

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年10月1日(01.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/119455 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/055479
- (22) 国際出願日: 2009年3月19日(19.03.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-083588 2008年3月27日(27.03.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 権田 幸祐 (GONDA, Kohsuke) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 樋口 秀男 (HIGUCHI, Hideo) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 大内 憲明 (OHUCHI, Noriaki) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 武田 元博 (TAKEDA, Motohiro) [JP/JP]; 〒9808577 宮城
- 県仙台市青葉区片平二丁目1番1号国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外 (TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2009/119455 A1

(54) Title: CANCER CELL MOTILITY AND CANCER CELL INFILTRATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: がん細胞運動およびがん細胞浸潤抑制剤

(57) Abstract: Provided are an antibody which binds specifically to PAR1 (protease-activated receptor 1) or a fragment of the preceding antibody which sustains similar characteristics thereto; a composition containing the same for inhibiting the motion activity and infiltration activity of cancer cells; and a medicinal composition for treating cancer and the like.

(57) 要約: PAR1(プロテアーゼ活性化受容体1)に特異的に結合する抗体または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント、それを含むがん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物、ならびにがん治療用医薬組成物などが提供される。

明 細 書

がん細胞運動およびがん細胞浸潤抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、がん細胞運動およびがん細胞浸潤抑制剤に関する。さらに詳細には、MMP1により誘導される細胞運動活性および細胞浸潤活性を抑制するPAR1抗体、ならびに該PAR1抗体を含有する医薬組成物などに関する。なお、本願は、日本国特許出願第2008-83588号に対して優先権を主張するものであり、参照により該日本国特許出願の内容を本願に一体化させる。

背景技術

[0002] 細胞の運動能および浸潤能が異常に高まった結果生じる疾病の典型はがんである。がんの最たる脅威の1つとして転移が挙げられる。転移性がん細胞は細胞運動によって原発巣から血管を介して移動し、血管内に浸潤した後、血流に乗り他の組織へ転移する。PAR1 (Protease activated receptor 1:プロテアーゼ活性化受容体1)は、がん細胞の運動能および浸潤能を活性化する7回膜貫通型受容体で、多種のがん(乳がん、肺がん、膵臓がんおよび前立腺がんなど)の転移に関与するものである。特に乳がんでは、転移能を有するがん培養細胞株のほとんどでPAR1が発現しており、がん特有のプロテアーゼ(MMP1:Matrix Metalloprotease 1:マトリックスメタロプロテアーゼ1)によって、PAR1のN末の細胞外領域(R₄₁とS₄₂の間)が切断されるとPAR1が活性化することが知られている。PAR1活性化の刺激は、PAR1の細胞内領域にカップルしているGタンパク質を活性化する。その結果、細胞内Ca²⁺濃度が局所的に高まり、このCa²⁺シグナルにより細胞運動能および細胞浸潤能が増強されると考えられている(非特許文献1参照)。

[0003] PAR1はもともと血小板を活性化させるために必要なトロンビン依存性の受容体(トロンビン受容体)として発見された。トロンビンは、MMP1と同じPAR1の部位を認識して切断する。また、血小板におけるトロンビン受容体の活性化もがん細胞の場合と同様に、Ca²⁺シグナルを活性化する。現在、PAR1のN末細胞ドメインに対するモノクローナル抗体がいくつか販売されており、これらの抗体は血小板の活性化を阻害

するものである。しかしながら、これらの抗体とがん細胞の運動性および浸潤性との関係に関する報告はなく、ましてやがん細胞の運動性および浸潤性をPAR1抗体で阻害する、あるいはPAR1抗体をがん治療に使用するという報告はない。

[0004] また、PAR1のGタンパク質結合部位に相当するペプチドを合成し、このペプチドに膜透過性を持たせたペプデュシン(Pepducin)という物質が作製されている(非特許文献2参照)。CovicらはペプデュシンをGタンパク質の拮抗剤として利用することでPAR1の活性を阻害することに成功している(ペプデュシンの阻害効果は3-4 μ M)。これに対し、抗体を抗がん剤として応用する方法は、標的分子活性の阻害効果だけでなく、免疫系細胞による抗体依存性細胞障害活性の効果が期待できる。さらに抗体は、遺伝子工学により高親和性抗体を作製する技術が確立されており、また生体への安全性も保証されているなど抗体を抗がん剤として応用するメリットは非常に大きい。そのため、PAR1抗体を抗がん剤として応用すれば、ペプデュシンより効果的な抗がん剤となりうる可能性を秘めていると考えられる。

[0005] PAR1の52番目のTyrから56番目のTrpをエピトープとする抗体がファージディスプレイ法で作製され、該抗体は、トロンビンがPAR1を切断する活性を阻害する。該抗体がPAR1の切断活性を阻害すること(PAR1への結合)に関して、特に56番目のTrpがエピトープとして含まれることが重要であるとされている(特許文献1参照)。現在、がん細胞の運動性や浸潤性をPAR1抗体で阻害する報告や、阻害効果に有効なPAR1抗体のエピトープとして他のペプチド配列が見出されたとの報告はない。
特許文献1:特開2002-10784号公報

非特許文献1:Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. Cell 120:303-313(2005)

非特許文献2:Covic L, Misra M, Badar J, Singh C, Kuliopulos A. Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. Nat. Med. 8:1161-1165(2002)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、細胞運動性および浸潤性に関する機能を効果的に阻害する薬剤を提供すること、詳細には、細胞のPAR1の活性を抑制して細胞運動性および浸潤性に関する機能を効果的に阻害する薬剤を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、PAR1のMMP1による切断部位(Arg₄₁とSer₄₂の間)を含む領域に特異的に結合する抗体を見出した。さらにこの抗体が、MMP1により誘導される細胞運動活性および細胞浸潤活性を阻害することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は：

(1) PAR1(プロテアーゼ活性化受容体1)に特異的に結合してMMP1(マトリックスメタロプロテアーゼ1)による切断を阻害し、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害する抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント；

(2) PAR1(プロテアーゼ活性化受容体1)のMMP1(マトリックスメタロプロテアーゼ1)による切断部位(Arg₄₁とSer₄₂の間)を含む領域をエピトープとして特異的に結合し、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害する(1)記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント；

(3) 該エピトープのアミノ酸配列が配列番号:1で示されるものである(2)記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント；

(4) 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターから受託番号FERM BP-11105を付与されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、(3)記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント；

(5) キメラ化またはヒト化されている、(1)～(4)のいずれかに記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント；

(6) モノクローナル抗体である(1)～(5)いずれかに記載の抗体；

(7) ポリクローナル抗体である(1)～(3)または(5)のいずれかに記載の抗体；

(8) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを含む、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物；

(9) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを含む、がん治療用医薬組成物;

(10) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを含む、医薬組成物の有効量を治療を必要とする対象に投与することを含むがんの治療方法;

(11) がんを治療するための医薬の製造における(1)～(7)のいずれかに記載の抗体またはフラグメントの使用;

(12) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを、対象から得た試料と接触させ、試料中の腫瘍細胞と結合させることを特徴とする、試料中の腫瘍細胞のイメージング方法または腫瘍の検出方法;

(13) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体またはフラグメントを含む、腫瘍細胞イメージング剤;

(14) (1)～(7)のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメントを対象に投与して、体内の腫瘍組織と本発明の抗体または抗体フラグメントとの結合を調べることを特徴とする、腫瘍の診断方法;

(15) 配列番号:1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド;

(16) 配列番号:1で示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよびキャリア蛋白からなる抗原性ペプチド;

(17) (15)記載のペプチドまたは(16)記載の抗原性ペプチドを用いることを特徴とする、PAR1に特異的に結合してMMP1による切断を阻害する抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメントの作製方法;

(18) (15)記載のペプチドまたは(16)記載の抗原性ペプチドを用いることを特徴とする、PAR1に特異的に結合してMMP1による切断を阻害する抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメントの精製方法;

(19) (15)記載のペプチドまたは(16)記載の抗原性ペプチドを含む、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物を提供するものである。

発明の効果

[0008] 本発明のPAR1に特異的に結合してMMP1による切断を阻害し、がん細胞の運

動活性および浸潤活性を阻害する抗体(以下、本明細書において「PAR1抗体」という)は、がん細胞の運動能および浸潤能を効果的に阻害することができるので、優れた抗がん剤を得ることができる。また、本発明のPAR1抗体を用いて腫瘍の検出やイメージングを行うこともできる。さらに本発明の抗原性ペプチドを用いて、有効なPAR1抗体を取得し、あるいは精製することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]実施例2のPAR1の部分アミノ酸配列(配列番号:3)および合成ペプチド(1)～(18)のアミノ酸配列(配列番号:4～21)ならびに各配列に対するN2-11抗体の結合を示すグラフである。なお、ペプチド溶液の濃度は、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ である。

[図2]実施例3のPAR1の部分アミノ酸配列(配列番号:24)および実施例3の合成ペプチドPAR1-N3-(1)～(27)のアミノ酸配列(配列番号:25～51)ならびに各配列に対するN3-1抗体の結合を示すグラフである。上グラフは、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド溶液であり、下グラフは、 $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド溶液である。

[図3] $3 \mu\text{M}$ または $10 \mu\text{M}$ のマウスIgG(コントロール)の浸潤細胞数を100%とした場合の(a)～(c)の各条件における浸潤細胞数の割合を示すものである。なお、(a)は $3 \mu\text{M}$ N2-11抗体($n=30$)処理、(b)は $10 \mu\text{M}$ N2-11抗体($n=80$)処理、および(c)は $10 \mu\text{M}$ N3-1抗体($n=40$)処理を示す。マトリゲルチャンバーには 1.5×10^5 細胞/ウェルをアプライした。 $10 \mu\text{M}$ のマウスIgGでは約 2.4×10^3 細胞が浸潤能を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図4]実施例5の(A)～(D)により得られた細胞(各々、カラム1～4)およびカラム1～4のデータの定量的解析結果を示すものである。エラーバーは標準誤差を示す。ただし、(カラム1) $n=16$ 、(カラム2) $n=11$ 、(カラム3) $n=11$ 、(カラム4) $n=10$ 。

[図5]表1の(a)～(d)の条件における2～13時間の間の1時間当たりの平均運動速度を示すものである。エラーバーは標準誤差を示す。

[図6]表2の(b)の条件の浸潤細胞数を100%とした場合の表2の(a)、(c)および(d)の各条件における浸潤細胞数の割合を示すものである。マトリゲルチャンバーには 1.5×10^5 細胞/ウェルをアプライした。(b)の条件では約 2.2×10^3 細胞が浸潤能を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

[図7]N2-11抗体-QDを用いた生体腫瘍組織のイメージング像を示す図である。(B)は(A)の2個の腫瘍細胞の像を示すものである(細胞の輪郭を白で示した)。細胞中央の黒く抜けた部分は核を示す。

[図8]表3の(a)の条件の浸潤細胞数を100%とした場合の表3の(a)、(b)および(c)の各条件における浸潤細胞数の割合を示すものである。マトリゲルチャンバーには 1.5×10^5 細胞/ウェルをアプライした。(a)の条件では約 1.5×10^3 細胞が浸潤能を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明は、1の態様において、PAR1抗体、および該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメントを提供する。本発明のPAR1抗体は、具体的には、MMP1による切断部位を含むPAR1の特定の領域に特異的に結合し、その結果、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するものであってもよい。あるいは本発明のPAR1抗体は、PAR1に特異的に結合し、立体障害を生じさせることによりMMP1による切断部位へのMMP1のアクセスを阻害するものであってもよい。本発明のPAR1抗体は、このようにしてMMP1によるPAR1の切断を阻害することにより、がん細胞の運動活性および浸潤活性を抑制するものである。それゆえ、本発明のPAR1抗体はがん治療に有用である。なお、本発明のPAR1抗体はモノクローナル抗体であつてもよく、あるいはポリクローナル抗体であつてもよい。

[0011] 本明細書において「該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント」とは、エピトープのアミノ酸配列が本発明のPAR1抗体のエピトープのアミノ酸配列と同じまたは類似のものであり、かつ、本発明のPAR1抗体と同じまたは同様のがん細胞運動阻害活性および浸潤阻害活性を有するフラグメントをいう。本発明のPAR1抗体の「フラグメント」とは、本発明のPAR1抗体の一部をいい、例えばFabフラグメントなどを包含する。なお、特に明記しない限り、本明細書において「PAR1抗体」という場合には、上述のフラグメントも包含するものとする。

[0012] なお、本明細書において「エピトープ」とは、本発明のペプチドおよび抗原性ペプチドを構成する、あるいはこれらに含まれるアミノ酸配列であつて、本発明の抗体または抗体フラグメントによって認識され結合されるアミノ酸配列をいう。詳細には、本発明

に用いられるエピトープは、MMP1による切断部位(Arg₄₁とSer₄₂の間)を含む、少なくとも数個、好ましくは少なくとも10個のアミノ酸配列であるが、これらに限定されるものではない。通常は、「エピトープ」は、約5個ないし約1000個のアミノ酸からなる。本発明の「エピトープ」はその変異体も包含する。例えば、上記アミノ酸配列を有する「エピトープ」において1個ないし数個のアミノ酸が欠失、付加、および置換されたアミノ酸配列を有するものであってもよく、構成アミノ酸が修飾されたものであってもよい。ただし、かかる変異または修飾「エピトープ」は、本来の「エピトープ」の性質、すなわち、本発明の抗体または抗体フラグメントによって認識され結合される性質を保持しているものである。

[0013] PAR1の特定の領域とは、MMP1によるPAR1の切断部位(Arg₄₁とSer₄₂の間)を含む領域である。好ましい特定の領域は、上記切断部位をまたぐ約10個のアミノ酸配列であり、最も好ましいのはPAR1の35番目から45番目のアミノ酸配列NATLD PRSFL(配列番号:1)である。本発明の好ましい抗体、または抗体フラグメントは、配列番号:1からなるアミノ酸配列を抗原認識部位(エピトープ)とするものである。

[0014] なお、本明細書ではアミノ酸の表記は当該分野で公知の1文字法および3文字法を用いる。アミノ酸の右下の数字はPAR1のアミノ酸配列のN末端から数えたアミノ酸位置を示し、例えばArg₄₁またはR₄₁はPAR1のアミノ酸配列のN末端から41番目のアルギニンを表す。

[0015] 本発明のPAR1抗体であって、配列番号:1からなるアミノ酸配列をエピトープとするもののなかで、がん細胞の運動活性および浸潤活性を強く阻害する好ましい抗体は、ブタペスト条約の下、平成20年(2008年)3月18日より、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-11105の受託番号で寄託してある、ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である(以下、本明細書において「N2-11抗体」という)。

[0016] 実施例にて説明するように、本発明の抗体または抗体フラグメントの特徴は、アミノ酸配列NATLDPRSFL(配列番号:1)を認識して特異的に結合することである。かかるアミノ酸配列は、本発明において新しく見出されたものである。上記アミノ酸配

列を認識する利点は、本発明の抗体または抗体フラグメントがMMP-1によるPAR1の切断部位をまたぐ形のアミノ酸配列を認識することにより、効率よくMMP-1による分解を阻害するものであるが、認識部位の候補となる多くのペプチドの中から配列番号:1を選び出した点において本発明の意義は大きい。

[0017] 本発明のPAR1抗体は、例えば、以下のように調製することができる。動物、好ましくはヒトのPAR1のMMP1による切断部位(R₄₁とS₄₂の間)を含む少なくとも数個、好ましくは少なくとも10個のアミノ酸配列を標的ペプチドとして用いる。好ましい標的ペプチドは配列番号:1に示されるアミノ酸配列からなる。標的ペプチドは、公知の方法にて、例えばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などのキャリアタンパク質に結合されてもよい。これを抗原としてマウスなどの動物を免疫し、ハイブリドーマを得ることができる。得られたハイブリドーマを培養し、培養上清を用いてがん細胞の運動活性および浸潤活性を、例えばマトリゲルアッセイなどの公知方法により検定し、強力な活性を有するハイブリドーマを選択し、それが産生する抗体を、例えばアフィニティー精製などの常法にて精製・単離することができる。得られた抗体について抗体特異性および抗体効果の解析を行うことができる。本発明のPAR1抗体は、上記方法と当該分野で公知のペプチドの化学合成法を組み合わせることによっても得ることができる。本発明のPAR1抗体の作製方法は上記方法に限定されないことはいうまでもない。

[0018] さらに、常法により本発明のPAR1抗体をキメラ化およびヒト化することもできる。また本発明の抗体は一本鎖抗体であってもよい。本発明のPAR1抗体という場合、これらのキメラ抗体、ヒト化抗体、一本鎖抗体を包含する。

[0019] また上述のごとく、本発明のPAR1抗体はポリクローナル抗体であってもよい。本発明のポリクローナルPAR1抗体は、当業者に公知の手法により得ることができる。その一例を実施例9に示す。

[0020] 上記アミノ酸配列とは異なるPAR1の領域を認識する抗体、例えば特開2002-10784号公報に記載された抗体や、それと同様の認識部位を有するN3-1抗体があるが、実施例にて説明するように、N3-1抗体には、がん細胞に対する浸潤抑制活性、運動抑制活性がない。これに対し、本発明の抗体、特に配列番号:1のアミノ酸

配列をエピトープとして認識する抗体(好ましくは、N2-11抗体)または抗体フラグメント(好ましくは、N2-11抗体のフラグメント)は、がん細胞に対する浸潤抑制活性、運動抑制活性が高い。したがって、本発明の抗体または抗体フラグメントは、がん治療用として優れた効果を発揮する。

[0021] それゆえ、本発明は、もう1つの態様において、PAR1抗体、好ましくはN2-11抗体を含む、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物を提供する。本発明の組成物はインビトロにおいても、インビボにおいても効果的に作用することができる。特に、キメラ化またはヒト化された本発明のPAR1抗体を含む組成物は、ヒトのがん細胞の運動活性および浸潤活性を効果的に阻害することができる。

[0022] 本発明は、さらにもう1つの態様において、PAR1抗体、好ましくはN2-11抗体を含む、がん治療用医薬組成物を提供する。ヒトに用いる場合には、本発明の医薬組成物中のPAR1抗体はキメラ化されていることが好ましく、ヒト化されていることがさらに好ましい。本発明の医薬組成物は、任意の剤形に調製することができる。剤形は、対象のがんの部位、がんの種類、大きさ、PAR1抗体の特性、対象の身体状況、健康状態などに応じて適宜選択することができる。例えば、注射剤、輸液剤などの液剤、経皮パッチ、軟膏、クリーム、粉末などの半固形～固形剤などにするすることができる。本発明の医薬組成物は、任意の投与経路にて対象に投与することができる。投与経路は、対象のがんの部位、がんの種類、大きさ、PAR1抗体の特性、対象の身体状況、健康状態などに応じて適宜選択することができる。例えば、本発明の医薬組成物を皮内注射、皮下注射、筋肉注射、静脈注射などの注射により、輸液により、あるいは経皮パッチ、軟膏、クリームなどによる局所適用により、対象に投与することができる。本発明の医薬組成物によるPAR1抗体の投与量は、1回あたり通常 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $125\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 、さらに好ましくは $50\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $50\text{mg}/\text{kg}$ であり、1日1回～数回投与することができる。投与は毎日、数日ごと、1週間～数週間ごと、1ヶ月～数ヶ月ごとにするすることができる。本発明の医薬組成物中のPAR1抗体は1種類であってもよく、2種類以上であってもよい。好ましくは、本発明の医薬組成物はN2-11抗体またはそのフラグメントを含む。また本発明の医薬組成物はPAR1抗体以外の他の有効成分、例えば公知の抗がん剤やその他の薬剤を含ん

でいてもよい。

- [0023] 本発明は、別の態様において、本発明のPAR1抗体またはフラグメントを含む、医薬組成物の有効量を治療を必要とする対象に投与することを含む、がんの治療方法を提供する。さらに本発明は、がんを治療するための医薬の製造における本発明のPAR1抗体またはフラグメントの使用も提供する。上記方法および使用に好ましいPAR抗体はN2-11抗体である。対象は、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。
- [0024] 腫瘍細胞は、PAR1蛋白を発現している。したがって、本発明は、さらなる態様において、これに結合する本発明の抗体または抗体フラグメントを、対象から得た試料と接触させ、試料中の腫瘍細胞と結合させることを特徴とする、試料中の腫瘍細胞のイメージング方法または腫瘍の検出方法を提供する。さらに本発明は、本発明の抗体または抗体フラグメントを含む、腫瘍細胞イメージング剤も提供する。
- [0025] さらに本発明は、本発明の抗体または抗体フラグメントを対象に投与して、体内の腫瘍組織と本発明の抗体または抗体フラグメントとの結合を調べることを特徴とする、腫瘍の診断方法も提供する。
- [0026] これらの方法およびイメージング剤において、本発明の抗体または抗体フラグメントには、検出可能な標識やタグを付すことが好ましい。検出可能な標識やタグとしては、蛍光物質、発光物質、セイヨウワサビペルオキシダーゼなどの酵素、ビオチンまたはアビジンなどの特異的結合物質、あるいはPETやSPECTなどに用いる陽電子放出核種などが例示されるが、これらに限定されない。また、これらの方法およびイメージング剤において、好ましい抗体はN2-11抗体であり、好ましい抗体フラグメントはN2-11抗体のフラグメントである。
- [0027] 本発明は、さらなる態様において、配列番号:1で示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよびキャリア蛋白からなる抗原性ペプチドを提供する。上述のごとく、かかる抗原性ペプチドを用いて本発明の抗体または抗体フラグメントを取得または製造することができる。
- [0028] 本明細書において「キャリア蛋白」とは、分子量の小さいペプチドに結合する、より大きなタンパク質であって、抗原として認識されないものをいう。キャリア蛋白の例とし

て、限定するものではないが、ウシ血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン(OVA)、およびキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)などが挙げられる。キャリア蛋白は、ペプチドのN末端、C末端、あるいはペプチド中の適当なアミノ酸に、公知の方法にて結合させることができる。

[0029] 本発明は、さらなる態様において、上記エピトープペプチドまたは抗原性ペプチドと本発明の抗体または抗体フラグメントとの特異的結合を利用して、本発明の抗体または抗体フラグメント作製する方法、ならびに精製する方法を提供する。好ましくは、かかる方法により得られ、あるいは精製される抗体または抗体フラグメントは、PAR1に特異的に結合してMMP1による切断を阻害する抗体または抗体フラグメントである。上記エピトープペプチドまたは抗原性ペプチドを不溶性担体に結合させておいて、本発明の抗体または抗体フラグメントを含む試料を該担体と接触させて特異的結合を生じさせ、適当な溶離条件を適用することにより、本発明の抗体または抗体フラグメントを精製することができる。

[0030] 上記エピトープペプチドまたは抗原性ペプチド、好ましくは配列番号:1に示すアミノ酸配列からなるペプチドを、癌の治療を必要とするあるいは癌の予防を必要とする対象に投与して、本発明の抗体または抗体フラグメントを対象において生成させることにより、対象のがん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害して、癌を治療または予防することができる。したがって、本発明は、さらなる態様において、上記エピトープペプチドまたは抗原性ペプチドを含む、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物も提供する。

[0031] 本発明を以下の実施例によりさらに詳しく説明するが、これらに限定されるものではない。

実施例 1

[0032] 実施例1:PAR1抗体の作製

(A)PAR1の切断部位(R₄₁とS₄₂の間)をまたぐような配列(N₃₅ATLDPRSFL₄₅) (配列番号:1)、および(B)PAR1の切断部位(R₄₁とS₄₂の間)よりも内側に位置する配列(L₄₅RNPNDKYEPFWEDEEK₆₄KNES) (配列番号:22)を標的として選択し、(A)配列のN末および(B)配列のC末にCを付加したC-N₃₅ATLDPRSFL₄₅

(配列番号:2)ペプチドおよびL₄₅RNPNDKYEPFWEDEEKKNES₆₄-C(配列番号:23)ペプチドを合成した。CのSH基を用いて合成ペプチドをKLHと架橋し、これを抗原としてマウスを免疫し、11種のハイブリドーマを得た。これらのハイブリドーマを、それぞれPAR1 N2-1~PAR1 N2-11およびPAR1 N3-1~PAR1 N3-11と命名し、そのうち、ハイブリドーマの培養上清を用いたマトリゲルアッセイから効果が最も強力であったPAR1 N2-11および配列番号:23に非常に強い結合活性を示したPAR1 N3-1を選択し、抗体特異性および抗体効果の解析を行った。PAR1 N2-11により産生される抗体をN2-11、PAR1 N3-1により産生される抗体をN3-1と命名した。このうち、N2-11抗体を産生するハイブリドーマは、PAR1 N2-11と命名し、ブタペスト条約の下、平成20年(2008年)3月18日より、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターにFERM BP-11105の受託番号で寄託してある。N2-11抗体およびN3-1抗体のクラス決定を行った結果、IgG1のクラスに属することが判明した。

実施例 2

[0033] 実施例2:N2-11抗体の抗原認識部位の決定

本発明のN2-11抗体の抗原認識部位を以下のように決定した。PAR1の部分アミノ酸配列A₂₆RRPESKATNATLDPRSFLLRNPNDKYEP₅₄(配列番号:3)に基づき12個のアミノ酸のペプチドを18種類作製し(以下、本明細書においてペプチド(1)~(18)という)、ELISA法によるエピトープマッピングを行った。ペプチド(1)~(18)のアミノ酸配列は以下のとおりであった。

- ペプチド(1)ARRPESKATNAT(配列番号:4)
- ペプチド(2)RRPESKATNATL(配列番号:5)
- ペプチド(3)RPESKATNATLD(配列番号:6)
- ペプチド(4)PESKATNATLDP(配列番号:7)
- ペプチド(5)ESKATNATLDPR(配列番号:8)
- ペプチド(6)SKATNATLDPRS(配列番号:9)
- ペプチド(7)KATNATLDPRSF(配列番号:10)

ペプチド(8) ATNATLDPRSFL (配列番号:11)
ペプチド(9) TNATLDPRSFL (配列番号:12)
ペプチド(10) NATLDPRSFLLR (配列番号:13)
ペプチド(11) ATLDPRSFLLRN (配列番号:14)
ペプチド(12) TLDPRSFLLRNP (配列番号:15)
ペプチド(13) LDPRSFLLRNPN (配列番号:16)
ペプチド(14) DPRSFLLRNPND (配列番号:17)
ペプチド(15) PRSFLLRNPNDK (配列番号:18)
ペプチド(16) RSFLLRNPNDKY (配列番号:19)
ペプチド(17) SFLLRNPNDKYE (配列番号:20)
ペプチド(18) FLLLRNPNDLYEP (配列番号:21)

[0034] ELISA用の96ウェルに1ウェル当たり4 μ g/mlの溶液を75 μ l添加し、4°Cで12時間静置し、ペプチド(1)～(18)を貼り付けた。室温で1時間125 μ lのPBS含有1%BSAにてブロッキングした後、室温で1時間、一次抗体にハイブリドーマ培養上清の原液100 μ lを、次いで、二次抗体に5000倍希釈のHRP結合抗マウス抗体(Upsate社)100 μ lを用いて、OPDを基質としたHRPによる発色を行った。発色結果は、プレートリーダーにて492nmの吸光度(O. D. 492nm)を検出し、N2-11抗体のペプチド(1)～(18)に対する反応性を検討した。コントロールには、ハイブリドーマの培養に使用した培地(10%FBS含有RPM1640(GIBCO社))100 μ lを用いた。コントロール実験でのO. D. 492nm値(約0.05)をN2-11抗体の発色値から引いた値を解析した。その結果、N2-11抗体の抗原認識部位がPAR1の35番目から45番目のアミノ酸配列NATLDPRSFL (配列番号:1)であることが判明した(図1参照)。

[0035] しかしながら、ペプチド(9)および(10)は同一のNATLDPRSFL配列を含むにもかかわらず、N2-11抗体はペプチド(9)には反応を示したが、ペプチド(10)には反応を示さなかった(O. D. 492値 ペプチド(9):約0.12、ペプチド(10):約0、図1参照)。これは、抗原ペプチドとしてCN₃₅ATLDPRSFL₄₅配列を用いているので、NATLDPRSFLのN末の露出したアミノ基がN2-11抗体と反応を示さなかった

ためであると考えられる。

[0036] 培養上清中のハイブリドーマ由来の抗体濃度は $0.1-10 \mu\text{g/ml}$ が一般的であるが、ハイブリドーマの培養上清中には、培地中の血清(FBS)由来のウシIgGが10% FBS中に 2mg/ml 含まれていた。そのため、SCIDマウスの腹水を用いた方法で抗体の精製を行った。「SCIDマウス」とは、免疫不全マウスのことであり、機能的なT細胞およびB細胞を欠失しているため体内にIgGがほとんど存在していないマウスをいう。したがって、SCIDマウスの腹水から抗体の精製を行うことにより、高純度のN2-11抗体を精製することができる。本発明の抗体を以下のように精製した。8-10週齢のSCIDマウスの腹腔内にプリスタン(SIGMA社)を $500 \mu\text{l}$ 注入し炎症を起こさせ、腹腔内をハイブリドーマの増殖に適した環境にした。プリスタンを注入して2週間後に、 10^7 個のN2-11抗体産生ハイブリドーマをマウス腹腔内に注入した。細胞注入後、1-3週間の間に腹水を採取し、遠心分離($20000\times g$)した上清を腹水溶液として冷凍保存した。該腹水溶液から、プロテインGセファロースFF(GEヘルスケア社)を用いて抗体の精製を行った。精製された抗体を10%SDS-PAGEにより、腹水溶液中に含まれるトランスフェリンおよびアルブミンがN2-11抗体中に混入していないことを確認した。抗体の収量は腹水溶液1ml当たり約 $200 \mu\text{g}$ であった。

実施例 3

[0037] 実施例3:N3-1抗体の抗原認識部位の決定

本発明のN3-1抗体の抗原認識部位を以下のように決定した。PAR1の部分アミノ酸配列A₃₆TLDPRSFLLRNPWEDEEKNESGLTEYRLVS₇₃(配列番号:24)に基づき12個のアミノ酸のペプチドを27種類作製し(以下、本明細書においてPAR1-N3-(1)~(27)という)、ELISA法によるエピトープマッピングを行った。PAR1-N3-(1)~(27)のアミノ酸配列は以下のとおりであった。

PAR1-N3-(1)ATLDPRSFLLRN(配列番号:25)

PAR1-N3-(2)TLDPRSFLLRNP(配列番号:26)

PAR1-N3-(3)LDPRSFLLRNPN(配列番号:27)

PAR1-N3-(4)DPRSFLLRNPND(配列番号:28)

PAR1-N3-(5)PRSFLLRNPNDK(配列番号:29)

PAR1-N3-(6)RSFLLRNPNDKY (配列番号:30)
PAR1-N3-(7)SFLLRNPNDKYE (配列番号:31)
PAR1-N3-(8)FLLRNPNDKYEP (配列番号:32)
PAR1-N3-(9)LLRNPNDKYEPF (配列番号:33)
PAR1-N3-(10)LRNPNDKYEPFW (配列番号:34)
PAR1-N3-(11)RNPNDKYEPFWE (配列番号:35)
PAR1-N3-(12)NPNDKYEPFWED (配列番号:36)
PAR1-N3-(13)PNDKYEPFWEDE (配列番号:37)
PAR1-N3-(14)NDKYEPFWEDEE (配列番号:38)
PAR1-N3-(15)DKYEPFWEDEEK (配列番号:39)
PAR1-N3-(16)KYEPFWEDEEKN (配列番号:40)
PAR1-N3-(17)YEPFWEDEEKNE (配列番号:41)
PAR1-N3-(18)EPFWEDEEKNES (配列番号:42)
PAR1-N3-(19)PFWEDEEKNESG (配列番号:43)
PAR1-N3-(20)FWEDEEKNESGL (配列番号:44)
PAR1-N3-(21)WEDEEKNESGLT (配列番号:45)
PAR1-N3-(22)EDEEKNESGLTE (配列番号:46)
PAR1-N3-(23)DEEKNESGLTEY (配列番号:47)
PAR1-N3-(24)EEKNESGLTEYR (配列番号:48)
PAR1-N3-(25)EKNESGLTEYRL (配列番号:49)
PAR1-N3-(26)KNESGLTEYRLV (配列番号:50)
PAR1-N3-(27)NESGLTEYRLVS (配列番号:51)

[0038] 1ウェル当たり4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の2種類の溶液を用いることを除き、実施例2と同様の方法を用いて、N3-1抗体のPAR1-N3-(1)~(27)に対する反応性を検討した。4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド溶液ではS/N比が多少悪かったため、S/N比を上げるために400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド溶液を用いた。その結果、N3-1抗体の抗原認識部位がPAR1の46番目から57番目のアミノ酸配列RNPNDKYEPFWE (配列番号:35)であることが判明した(図2参照)。なお、OD値はOPDを基質と

した反応時間によって変化するものであるため、抗原に対する結合の相対性は示すが、抗体の実質的な結合力を示す指標ではない。

[0039] 実施例2と同様の方法を用いて、N3-1抗体を精製した。精製された抗体を10% SDS-PAGEにより、腹水溶液中に含まれるトランスフェリンおよびアルブミンがN3-1抗体中に混入していないことを確認した。抗体の収量は腹水溶液1ml当たり約400 μ gであった。

実施例 4

[0040] 実施例4:N2-11抗体およびN3-1抗体の比較

N2-11抗体およびN3-1抗体が、トロンビンに依存する細胞浸潤活性をどの程度阻害できるのかを調べるために、マトリゲルアッセイを用いて、抗体の浸潤阻害効果を試験した。第1に、アッセイを用いる細胞を調製するため、低浸潤性乳がん培養細胞KPL-4 (PAR1低発現株)にPAR1-GFPを安定発現させた細胞株(以下、本明細書においてPAR1発現KPL-4という)を作製した。1. 5×10^5 細胞のPAR1発現KPL-4細胞をトリプシン処理により浮遊させ、PBSで洗浄した。3および10 μ MのN2-11抗体または10 μ MのN3-1抗体またはコントロール抗体である3および10 μ MのマウスIgGを添加し、37°Cで90分間保温した。次いで、セルカルチャーインサート(BD バイオサイエンス社)に細胞を蒔き、37°Cで45時間培養した。インサートを浸す誘引物質溶液には、10%FBS含有2.5U/mlトロンビン(WAKO社)溶液を用い、45時間後にメンブレンフィルターの底面に移動してきた浸潤細胞をHE染色し、浸潤細胞数をカウントした。浸潤細胞数のカウントは、フィルター内のランダムな地点を0.66mmX0.66mmの大ききでスキャンし、その平均細胞数を算出した。次いで、マウスIgGで処理した場合の浸潤細胞数を100%としたときのN2-11抗体およびN3-1抗体処理時の浸潤細胞数の割合を図3に示す。なお、10 μ MのマウスIgGで処理した場合の浸潤細胞数は、約 2.4×10^3 細胞であった。図3において、(a)は3 μ M N2-11抗体(n=30)処理時、(b)は10 μ M N2-11抗体(n=80)処理時、および(c)は10 μ M N3-1抗体(n=40)処理時の細胞数の割合を示す。

[0041] 結果

10 μ Mの抗体濃度において、N2-11抗体は40%の阻害効果を有することが判明したが、N3-1抗体にはこのような活性はみられなかった(図3(b)および(c)参照)。このため、PAR1の52番目のTyrから56番目のTrpを含む配列をエピトープとする抗体は、細胞浸潤能を阻害しないことが分かる。

[0042] したがって、細胞浸潤阻害効果を有する抗体医薬品を作製するためには、N3-1抗体よりN2-11抗体が有効であると考えられるため、以後、N2-11抗体の効果について検討を行った。

実施例 5

[0043] 実施例5:抗体の特性の検討

N2-11抗体が細胞表面のPAR1を特異的に認識できるかを評価するため、PAR1発現KPL-4を作製し、次いで、KPL-4およびPAR1発現KPL-4に対するN2-11抗体の特性について以下の(A)～(D)により検討した:

(A) KPL-4細胞をトリプシン処理により浮遊させ、FBS不含L-15溶液(GIBCO社)で洗浄した。2 μ M マウスIgG(SIGMA社)含有L-15培地を添加し、37°Cで15分間保温し、ブロッキングを行い、さらに40nMのN2-11抗体-QDプローブを添加し、37°Cで30分間保温した。次いで、N2-11抗体-QDプローブをL-15培地で洗浄し、0.5%FBS含有L-15培地を添加し、ガラスボトムディッシュに細胞を蒔き、細胞の観察および解析を行った。なお、N2-11抗体-QDプローブは、N2-11抗体と高輝度の蛍光性ナノ粒子(QD705(Invitrogen社))を結合させたプローブである。

(B) PAR1発現KPL-4をトリプシン処理により浮遊させ、FBS不含L-15溶液(GIBCO社)で洗浄した。2 μ M マウスIgG(SIGMA社)含有L-15培地を添加し、37°Cで15分間保温し、ブロッキングを行い、さらに40nMのN2-11抗体-QDプローブを添加し、37°Cで30分間保温した。次いで、N2-11抗体-QDプローブをL-15培地で洗浄し、0.5%FBS含有L-15培地を添加し、ガラスボトムディッシュに細胞を蒔き、細胞の観察および解析を行った。

(C) PAR1発現KPL-4をトリプシン処理により浮遊させ、FBS不含L-15溶液(GIBCO社)で洗浄した。50nM MMP1(SIGMA社)を添加し、37°Cで60分間保温

した。2 μ M マウスIgG (SIGMA社) 含有L-15培地を添加し、37°Cで15分間保温し、ブロッキングを行い、さらに40nMのN2-11抗体-QDプローブを添加し、37°Cで30分間保温した。次いで、N2-11抗体-QDプローブをL-15培地で洗浄し、0.5%FBS含有L-15培地を添加し、ガラスボトムディッシュに細胞を蒔き、細胞の観察および解析を行った。

(D) PAR1発現KPL-4をトリプシン処理により浮遊させ、FBS不含L-15溶液(GIBCO社)で洗浄した。2 μ M マウスIgG (SIGMA社) 含有L-15を添加し、37°Cで15分間保温し、ブロッキングを行い、さらに40nMのN2-11抗体-QDプローブを添加し、37°Cで30分間保温した。次いで、N2-11抗体-QDプローブをL-15培地で洗浄し、50nM MMP1を添加し、37°Cで60分間保温した。さらに、L-15培地で洗浄し、0.5%FBS含有L-15培地を添加し、ガラスボトムディッシュに細胞を蒔き、細胞の観察および解析を行った。

[0044] さらに、N2-11抗体-QDプローブを用いて抗体の結合性の定量的解析を行った。蛍光性ナノ粒子は粒子数と蛍光強度が比例関係にある。露光時間100msでの蛍光画像をSOLISソフト(Andor社)のコントラスト範囲1150-1600でTIFFフォーマット画像に変換した。次いで、ImageJソフトで細胞1個の全グレイ値(1-256階調の濃淡値)からバックグラウンドのグレイ値を差し引き、N2-11抗体-QD蛍光に由来する1細胞当たりの全グレイ値を算出した。

[0045] 結果

上記(A)~(D)により得られた細胞およびそのデータに基づく定量的解析結果を図4に示す。なお、(A)~(D)の結果は図中のカラム1~4にそれぞれ対応している。細胞を観察した結果、KPL-4細胞ではPAR1の発現量が少ないことから、N2-11抗体-QDが僅かしか反応していなかったこと(カラム1)、PAR1発現KPL-4ではN2-11抗体-QDによる標識により、「細胞膜上のPAR1」および「細胞内に取り込まれたPAR1」がドット状に強く標識されていたこと(カラム2)、MMP1で細胞膜上のPAR1が切断されているため、N2-11抗体がPAR1を認識できず、N2-11抗体-QDで標識されなかったこと(カラム3)、ならびにPAR1発現KPL-4をN2-11抗体-QDで標識した後にMMP1で処理した場合には、N2-11抗体がカラム2と同

程度細胞に結合していたこと(カラム4)が示された。また、定量的解析の右パネルにより、PAR1発現KPL-4に結合するN2-11抗体の量はKPL-4に結合する量の約6倍であること、PAR1発現KPL-4を50nM MMP1で処理した場合には、N2-11抗体の結合量はKPL-4と同レベルになること、ならびにN2-11抗体で標識後にMMP1処理した場合には、N2-11抗体がMMP1未処理の場合とほぼ同程度結合していることが示された。

[0046] したがって、N2-11抗体は細胞膜上のPAR1の未切断部位配列を認識し特異的に結合し、MMP1によるPAR1の切断を阻害することを示している。

実施例 6

[0047] 実施例6:抗体の細胞運動能への効果の検討

PAR1発現KPL-4細胞は、MMP1処理によりPAR1が活性化し、細胞浸潤能が促進される。そこで、PAR1発現KPL-4の細胞運動の経時的コマ撮り撮影(Time-laps)観察およびその運動軌跡解析を行い、N2-11抗体がMMP1依存的な細胞運動能を阻害するかを検討した。7x10⁴細胞のPAR1発現KPL-4細胞をトリプシン処理により浮遊させ、PBSで洗浄した。10 μMのN2-11抗体またはコントロール抗体であるマウスIgGを添加し、37°Cで60分間保温した。次いで、2.5nM MMP1を含む10%FBS含有L-15培地を添加し、ガラスボトムデッシュに細胞を蒔いた。細胞運動の経時的コマ撮り撮影画像を2分ごとに取得し、細胞運動の軌跡を追跡した。経時的コマ撮り撮影観察開始後、2-13時間の間1時間当たりの平均運動速度を算出した。細胞運動の軌跡では、核の重心位置を指標とし、データに偏りが出ないように追跡可能な全ての細胞を解析した。また、コントロール実験として、KPL-4細胞およびMMP1未処理のPAR1発現KPL-4細胞についても同様に解析を行った。

[0048] 結果

N2-11抗体の算出された平均運動速度を図5に示し、その算出値を表1に示す。

[表1]

細胞	条件	算出値
KPL-4	MMP1非存在下	$2.8 \pm 0.2 \mu\text{m/h}$ (n=195)
PAR1発現KPL-4	$10 \mu\text{M}$ マウスIgG (MMP1非存在下)	$10.2 \pm 0.5 \mu\text{m/h}$ (n=355)
PAR1発現KPL-4	$10 \mu\text{M}$ マウスIgG (2.5 nM MMP1存在下)	$17.2 \pm 0.7 \mu\text{m/h}$ (n=357)
PAR1発現KPL-4	$10 \mu\text{M}$ N2-11抗体 (2.5 nM MMP1存在下)	$14.0 \pm 0.7 \mu\text{m/h}$ (n=272)

表1より、KPL-4が最も運動速度が遅く、 $10 \mu\text{M}$ マウスIgGで処理したPAR1発現KPL-4細胞では、MMP1非存在下でも運動速度の上昇が認められた。さらに、マウスIgGで処理をしたPAR1発現KPL-4細胞を 2.5 nM MMP1存在下の条件にすると、MMP1非存在下に比べ、運動速度の大きな上昇が認められ、 $10 \mu\text{M}$ N2-11抗体で処理をすると、MMP1存在下における運動速度の上昇の抑制が認められた。マウスIgGで処理したPAR1発現KPL-4細胞のMMP1による運動速度の上昇度($7.0 \mu\text{m/h}$)を100%とする場合における、N2-11抗体存在下でのMMP1による運動速度の上昇度($3.8 \mu\text{m/h}$)は54%であった。

[0049] したがって、PAR1発現細胞はMMP1処理することにより運動速度が促進されるが、N2-11抗体で処理することによりMMP1によるPAR1切断効果が阻害され、運動能の活性化が約50%阻害されることを示している。

実施例 7

[0050] 実施例7: 抗体の細胞浸潤能への効果の検討

PAR1発現KPL-4細胞は、MMP1処理によりPAR1が活性化し、細胞浸潤能が促進される。そこで、N2-11抗体存在下でPAR1発現KPL-4のマトリゲルアッセイを行い、N2-11抗体がMMP1依存的な細胞浸潤能を阻害するかを検討した。 1.5×10^5 細胞のPAR1発現KPL-4細胞をトリプシン処理により浮遊させ、PBSで洗浄した。3および $10 \mu\text{M}$ のN2-11抗体またはコントロール抗体であるマウスIgGを添加し、 37°C で90分間保温した。次いで、セルカルチャーインサートに細胞を蒔き、 37°C で45時間培養した。インサートを浸す誘引物質溶液には、10%FBS含有 2.5

nM MMP1溶液を用い、45時間後にメンブレンフィルターの底面に移動してきた浸潤細胞をHE染色し、浸潤細胞数をカウントした。浸潤細胞数のカウントは、フィルター内のランダムな地点を0.66mmX0.66mmの大きさでスキャンし、その平均細胞数を算出した。次いで、マウスIgGで処理した場合の浸潤細胞数を100%としたときのN2-11抗体処理時の浸潤細胞数の割合を求めた。

[0051] 結果

条件(b)の平均浸潤細胞数を100%とした場合におけるN2-11抗体処理時の浸潤細胞数の割合を図6に示し、その算出値を以下の表2に示す。

[表2]

条件	算出値
(a) 10 μ M マウスIgG (MMP1非存在下)	24.3 \pm 8.5% (n=20)
(b) 10 μ M マウスIgG (2.5 nM MMP1存在下)	100 \pm 18.9% (n=20)
(c) 3 μ M N2-11抗体 (2.5 nM MMP1存在下)	76.2 \pm 17.4% (n=30)
(d) 10 μ M N2-11抗体 (2.5 nM MMP1存在下)	38.9 \pm 12.5% (n=20)

[0052] したがって、PAR1発現細胞はMMP1処理することにより浸潤能が促進されるが、N2-11抗体で処理することによりMMP1によるPAR1切断効果が用量依存的に阻害され、浸潤能の活性化が約60%阻害されることを示している。

[0053] 上記実施例5~7の結果より、N2-11抗体はPAR1の切断部位を認識し特異的に結合し、MMP1によるPAR1の切断活性を阻害することで、PAR1発現細胞のMMP1依存的な細胞運動活性および細胞浸潤活性を阻害することを示している。すなわち、N2-11抗体ががん治療において有効な抗体医薬品となりうることを示している。

実施例 8

[0054] 実施例8:抗体の腫瘍細胞に対する特異性の検討

実施例5と同様のN2-11抗体-QDをプローブに用いて、独自のインビボイメージング法により腫瘍組織の生体染色を行い、上記により調製された抗体が腫瘍組織のPAR1に対し特異的であるかを検討した。SCIDマウスに 1×10^6 細胞のPAR1発

現KPL-4細胞を皮下注入した。次いで、4週間飼育しPAR1発現KPL-4細胞由来の腫瘍を作製した。腫瘍を露出させて観察用の小窓を作製した後、N2-11抗体-QDプローブを血中濃度10nMで尾静脈より注入した。次いで、独自のイメージング装置を用いて、生きたマウスの腫瘍組織を観察した。

[0055] 結果

N2-11抗体-QDが腫瘍細胞に特異的に反応している像を図7に示す。図7より、マウス生体内において、N2-11抗体が腫瘍細胞に対し特異的であることが示された。したがって、濃度や結合能(結合定数)を高めることにより、N2-11抗体が生きた腫瘍細胞のPAR1活性を阻害する可能性を示唆している。

実施例 9

[0056] 実施例9:ポリクローナルPAR1抗体の調製と腫瘍細胞に対する活性の検討

PAR1の切断部位(R₄₁とS₄₂の間)をまたぐような配列(N₃₅ATLDPRSFL₄₅) (配列番号:1)を標的として選択し、この配列のN末にCを付加したCN₃₅ATLDPRSFL₄₅ (配列番号:2)ペプチドを合成した。CのSH基を利用して合成ペプチドをKLHと架橋し、これを抗原としてウサギを免役し、PAR1に対する抗血清を調製した。次いで、抗血清のアフィニティー精製を行うため、抗原に用いたペプチドとSulfoLinkカップリングゲル(PIERCE社)を用いてカラムを作製した。カラムに抗血清をアプライした後、カラム体積の5倍以上のPBS(pH7.2)でカラムの洗浄を行った。その後、3M MgCl₂でPAR1ポリクローナル抗体の溶出を行った。溶出後はPBSにて透析を行い、精製PAR1抗体とした(10mlの抗血清から約0.4mgの精製抗体を得た)。ポリクローナル抗体の細胞浸潤活性を、モノクローナル抗体のアッセイと同様の方法でマトリゲルを用いて検討した。コントロールとして300nMのウサギIgGを用いた。

[0057] 結果

条件(a)の平均浸潤細胞数を100%とした場合におけるPAR1ポリクローナル抗体処理時の浸潤細胞数割合を図8に示し、その算出値を以下の表3に示す。

[表3]

条件	算出値
(a) 300 nM ウサギ IgG (2.5 nM MMP1 存在下)	100% ± 22.2% (n = 40)
(b) 100 nM ポリクローナル PAR1 抗体 (2.5 nM MMP1 存在下)	82.6% ± 14.3% (n = 40)
(c) 300 nM ポリクローナル PAR1 抗体 (2.5 nM MMP1 存在下)	46.5% ± 13.6% (n = 40)

表3より、条件(a)の浸潤細胞数を100%とすると、300nMのポリクローナルPAR1抗体が、PAR1発現KPL-4の細胞浸潤能を約55%阻害することを示す。

[0058] したがって、300nMのポリクローナルPAR1抗体は、10 μ MのモノクローナルPAR1抗体(阻害効果:約60%)と同レベルのがん細胞の浸潤能抑制効果を有することを示している。すなわち、遺伝子工学的手法により、モノクローナルPAR1抗体の遺伝子に改良を加えることで、10-100倍阻害効果を強化できることを示唆しており、本発明の抗体が有効な抗がん剤として使用できることを示している。

[0059] さらに、これらの実験結果から、本発明の抗体は有効な抗がん剤として使用できるのみならず、腫瘍の検出にも使用できることも明らかである。

産業上の利用可能性

[0060] 本発明によれば、PAR1抗体が、PAR1発現細胞においてMMP1依存的な細胞運動能および細胞浸潤能を阻害すること、およびマウス生体内において腫瘍細胞に特異的に反応を示すことから、がん治療において有効な抗体医薬品となりうることを示唆している。また、本発明の抗体は腫瘍の検出等に使用することができる。

請求の範囲

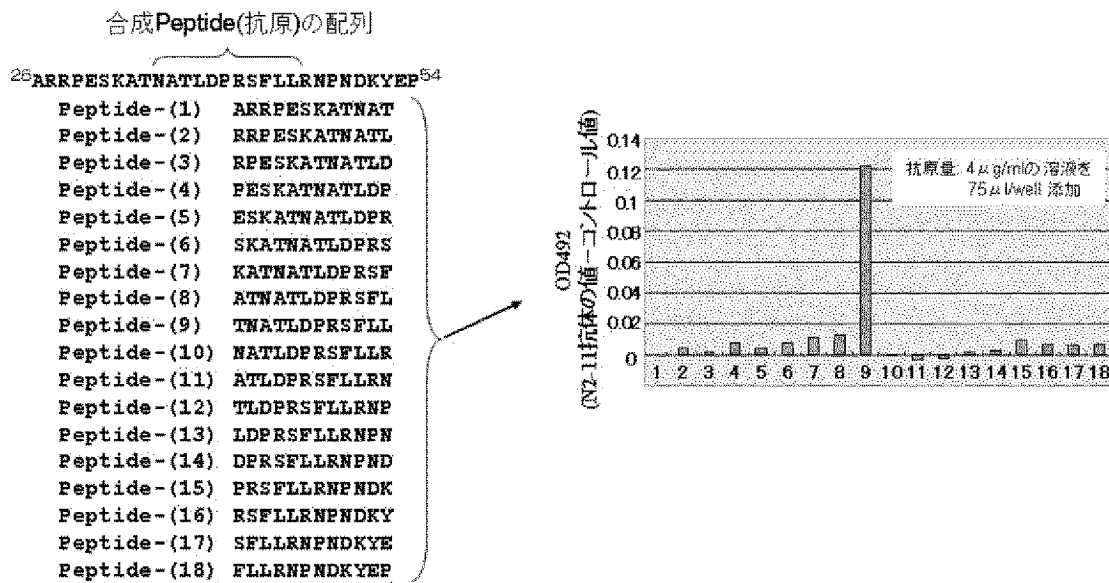
- [1] PAR1(プロテアーゼ活性化受容体1)に特異的に結合してMMP1(マトリックスメタロプロテアーゼ1)による切断を阻害し、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害する抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント。
- [2] PAR1(プロテアーゼ活性化受容体1)のMMP1(マトリックスメタロプロテアーゼ1)による切断部位(Arg₄₁とSer₄₂の間)を含む領域をエピトープとして特異的に結合し、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害する請求項1記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント。
- [3] 該エピトープのアミノ酸配列が配列番号:1で示されるものである請求項2記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント。
- [4] 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターから受託番号FERM BP-11105を付与されたハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体である、請求項3記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント。
- [5] キメラ化またはヒト化されている、請求項1~4のいずれか1項記載の抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメント。
- [6] モノクローナル抗体である請求項1~5いずれか1項記載の抗体。
- [7] ポリクローナル抗体である請求項1~3または5のいずれか1項記載の抗体。
- [8] 請求項1~7のいずれか1項記載の抗体またはフラグメントを含む、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物。
- [9] 請求項1~7のいずれか1項記載の抗体またはフラグメントを含む、がん治療用医薬組成物。
- [10] 請求項1~7のいずれか1項記載の抗体またはフラグメントを含む、医薬組成物の有効量を治療を必要とする対象に投与することを含む、がんの治療方法。
- [11] がんを治療するための医薬の製造における請求項1~7のいずれか1項記載の抗体またはフラグメントの使用。
- [12] 請求項1~7のいずれか1項記載の抗体またはフラグメントを、対象から得た試料と接触させ、試料中の腫瘍細胞と結合させることを特徴とする、試料中の腫瘍細胞のイ

メーキング方法または腫瘍の検出方法。

- [13] 請求項1～7のいずれか1項記載の抗体またはフラグメントを含む、腫瘍細胞イメージング剤。
- [14] 請求項1～7のいずれか1項記載の抗体または抗体フラグメントを対象に投与して、体内の腫瘍組織と本発明の抗体または抗体フラグメントとの結合を調べることを特徴とする、腫瘍の診断方法。
- [15] 配列番号:1で示されるアミノ酸配列からなるペプチド。
- [16] 配列番号:1で示されるアミノ酸配列からなるペプチドおよびキャリア蛋白からなる抗原性ペプチド。
- [17] 請求項15記載のペプチドまたは請求項16記載の抗原性ペプチドを用いることを特徴とする、PAR1に特異的に結合してMMP1による切断を阻害する抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメントの作製方法。
- [18] 請求項15記載のペプチドまたは請求項16記載の抗原性ペプチドを用いることを特徴とする、PAR1に特異的に結合してMMP1による切断を阻害する抗体、または該抗体と同様の性質を保持する該抗体のフラグメントの精製方法。
- [19] 請求項15記載のペプチドまたは請求項16記載の抗原性ペプチドを含む、がん細胞の運動活性および浸潤活性を阻害するための組成物。

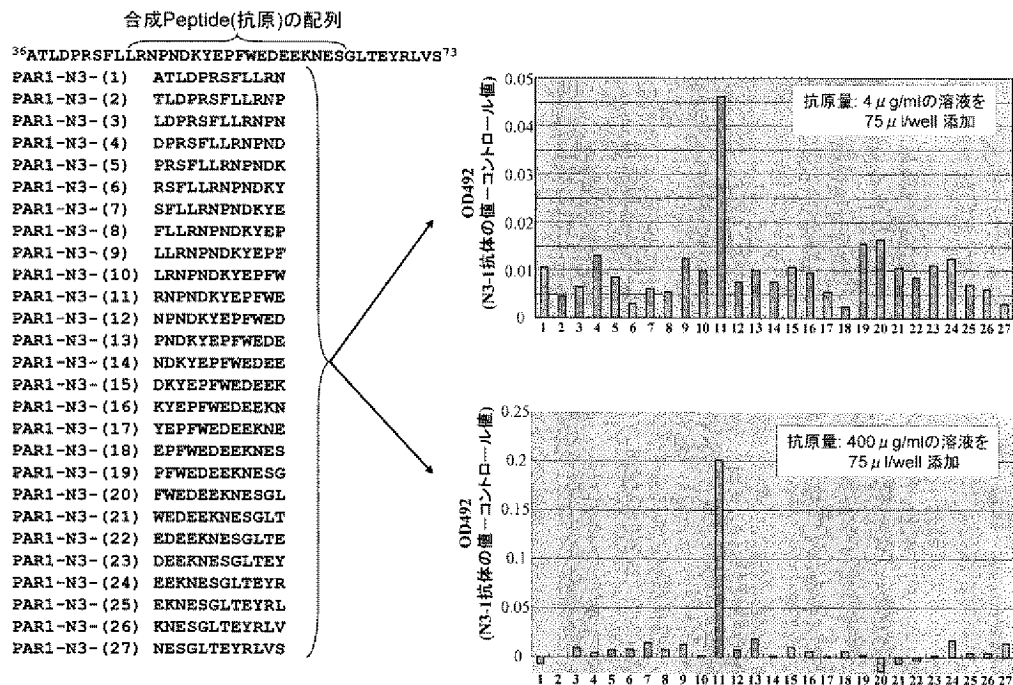
[図1]

図1 N2-11抗体の抗原認識部位の決定



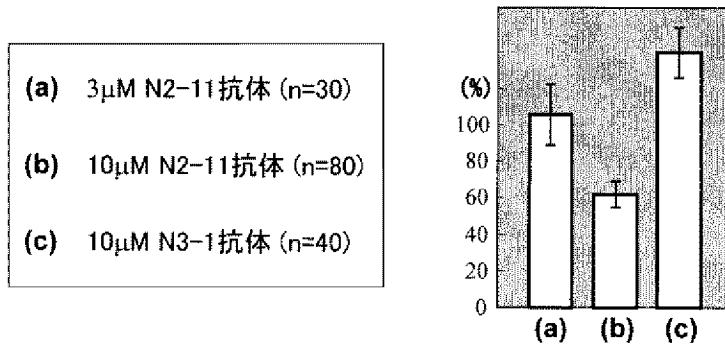
[図2]

図2 N3-1抗体の抗原認識部位の決定



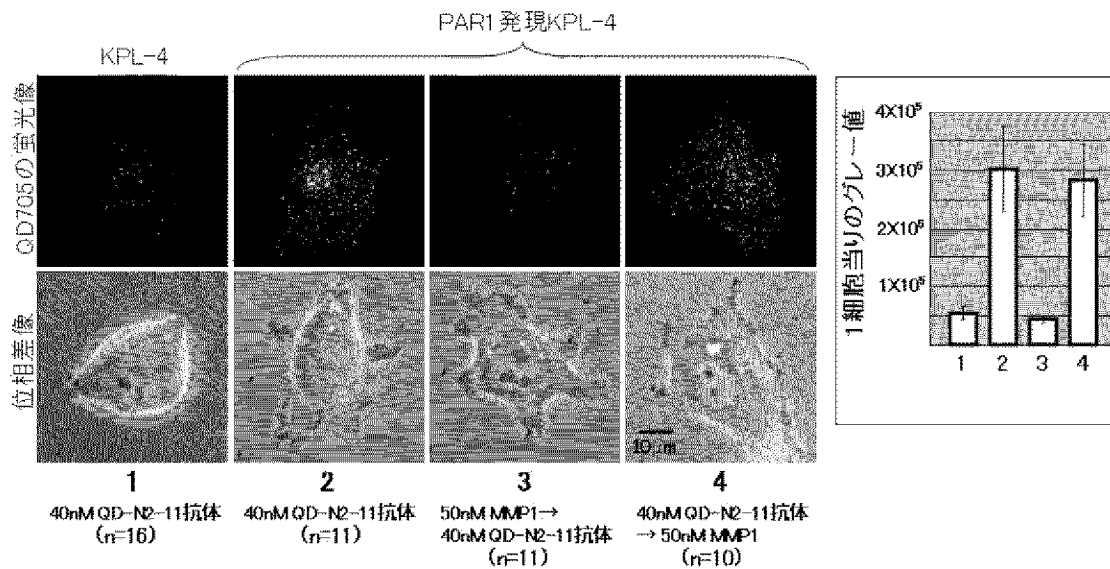
[図3]

図3 各PAR1抗体の細胞浸潤能への効果



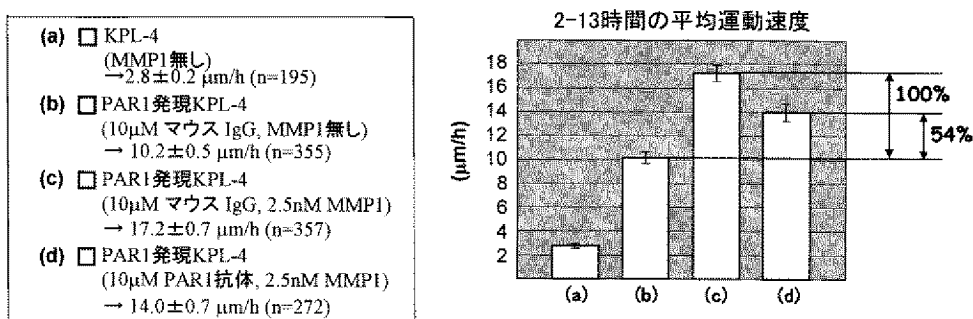
[図4]

図4 PAR1抗体の特性



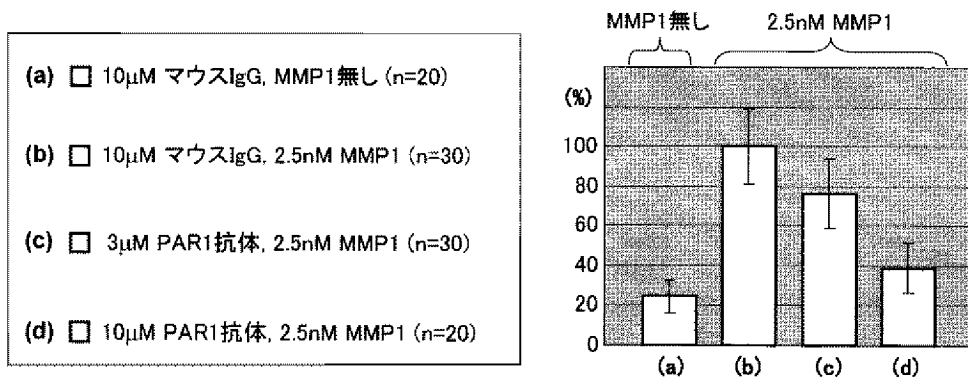
[図5]

図5 PAR1抗体の細胞運動能への効果



[図6]

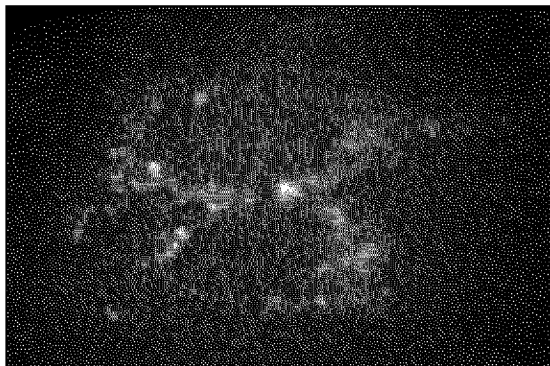
図6 PAR1抗体の細胞浸潤能への効果



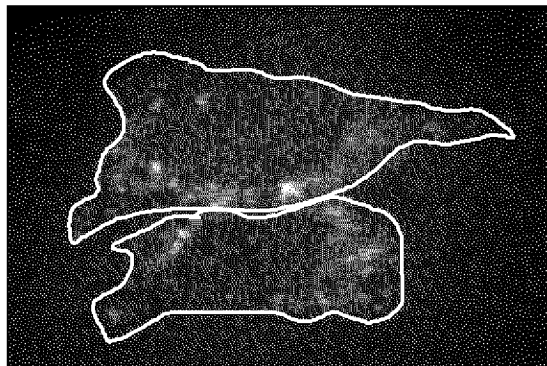
[図7]

図7 PAR1抗体-QDを用いた生体腫瘍組織のイメージング像

(A)

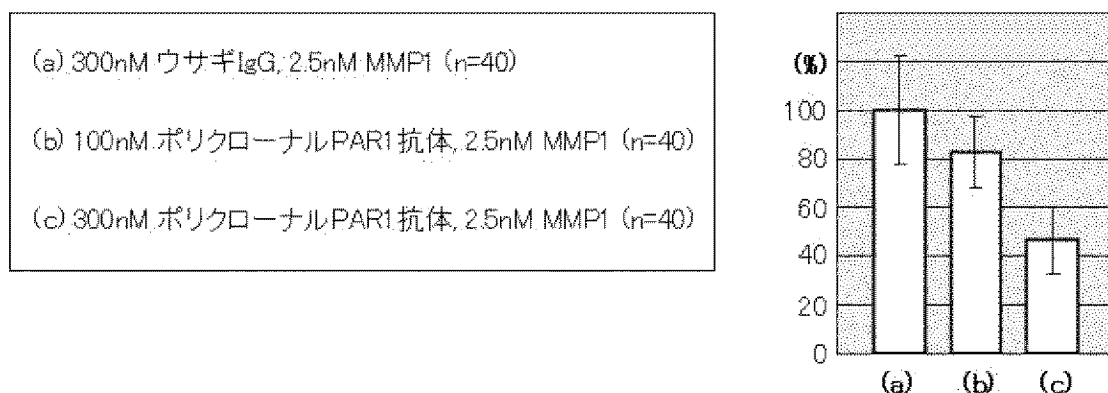
10 μ m

(B)

10 μ m

[図8]

図8 ポリクローナルPAR1抗体の細胞浸潤能への効果



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055479

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 C12N15/09(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i, A61P35/00(2006.01) i,
 C07K1/22(2006.01) i, C07K7/06(2006.01) i, C07K14/705(2006.01) i,
 C07K16/46(2006.01) i, C07K19/00(2006.01) i, G01N33/574(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)
 C12N15/00-15/90, C07K14/00-19/00

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII),
 GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	BRASS, Lawrence F., et al., Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling., The Journal of biological chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pages 2943-2952	<u>1-7, 15-16</u> 8-9, 11-13, 17-19
<u>Y</u> A	BOIRE, Adrienne, et al., PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells., Cell, 2005, Vol.120, No.3, pages 303-313	8-9, 11-13, <u>17-19</u> 1-7, 15-16

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 03 April, 2009 (03.04.09)	Date of mailing of the international search report 21 April, 2009 (21.04.09)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055479

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

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

Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055479

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.: 10, 14
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 and 14 relate respectively to a method of treating cancer and a method of diagnosing tumor and, therefore, pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.
(continued to extra sheet)
2. Claims Nos.:
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:
3. Claims Nos.:
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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/JP2009/055479

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet (2)

Thus, these claims relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)i, C07K14/705(2006.01)i, C07K16/46(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/00-15/90, C07K14/00-19/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq, 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> Y	BRASS, Lawrence F., et al., Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling., The Journal of biological chemistry, 1994, Vol.269, No.4, pages 2943-2952	<u>1-7, 15-16</u> 8-9, 11-13, 17-19
<u>Y</u> A	BOIRE, Adrienne, et al., PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells., Cell, 2005, Vol.120, No.3, pages 303-313	8-9, 11-13, 17- <u>19</u> 1-7, 15-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 3 . 0 4 . 2 0 0 9

国際調査報告の発送日

2 1 . 0 4 . 2 0 0 9

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清水 晋治

4 B

3 5 3 5

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ 10, 14 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 1 0, 1 4 は、それぞれ、がんの治療方法、腫瘍の診断方法であり、手術又は治療による人体の処置方法及び人体の診断方法に該当し、PCT 第 17 条(2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (iv) の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。