20

30

40

50

ion)させ、94 で15秒、56 で30秒、72 で90秒の反応を30回繰り返した後、72 で10分間静置した。

【0067】

前記の過程を経て増幅されたDNAを1%のアガロースゲルで電気泳動を行った後、QIAquickゲル抽出キット(QIAquick gel extraction kit、Qiagen、米国)を用いて精製した。

【0068】

(1-2) ヒトの抗体不変領域の増幅

ヒト軽鎖不変領域(C_κ)およびヒト重鎖不変領域(CH1-CH3)の抗体不変領域(Constant region)を増幅するために、20ngのpComb3XTTベクター(Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, (1991), 15:88(18), 7978-7982)を鋳型とし、それぞれ60pmolのC_κ用順方向および逆方向プライマー(配列番号:15および16)およびCH1-CH3用の順方向および逆方向プライマー(配列番号:17および18)を使用したことを除いては、前記実施例(1-1)と同様の方法でPCRを行った後、増幅されたDNAのゲル電気泳動および精製を行った。

10

【0069】

(1-3) 軽鎖(light chain)の増幅

軽鎖を増幅するためのPCRを実行するために、前記実施例(1-1)および(1-2)において調製および精製したウサギの抗体軽鎖可変領域(V_L)およびヒトの抗体軽鎖不変領域(C_κ)を重複伸長PCRによって結合させ軽鎖遺伝子を調製した。

20

【0070】

具体的に、PCR反応のために、それぞれ100ngのV_LおよびC_κPCR産物、それぞれ60pmolの抗-コチニンウサギ/ヒトキメラ抗体軽鎖の順方向および逆方向プライマー(配列番号:7および8)を使用したことを除いては、前記実施例(1-1)と同様の方法でPCRを行った。以後、増幅されたDNAを前記実施例(1-1)と同じ方法で、アガロースゲル電気泳動および精製を行った。

【0071】

(1-4) 重鎖(heavy chain)の増幅

重鎖を増幅するためのPCRを実行するために、前記実施例(1-1)および(1-3)において調製および精製した、ウサギの抗体重鎖可変領域(V_H)およびヒトの抗体重鎖不変領域(CH1-CH3)を重複伸長PCRによって結合させ重鎖遺伝子を調製した。

30

【0072】

具体的に、PCR反応のために、それぞれ100ngのV_HおよびCH1-CH3 PCR産物、それぞれ60pmolの抗-コチニンウサギ/ヒトキメラ抗体重鎖の順方向および逆方向プライマー(配列番号:9および10)、10μlの10×PCRバッファー、8μl 2.5mMのdNTP混合物および0.5μlのTaqポリメラーゼを混合し、これに蒸留水100μlを添加した。前記混合物を94 で10分間変性(denaturation)させ、94 で15秒、56 で30秒、72 で180秒の反応を20回繰り返した後、72 で10分間静置した。

40

【0073】

以後、増幅されたDNAを前記実施例(1-1)と同じ方法で、アガロースゲル電気泳動および精製を行った。

【0074】

(1-5) 抗-コチニンウサギ/ヒトキメラIgG遺伝子を含む発現ベクターの作製

前記実施例(1-3)において調製および精製した軽鎖PCR産物および前記実施例(1-4)において調製および精製した重鎖PCR産物を、それぞれ制限酵素HindIII/XbaI(NEB、米国)および制限酵素BamHI/NheI(NEB、米国)により切断して純粋分離した後、発現ベクター(pCDNA3.1) multiple

50

cloning site (MCS) の部位に挿入した。

【0075】

(実施例2：抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ Ig G 発現および *in vitro* 分析のための精製)

抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ Ig G 遺伝子を含む発現ベクター DNA により、哺乳動物 CHO DG44 (インビトロジェン、米国) 細胞を形質注入させた。形質注入された細胞を、100 U / ml のペニシリンおよび 100 g / ml のストレプトマイシン (GIBCO、米国) を含む CD OptiCHO (登録商標) 発現培地 (GIBCO) に 500 μg / ml G418 を添加し、37 °C および 135 rpm の条件で培養した。培養液の上清液を Lab scale TFF システム (Millipore、米国) で濃縮して、タンパク質 A カラム (Repligen Co.、米国) により精製した。精製された 150 KDa の Ig G をクーマシー染色で確認し (図 1 参照)、その後の実験 (試験例) に使用した。

10

【0076】

図 1 に示すように、レーン 1 はサイズマーカーであり、レーン 2 は還元していない抗 - コチニン Ig G (150 KDa) であり、レーン 3 は還元された抗 - コチニン Ig G として軽鎖 (25 KDa) および重鎖 (50 KDa) であることが分かった。

【0077】

(実施例3：コチニンおよび接合物質の接合体の調製)

(3-1) コチニンおよびペプチドの接合体

20

ペプチドとして、WKYMVm - NH₂ ペプチド (WKYMVm - NH₂、配列番号：1) および wkymvm - NH₂ ペプチド (wkymvm - NH₂、配列番号：2) を使用した。WKYMVm - NH₂ および wkymvm - NH₂ は、固相ペプチド合成 (solid phase peptide synthesis) 方法によって、ASP48S ペプチド自動合成器において合成した。その後、Vydac Everest C18 カラム (250 mm × 22 mm、10 μm) を用いて逆相 HPLC (reverse phase HPLC) で精製し、(95% より高い純度)、LC/MS (Agilent HP1100 series) でペプチドのサイズを確認した (95% より高い純度)。

【0078】

30

一方、コチニンおよびペプチドの接合体としてコチニン - WKYMVm - NH₂ およびコチニン - wkymvm - NH₂ は、ペプチドの最後の合成過程において、PEG リンカーとコチニンを導入することを除いては、前記方法と同様の方法で行うことにより合成した。

【0079】

コチニンおよびペプチド接合体の調製方法は、まず、基本的なペプチドは、ASP48S ペプチド自動合成器を用いて合成した後、C - 末端アミド化 (C - terminal amidation) のために MBHA リンクアミド樹脂 (link amide Resin) に、最初の配列である Fmoc - m - OH (8 当量) とカップリング剤 HBTU (8 当量) / HOBt (8 当量) / NMM (16 当量) を DMF に溶解して添加した後、常温で 2 時間反応させた。その後、DMF 中のピペリジンの 20% を加え、常温で 5 分間 2 回反応させ Fmoc を分解した。前記の過程を繰り返して、ペプチドの基本骨格となる NH₂ - W (Boc) - K (Boc) - Y (tBu) - M - V - m - MBHA リンクアミド樹脂を作り、ペプチドがついた樹脂を少量取って切断カクテル (cleavage cocktail、TFA / TIS / H₂O = 95 / 2.5 / 2.5) を加えペプチドを樹脂から分離した後、過量のジエチルエーテルを加えてペプチドを沈殿させた。得られた少量の粗ペプチドを DW / CAN (1 / 1) に溶解して、合成しようとするペプチド (WKYMVm - NH₂) の分子量が取れるのか LC / MS により確認した後、前記の過程と同様に Fmoc - ミニ PEG 12 - OH をカップリングし、再び樹脂を取り LC / MS で分子量を確認した。再度、トランス - 4 - コチニンカルボン酸を上記の手順と同様にカップ

40

50

リングし、切断カクテル (TFA / TIS / H₂O = 95 / 2.5 / 2.5) を加えてペプチドを樹脂から分離した後、過量のジエチルエーテルを加えてペプチドを沈殿させ、HPLCにより精製した後LC/MSで分子量を確認して凍結乾燥した。

【0080】

前記で合成したWKYMVm - NH₂ ペプチドおよびwkyvmv - NH₂ ペプチドと、コチニン - ペプチド接合体とは、DMSOに溶解した後 - 20 で保存した。このように調製されたコチニン - WKYMVm - NH₂ 接合体の構造を図2に示す。

【0081】

(3-2) コチニンおよびアプタマーの接合体

アプタマーとして、AS1411 DNAアプタマー (5' - dTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG - 3'、配列番号: 3)、CRO26 DNAアプタマー (5' - dCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCC - 3'、配列番号: 4) およびペガプタニブRNAアプタマー (5' - pCfpGmpGmpArpArpUfpCfpAmpGmpUfpGmpAmpAmpUfpGmpCfpUfpUfpAmpUfpAmpCfpAmpUfpCfpCfpGm3' - p - dT - 3'、配列番号: 5) を使用した。

【0082】

一方、コチニンおよびアプタマーの接合体としてコチニン - AS1411とコチニン - CRO26およびコチニン - ペガプタニブは、アプタマーを、固相オリゴヌクレオチド合成 (solid phase oligonucleotide synthesis) 方法によりオリゴヌクレオチド合成装置 (oligonucleotide synthesizer) において3'から5'に合成した後、合成最後の過程で、アミノC6リンカー (ST Pharm、韓国) を付けて、活性エステル法 (active ester method) を用いてコチニンと接合し調製した。その後、Xbridge Prep C18カラム (5 μm、10 × 150 mm、Waters Corp.、米国) を用いた逆相高圧液体クロマトグラフィー (reversed-phase high-pressure liquid chromatography) で接合体を精製 (95% より高い純度) し、マスマススペクトル (MS: mass spectrometry) でサイズを確認した。

【0083】

前記において合成したコチニン - AS1411およびコチニン - CRO26は蒸留水に溶解し、コチニン - ペガプタニブはRNAであるためジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate) で処理した蒸留水に溶解して、95 で5分間静置した後、常温で30分間ゆっくり冷やしてから、-20 で保存した。このように調製されたコチニン - AS1411およびコチニン - ペガプタニブの構造を図3に示す。

【0084】

(3-3) コチニンとアブシキシマブの接合体

アブシキシマブ (Reopro) を利用して、コチニンおよびアブシキシマブの接合体 (コチニン - アブシキシマブ) を調製した。

【0085】

コチニンおよびアブシキシマブの接合体は、活性エステル法を用いて調製した。DMF 1 ml にコチニン 0.1 mmol を入れて常温で溶解した後、DMAP極少量、DCCO.118 mmol とNHSO.12 mmol を入れ、常温で4時間ほどローテーション (rotation) を行った。10000 × gにおいて30分間遠心分離し、上清液のみを分離した。20 mgのアブシキシマブを炭酸バッファー (carbonate buffer) 2 ml に入れて溶解し、DMF 1 ml を添加した後、前記上清液を徐々にに入れて3時間ほど常温でローテーションした。その後、4 で6時間以上の透析 (dialysis) をして、再び遠心分離し、上清液のみを得ることにより接合体を調製した。

【0086】

(3-4) コチニンおよびインスリンの接合体

インスリン（配列番号：６）を使用して、コチニンおよびインスリンの接合体（コチニン - インスリン）を調製した。

【００８７】

コチニンおよびインスリンの接合体は、前記実施例３ - ３のコチニンおよびアブシキシマブの接合体の調製方法と同様に行って調製した。

【００８８】

（実施例４：コチニンと接合物質の接合体および抗 - コチニン抗体を含む複合体の調製）

前記実施例１で調製したコチニンと接合物質との接合体と、実施例２で調製した抗 - コチニン抗体を含む複合体として、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体を調製するために次のように実施した。

【００８９】

< 試験例１：コチニンに対する抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ I g G の親和性分析 >
コチニンに対する抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ I g G の親和性は、B I A c o r e 3 0 0 0 (B I A c o r e A B 、 U p p s a l a 、 スウェデン) を使用して表面プラズモン共鳴技術 (S u r f a c e p l a s m o n R e s o n a n c e 、 S P R) より分析した。

【００９０】

具体的に、１０ｍＭナトリウム酢酸緩衝液 (p H ４ . ０) を ５ μ l / 分の速度で流しながら、アミンカップリングキット (B i a c o r e A B) に添付された説明書に従って、C M ５ (c a r b o x y m e t h y l d e x t r a n - m o d i f i e d) センサーチップ (B i a c o r e A B) にコチニン - O V A (o v a l b u m i n) を固定した。０ . ０ ０ ５ % の T w e e n ２ ０ (s i g m a 、 米国) を含む P B S (p H ７ . ４) に溶解した抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ I g G 抗体を ２ ５ で ３ ０ μ l / 分の速度でチップに注入した。抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ I g G 抗体は、０ . １ ５ ６ ２ ５ - １ ０ n M の濃度に希釈された。

【００９１】

表面は、１ M N a C l / ５ ０ m M N a O H で再生し、分析ソフトウェア (B I A e v a l u a t i o n s o f t w a r e) を利用して結合・解離速度定数 (k o n および k o f f) と平衡解離定数 (K d) を得た。その結果を表１に示し、図４にグラフで示す。

【００９２】

図４に示すように、抗 - コチニンウサギ / ヒトキメラ I g G 抗体の注入量が増加するにつれ、C M ５ チップに固定されているコチニンに結合する抗 - コチニン I g G 抗体の量が増加することが分かった。

【００９３】

【表１】

クローン	K o n (M ⁻¹ s ⁻¹)	K o f f (M ⁻¹ s ⁻¹)	K D (M)
抗-コチニンウサギ / ヒトキメラ抗体	2.559 × 10 ⁶	1.253 × 10 ⁻⁵	4.896 × 10 ⁻¹²

【００９４】

< 試験例２：細胞受容体に対するコチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の反応性テスト >

コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体が、W K Y M V m - N H ₂ の細胞受容体である F P R ２ に結合することを確認するためにフローサイトメトリー (f l o w c y t o m e t r y) を行った。

【００９５】

F P R ２ またはベクター (p c D N A ３ . １) を形質注入した R B L - ２ H ３ 細胞 (Y

10

20

30

40

50

oe - Sik Bae et al J Immunol 2004 ; 173 ; 607 - 614) を、10%のFBS (fetal bovine serum) が添加されたRPMI 培地において37 °C および5%のCO₂ 条件で培養した。その後、96 - ウェルプレート の各ウェル当たり 1×10^5 個の細胞を分注した後、PBSで2回、分析バッファ (assay buffer) (1%のFBSおよびPBS中に0.02%のアジ化ナトリウムを含む) で1回洗浄した。

【0096】

FPR2を形質注入したRBL-2H3細胞の各ウェルに、コチニン-WKYMVM-NH₂ / 抗-コチニンIgG複合体を、分析バッファで希釈して50 µlずつ添加し4分間で30分間反応させた。この場合、コチニン-WKYMVM-NH₂は、0 nM、1 nM、10 nM、100 nMの4つの濃度について実験し、抗-コチニンIgGは100 nMで固定した。

10

【0097】

この際、比較のために、ベクターを形質注入したRBL-2H3細胞に対しても、コチニン-WKYMVM-NH₂ / 抗-コチニンIgG複合体を用いて前記と同じ実験を繰り返した。

【0098】

また、他の比較群としてFPR2を形質注入したRBL-2H3細胞に、コチニン-WKYMVM-NH₂ / 非特異的IgG (Palivizumab ; シナジス (Synagis、登録商標) ; Abbott Laboratories、英国) を、前記と同様の濃度条件で処理した実験群1およびWKYMVM-NH₂ に対する陰性ペプチド (negative peptide) であるwkymvm-NH₂を利用して100 nMコチニン-wkymvm-NH₂ / 100 nM抗-コチニン抗体を処理した実験群2を使用した。

20

【0099】

細胞を分析バッファで2回洗浄した後、FITCが標示されたモノクローナル抗-ヒトFc特異的IgG (Thermo Fisher Scientific、米国) を分析バッファにて1:100に希釈し、各ウェルに50 µlずつ添加した後、4 °Cで20分間反応させた。続いて、分析バッファで細胞を2回洗浄した後、PBSで再懸濁 (resuspension) し、2%のパラホルムアルデヒド (paraformaldehyde) (1:1 (v/v)) で固定した後、FACSCanto (登録商標) II フローサイトメーター (BD Bioscience、ドイツ) で測定して、flowJo データ分析ソフトウェア (TreeStar、米国) を利用してデータを分析した。その結果を図5に示す。

30

【0100】

図5に示すように、コチニン-WKYMVM-NH₂ / 抗-コチニンIgG複合体は、FPR2が形質注入されたRBL-2H3細胞に特異的に結合し、コチニン-WKYMVM-NH₂ の濃度が増加するほど結合力が増加することが分かった。

【0101】

一方、ベクターが形質注入されたRBL-2H3細胞には、前記複合体が結合しないことを確認した。また、コチニン-WKYMVM-NH₂ / 非特異的IgG複合体およびコチニン-wkymvm-NH₂ / 抗-コチニンIgG複合体もやはり、FPR2が形質注入されたRBL-2H3細胞に結合しないことを確認した。

40

【0102】

< 試験例3 : コチニン-WKYMVM-NH₂ / 抗体複合体のWKYMVM-NH₂ ペプチドに対する機能的活性を保持するか否かの測定 (in vitro assays) >

(3-1) 細胞内カルシウム (calcium) の濃度変化

細胞内のカルシウムの濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は、Fura-2 / AMを利用したGrynkiiewiczの方法 (文献 [Grynkiiewicz G. et al., J Biol Chem., 260, p3440-3450 1985] 参照) を用いて測定し

50

た。

【0103】

ヒト末梢血からデキストラン沈降 (dextran sedimentation)、赤血球の低張性溶解 (hypotonic lysis of erythrocytes) およびリンパ球分離培地勾配 (lymphocyte separation medium gradient) を利用して好中球を新鮮に分離した。その後、これに4 mLの新鮮な無 - 血清 RPMI 1640 に希釈した $3 \mu\text{M}$ の Fura - 2 / AM を添加し、37 °C で50分間持続的に攪拌しながら培養した。無 - 血清 RPMI 1640 により3回洗浄した後、1 mL の無 - Ca^{2+} Locke 溶液 (154 mM の NaCl、5.6 mM の KCl、1.2 mM の MgCl_2 、5 mM の HEPES [pH 7.3]、10 mM のグルコースおよび0.2 mM の EGTA) に 2×10^6 個の細胞を分注した。分注した細胞に WKYMVM - NH_2 (1 nM、2.5 nM、5 nM、10 nM および 100 nM)、コチニン - WKYMVM - NH_2 (1 nM、2.5 nM、5 nM、10 nM および 100 nM)、コチニン - WKYMVM - NH_2 (1 nM、2.5 nM、5 nM、10 nM および 100 nM) / 抗 - コチニン IgG 複合体 (モル濃度 2 : 1) をそれぞれ添加した。

10

【0104】

このとき、比較群として、非特異的ペプチドである wkymvm - NH_2 (100 nM)、コチニン - wkymvm - NH_2 (100 nM)、コチニン - wkymvm - NH_2 (100 nM) / 50 nM 抗 - コチニン IgG をそれぞれ処理した実験群を使用した。

【0105】

20

RF - 5301PC 分光蛍光光度計 (spectrofluorophotometer、Shimadzu Instruments Inc.、日本) を用いて 340 nm と 380 nm の2つの励起 (excitation) 波長に対する 500 nm での蛍光値 (fluorescence) を測定した。その結果を図6に示す。この時、細胞内カルシウム濃度の増加は、380 nm 励起効率 (excitation efficiency) に対する 340 nm 励起効率の蛍光値比の増加を示す。

【0106】

図6に示すように、WKYMVM - NH_2 、コチニン - WKYMVM - NH_2 およびコチニン - WKYMVM - NH_2 / 抗 - コチニン IgG 複合体は、濃度依存性 (concentration - dependencies) が類似であった。また、コチニン - WKYMVM - NH_2 およびコチニン - WKYMVM - NH_2 / 抗 - コチニン IgG 複合体は、WKYMVM - NH_2 のように細胞内カルシウム濃度の増加を強く誘導している。一方、wkymvm - NH_2 、コチニン - wkymvm - NH_2 およびコチニン - wkymvm - NH_2 / 抗 - コチニン IgG 複合体は、特異的なカルシウムの如何なる増加も示さなかった。

30

【0107】

(3 - 2) スーパーオキシドの発生 (superoxide generation) スーパーオキシドの発生は、スーパーオキシドに依存的なシトクロム (cytochrome) c の還元値を測ることにより測定することができる (文献 [Bae et al., Blood, 97, p 2854 - 2862, 2001] を参照)。

40

【0108】

具体的に、RPMI 1640 培地に 2×10^6 個に分注したヒト好中球を 37 °C、50 μM のシトクロム c で1分間全培養した後、WKYMVM - NH_2 (0 nM、10 nM、100 nM および 1000 nM)、コチニン - WKYMVM - NH_2 (0 nM、10 nM、100 nM および 1000 nM)、およびコチニン - WKYMVM - NH_2 (0 nM、10 nM、100 nM および 1000 nM) / 抗 - コチニン IgG (モル比 2 : 1) とそれぞれ反応させた。

【0109】

この際、比較群として、wkymvm - NH_2 (0 nM、10 nM、100 nM および 1000 nM)、コチニン - wkymvm - NH_2 (0 nM、10 nM、100 nM およ

50

び1000nM)、およびコチニン-wkymvm-NH₂(0nM、10nM、100nMおよび1000nM)/抗-コチニンIgG(モル比2:1)をそれぞれ処理した実験群を使用した。

【0110】

シトクロムc還元による550nmにおける吸光度の変化を、分光光度計(spectrophotometer, EL312e, Bio-Tek instruments, Winooski, VT)を使用して、1分間隔で5分間測定した。0分における吸光度値を以後の測定値の吸光度から引いて算出した後、吸光係数(extinction coefficient)である0.022μM⁻¹cm⁻¹で割ることにより、ナノモル(nanomole)単位で示した。その結果を図7に示す。

10

【0111】

図7に示すように、WKYMVm-NH₂、コチニン-WKYMVm-NH₂およびコチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニンIgG複合体は、濃度-依存度が似ていて、コチニン-WKYMVm-NH₂およびコチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニンIgG複合体は、WKYMVm-NH₂のように、スーパーオキシド発生を強力に誘導することを確認した。一方、wkymvm-NH₂、コチニン-wkymvm-NH₂接合体およびコチニン-wkymvm-NH₂/抗-コチニンIgG複合体は、特異的スーパーオキシドの如何なる発生も示さなかった。

【0112】

(3-3) 走化性(chemotaxis)分析

20

ヒト好中球を1×10⁶/mlでRPMI1640培地に分注した後、マルチウェルチャンバー(multiwell chamber, Neuroprobe, 米国)の上部ウェルに前記細胞懸濁液25μlを添加した(文献[Baee et al., Blood, 97, p2854-2862, 2001]を参照)。マルチウェルチャンバーの上部ウェルは、WKYMVm-NH₂(0nM、10nMまたは100nM)、コチニン-WKYMVm-NH₂(0nM、10nMまたは100nM)およびコチニン-WKYMVm-NH₂(0nM、10nMまたは100nM)/抗-コチニンIgG(モル比2:1)が含まれている下部ウェルと、3μmのポリ炭化水素フィルター(polyhydrocarbon filter)とによって分離されている。

【0113】

30

この際、比較群として、wkymvm-NH₂(0nM、10nMおよび100nM)、コチニン-wkymvm-NH₂(0nM、10nMおよび100nM)およびコチニン-wkymvm-NH₂(0nM、10nMおよび100nM)/抗-コチニンIgG(モル比2:1)をそれぞれ処理した実験群を使用した。

【0114】

37で90分間静置した後、移動していない細胞をスクラッピング(scrapping)で除去した後、フィルターを介して移動した細胞を、4%のパラホルムアルデヒドを添加して一晩固定した。固定されたフィルターを、90%、80%および70%のエタノールおよび脱イオン水の順に処理した後、空気中で乾燥させて、ヘマトキシリン(Sigma-Aldrich, 米国)を利用して乾燥されたフィルターを染色した。各ウェルからの染色された細胞は、high-power fields(400×)においてランダムに5回選択されカウントされた。その結果を図8に示す。

40

【0115】

図8に示すように、WKYMVm-NH₂、コチニン-WKYMVm-NH₂およびコチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニンIgG複合体は、類似の濃度-依存度を示し、好中球の移動(migration)を強く触発した。一方、wkymvm-NH₂、コチニン-wkymvm-NH₂接合体およびコチニン-wkymvm-NH₂/抗-コチニンIgG複合体は、どのような特異的細胞の移動も示さなかった。

【0116】

<試験例4:コチニン-WKYMVm-NH₂とコチニン-WKYMVm-NH₂/抗

50

< コチニン I g G 複合体の薬物動態試験 >

4週～6週齢の雄の野生型アルビノICRマウス(Institute of Cancer Research Center, ORIENT BIO Inc. 韓国)に、コチニン-WKYMVm-NH₂(0.5mg/kg)、およびコチニン-WKYMVm-NH₂(0.5mg/kg)/抗-コチニンI g G(10mg/kg)複合体をそれぞれ100μlのPBSで希釈し、尾静脈に注射した。

【0117】

コチニン-WKYMVm-NH₂を注射したマウスの場合、注射後0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、16、20および24時間の時に眼窩静脈叢採血を実施して末梢血を得て、コチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニンI g G複合体を注射したマウスの場合、注射後0、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10、12、16、20、24、48、72、96、120、144、および168時間の時には眼窩静脈叢採血を実施して末梢血を得た。各末梢血を、常温で30分間静置した後、800×gで15分間遠心分離し上清液のみを集めて血清を得て、各血清をフローサイトメトリー用いて分析した。

【0118】

それぞれの血清を分析バッファー(1%FBSおよび0.02%アジ化ナトリウム(NaN₃)in PBS)により希釈した後、200nMの抗-コチニンI g Gを同量加えて、血清中のコチニン-WKYMVm-NH₂がすべて抗-コチニンI g Gと複合体とを形成するようにして、測定できるようにした。

【0119】

FPR2形質注入したRBL-2H3細胞1×10⁵個を、前記混合物と4で30分間反応させた。その後、分析バッファーで2回洗浄した後、FITCが標示されたモノクローナル抗-ヒトFc特異的I g G(Thermo Fisher Scientific、米国)を分析バッファーにより1:100で希釈し各ウェルに添加して、4で20分間反応させた。

【0120】

細胞を分析バッファーで2回洗浄した後、FITCが標示されたモノクローナル抗-ヒトFc特異的I g G(Thermo Fisher Scientific、米国)を分析バッファーにて1:100で希釈し各ウェルに50μlずつ添加した後、4で20分間反応させた。細胞を分析バッファーにて2回洗浄した後PBSで再懸濁し、2%のパラホルムアルデヒド(1:1(v/v))で固定して、FACSCanto(登録商標)IIフローサイトメーター(BD Bioscience、ドイツ)で測定した後、flowJoデータ分析ソフトウェア(TreeStar、米国)を用いて、データを分析した。その結果を図9に示す。

【0121】

図9に示すように、平均蛍光強度(mean fluorescence intensity)の値を比較して見ると、コチニン-WKYMVm-NH₂/抗-コチニンI g G複合体を注射したマウスの血清の場合、約8時間の間そのピークの半分よりも高く維持されて、16時間の間バックグラウンド(background)よりも高く維持された。一方、コチニン-WKYMVm-NH₂を注射したマウスの血清は、1時間が経過するとバックグラウンドよりも低くなることが分かった。

【0122】

< 試験例5：抗-コチニンI g Gの薬物動態試験 >

4週～6週齢の雄の野生型アルビノICRマウス(ORIENT BIO Inc. 韓国)に、抗-コチニンI g G(10mg/kg)を100μlのPBSで希釈して尾静脈に注射した後、0、1、3、6、12時間目、および1、2、3、4、5、6、7、10、14、21、28日目の時に眼窩静脈叢採血を実施して末梢血を得た。各末梢血を、常温で30分間静置した後、800×gで15分間遠心分離し上清液のみを集めて血清を得て、血清中の抗-コチニンI g G量を測定するためにELISAを行った。

【0123】

96 - ウェル E L I S A プレートの各ウェルを、P B S に溶解した $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ のコチニン - B S A を用いて4 で一晩中コーティングし P B S B (3 % B S A in P B S) でブロッキングした。前記で得られた血清を P B S B に希釈 (1 : 10 乃至 1 : 100) した後、コーティングされた各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ添加した。続いて、常温で1時間放置して、P B S - T (0 . 02 % t w e e n 20 in P B S) で洗浄した。各ウェルに A B T S (o n e - s t e p A B T S 溶液、シグマ) を基質として用いて H R P が結合された羊 (s h e e p) 抗 - ヒト F c 特異的 I g G (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) を添加し、常温で30分間放置した後、 405nm における光学密度を測定した。その結果を図10に示す。

10

【0124】

図10に示すように、抗 - コチニン I g G の血清中半減期は6日以上であることが分かった。

【0125】

< 試験例6 : マウス敗血症モデルにおけるコチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体の治療効果 >

I C R マウスを2cm腹壁切開し盲腸を取り出して、回盲弁 (i l e o c e c a l v a l v e) 直下にて25%の盲腸を結紮し、22ゲージ (g a u g e) の針で一回貫通した後大便が腹腔内に出てくるように処置した。腹壁の筋肉および皮膚層を縫合した。シャム - 手術を施した (S h a m - o p e r a t e d) マウス実験群は、腹壁を2cm切開して盲腸を取り出した後、何の処置も行わずに腹腔内に再び戻した。C L P を施したマウスを、各グループ当り20匹ずつ6グループに分け、C L P の後2時間後から12時間間隔で2日間、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ (0 . 4 m g / k g および 0 . 04 m g / k g) / 抗 - コチニン I g G (18 m g / k g および 1 . 8 m g / k g) 複合体の実験群、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ (0 . 4 m g / k g) 実験群、W K Y M V m - N H ₂ 単独 (0 . 2 m g / k g) 実験群、抗 - コチニン I g G (18 m g / k g) 単独実験群および P B S ビヒクル対照群 (全 100 μl を投与) をそれぞれ尾静脈に注入し、飼育施設に入れて水と飼料を与え10日間観察した。続いて生存率を分析し、その結果を図11に示す。

20

【0126】

図11に示すように、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ / 抗 - コチニン I g G 複合体を注入した実験群では80%程度の生存率を示した。これは、コチニン - W K Y M V m - N H ₂ 実験群の生存率 (40 %) 、W K Y M V m - N H ₂ 実験群の生存率 (45 %) 、および P B S ビヒクル対照群の生存率 (20 %) に比べ相対的に改善されたことであることが分かった。

30

【0127】

< 試験例7 : コチニン - ペガブタニブおよびコチニン - ペガブタニブ / 抗 - コチニン I g G 複合体の薬物動態試験 >

4週 ~ 6週齢の雄の野生型 I C R マウスに、コチニン - ペガブタニブ (0 . 135 m g / k g) およびコチニン - ペガブタニブ (0 . 135 m g / k g) / 抗 - コチニン I g G (1 m g / k g) 複合体をそれぞれ100 μl の P B S に希釈し尾静脈に注射した。0、0 . 5、1、1 . 5、および2時間後に眼窩静脈叢採血を施しそれぞれの末梢血を得て、常温で30分間静置した後、 $800 \times g$ で15分間遠心分離し、上清液のみを集めて血清を得た後、E L I S A により分析した。

40

【0128】

96 - ウェル E L I S A プレートの各ウェルを P B S に溶解した 50ng のヒト V E G F を用いて4 で一晩コーティングし P B S B でブロッキングした。その後、それぞれの血清を P B S B に 1 : 100 で希釈した後、 100nM の抗 - コチニン I g G と一緒に各ウェルに添加した。常温で1時間放置し P B S - T で洗浄後、H R P が結合されたウサギ (r a b b i t) 抗 - ヒト F c 特異的 I g G (T h e r m o F i s h e r S c i e n

50

t i f i c) を各ウェルに添加し、常温で1時間放置した。次いで、3、3'、5、5'-テトラメチルベンジジン(3、3'、5、5'-tetramethylbenzidine(TMB)、Thermo Fisher Scientific)を基質として添加し、常温で15分間放置した後650nmにて光学密度を測定した。その結果を図12に示す。

【0129】

図12に示すように、コチニン-ペガプタニブ/抗-コチニンIgG複合体の血清中半減期がコチニン-ペガプタニブに比べて相当増加したことが分かった。また、0時間での濃度もやはり大きい。これは、コチニン-ペガプタニブは体内に入ってからなり分解(degradation)される反面、コチニン-ペガプタニブ/抗-コチニンIgG複合体で注射する場合、コチニン-ペガプタニブの急激な分解を阻害することが予測できた。

10

【0130】

<試験例8:コチニン-アプタマー/抗-コチニンIgGの生物学的分析>

(8-1)コチニン-アプタマー/抗-コチニンIgG細胞表面のヌクレオリン(nucleolin)に対するコチニン-AS1411/抗-コチニンIgG複合体の結合
Raji(ヒトバケツリンパ腫、American Type Culture Collection、米国)細胞を各ウェル当たり 1×10^5 個の細胞で分注した後、コチニン-AS1411(1、10、50および100nM)/抗-コチニンIgG(100nM)複合体を50ul/sampleの量で処理し、4で20分間反応させた。その後の分析バッファー(1%FBSおよび0.02%アジ化ナトリウム(NaN_3)in PBS)により2回洗浄した後、FITCが標示されたモノクローナル抗-ヒトFc特異的IgG(Thermo Fisher Scientific)を分析バッファーに1:100で希釈し各ウェルに添加し、4で15分間反応させた。

20

【0131】

このとき、比較群として非特異的アプタマーであるCRO26(ST Pharm、韓国)を用いて調製したコチニン-CRO26/抗-コチニンIgG複合体、および対照抗体として非特異的抗体であるパリビズマブ(palivizumab)(Abbott Laboratories、Kent、英国)を用いて調製したコチニン-AS1411/パリビズマブ複合体を用いて、前記と同様の方法で行った。

30

【0132】

また、background controlとして、細胞にFITCが標示されたモノクローナル抗-ヒトFc特異的IgG(Thermo Fisher Scientific)のみを反応させ、その後の反応は前記と同じ方法で行った。

【0133】

上記で得られた細胞を分析バッファーで2回洗浄した後PBSで再懸濁し、2%のバラホルムアルデヒド(1:1(v/v))で固定した。その後、FACSCanto(登録商標)IIフローサイトメーター(BD Bioscience、ドイツ)で測定した後、flowJoデータ解析ソフトウェア(TreeStar、米国)を用いてデータを分析した。その結果を図13および図14に示す。

40

【0134】

図13に示すように、コチニン-AS1411/抗-コチニンIgG複合体は、コチニン-AS1411の濃度が増加するにつれ、細胞表面のヌクレオリンに対する結合力が高くなった。一方、非特異的アプタマー(CRO26)または非特異的抗体(パリビズマブ)を含む複合体の場合、ヌクレオリンに対する結合力は観察されなかった。

【0135】

また、図14に示すように、ヒト肝細胞癌の癌細胞(human hepatocellular carcinoma、HepG2)、ヒト膠芽腫の細胞(human glioblastoma、U87MG)、およびマウス胚線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast、NIH3T3)(American Type

50

Culture Collection、米国) に対してコチニン - AS1411 (50 nM) / 抗 - コチニン IgG (100 nM) 複合体を処理して細胞間のヌクレオリン発現率の差を確認した。その結果、Raji 細胞に比べて HepG2 細胞および U87MG 細胞は強力な結合を示す反面、NIH3T3 細胞は弱い結合を示すことが分かった。

【0136】

(8-2) コチニン - AS1411 / 抗 - コチニン IgG 複合体を用いたウェスタンブロット

Raji 細胞を PBS で 3 回洗浄した後、1 ml の溶解バッファー (20 mM Tris - Cl、pH 7.5、150 mM NaCl、1% Triton X - 100、0.25 mM 合成デキストローズコンプリート培地 (synthetic dextrose complete medium)、1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)、1 µg / mL アプロチニン (aprotinin)、1 µg / mL ロイペプチン (leupeptin)、および 1 µg / mL のペプスタチン (pepstatin) A) を入れ、音速ディスメンブレーターモデル 500 (sonic Dismembrator model 500、Thermo Fisher Scientific) 機械を用いて放出セッティング (output setting) 7 の条件で 10 秒ずつ 3 回音波処理 (sonication) をした。17,000 × g で 10 分間遠心分離し上清液のみを集め、ブラッドフォード分析 (bradford assay、Bio - Rad、米国) を行い、濃度を測定した。

【0137】

溶解物 50 µg を、4 × SDS ローディングバッファー (50 mM MES、50 mM Tris - base、0.1% SDS、1 mM EDTA、および 50 mM ジチオトレイトール (dithiothreitol、pH 7.3) を入れ 95 ° で 10 分間沸騰させタンパク質を変性させた後、4% ~ 12% の Bis - Tris ゲル (Invitrogen) において SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS - PAGE) を行った。XCell SureLock (登録商標) Novex Mini - Cell (Invitrogen) を使用してニトロセルローズ膜 (Whatman、ドイツ) でタンパク質を移動させた。以後、5% のスキムミルク (BD Biosciences Diagnostic Systems、米国) を含む TBST (10 mM Tris、pH 7.5、150 mM NaCl、および 0.1% の Tween - 20) において、常温で 30 分間振りながら培養し、コチニン - AS1411 (100 nM) / 抗 - コチニン IgG (50 nM) 複合体とともに常温で 2 時間振りながら培養した。

【0138】

この際、比較のために、ブロッキングバッファーに 1 : 100 で希釈したマウス抗 - ヌクレオリン IgG (Santa Cruz Biotechnology、米国) を用いて上記実験と同じ実験を繰り返した。

【0139】

また、比較群としてコチニン - AS1411 (100 nM) / 非特異的抗体 (パリビズマブ) (50 nM) 複合体とコチニン - CRO26 (100 nM) / 抗 - コチニン IgG (50 nM) 複合体との実験群を使用した。

【0140】

膜を TBST により 3 回洗浄した後、HRP が結合されたウサギ抗 - ヒト IgG (Thermo Fisher Scientific) および HRP が結合された抗 - マウス IgG (Thermo Fisher Scientific) を TBST に 1 : 5,000 で希釈して添加し、常温で 1 時間振りながら培養した。膜を TBST で 3 回洗浄した後、SuperSignal Pico West 化学発光基質 (chemiluminescent substrate) (Thermo Fisher Scientific) を添加してタンパク質バンドを可視化した。その結果を図 15 に示す。

【0141】

図 15 に示すように、コチニン - AS1411 / 抗 - コチニン IgG 複合体を処理した

10

20

30

40

50

レーン1では、100 kDaの完全長のヌクレオリンバンドだけでなく、40 kDa以下においてもいくつかのバンドが観察された。これは、従来の報告によると、ヌクレオリンの自己分解活性 (autolytic activity) によってヌクレオリンが切断されて生じる小さいサイズの断片であり、コチニン - AS1411 / 抗 - コチニン IgG 複合体が完全長だけでなく、小さい断片までも検出できることを示している。

【0142】

一方、レーン4のマウス抗 - ヌクレオリン IgGは、完全長のヌクレオリンのみ検出可能であった。比較群であるレーン2のコチニン - AS1411 (100 nM) / パリビズマブ (50 nM) 複合体と、レーン3のコチニン - CRO26 (100 nM) / 抗 - コチニン IgG 複合体は、どのようなバンドも観察できなかった。

10

【0143】

(8-3) コチニン - AS1411 / 抗 - コチニン IgG 複合体を利用したヌクレオリンの免疫沈降法 (immunoprecipitation) の可否確認

Raji細胞溶解物1mgを、コチニン - AS1411 (40 nM) / 抗 - コチニン IgG (20 nM) 複合体、コチニン - CRO26 (40 nM) / 抗 - コチニン IgG (20 nM) 複合体、およびコチニン - AS1411 (40 nM) / 非特異的抗体 (20 nM) 複合体とともに4で一晩中回転 (rotation) させながら放置した。

【0144】

タンパク質A - セファロース (sepharose) ビーズを各サンプルに40 µlずつ入れて回転させながら4で2時間放置した後、800 × gで1分間遠心分離した。その後、免疫沈降されたペレットを、洗浄バッファー (20 mM Tris - Cl、pH 7.5、150 mM NaCl、および1% Triton X - 100) により3回洗浄した。4 × SDSローディングバッファーを入れ、95 °Cで10分間沸騰させタンパク質を変性させた後、免疫ブロット (immunoblot) を実施した。1次抗体として、マウス抗 - ヌクレオリン IgG (Santa Cruz Biotechnology、米国) を0.2% TBS-Tに1:100で希釈して添加し常温で2時間放置して、2次抗体として、HRPが付いているウサギ抗 - マウス IgGを1:5,000に希釈して添加し常温で1時間放置した。膜を洗浄した後、SuperSignal Pico West 化学発光基質を添加してブロットを可視化した。その結果を図16に示す。

20

【0145】

図16に示すように、第1レーンのコチニン - AS1411 / 抗 - コチニン IgG 複合体をもって免疫沈降した場合、100 kDaにおいてヌクレオリンのバンドが確認される反面、第2レーンのコチニン - CRO26 / 抗 - コチニン IgG 複合体、および第3レーンのコチニン - AS1411 / 非特異的抗体をもって免疫沈降した場合は、バンドが確認されなかった。これから見ると、コチニン - AS1411 / 抗 - コチニン IgG 複合体がRaji細胞の溶解物において正常にヌクレオリンを免疫沈降したことが分かった。

30

【0146】

(8-4) VEGFに対するコチニン - ペガブタニブ / 抗 - コチニン IgG 複合体の特異的結合力の測定

96 - ウェル ELISA プレートの各ウェルをPBSに溶解した50 ngのヒトVEGFを用いて4で一晩中コーティングしPBSSBによりブロッキングした。100 nM コチニン - ペガブタニブ / 50 nMの抗 - コチニン抗体複合体をPBSSBに希釈した後、10倍ずつ希釈してコーティングされた各ウェルに50 µlずつ添加した。続いて、常温で1時間放置し、PBS-Tで洗浄した。この際比較のために、VEGFに対する抗体である100 nMベバシズマブ (bevacizumab) を前記複合体の代わりに用いて、上記と同じ実験を繰り返した。

40

【0147】

その後、各ウェルにTMB (Thermo Fisher Scientific) を基質として使用し、HRPが結合されたウサギ (rabbit) 抗 - ヒトFc特異的 IgG (Thermo Fisher Scientific) を添加して常温で1時間放置

50

した後、650 nmにて光学密度を測定した。その結果を図17に示す。

【0148】

図17に示すように、コチニン - ペガブタニブ / 抗 - コチニン IgG複合体は、VEGFに対して0.1 pM ~ 1,000 pM区間においてコチニン - ペガブタニブの濃度 - 依存的やり方で結合力が増加した。これは、抗 - VEGF抗体であるペバシズマブの濃度 - 依存的な方式のVEGFに対する結合度と類似していた。

【0149】

< 試験例9：コチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン IgG複合体の反応性 >

(9-1) コチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン IgG複合体、コチニン - アブシキシマブ、およびアブシキシマブの反応性を確認するための酵素 - リンクされた酵素結合免疫吸着測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

0.001 nM ~ 1000 nMのアブシキシマブおよびコチニン - アブシキシマブを用いて、インテグリンアルファ2bベータ3に対する反応性を測定した。この時、1 uMの抗 - コチニン IgG抗体を使用した。

【0150】

具体的に、20 µlの金属バッファ (25 mM Tris - Cl、137 mM NaCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、1 mM MnCl₂ および1 mM KCl; pH 7.5) に溶解した100 ngのインテグリンアルファ2bベータ3を各ウェルに添加した後、37 °Cで2時間培養することにより、96 - ウェルの半分 (half-area) マイクロタイタープレートのウェルをインテグリンアルファ2bベータ3でコーティングした。前記ウェルを150 µlのPBSS (PBS中にBSA3%) によって37 °Cで1時間ブロッキングした。抗 - コチニン抗体を含むか、または含まないアブシキシマブ / コチニンおよびアブシキシマブを3%のPBSS中で様々な濃度に調節して、最終の50 µlを各ウェルに適用した。前記プレートを37 °Cで1時間培養して0.05% Tween 20を含むPBS (PBST) により3回洗浄した後、抗 - ヒトFc - HRPおもて処理しコチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン IgG抗体の複合体を検出し、抗 - ヒトFab - HRPをもって処理してコチニン - アブシキシマブおよびアブシキシマブをそれぞれ検出した。37 °Cで45分間培養して0.05% PBS - Tにより4回洗浄した後、各ウェルを100 µlのABTS基質の溶液をもって37 °Cで30分間培養し、405 nmで吸光度を測定した。その結果を図18に示す。

【0151】

図18に示すように、本発明のコチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン抗体複合体は、インテグリンアルファ2bベータ3に対してアブシキシマブと同じ反応性を保持することが分かった。

【0152】

(9-2) コチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン抗体複合体のヒトの血小板に対する特異的結合試験

0、5 nMおよび50 nMのコチニン - アブシキシマブを、0、0.1 µMと1 µMの抗 - コチニン抗体で活性化されたヒト血小板に処理した後、抗 - ヒトFc - FITC (Thermo Fisher Scientific、米国) を1:75に希釈した後、血小板に処理し20分間培養した。続いて得られた細胞を、前記試験例8と同様にフローサイトメトリーにより分析した。

【0153】

具体的には、1.5 mlの血液を0.84 mlの酸 - クエン酸 - デキストロース (ACD) および10 mMのEDTAを含む5 mlバキューテナー (vacutainer) チューブに集めた。前記血液を遠心分離管に移動した後、常温において250 × gで10分間回転させた。多血小板血漿 (platelet rich plasma、PRP) を新しいチューブに移動した後、常温において1500 rpmで10分間回転させた。上清液を除去し、血小板を1 mlのタイロッドバッファ (Tyrode's buffer; 1

10

20

30

40

50

37 mM NaCl、2.7 mM KCl、2 mM MgCl₂、0.5 mM NaH₂PO₄、5 mM グルコース、10 mM HEPES および 0.2 % BSA、pH 7.4) により洗浄した。1500 rpm で 7 分間の遠心分離後、上清液を除去し、ペレットを 0.1 % BSA で補充された金属バッファー (25 mM Tris-Cl、137 mM NaCl、1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂、1 mM MnCl₂ および 1 mM KCl; pH 7.5) 300 µl において再懸濁した。調製された PRP 懸濁液 50 µl を FACS 分析に適用した。様々な濃度のアブシキシマブ - コチニン 25 µl、および抗 - コチニン抗体またはシナジス (Synagis、登録商標) 25 µl を、0.1 % BSA 補充済みの金属バッファー中において常温で 45 分間適用した。同じバッファーにより 2 回洗浄した後、0.1 % BSA で補充された金属バッファー 50 µl に 1 µg/ml 濃度

10

【0154】

このとき、陰性抗体対照群としては、シナジスを抗 - コチニン抗体と同じ濃度で処理し、陽性対照群としては、アブシキシマブ (0 nM、5 nM および 50 nM) を使用した。

【0155】

図 19 に示すように、コチニン - アブシキシマブ / 抗 - コチニン抗体複合体は、血小板に対してアブシキシマブと同じ反応性を維持し、コチニン - アブシキシマブまたは抗 - コチニン抗体の濃度が増加するにつれ、結合度もやはり増加することが分かった。一方、抗 - コチニン抗体 (10 µM) 処理された FBL - コチニンは血小板に結合しなかった。

20

【0156】

< 試験例 10 : コチニン - インスリン / 抗 - コチニン抗体複合体の反応性 >

(10 - 1) コチニン - インスリン / 抗 - コチニン抗体複合体の MCF - 7 および SK - Br - 3 細胞に対する特異的結合試験

具体的には、SK - Br - 3 または MCF - 7 細胞 (インスリン受容体陽性乳癌細胞株) (ATCC、米国) (1×10^6 / 反応) を FACS バッファー (PBS、1 % FBS および 0.02 % アジ化ナトリウム) により 3 回洗浄した。様々な濃度 (0 nM ~ 5000 nM) のコチニン - インスリン 25 µl、および抗 - コチニン抗体 (1000 nM) またはシナジス (1000 nM) 25 µl を、FACS バッファー中において常温で 45 分間適用した。このとき、シナジスは、陰性抗体対照群として使用した。FACS バッファーで 2 回洗浄した後、FACS バッファー 50 µl 中で 2 次抗体である抗 - ヒト Fc - FITC 1 µg/ml を適用し、癌の条件下の常温において 30 分間放置した。次いで細胞を FACS バッファーで 2 回洗浄し、PBS 100 µl 中において再懸濁した。2 つの細胞株を、FACS can 蛍光活性化細胞分析装置 (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーで蛍光分析を行った。その結果を図 20 A に示す。

30

【0157】

一方、5000 nM のコチニン - インスリン / 抗 - コチニン抗体複合体、およびコチニン - 陰性ペプチド / 抗コチニン抗体複合体を用いて前記と同様の方法で抗 - ヒト Fc - FITC を用いて培養した後、フローサイトメトリーで分析した。この時、コチニン - 陰性ペプチド接合体としては、卵胞 B リンパ球 (follicular B lymphocyte) 結合ペプチドであるコチニン - FBL (配列番号 : 19) 接合体、アペリン受容体 (apelin receptor) 結合ペプチドであるコチニン - A13 (配列番号 : 20) 接合体、およびコチニン - F13A 接合体 (配列番号 : 21) を用いた。(ST Pharm、韓国)、その結果を図 20 B に示す。

40

【0158】

図 20 に示すように、インスリン - コチニン / 抗 - コチニン抗体複合体は、インスリン受容体を発現する細胞に対して正常に結合することから、前記複合体がインスリンの受容体結合力を保持していることが分かった。

50

【0159】

(10-2) コチニン-インスリン/抗-コチニン抗体複合体のヒト補体依存性細胞毒性(CDC)の分析

補体依存細胞毒性分析を行うために、コチニン-インスリン/抗-コチニン抗体複合体を細胞可視インジケータ(cell viability indicator)のWST-1(タカラ)を用いてテストした。

【0160】

具体的には、インスリン受容体を発現するMCF-7細胞(ATCC、米国)を分析培地(DMEM、1%FBS)により洗浄し、 1×10^5 /mlに希釈した。前記細胞懸濁液100 μ lを、滅菌96-ウェル組織培養プレート中において各ウェルに投入し、5%CO₂インキュベーター内において37℃で一晩培養して細胞がよく付着するようにした。前記細胞から分析培地を除去した後、25 μ lコチニン-インスリン、25 μ lの様々な濃度(0 μ M、0.1 μ Mおよび1 μ M)の抗-コチニン抗体、および50 μ lの1/12ヒト補充希釈剤(complement dilution)を含むウェルセットを37℃および5%CO₂インキュベーターにおいて培養してヒト補体-媒介細胞溶解(complement-mediated cell lysis)を促進させた。一晩培養した後、10 μ lのWST-1(Takara)を各ウェルに添加し、37℃で3時間追加培養してから、450nmにて吸光度を測定した。1%トリトンX-100および培地を、ヒト血清とともに高-対照群(high-control)および低-対照群(low-control)の細胞にそれぞれ適用した。また、コチニン-インスリン/抗-コチニン抗体複合体を、ヒト血清とともに細胞なしでウェルに適用したものを補完対照群(supplement control)とした。それぞれの分析を3回ずつ行い、その結果を図21に示す。高-対照群は1%トリトンX-100によって細胞が100%死滅した場合を意味し、低-対照群は補体による細胞死滅が誘導されていない場合を意味し、バッファー対照群(bf control)は、他の条件に関係なくバッファーによる結果の違いがあるか否かを確認するための場合を意味する。

【0161】

図21に示すように、本発明のコチニン-インスリン/抗-コチニン抗体複合体は、乳癌細胞を過発現させるインスリン受容体に対して特異的な細胞毒性剤(cytotoxic agent)として作用させる抗-コチニン抗体のヒト補体依存細胞毒性能力を保持させることが分かった。

【0162】

<試験例11>

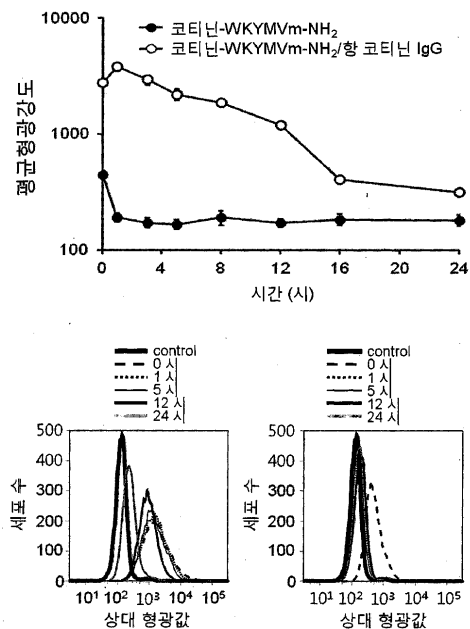
ヒト補体C5(complement component C5)に結合力を有する免疫グロブリンエクリズマブ(eculizumab)のアミノ酸配列(US6,355,245 B1)から、VH、VL配列のみを用いてscFvを組み合わせて、これをcotinibody(コチニンに結合する抗体ScFv)の最初のscFvに位置するようにした。このペクターを293F細胞株に形質転換させタンパク質を発現させた後、細胞培養液から抗体を精製するためにプロテインAアガロース(protein A agarose)を用いたアフィニティークロマトグラフィー(affinity chromatography)を行った。ヒト血清を1/10、1/20、1/40、1/80(レーン1、2、3、4)希釈したもの20 μ Lと、精製されたヒト補体C5 100ng(レーン5)とをSDS-PAGE実施し、電気泳動を行ったタンパク質をニトロセルロースメンブレンに伝導させた。ヒト補体C5-cotinibodyタンパク質を、2 μ g/mLになるように5%スキムミルク入りトリス緩衝生理食塩液(skim milk in Tris-buffered saline)に希釈した後、メンブレンに接触した状態で4、16時間反応させた。メンブレンは、0.2%Tween 20が含まれたTBS溶液をもって洗浄し、horseradish peroxidaseが結合されたコチニンを1/1000希釈した溶液を、常温で2時間メンブレンと反応させた。その後、メンブレンを0.2%Tween 20が含まれているTBS溶液により洗浄し、

化学発光 (chemiluminescent) 物質を処理した後フィルムに感光した。
ヒト補体 C5 - cotini body が選択的にヒト補体 C5 に結合することを確認した
(図 23)。

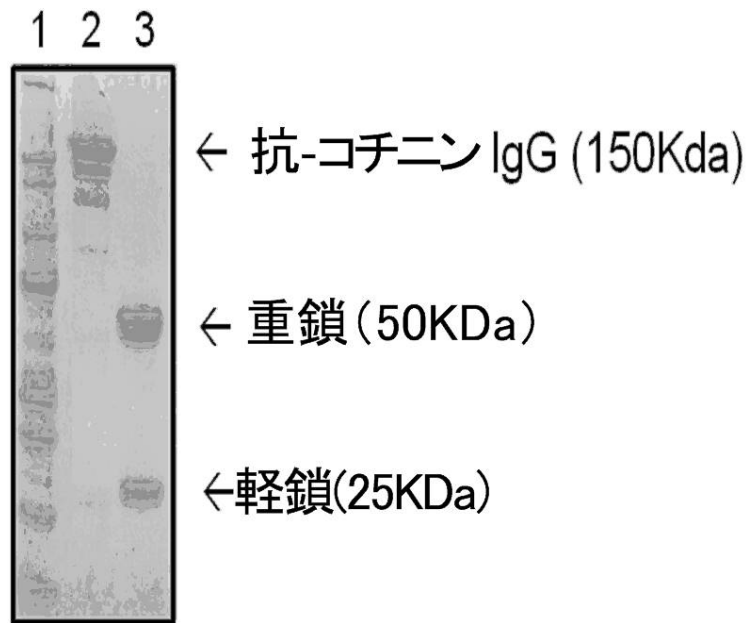
【0163】

本発明を前記具体的実施例に関連して記述したが、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲内で当分野の熟練者は、本発明を多様に改変および変化させることができる。

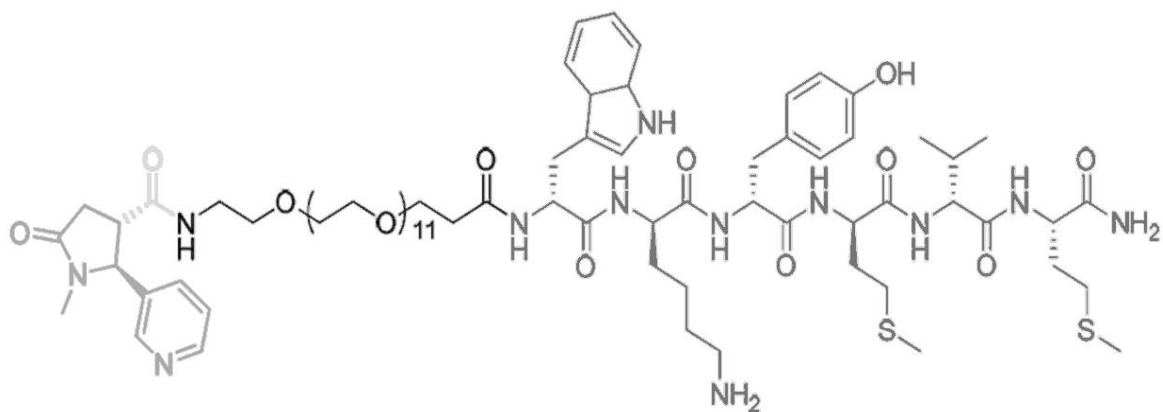
도 9



【図1】

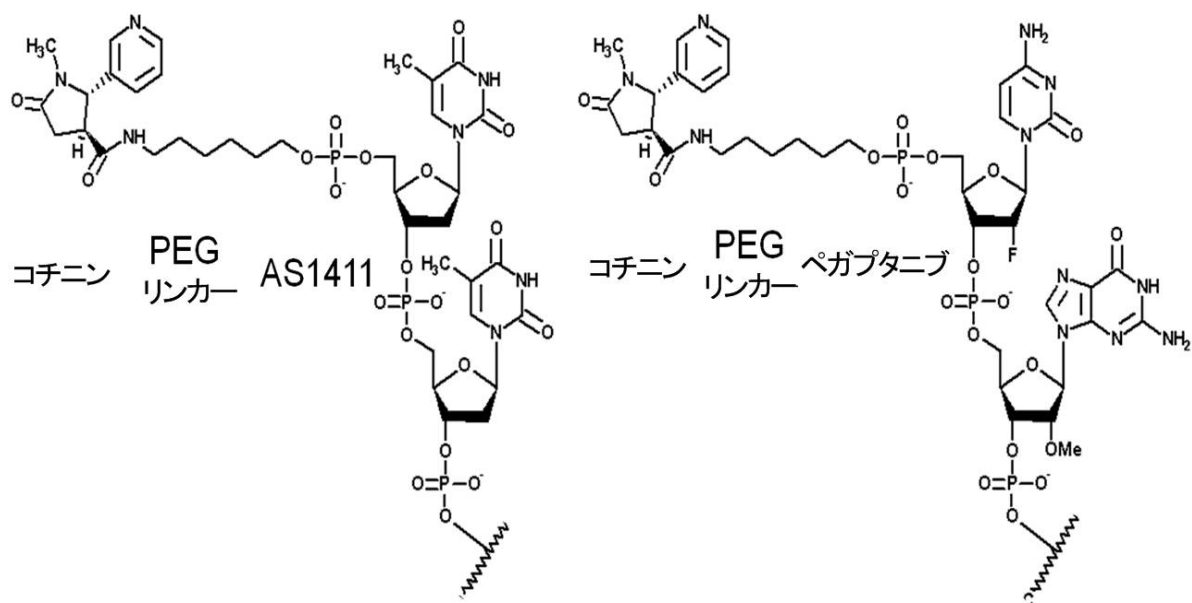


【図2】

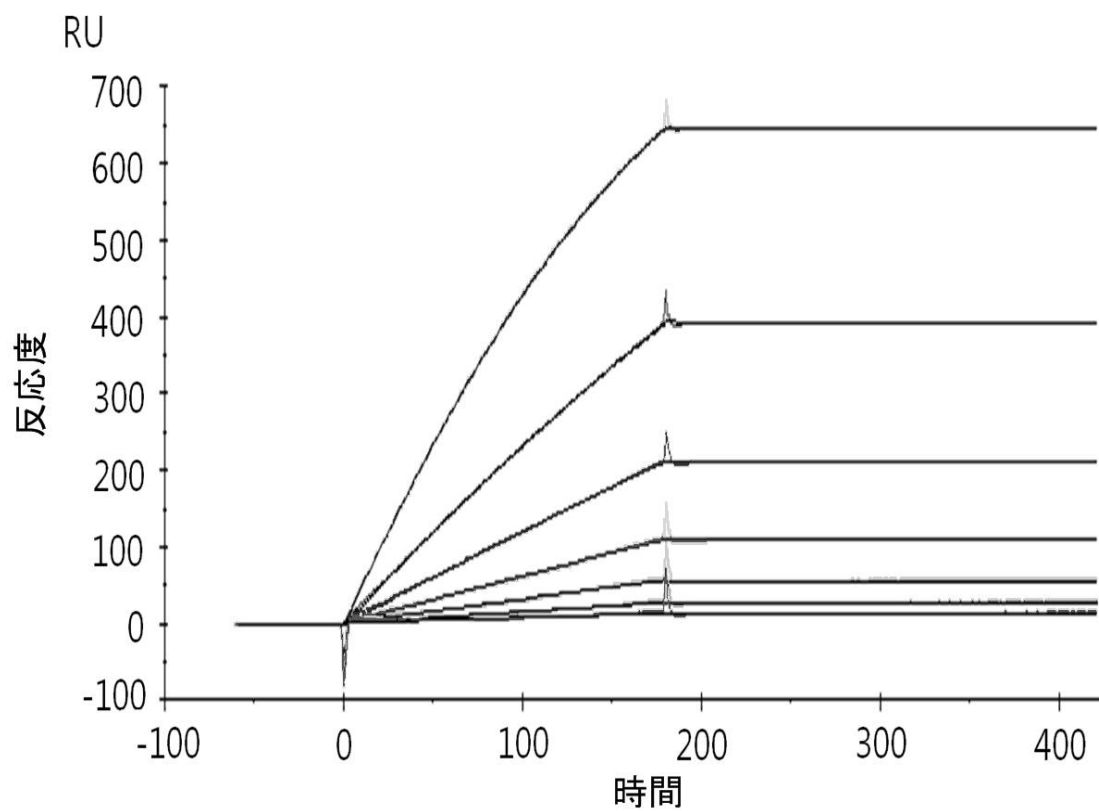


コチニン PEGリンカー WKYMMVm-NH₂

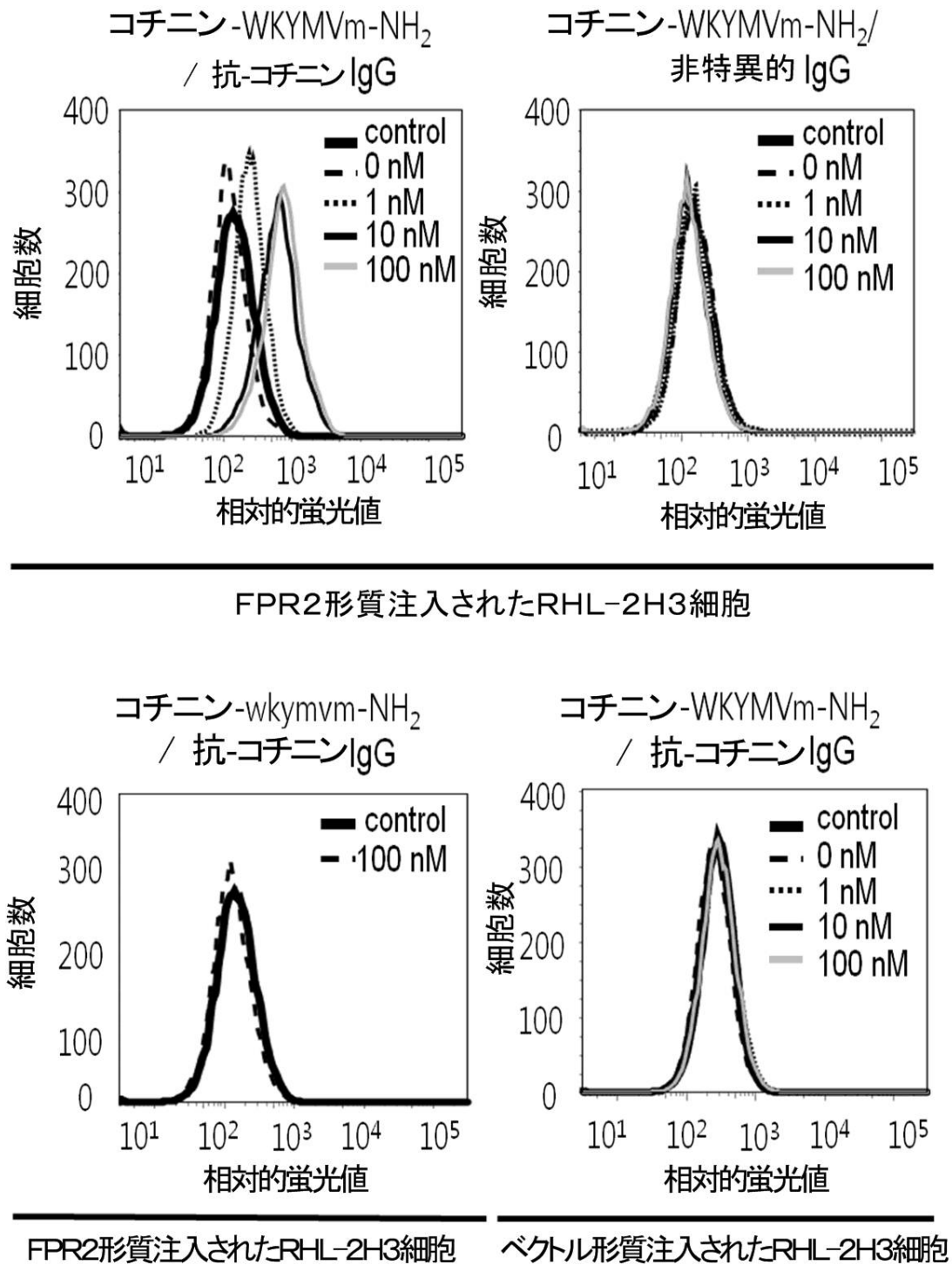
【 図 3 】



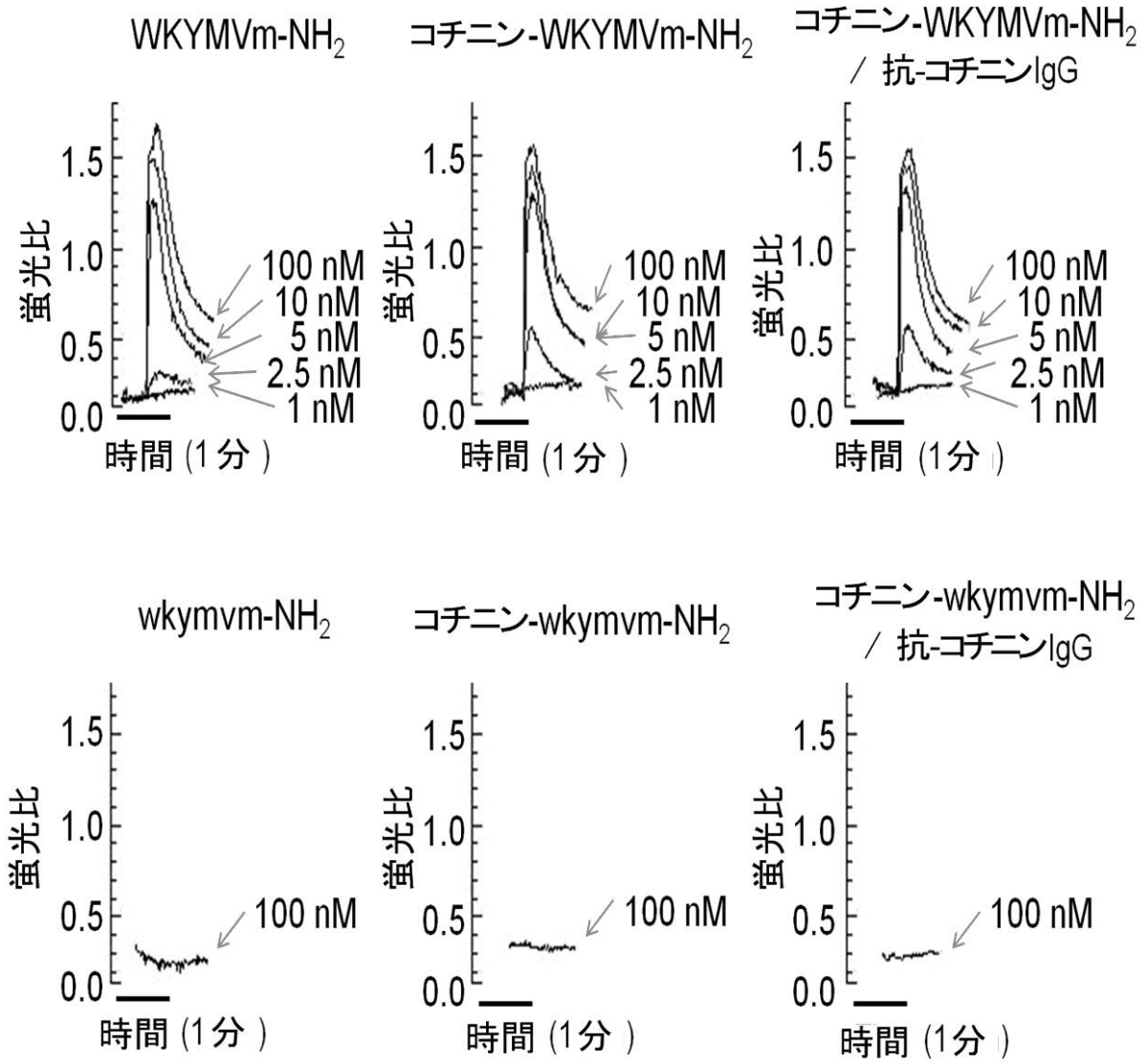
【 図 4 】



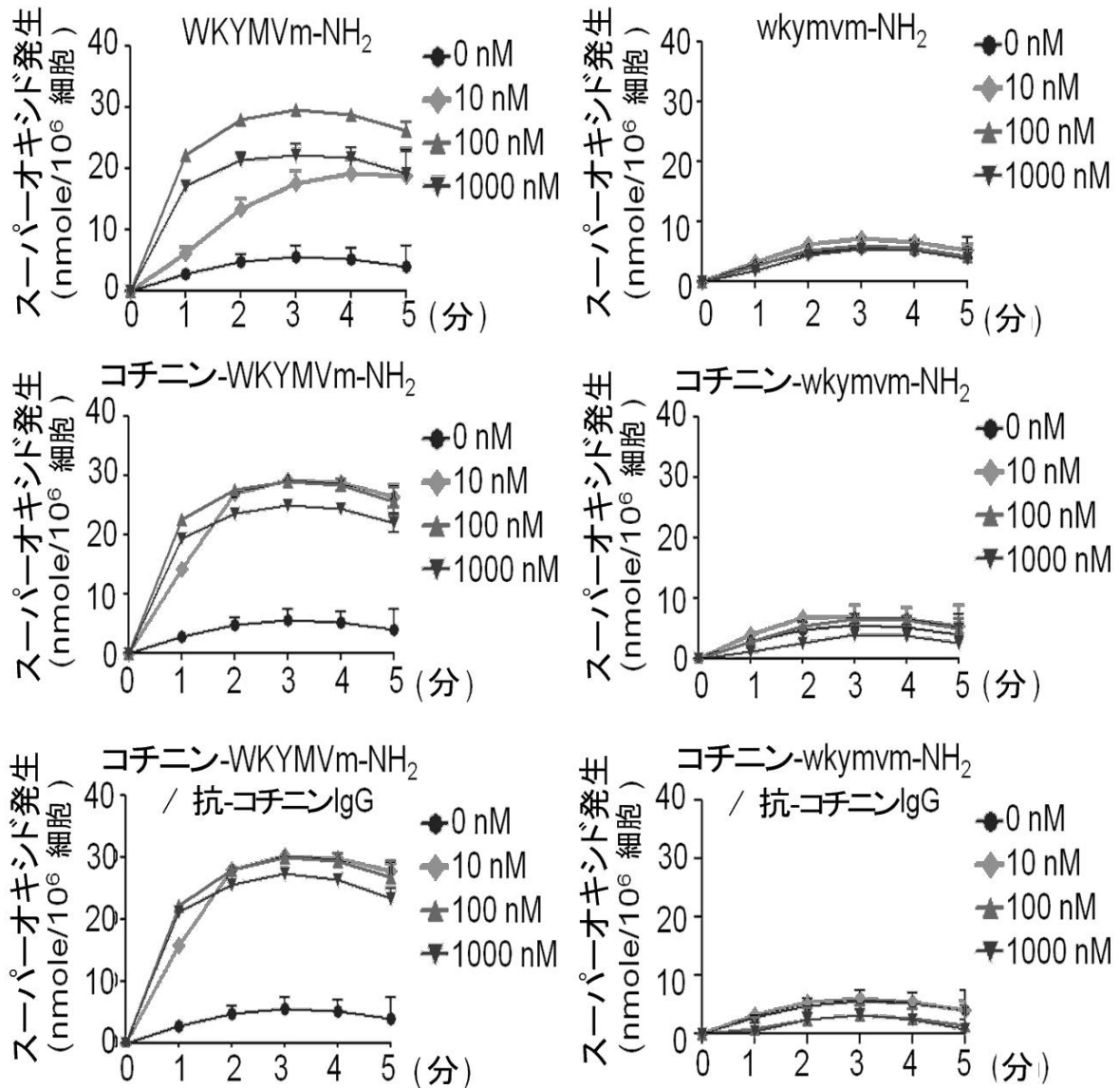
【図5】



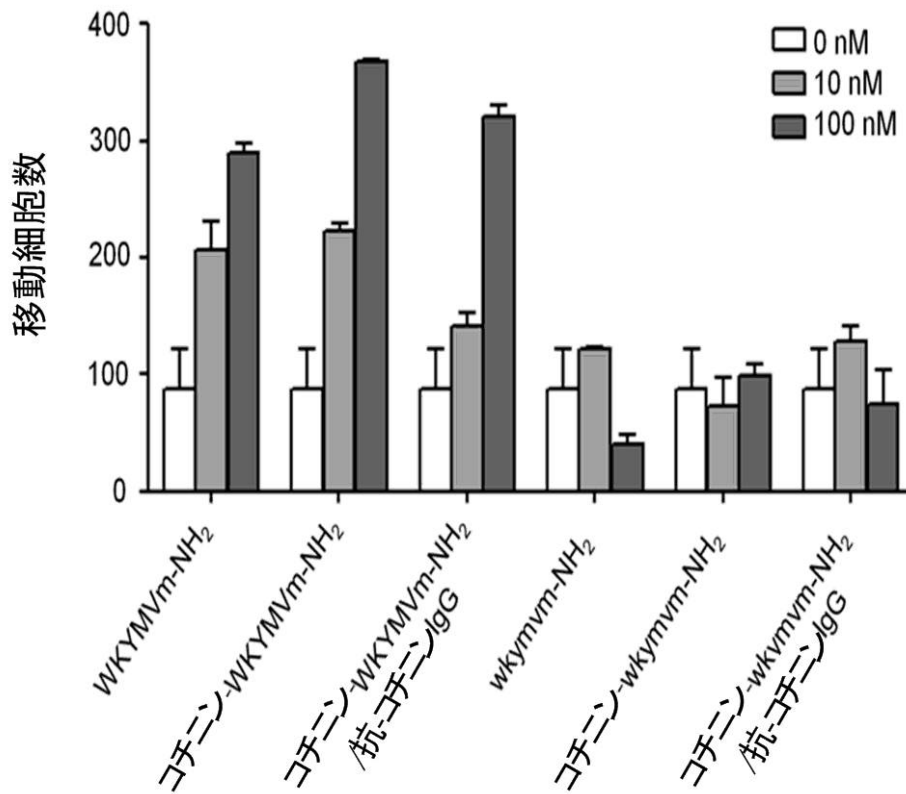
【図6】



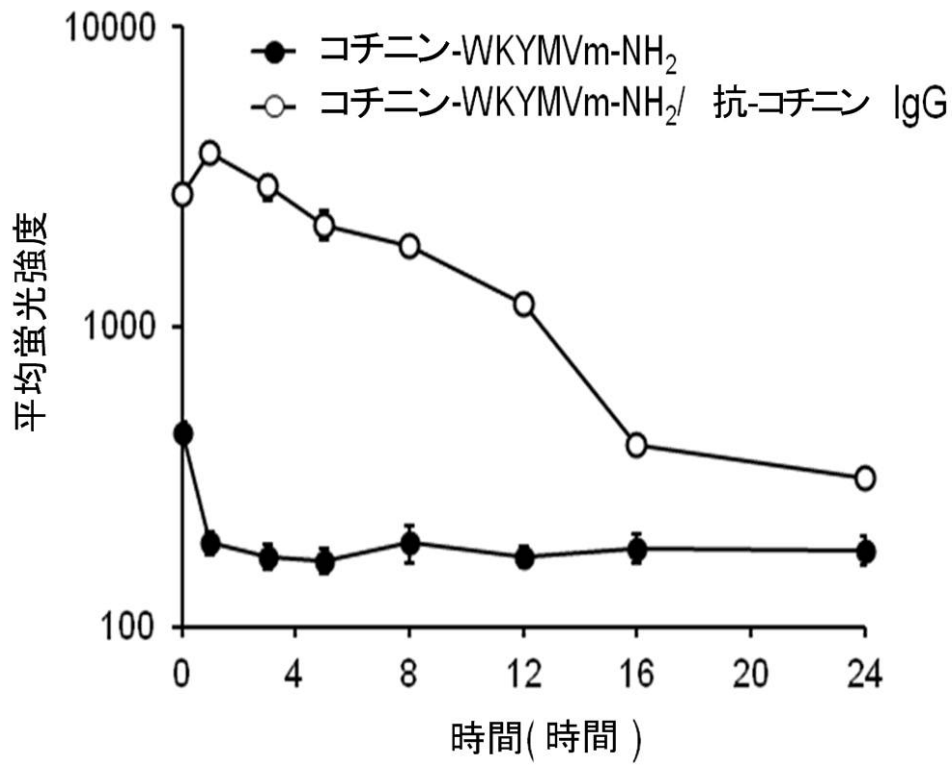
【図 7】



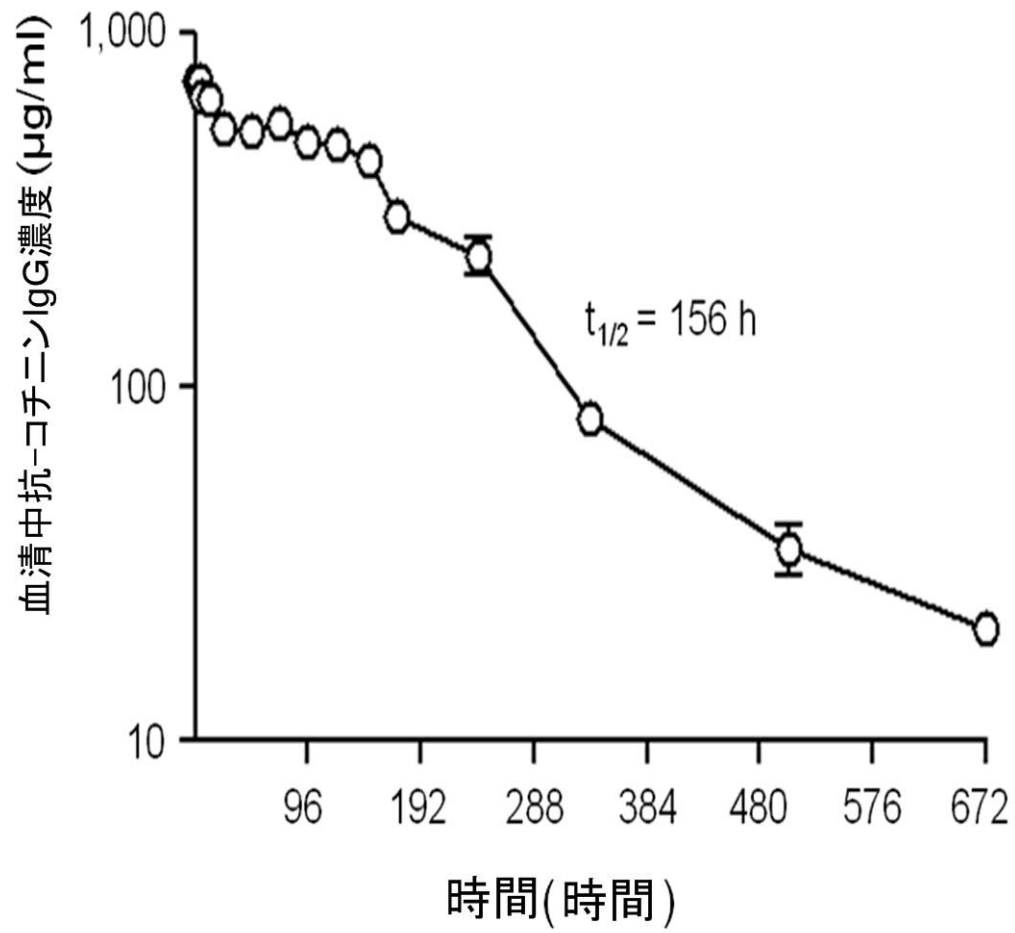
【図 8】



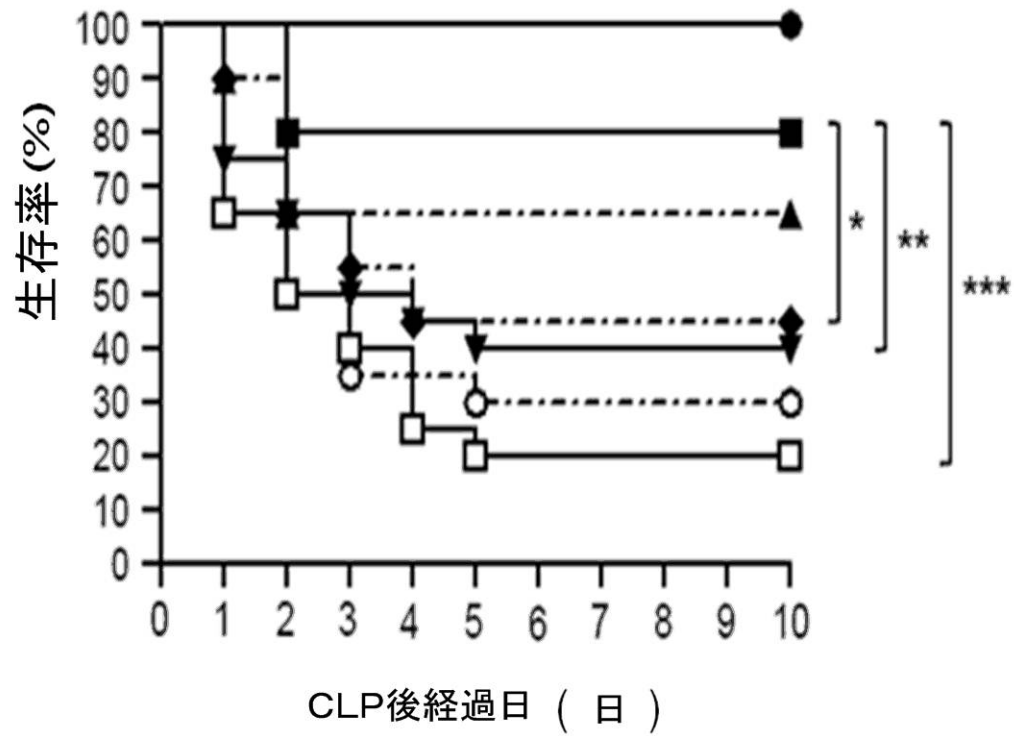
【図 9】



【図10】



【図 11】



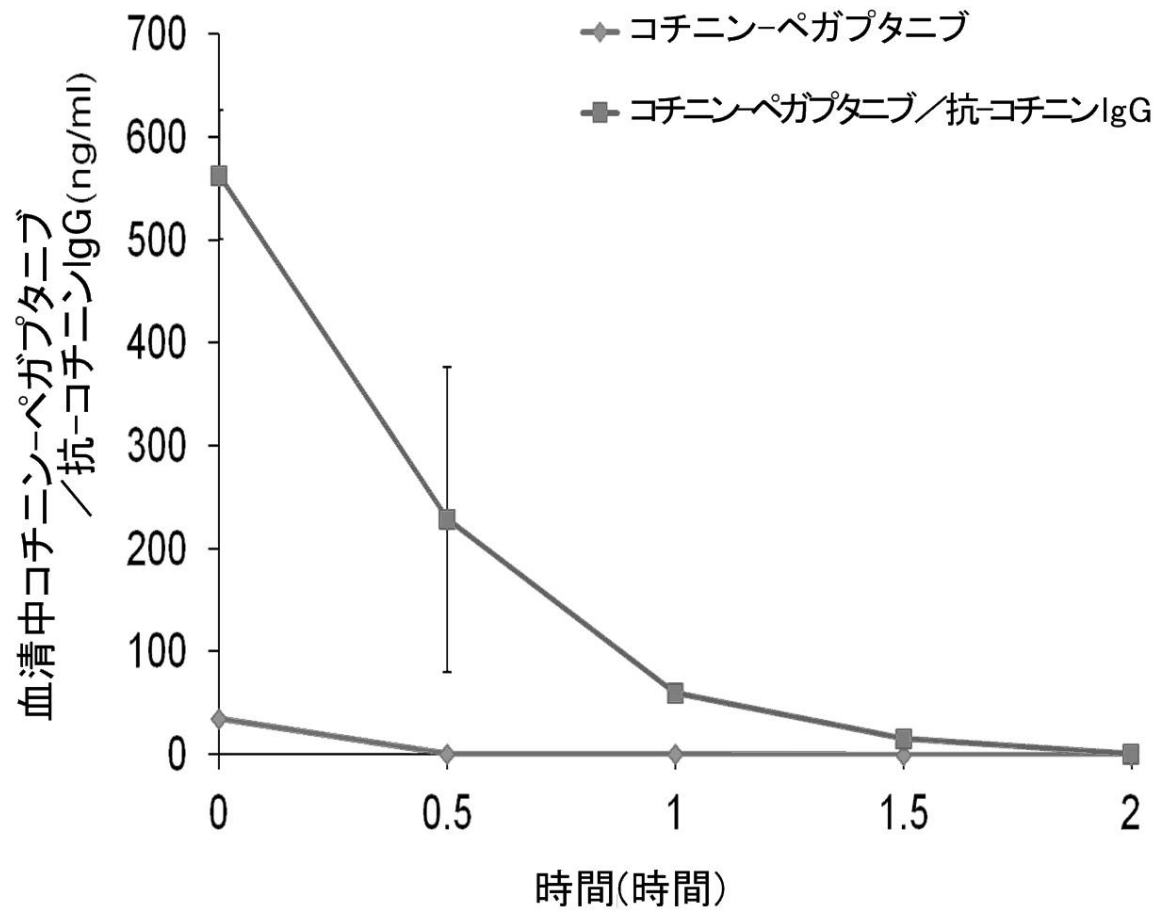
● シヤム

■ コチニン-WKYMVm-NH₂/ 抗-コチニン IgG (0.4 mg/kg and 18mg/kg)▲ コチニン-WKYMVm-NH₂/ 抗-コチニン IgG (0.04 mg/kg and 1.8mg/kg)▼ コチニン-WKYMVm-NH₂ (0.4 mg/kg)◆ WKYMVm-NH₂ (0.2 mg/kg)

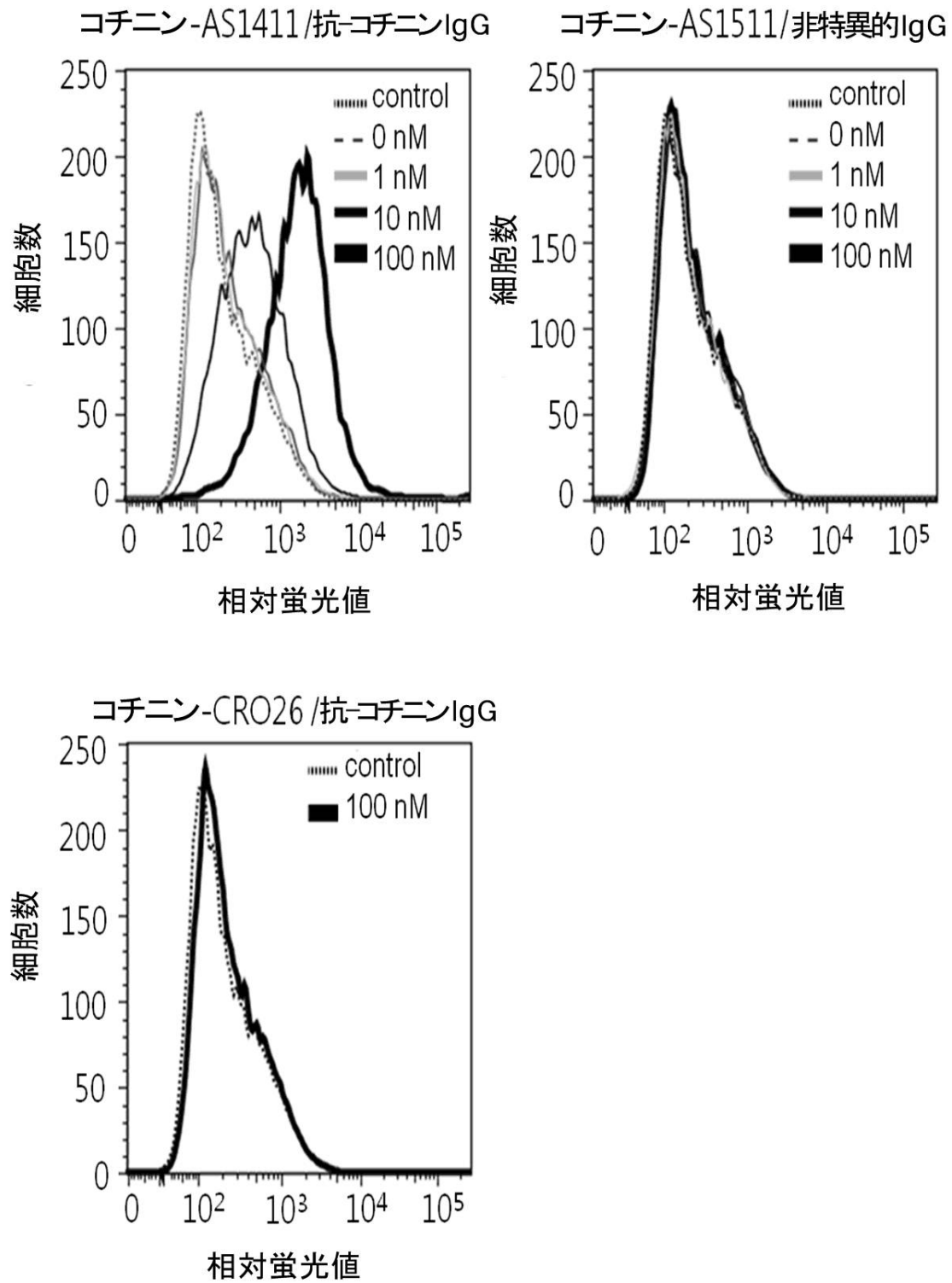
○ 抗-コチニン IgG (18 mg/kg)

□ PBS

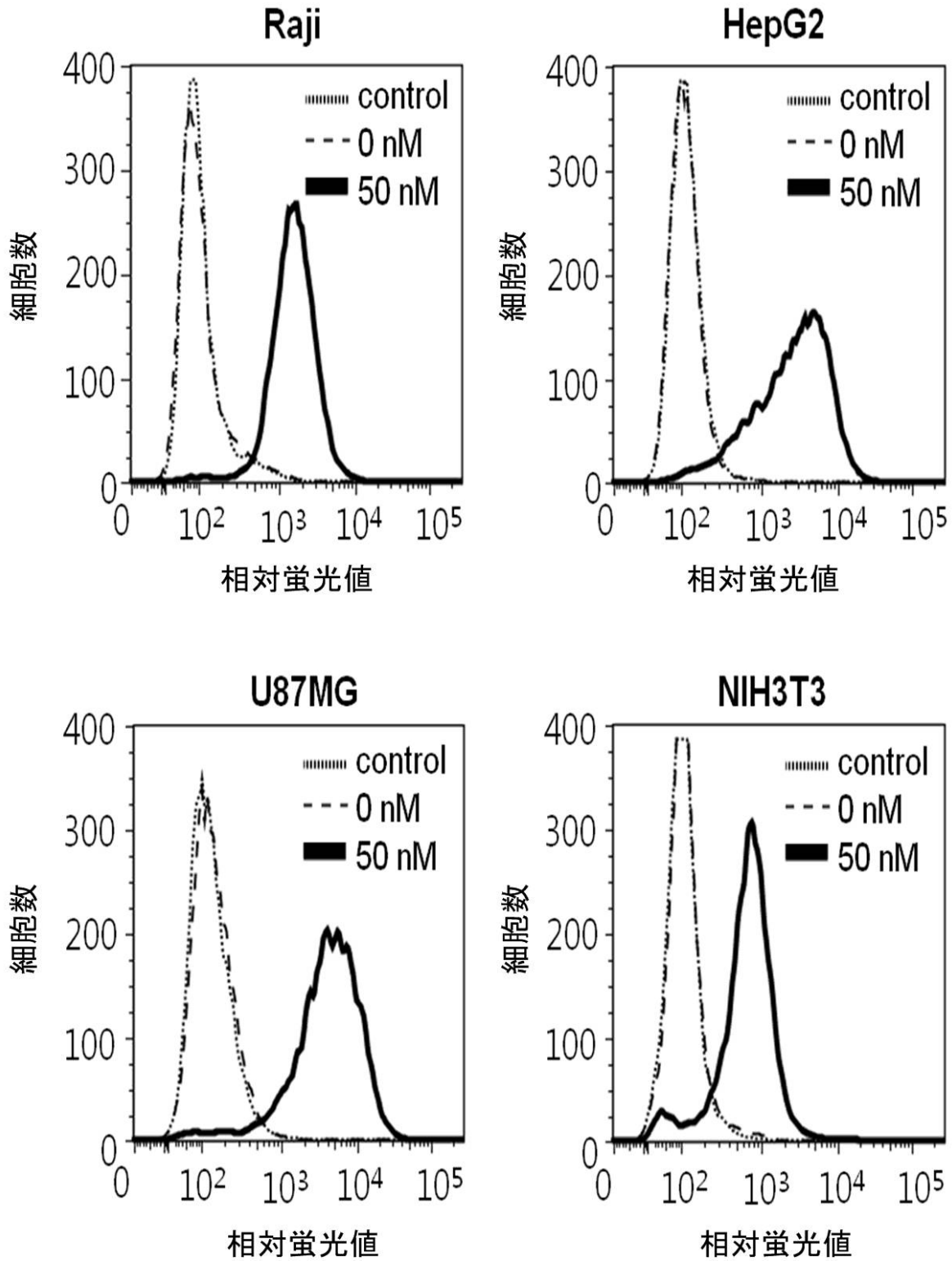
【図 12】



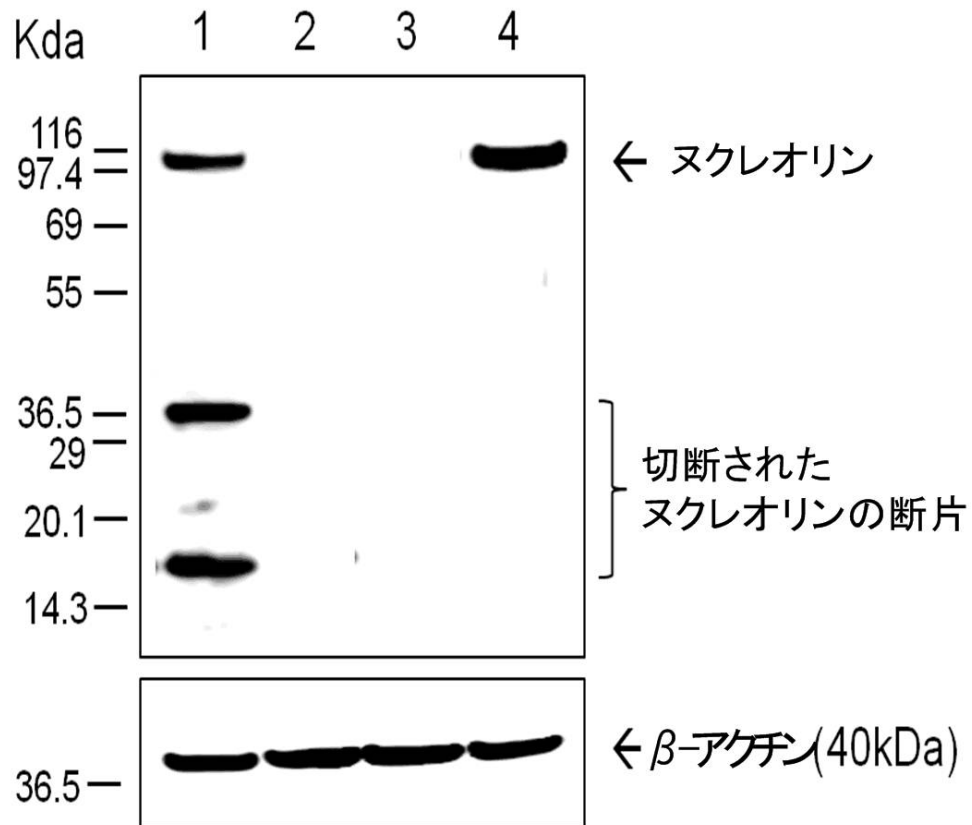
【図 13】



【図 14】



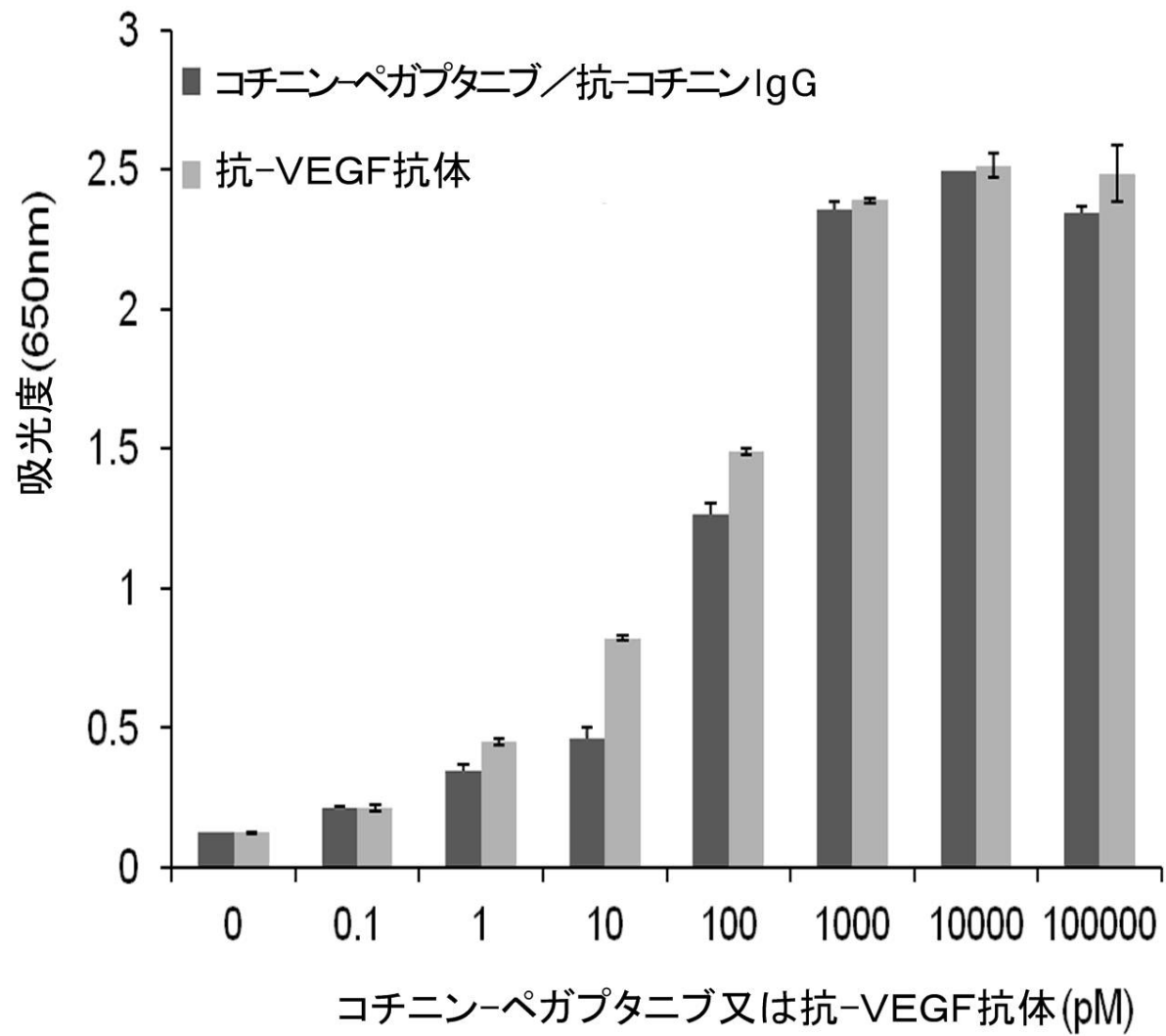
【図15】



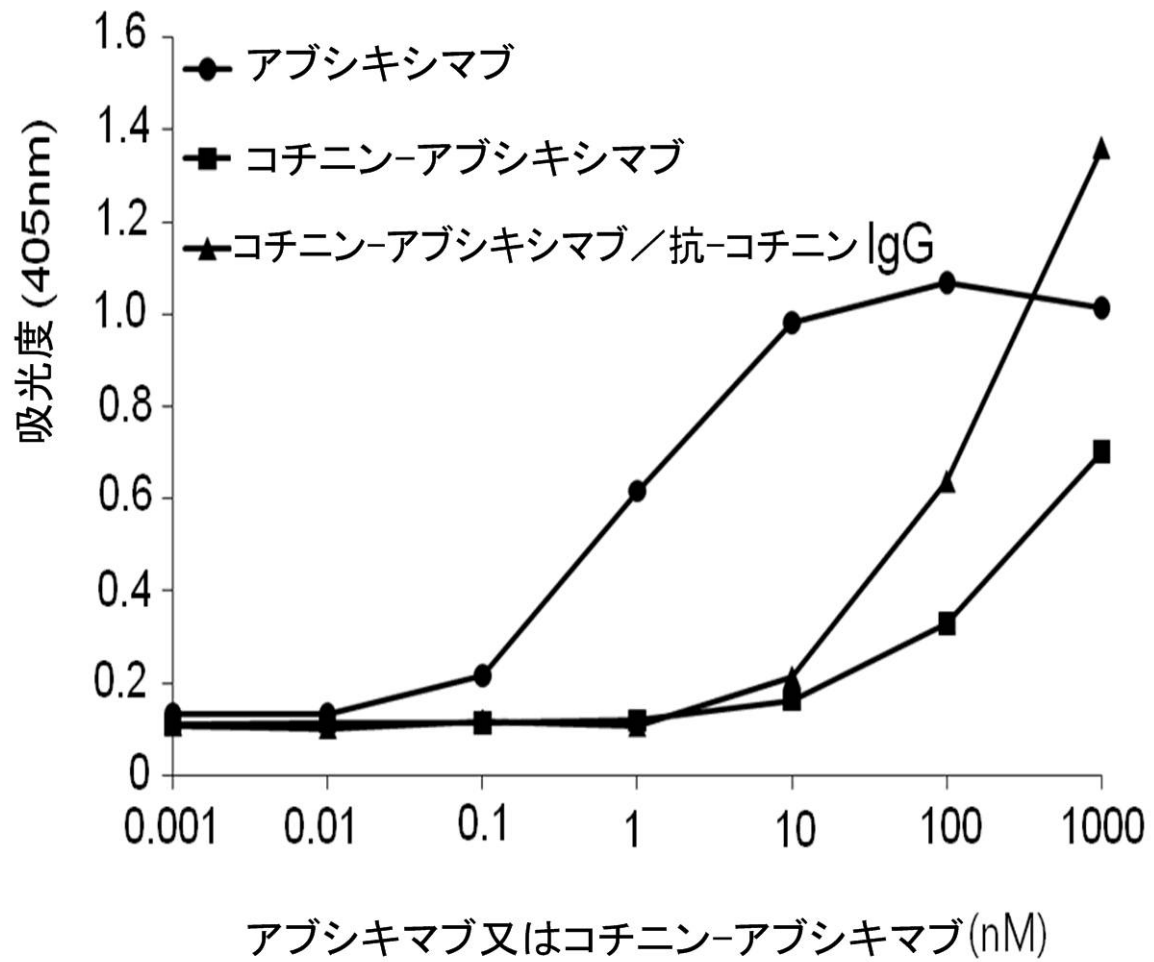
【図16】



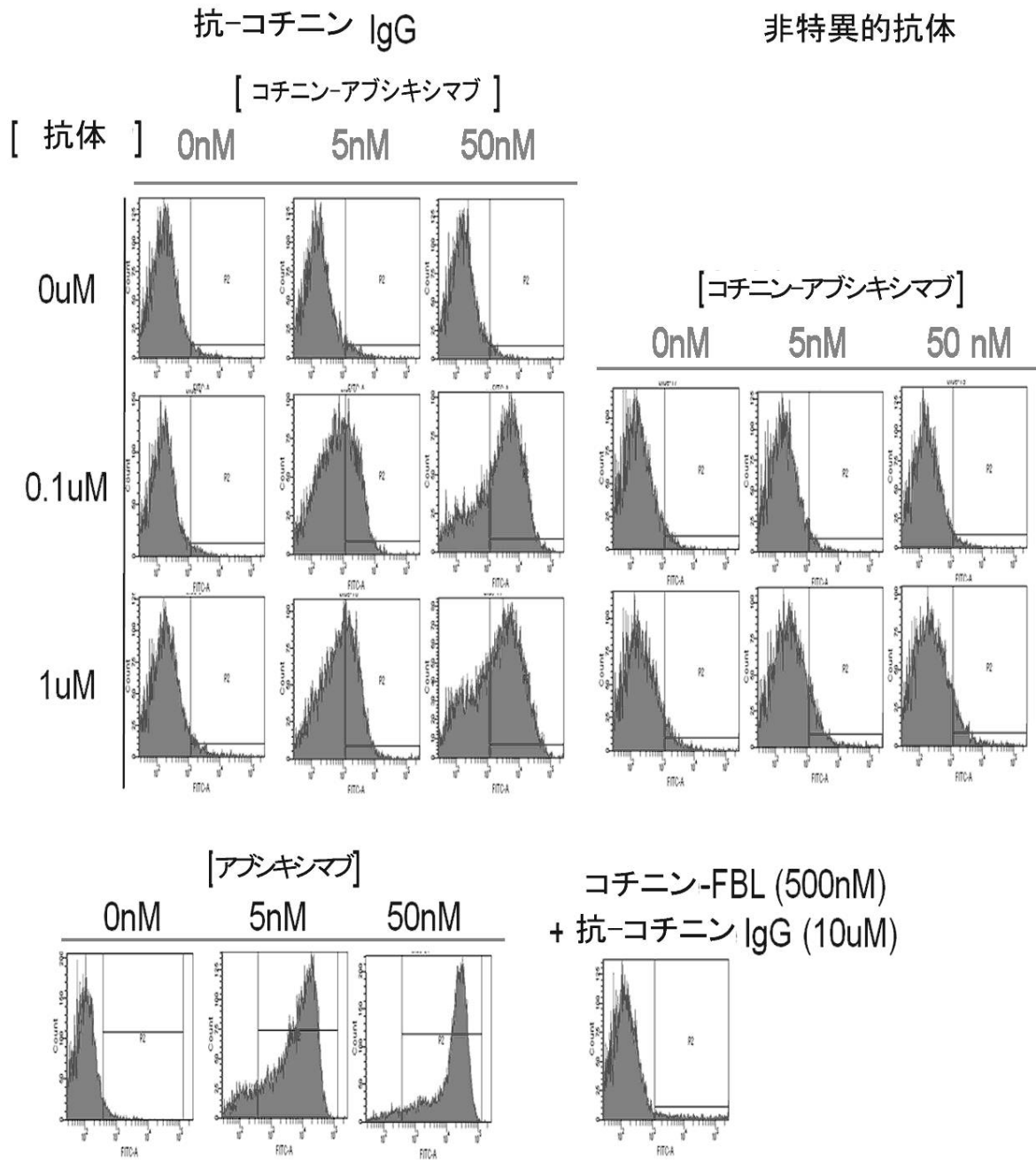
【図 17】



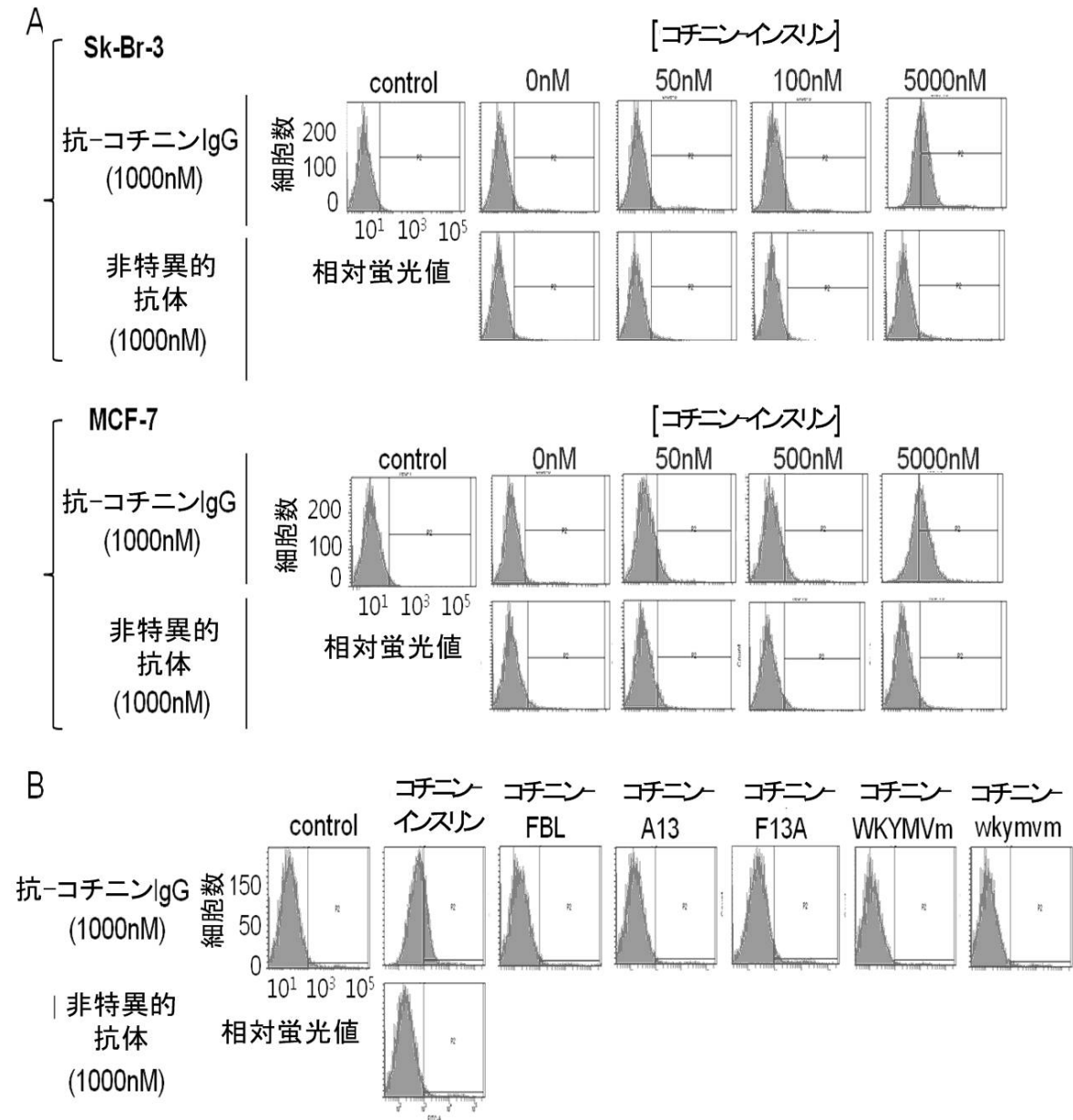
【図 18】



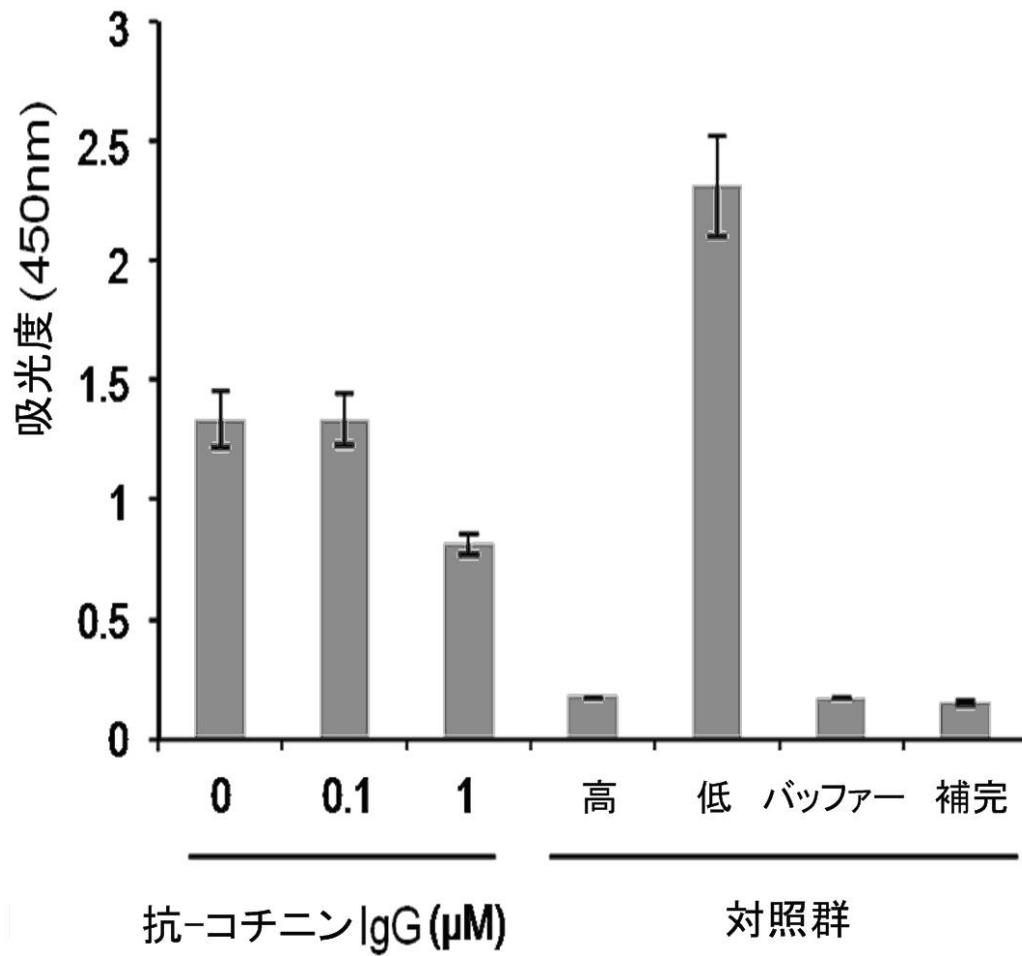
【図 19】



【図 20】



【図 2 1】

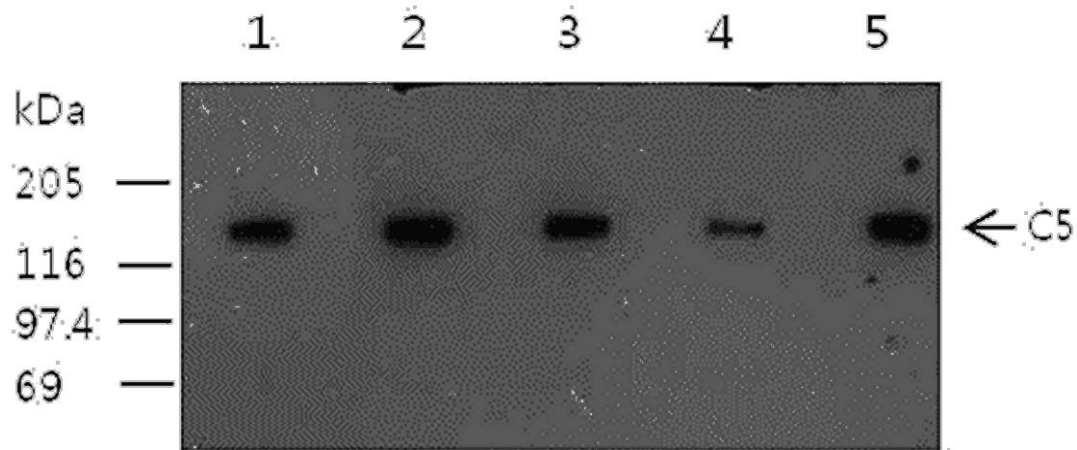


【図 2 2】

接合物質 コチニン 抗-コチニンIgG



【図 23】



【配列表】

0005838486000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	S
G 0 1 N 33/535 (2006.01)		G 0 1 N 33/535	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 N 15/115 (2010.01)		C 1 2 N 15/00	H

(72)発明者 パク ソンヨン
 大韓民国 1 1 0 - 0 5 4 ソウル ジョンノグ サジクドン プンリム スペース ボン 2 0
 2 - 5 1 4

(72)発明者 ファン ドビン
 大韓民国 1 3 5 - 8 2 8 ソウル カンナムグ デチ 1ドン ゲボ ウソン 1チャ アパー
 ト 1 2 - 7 0 5

(72)発明者 イ ファギョン
 大韓民国 5 4 0 - 7 5 6 ジョルラナムド スンチョンシ センモクドン ビョクサン アパー
 ト 1 0 9 - 1 1 0 2

審査官 吉岡 沙織

(56)参考文献 特開昭62-122594(JP,A)
 特開2006-091023(JP,A)
 米国特許出願公開第2008/0226650(US,A1)
 PARK S. et al., Clinica Chimica Acta, 2010年, Vol.411, P.1238-1242

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 K
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 9 8
 C 1 2 N 1 5 /
 C 1 2 Q
 A 6 1 K 3 9 /
 A 6 1 P
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	具有结合缀合物和可替宁的缀合物的抗可替宁抗体的复合物及其用途		
公开(公告)号	JP5838486B2	公开(公告)日	2016-01-06
申请号	JP2014505086	申请日	2012-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	首尔大学校产学协力团		
申请(专利权)人(译)	首尔国立大学产学协力机构		
当前申请(专利权)人(译)	首尔国立大学产学协力机构		
[标]发明人	チョンジュンホ パクソンヨン ファンドビン イファギョン		
发明人	チョン ジュンホ パク ソンヨン ファン ドビン イ ファギョン		
IPC分类号	C07K16/44 C07K16/46 C12Q1/68 C12Q1/02 A61K39/395 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/535 C12N15/09 C12N15/115		
CPC分类号	A61K31/465 A61K47/545 A61K47/6891 A61K2039/505 B82Y5/00 C07D401/04 C07D401/14 C07K16/18 C07K16/2848 C07K16/44 C07K2317/24 C07K2317/31 C07K2317/622 C07K2317/92 C07K2317/94 G01N33/94 C07K14/575 C07K17/02 A61K47/6803 A61K47/6849		
FI分类号	C07K16/44.ZNA C07K16/46 C12Q1/68.A C12Q1/02 A61K39/395.L A61P43/00.105 G01N33/53.S G01N33/535 C12N15/00.A C12N15/00.H		
优先权	61/476018 2011-04-15 US		
其他公开文献	JP2014517819A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种复合物，其中抗可替宁抗体与结合材料和可替宁的缀合物结合，以及该复合物的用途。根据本发明的复合物可以用作体外生物测定方法中的分析工具，并且可以保留结合材料的特异反应性和生物学功能，以及诱导补体介导的细胞毒性 (CDC) 的能力。和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 和延长的体内半衰期，这是抗体的固有特征。

(21) 出願番号	特願2014-505086 (P2014-505086)	(73) 特許権者	513246872
(86) (22) 出願日	平成24年4月16日 (2012. 4. 16)		ソウル大学校産学協力団
(65) 公表番号	特表2014-517819 (P2014-517819A)		SNU R&DB FOUNDATION
(43) 公表日	平成26年7月24日 (2014. 7. 24)		大韓民国 151-015 ソウル クァ
(86) 国際出願番号	PCT/KR2012/002873		ナック クァナックロ 1
(87) 国際公開番号	W02012/141554	(74) 代理人	100121728
(87) 国際公開日	平成24年10月18日 (2012.10.18)		弁理士 井関 勝守
審査請求日	平成25年11月20日 (2013.11.20)	(74) 代理人	100129997
(31) 優先権主張番号	61/476, 018		弁理士 田中 米福
(32) 優先日	平成23年4月15日 (2011. 4. 15)	(72) 発明者	チョン ジュンホ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		大韓民国 463-862 キョンギド
			ソンナムシ プンダング ソヒョンロ17
			0 ティー-1801

最終頁に続く