

(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2014-502965

(P2014-502965A)

(43) 公表日 平成26年2月6日(2014.2.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 19/00 Z N A	4 B O 2 4
<b>C07K 16/00 (2006.01)</b>	C O 7 K 16/00	4 C O 8 4
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C O 7 K 14/47	4 H O 4 5
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-545359 (P2013-545359)	(71) 出願人	507101761 イフォーム・フォンダツィオーネ・インステ イトゥオ・フィルチ・ディ・オンコロジ ・モレコラーレ イタリア・イー20139・ミラン・ヴィ ア・アダメッコ・16
(86) (22) 出願日	平成23年12月21日 (2011.12.21)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月20日 (2013.8.20)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(86) 国際出願番号	PCT/EP2011/073577	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02012/085076	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(87) 国際公開日	平成24年6月28日 (2012.6.28)		
(31) 優先権主張番号	61/426, 236		
(32) 優先日	平成22年12月22日 (2010.12.22)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 uPARアンタゴニストおよびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、ウロキナーゼ型プラスミノージェン活性化因子受容体(uPAR)の阻害剤に関する。生成される阻害剤は、足場により連結された、異なる配置にある、細胞外プロテアーゼであるウロキナーゼ型プラスミノージェン活性化因子(uPA)の受容体結合ドメインと、細胞外マトリックスタンパク質であるビトロネクチン(VN)の受容体結合ドメインとを含有する二価uPARリガンドである。本発明はまた、薬剤としての、特に、癌の治療のため、および診断目的での使用のための上記分子に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号1の第11～第42アミノ酸の、uPAの増殖因子様ドメイン(GFDドメイン)を含む第1のポリペプチド、もしくはuPAオーソログス遺伝子に由来する対応する領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体;および

配列番号2の第5～第39アミノ酸の、VNのソマトメジンBドメイン(SMBドメイン)を含む第2のポリペプチド、もしくはVNオーソログス遺伝子に由来する対応する領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体;からなる群より選択される2つのポリペプチドを含み、2つのポリペプチドが分子足場により互いに連結される、ダイマー分子。

10

## 【請求項2】

前記第1のポリペプチドが、配列番号2の第5～第39アミノ酸の、SMBドメイン、もしくはVNオーソログス遺伝子に由来する同じ領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体をさらに含み;

および

前記第2のポリペプチドが、配列番号1の第11～第42アミノ酸の、GFDドメイン、もしくはuPAオーソログス遺伝子に由来する同じ領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体をさらに含む、

請求項1に記載のダイマー分子。

20

## 【請求項3】

前記GFDドメインが配列番号1の第8～第48アミノ酸から本質的になる、請求項1または2に記載のダイマー分子。

## 【請求項4】

前記GFDドメインが配列番号1の第1～第48アミノ酸からなる、請求項1から3のいずれか一項に記載のダイマー分子。

## 【請求項5】

前記SMBドメインが配列番号2の第1～第41アミノ酸からなる、請求項1から4のいずれか一項に記載のダイマー分子。

## 【請求項6】

第1および第2のポリペプチドが、  
c)N末端-SMBドメイン-GFDドメイン-C末端の順序の配列を含む、および  
d)そのC末端を介して分子足場に連結される、  
請求項2から5のいずれか一項に記載のダイマー分子。

30

## 【請求項7】

前記SMBドメインおよびGFDドメインが第1のリンカーペプチドにより連結される、請求項2から6のいずれか一項に記載のダイマー分子。

## 【請求項8】

前記第1のリンカーペプチドが配列番号3の配列から本質的になる、請求項7に記載のダイマー分子。

## 【請求項9】

第1および第2のポリペプチドのそれぞれが第2のリンカーペプチドにより分子足場に連結される、請求項1から8のいずれか一項に記載のダイマー分子。

40

## 【請求項10】

リンカーペプチドが配列番号4の配列から本質的になる、請求項9に記載のダイマー分子。

## 【請求項11】

分子足場が免疫グロブリン定常領域(Fc)、ロイシンジッパー、化学的リンカーまたはペプチドリンカーである、請求項1から10のいずれか一項に記載のダイマー分子。

## 【請求項12】

Fcの重鎖定常領域のそれぞれが、本質的に配列番号5の配列を有する、請求項11に記載

50

のダイマー分子。

【請求項 1 3】

配列番号6の配列の第1のモノマーおよび配列番号7の配列の第2のモノマーから本質的になる、請求項12に記載のダイマー分子。

【請求項 1 4】

第1および第2のモノマーが配列番号8の配列を有する、請求項12に記載のダイマー分子。

【請求項 1 5】

医学的使用のための、請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子。

【請求項 1 6】

癌の治療としての使用のための、請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子。

【請求項 1 7】

治療剤にコンジュゲートされる、請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子。

【請求項 1 8】

前記治療剤が放射性核種または毒素である、請求項17に記載のダイマー分子。

【請求項 1 9】

診断方法における使用のための、請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子。

【請求項 2 0】

uPARにより媒介される病理または腫瘍の診断における使用のための、請求項19に記載のダイマー分子。

【請求項 2 1】

治療上有効量の請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子のそれを必要とする対象への投与を含む、癌の治療方法。

【請求項 2 2】

請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子および好適な賦形剤または添加剤を含む医薬組成物。

【請求項 2 3】

別の治療剤をさらに含む、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

前記治療剤が放射性核種または毒素である、請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

請求項1から14のいずれか一項に記載のダイマー分子を含む、uPARにより媒介される病理または腫瘍の診断のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)の阻害剤に関する。生成される阻害剤は、足場により連結された、異なる配置にある、細胞外プロテアーゼであるウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)の受容体結合ドメインと、細胞外マトリックスタンパク質であるビトロネクチン(VN)の受容体結合ドメインとを含有する二価uPARリガンドである。uPARへのそのような阻害剤の結合は、uPAとVNの両方の結合部位が同時に占有され、かくして、受容体のタンパク質分解とシグナル活性の両方を効率的に遮断する複合体をもたらす。

【背景技術】

【0002】

ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR、CD87とも呼ばれる)は、グリコシルホスファチジルイノシトール(GPI)アンカーにより細胞膜に繋ぎ止められた膜糖タン

10

20

30

40

50

パク質である。豊富な *in vitro*、*in vivo* および臨床的証拠は、uPARが腫瘍成長、浸潤および転移、炎症疾患ならびにウイルス感染などの様々な病理学的プロセスにおいて重要な役割を果たすことを示唆している。従って、uPAR機能を効率的に阻害する薬剤は、様々な病状における新規治療レジメンを提供し得る。

#### 【0003】

uPARならびに、その2つの確立したリガンド、セリンプロテアーゼであるウロキナーゼ(uPA)ならびに細胞外マトリックス(ECM)タンパク質であるビトロネクチン(VN)との分子相互作用が、調節細胞外タンパク質分解、細胞接着、移動、浸潤および増殖におけるuPARの活性にとって必要である(Blasi & Carmeliet, 2002; Smith & Marshall, 2010)。uPARへのuPAの結合は、細胞表面プラスミノゲン活性化を加速することにより細胞外タンパク質分解を促進するが、VNの結合は、p130CasおよびERK1/2シグナル経路のインテグリン依存的活性化を介し、移動および増殖シグナルを増強するECMへの細胞接着を強化する。*in vivo*におけるuPAとuPARとの相互作用の重要性は、集中的に研究されており、通常は、抗体、組換えタンパク質、合成ペプチドならびに低分子量化合物を含む様々な特異的アンタゴニストを用いて確認されている。VNとの相互作用の重要性はuPARのシグナル活性にとって重要であると文書で十分に裏付けられている(Madsenら、2007; Smithら、2008)が、この相互作用の重要性について、*in vivo*では未だ取り組まれていない。様々なuPAR変異体を過剰発現するヒト癌細胞を用いる腫瘍成長の異種移植マウスモデルにおいて、著者は、VNとの相互作用が腫瘍成長の加速におけるuPARの活性にとって実際に必要であることを最近証明し(原稿準備中)、この相互作用が実際に関連する抗癌標的であるという仮定を支持している。

10

20

#### 【0004】

WO01/17544などのいくつかの国際出願が、ウロキナーゼ受容体のペプチドリガンドを開示する。特に、WO97/35969は、uPARに結合し、インテグリンおよびビトロネクチンの結合を阻害することができるペプチドを開示する。この文献はuPA結合には言及していない。

#### 【0005】

さらに、WO2008/073312は、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体エピトープおよびそれから誘導されたモノクローナル抗体に関する。この文献は、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)に特異的な抗体およびその抗原結合断片ならびに癌の治療または予防のためのその使用を開示する。特に、開示された抗体は、uPAR上の特定のエピトープに特異的である。

30

#### 【0006】

WO2005116077は、uPA-uPAR二元複合体、uPA-uPARを含む三元複合体およびuPARと、インテグリンなどのuPA以外のタンパク質との複合体に特異的な抗体または他のリガンドを同定する。この抗体は、複合体が相互作用するさらなる分子を用いてuPAとuPARとの相互作用を阻害する。そのような抗体または他のリガンドは、特に癌に対する診断および治療法において用いられる。

#### 【0007】

Tressler RJら(APMIS, 1999 Jan;107(1):168~73頁)は、ヒトおよびマウスの両方のウロキナーゼの増殖因子ドメインに基づくウロキナーゼ受容体アンタゴニストを開示する。そのようなアンタゴニストは、それらの相同な受容体に対してナノモル濃度以下の親和性を示す。ヒトIgGの定常領域との融合物を調製することによるこれらの分子のさらなる改変は、高い親和性および長い*in vivo*半減期を有する分子をもたらした。バクテリオファージディスプレイとペプチド類似体合成との組合せによって、より小さいペプチド阻害剤が得られた。これらの分子は全て、uPA受容体へのuPAの増殖因子ドメインの結合を阻害し、ビトロネクチンへのuPA受容体の結合を増強する。

40

#### 【0008】

疾患状態におけるuPAR:VN相互作用の*in vivo*での重要性に取り組み、この知識を医療に移転させるためには、強力の特異的な薬剤が必要である。本発明は、現在利用可能である阻害剤よりも約1000倍強力であるuPAR:VNアンタゴニストの遺伝子操作、発現、精製およ

50

び特性評価を記載する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】WO01/17544

【特許文献2】WO97/35969

【特許文献3】WO2008/073312

【特許文献4】WO2005116077

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Tressler RJら、APMIS. 1999 Jan;107(1):168~73頁

【非特許文献2】Okumura Yら、J Biol Chem 2002

【非特許文献3】Madsenら、JCB 2007

【非特許文献4】Rabban SAら、Neoplasia 2010

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、新しい型のウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子受容体(uPAR)の阻害剤の概念、構築および検証に関する。生成される阻害剤分子(uPAR-lockおよびuPAR-lockV2、また、uPAR-lock分子と命名される)は、共通の足場上で非常に近い位置にある、細胞外プロテアーゼであるウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子(uPA)の受容体結合ドメインと細胞外マトリックスタンパク質であるビトロネクチン(VN)の受容体結合ドメインとを含有する二価uPARリガンドである。uPARへのそのような阻害剤の結合は、uPAとVNの両方の結合部位が同時に、および効率的に占有され、かくして、受容体のタンパク質分解活性およびシグナル活性の両活性を遮断する複合体をもたらす。

【0012】

本発明の阻害剤分子は、物理的および機能的uPAR/VN相互作用およびuPAR/uPA相互作用の強力なアンタゴニストである。

【0013】

それは受容体へのVN結合を刺激することなく、uPAR中のuPA結合ポケットを標的化する点で非常に有利である。実際、uPARのuPA結合ポケットに結合する、全てではないとしても、多くの公知の薬剤が、uPAR:VN相互作用のアゴニストであり、従ってシグナリングを誘導する。対照的に、本発明の分子uPAR-lockは、シグナリングを遮断する。

【0014】

さらに、uPAR-lock分子の使用については、種特異性の障壁がない。uPA:uPAR相互作用に対する薬剤の評価における主な問題は、それらが広範囲の種特異性を示し、異種移植モデルにおいて化合物を確実に試験することを困難にするということである。uPAR-lockの特異性は、エフェクタードメインの種の起源を変化させることにより、容易に「設定」することができる。

【0015】

本発明のアンタゴニスト分子は、Fcタグに起因する長いin vivo半減期などの優れた薬剤特性を示す。さらに、それはヒト配列から構成され、かくして、それは非免疫原性である。

【0016】

uPAR-lock分子は、遮断剤として機能するように設計されたものである。uPARへのその高い親和性および特異性ならびにFc部分の存在によって、例えば、放射性核種、毒素などの好適なエフェクター分子とのコンジュゲーションにより、uPAR標的化診断および/または療法のために前記分子を好適に用いることができる。

【0017】

かくして、本発明のアンタゴニスト分子は、多用途の臨床適用を有する。

10

20

30

40

50

## 【0018】

従って、本発明の目的は、

- 配列番号1の第11～第42アミノ酸のu、PAの増殖因子様ドメイン(GFDドメイン)を含む第1のポリペプチド、もしくはuPAオーソログス遺伝子に由来する対応する領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体;および  
- 配列番号2の第5～第39アミノ酸の、VNのソマトメジンBドメイン(SMBドメイン)を含む第2のポリペプチド、もしくはVNオーソログス遺伝子に由来する対応する領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体;  
からなる群より選択される2つのポリペプチドを含むダイマー分子であって、2つのポリペプチドが分子足場により互いに連結される、前記分子である。

10

## 【0019】

好ましくは、上記のダイマー分子中、

- 第1のポリペプチドは、配列番号2の第5～第39アミノ酸のSMBドメイン、もしくはVNオーソログス遺伝子に由来する同じ領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体をさらに含み;  
および  
- 第2のポリペプチドは、配列番号1の第11～第42アミノ酸のGFDドメイン、もしくはuPAオーソログス遺伝子に由来する同じ領域によりコードされるポリペプチド、またはその機能的変異体もしくは誘導体もしくは類似体をさらに含む。

20

## 【0020】

本発明のダイマー分子は、当業界で公知の任意の手段により取得し得る。誘導体は、より長い、またはより短い配列を有するポリペプチドであってよく、すなわち、酵素に対して耐性であるように改変されたものなどであってよい。

## 【0021】

本発明のダイマー分子中、GFDドメインは、好ましくは、配列番号1の第8～第48アミノ酸から本質的になり、より好ましくは、それは配列番号1の第1～第48アミノ酸からなる。

## 【0022】

本発明のダイマー分子中、SMBドメインは、好ましくは、配列番号2の第1～第41アミノ酸からなる。

30

## 【0023】

好ましい実施形態において、第1および第2のポリペプチドは、

- a) N末端-SMBドメイン-GFDドメイン-C末端の順序の配列を含む、および
- b) そのC末端を介して分子足場に連結される。

## 【0024】

より好ましくは、SMBドメインおよびGFDドメインは、第1のリンカーペプチドにより連結される。前記第1のリンカーペプチドは、好ましくは、配列番号3の配列から本質的になる。

## 【0025】

本発明のダイマー分子中、第1および第2のポリペプチドはそれぞれ、好ましくは、第2のリンカーペプチドを用いて分子足場に連結される。

40

## 【0026】

前記リンカーペプチドは、好ましくは、配列番号4の配列から本質的になる。

## 【0027】

本発明のダイマー分子の分子足場は、好ましくは、免疫グロブリン定常領域(Fc)、ロイシンジッパー、化学的リンカーまたはペプチドリinkerである。

## 【0028】

本発明の実施形態において、Fcの重鎖定常領域はそれぞれ、本質的に、配列  
PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN  
STYRVVSVLTVLHQDWLNGEYKCKVSNKALPAP I EKT I SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLXaaCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGOPENNYKATPPVLDSDGSFFLXaaSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK、(式中

50

、XaaはYまたはTのいずれかであってよい)(配列番号5)を有する。

【0029】

好ましい実施形態において、本発明のダイマー分子は、配列番号6の配列の第1のモノマー、および配列番号7の配列の第2のモノマーから本質的になる。

【0030】

別の好ましい実施形態において、本発明のダイマー分子の第1および第2のモノマーは、配列番号8の配列を有する。

【0031】

本発明の別の目的は、医学的使用のため、好ましくは、癌の治療としての使用のための上記ダイマー分子である。

【0032】

好ましい実施形態において、本発明のダイマー分子は、治療剤にコンジュゲートされ、その治療剤は、好ましくは放射性核種または毒素である。

【0033】

本発明のさらなる目的は、診断方法における使用のため、好ましくは、uPARにより媒介される病理または腫瘍の診断における使用のための上記ダイマー分子である。

【0034】

本発明の他の目的は、治療上有効量の本発明のダイマー分子のそれを必要とする対象への投与を含む癌の治療方法であって、医薬組成物が本発明のダイマー分子と、好適な賦形剤または添加剤とを含む、前記方法である。前記医薬組成物はさらに、別の治療剤、好ましくは放射性核種または毒素を含んでもよい。

【0035】

本発明の別の目的は、本発明のダイマー分子を含む、uPARにより媒介される病理または腫瘍の診断のためのキットである。

【0036】

ここで、本発明を以下の図面を参照しながら非限定例によって説明する。

【図面の簡単な説明】

【0037】

【図1】uPAR-lockの強制的近接性概念を例示する略図である。uPA結合により媒介される細胞外タンパク質分解におけるuPARの機能は、uPAの増殖因子様ドメイン(GFD)の受容体結合によって競合的に阻害することができる。VN結合により媒介されるシグナル伝達におけるuPARの機能は、VNのソマトメジンBドメイン(SMB)によって競合的に阻害することができる。以下のD1、D2およびD3はuPARドメインである。(A)競合的uPARアンタゴニストとしてのGFDおよびSMBドメイン。単離されたGFDおよびSMBの混合物を用いるuPAR機能の遮断には、2つの連続する第1の順序の分子間結合反応(1および2)が必要であり、受容体に初めて結合するのがGFDであるか、またはSMBであるかに応じて2つの経路(AおよびB)に従い得る。uPAR:GFD:SMB三元複合体、および従って、受容体阻害の全体の安定性は、最も弱い第2の結合反応、この場合、SMB結合(KD=360nM)によって制限される。既知の場合、個別の結合反応に関する実験的に決定された平衡定数は、Gardsvollら(Gardsvoll & Ploug, 2007)に由来するものである。(B)GFDおよびSMBドメインの両方を含有する分子足場の強制的近接性操作(「uPAR-lock」と命名される)。GFDおよびSMBが、共通の足場(uPAR-lock)への結合によって非常に近い位置に強制される場合、受容体阻害は同じシーケンスの結合反応に従う。しかしながら、重要なことは、第2の結合反応(A2およびB2)がここでゼロオーダー(すなわち、濃度非依存的)の分子内再編成であることである。このシナリオでは、受容体阻害の効率はかくして、最も強い初期結合反応、この場合、GFD部分の結合によってのみ制限される(予想されるKDは約0.29nM)。結果として、好適な足場を用いて作製されたuPAR-lockは、GFDおよびSMBの混合物よりも極めて強力な(1000倍を超える)uPAR機能のアンタゴニストであることが予測される。(C)足場。uPAR-lockを作製するために、いくつかの異なる型の足場を想定することができる。GFDおよびSMB分子を、共有ダイマーを形成する免疫グ

10

20

30

40

50

ロブリン重鎖(Fc)の定常領域に結合させることができる。GFDおよびSMBドメインはまた、ヘテロダイマーを形成するように改変されたロイシンジッパー配列を用いてタグ付けすることもできる(MoIIら、2001)。また、GFDおよびSMBドメインを、好適なリンカー領域を用いて単一のポリペプチド中に遺伝子操作することができる。

【図2A】uPAR:GFD:SMB三元複合体の結晶構造を示す図である。uPAR(灰色)、uPAの受容体結合ドメイン(GFD、黒色)およびVNの受容体結合ドメイン(SMB、白色)の間の三元複合体の結晶構造。GFDおよびSMBのN末端残基(Gln2およびPro8)ならびにGFD、SMBおよびuPARのC末端残基(Lys48、Pro41、Asp274)を示す。GFD(Lys48)およびSMB(Pro41)のC末端残基はわずかに18.9 Å離れており、同じ極性を有し、受容体から、および構造中のuPARのC末端残基(Asp274)により強調された推測される膜固定位置から遠い位置にあることに留意されたい。

10

【図2B】ヒト免疫グロブリン定常領域の結晶構造を示す図である。ダイマーヒトIgG重鎖定常領域(Fc)<sub>2</sub>の結晶構造。N末端残基(下図、Pro238)およびC末端残基(上図、Ser444)。2つのポリペプチドのN末端残基は、uPARに結合したGFDおよびSMBのC末端残基と同様に離れていることに留意されたい。ヘテロダイマー化を助けるように操作することができる2個の残基(Tyr407およびThr366、黒色)(Ridgwayら、1996)が図面の右側および左側に示される。この構造は、タンパク質データベース(PDB)エントリー3BT2および1H3Xに由来するものであり、MacPyMOLソフトウェアを用いて構成されたものである。

【図3】uPAR-lockトランスフェクト細胞の馴化培地がuPAR結合活性を示すグラフ(A)ならびに予測されるuPAR-lock構造の略図およびSDS-PAGEによる精製タンパク質の見かけ(B)を示す図である。(A)可溶性uPAR(5nM)で被覆された96穴プレートを、GFD/FcKおよびSMB/FcH(すなわち、uPAR-lock)を共に同時トランスフェクトしたPhoenix細胞に由来する馴化培地の連続希釈液と共にインキュベートした。ヒトFcを検出する二次試薬を用いて結合したuPARを検出した。uPAR被覆ウェルへの全結合(四角)、非被覆ウェルへの非特異的結合(三角)および特異的結合(丸)を示す。(B)uPAR-lockは、GFD/FcK(FcK=Fc「Knob」=Thr366 Tyr置換を担持するFc)とSMB/FcH(FcH=Fc「Hole」=Tyr407 Thr置換を担持するFc)の間の共有(ジスルフィド結合)ヘテロダイマーである。3μgの精製タンパク質を、非還元(左)および還元(右)条件下での12%SDS-PAGEにより分離し、ゲルをコロイドクマシー染色により染色した。

20

【図4】uPAR-lockのアンタゴニスト特性を示すグラフである。(A)Fcタグ付uPARは、固定されたuPAに高い親和性で結合する。固定されたuPAを、マウスFcでタグ付けされた増加する濃度のuPAR(uPAR/mFc)と共にインキュベートした。洗浄後、結合したuPAR/mFcを、ビオチン化抗マウスFc抗体およびユーロピウム標識ストレプトアビジンを用いて定量した。uPAR/mFcが固定されたuPAに対する特異的高親和性結合を示すことに留意されたい。(B)uPAR-lockは固定されたuPAへのuPAR結合を阻害する。固定されたuPAを、増加する濃度のuPAR-lock(菱形)またはuPA(丸)の存在下でuPAR/mFc(1nM)と共にインキュベートした。固定されたuPAに結合したuPAR/mFcの量を、上記のように定量した。uPAR-lockおよびuPAは両方とも、固定されたuPAに対するuPAR/mFc結合の競合的アンタゴニストであることに留意されたい。(C)固定されたVNへのuPARの高親和性結合は、uPAを必要とする。固定されたVNを、増加する濃度のuPAと混合したuPAR/mFc(5nM)と共にインキュベートした。洗浄後、結合したuPAR/mFcを上記のように定量した。固定されたVNへのuPAR/Fc結合にとってはuPAが必要であることに留意されたい。(D)uPAR-lockは、VNに対するuPAに誘導されるuPAR結合を阻害する。固定されたVNを、uPAR/mFc(1nM)、uPA(5nM)および増加する濃度のuPAR-lock(菱形)またはuPA(丸)と共に同時インキュベートした。洗浄後、結合したuPAR/mFcを上記のように定量した。uPAとは対照的に、uPAR-lockは、固定されたVNに対するuPAR結合のアンタゴニストであることに留意されたい。

30

40

【図5】VNへの細胞接着を示すグラフである。uPAR-lockは、VNへのuPARに媒介される細胞接着を特異的に阻害する。50nMのuPAR-lockの存在下または非存在下で、モックトランスフェクト細胞および293/uPAR<sup>T54A</sup>細胞を、VNで被覆された96穴プレート中に播種した(20,000個/ウェル)。リアルタイム細胞分析装置(RTCA)中で3時間にわたって2分毎にインピ

50

ーダンス(細胞指数)を測定することにより、細胞接着を定量した。基底細胞接着(v 5 インテグリンにより媒介される(Madsenら、2007))がプラトーに達した時、ウェルに最終濃度10nMとなるようにuPAを添加して、VNに対するuPAR<sup>T54A</sup>結合を誘導し、記録を続けた。uPAR-lockが293/uPAR<sup>T54A</sup>細胞の細胞接着のuPAに誘導される増加を完全に阻害することに留意されたい(uPA添加後の曲線を比較されたい)。uPAR-lockはインテグリン媒介性接着に影響せず(uPA添加前の曲線を比較されたい)、uPAは空のpcDNA5/FRT-TOベクター(293/モック)でトランスフェクトされた細胞の接着を調節しない。

【図6A】uPAR-lockおよび対照変異体の略図である。上記のように、uPAR-lockは、Fcタグ付GFDとSMBドメインとのヘテロダイマーである。GFD/GFDおよびSMB/SMBハイブリッドは、uPAR-lockと同じ方法で構築されるが、両ポリペプチド上にGFDまたはSMBドメインのいずれかを有する。いくつかの実験については、GFD/GFDおよびSMB/SMBの混合物は、uPAR-lockと同じドメイン組成を有するが、GFDおよびSMBドメインは別々の足場上に位置するため、これを用いた。

【図6B】uPAR-lockおよび対照タンパク質の見かけを示す図である。3マイクログラムの精製タンパク質を、非還元(左)および還元(右)条件下で10%SDS-PAGEにより分離し、ゲルをコロイドクマシー染色により染色した。

【図6C】固定されたuPARへの結合を示すグラフである。増加する濃度のuPAR-lock(丸)、GFD/GFD(四角)、SMB/SMB(上向きの三角)およびGFD/GFD+SMB/SMB(下向きの三角)を、固定されたuPARに結合させた。結合したタンパク質を、ヒトFcを検出する二次試薬を用いて検出した。最も強い結合はuPAR-lockについて認められることに留意されたい。

【図6D】uPAR-lockおよび対照タンパク質による固定されたuPAに対するuPAR/mFc結合の阻害を示す図である。固定されたuPAを、uPAR/mFc(1nM)と増加する濃度のuPAR-lockとの混合物と共にインキュベートし、結合したuPAR/mFcを図4Bに記載のアッセイを用いて定量した。GFDドメインを含有する全調製物が競合的uPAR/uPA相互作用アンタゴニストとして作用することに留意されたい。

【図7】VNへのuPAR媒介性細胞接着に対するuPAR-lockの阻害活性にはGFDとSMBとの強制的近接性が必要であることを示すグラフである。293/uPAR(A)および293/uPART54A(B)細胞(20,000個/ウェル)を、uPAR-lock(赤色)、GFD/GFD(黄色)、SMB/SMBまたはGFD/GFD+SMB/SMB(青色)の非存在下(黒色)または存在下、VN被覆された96穴Eプレート中に播種し、接着させた。播種の2時間後、ウェルに10nMとなるようにuPAを添加し、細胞接着の測定をさらに2時間継続した。uPAR-lockがVNへのuPA非依存的uPAR媒介性細胞接着(図7A中のuPA添加前の赤色と黒色の曲線を比較されたい)ならびにuPA誘導性接着(図7Aおよび7B中のuPA添加後の赤色と黒色の曲線を比較されたい)を阻害することに留意されたい。対照的に、GFD/GFDおよびGFD/GFD+SMB/SMBは両方とも、uPAR媒介性VN接着の強力なアゴニストである(図7Aおよび7B中のuPA添加前の黄色および緑色の曲線と黒色の曲線とを比較されたい)。SMB/SMBは、大部分は不活性である。

【図8】uPAR-lockはuPAR媒介性細胞移動を阻害し、GFDとSMBとの強制的近接性が必要であることを示すグラフである。293/uPAR細胞を、完全血清含有培地中、12穴プレート中に播種し、一晚接着させた。次の日、培地を、何も含有しない(左)、またはuPAR-lockを含有する(中央)、またはGFD/GFD+SMB/SMBを含有する(両方とも20nM、右)完全培地と交換し、経時的顕微鏡に移した。以前に記載のように(Madsenら、2007)、無作為細胞移動を記録し、ImageJソフトウェアを用いる手動細胞トラッキングにより定量した。それぞれのドットは単一の細胞を表す。平均移動速度(+/-95%信頼区間)を示す。データを非パラメータ分析により分析し、複数の比較について補正した(\*\*\*P<0.001、\*\*P<0.01およびns P>0.05)。uPAR-lockが293/uPAR細胞の移動を劇的に阻害することに留意されたい。

【図9A】単一のポリペプチド鎖内にGFDおよびSMBドメインを含有するホモダイマーuPAR-lock変異体の構造を示す略図である。上記のように、uPAR-lockは2つの異なるポリペプチド上に位置し、ヘテロダイマー化を助けるためにKnobおよびhole突然変異を含有するヒトFc定常領域でタグ付けられたGFDおよびSMBを含むジスルフィド結合したヘテロダイマーである。対照的に、GFD-SMB/mFcおよびSMB-GFD/mFcは、同じポリペプチド鎖上にSMBとGFD

10

20

30

40

50

ドメインの両方を含有するホモダイマーである。

【図9B】ホモダイマー-uPAR-lock変異体の阻害活性を示すグラフである。ヒトuPARを発現する293細胞を、VNで被覆された96穴Eプレート中に播種し、リアルタイム細胞分析装置(RTCA、xCELLingence、SP Roche Corp.)に移した。細胞接着の尺度である電気インピーダンス(細胞指数、CIと呼ばれる)を規則的な間隔で記録した。CIが完全な細胞接着を示唆するプラトーに達した時、ウェルに、グラフに示される最終濃度となるように3倍希釈曲線のSMB-GFD/mFcを添加した。Eプレートを装置に戻し、インピーダンスの測定を規則的な間隔で継続した。阻害剤を添加した時点(T=0)および図9Cに示される用量応答曲線の計算に用いられる時点(T=1h)を縦の点線で示す。この曲線は、時間(X軸)の関数として正規化された細胞指数(NCI、Y軸)を示す。全ての細胞指数を、阻害剤添加の直前に測定された細胞指数に対して正規化した。

10

【図9C】ホモダイマー-uPAR-lock変異体の阻害活性を示すグラフである。IC50値を決定するために、試薬添加の1時間後に測定されたNCIを、同じ時点でビヒクル処理された細胞に関するNCIの%(NCI、Y軸)で算出し、阻害剤濃度(X軸)の関数でグラフ化した。S字状用量応答曲線(可変勾配)を、Prism 5ソフトウェアスイートを用いて適合させ、その誘導されたIC50値を示す。

【図10A】ヘテロダイマー-uPAR-lockおよびホモダイマー-uPAR-lockV2、ならびにSMBドメインとuPARとの相互作用を弱めるこのドメイン中に単一のアミノ酸置換(D22A)を担持するこれらの変異体の構造を示す略図である(Okumura Yら、J Biol Chem 2002)。uPAR-lockV2は、uPAR-lockV2中の定常領域(Fc)がヒトIgGから誘導されることを唯一除いて、図9Aに示されるSMB-GFD/mFcと同一である。

20

【図10B】uPAR-lockV2活性および原理の証明を示すグラフである。ヒトuPARを発現する293細胞を、VN(1-66)/Fc<sup>RAD</sup>で被覆された96穴Eプレート中に播種し、リアルタイム細胞分析装置(RTCA、xCELLingence、SP Roche Corp.)に移した。細胞を、uPAR-lockおよびuPAR-lockV2の希釈曲線で処理し、図9に示されるように用量応答曲線を算出した。

【図10C】uPAR-lockV2活性および原理の証明を示すグラフである。D22A置換されたuPAR-lock変異体を用いた図10Bと同じ実験である。これらの変異体が接着を刺激することに留意されたい。

【図11】uPAR-lockV2によるin vivoでの腫瘍成長の阻害を示すグラフである。in vivoで増殖した前立腺癌に対するuPAR-lockV2の効果を示す。オスのBalb C nu/nuマウスに、皮下注射経路により(1x10<sup>6</sup>)個のPC-3細胞を接種した。動物をビヒクル(PBS)、10.0mg/kgの対照マウス免疫グロブリンまたはuPAR-lockV2で腹腔内経路により処理した。腫瘍を週に2回測定し、腫瘍体積を材料および方法に記載のように決定した。対照からの有意差を星印で表す(\*P<0.05、\*\*P<0.01および\*\*\*P<0.001)。

30

【図12】uPAR-lockはPC-3腫瘍細胞増殖を減少させ、in vivoでアポトーシスを促進することを示す図である。オスの無胸腺nu/nuマウスにPC-3細胞を皮下接種し、腹腔内経路を介するPBSまたは10.0mg/kgのuPAR-lockV2の週2回の注射により処理した。異種移植の8週間後、腫瘍を収獲し、材料および方法の節に記載のように免疫組織化学分析(図12A)にかけた。Ki-67およびカスパーゼ3染色を示し、核をDapiで対比染色する。データの定量化を図12Bに示す。

40

【図13】uPAR-lockを用いる腫瘍標的化を示す図である。PC-3腫瘍を担持するマウスに、Alexa488で標識されたuPAR-lockV2またはAlexa488で標識されたマウスIgGを注射し、24時間後、腫瘍を切り出し、蛍光顕微鏡観察により分析した。蛍光の明らかな領域が標識されたuPAR-lockV2を注射された動物に由来する腫瘍中で観察することができる(右図の輪郭を描いた領域)が、標識されたマウスIgGで処理されたマウスに由来する腫瘍中では同様の領域は観察されない。代表的なマイクログラフを示す。

【発明を実施するための形態】

【0038】

実験手順

uPA、VNおよびuPARのアミノ酸配列

50



























【 図 2 B 】

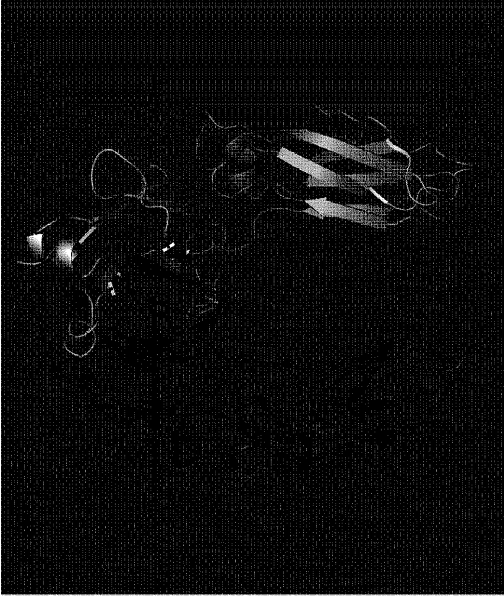
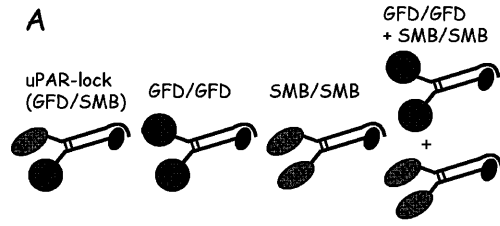


Fig. 2(2/2)

B

【 図 6 A 】



【 図 1 3 】

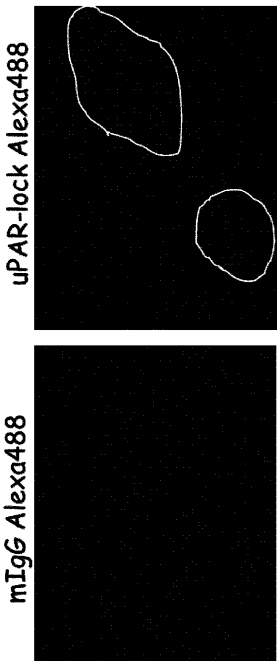


Fig. 13

【 図 1 】

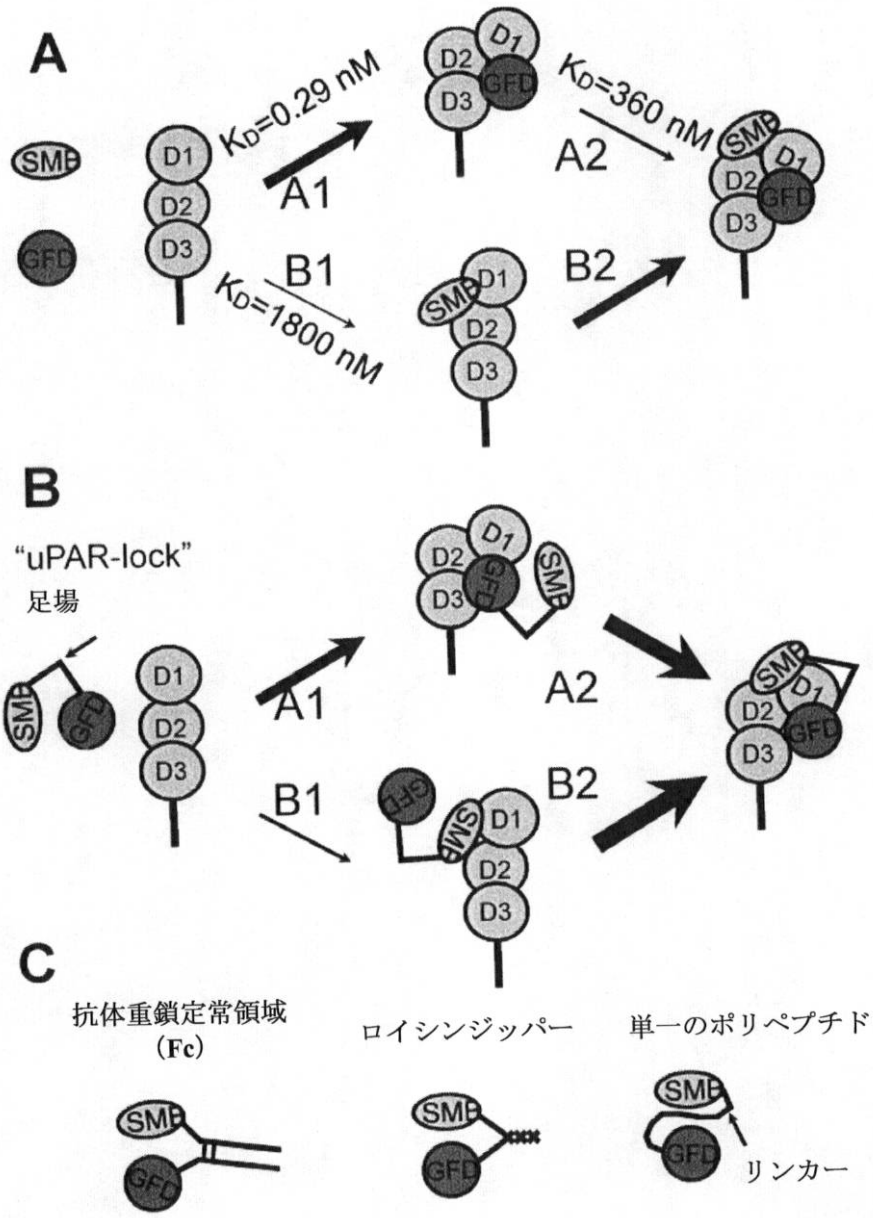


図 1

【 図 2 A 】

A

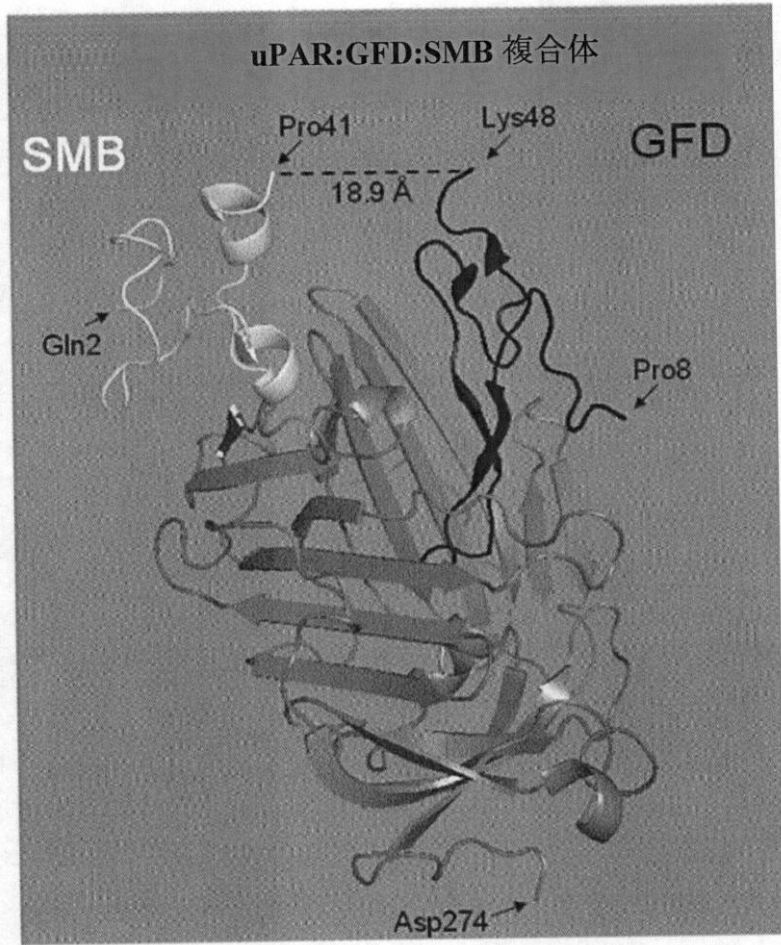


図 2A

【 図 3 】

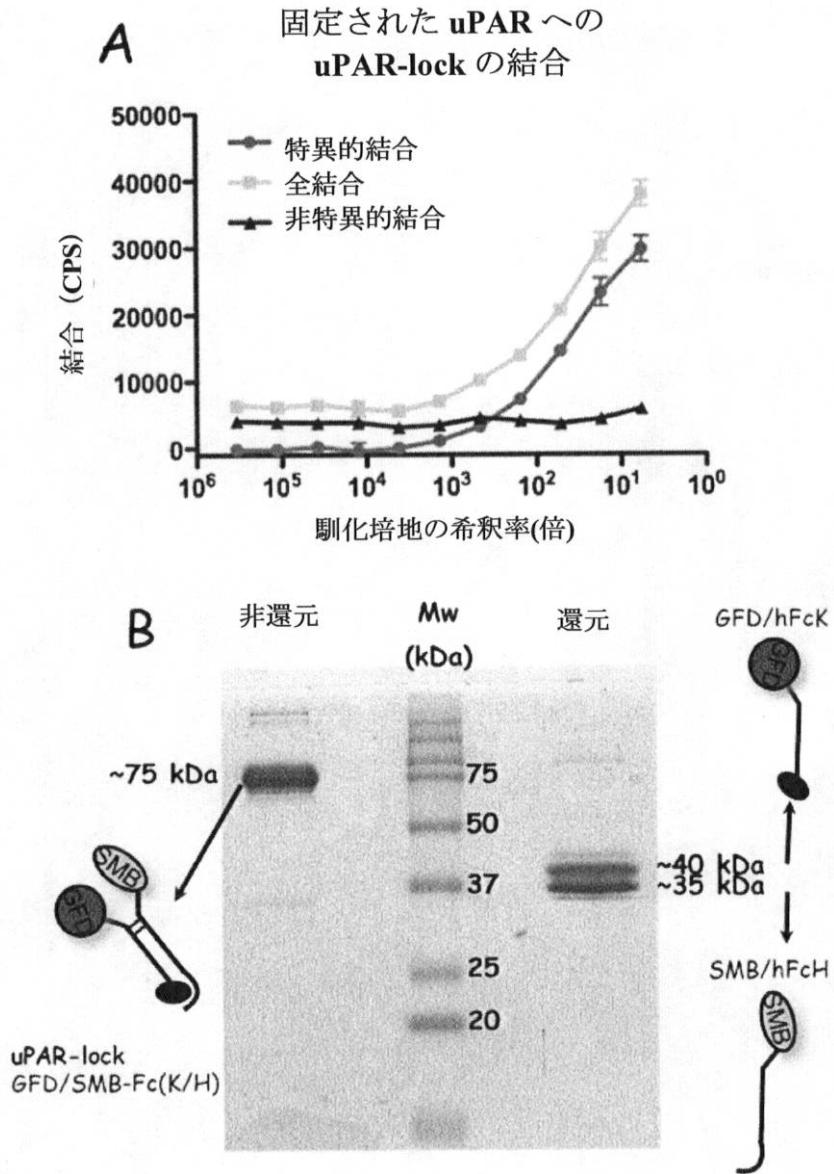


図 3

【 図 4 】

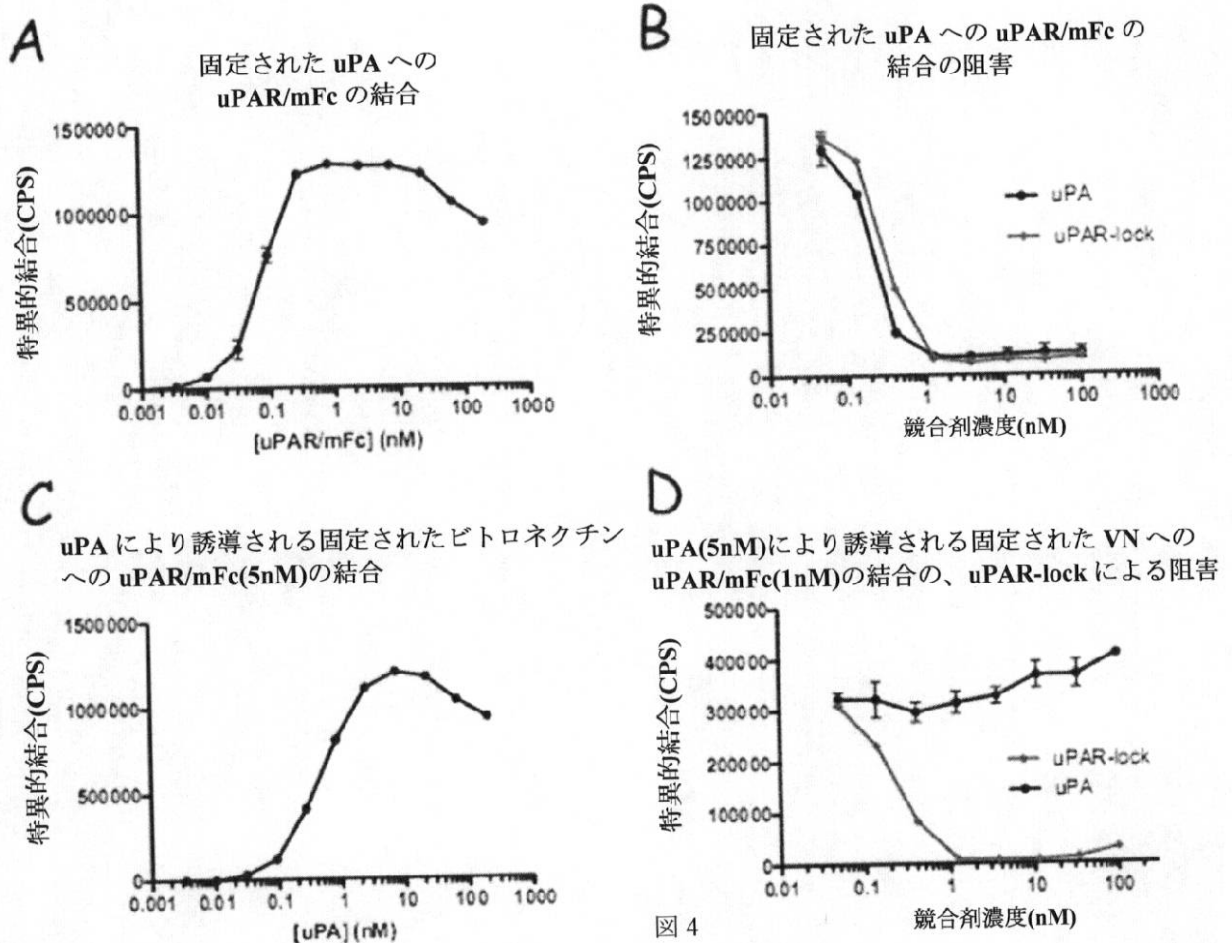


図 4

【 図 5 】

ビトロネクチン(VN)への細胞接着

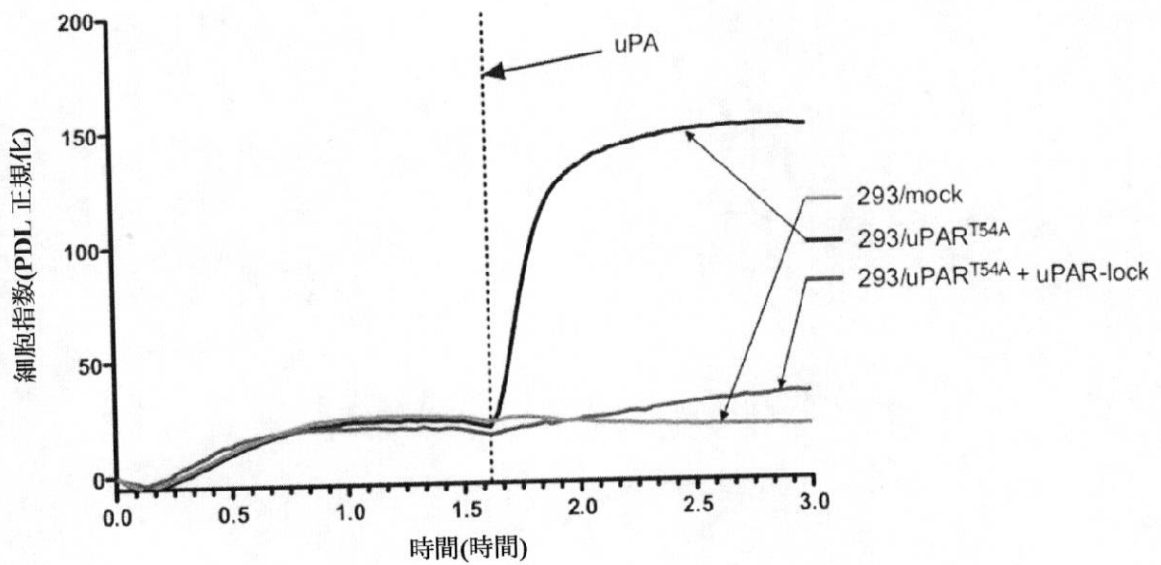


図 5

【 図 6 B 】

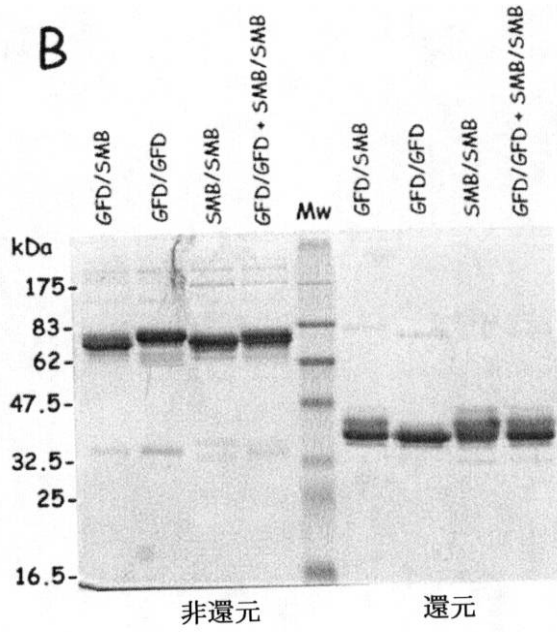


図 6B

【 図 6 C 】

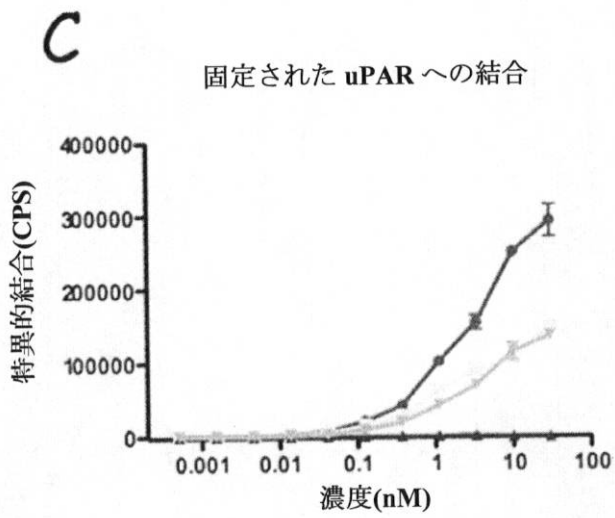


図 6C

【図6D】

D

固定された uPA への uPAR/mFc の  
結合の阻害

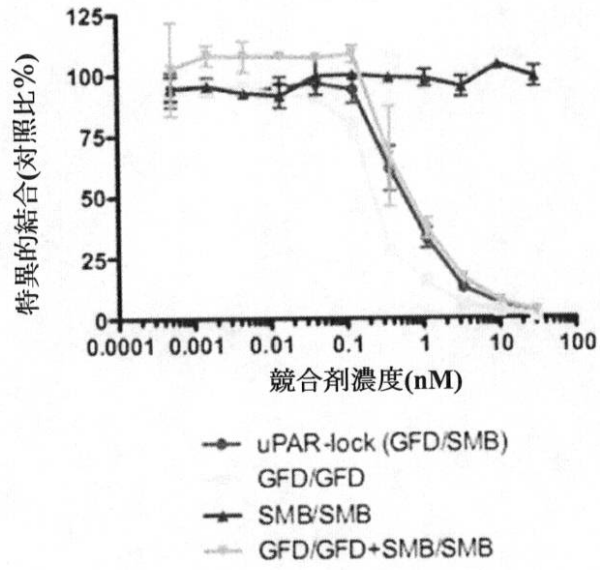
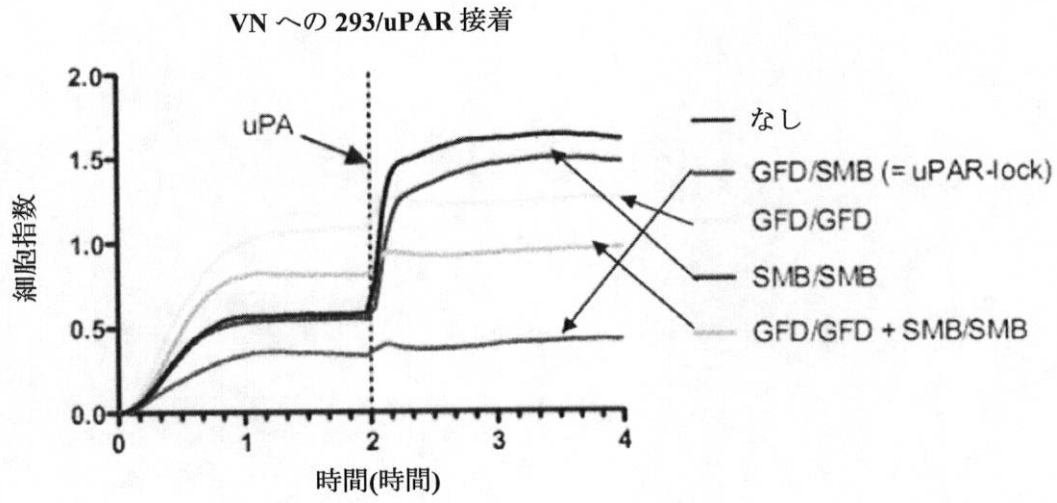


図 6D

【 図 7 】

A



B

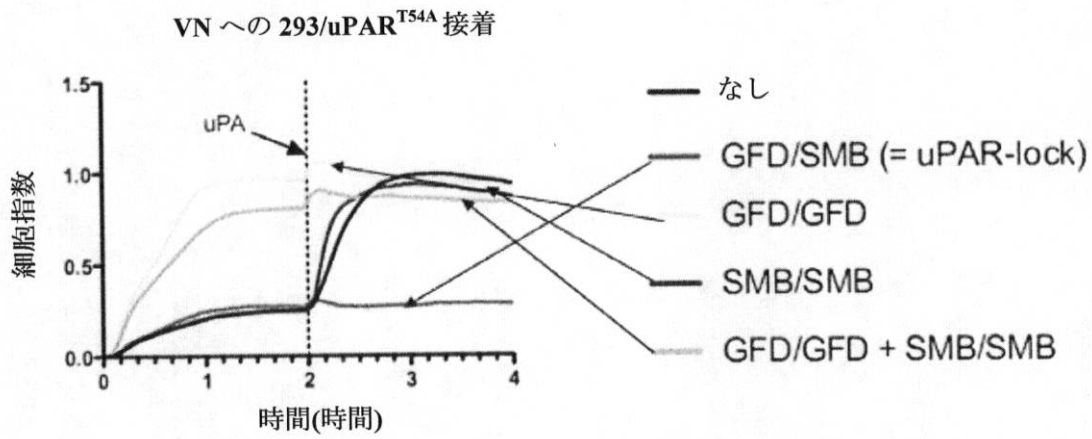


図 7

【 図 8 】

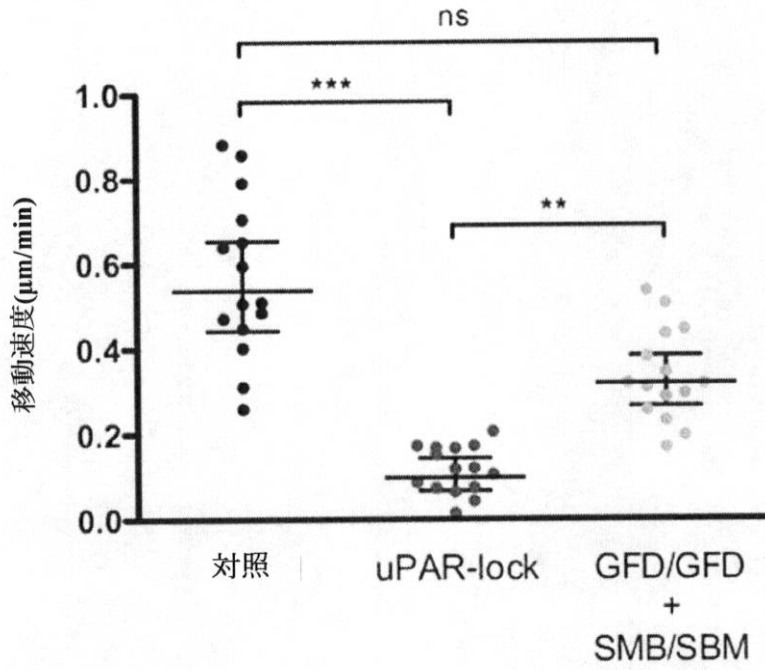


図 8

【 図 9 A 】

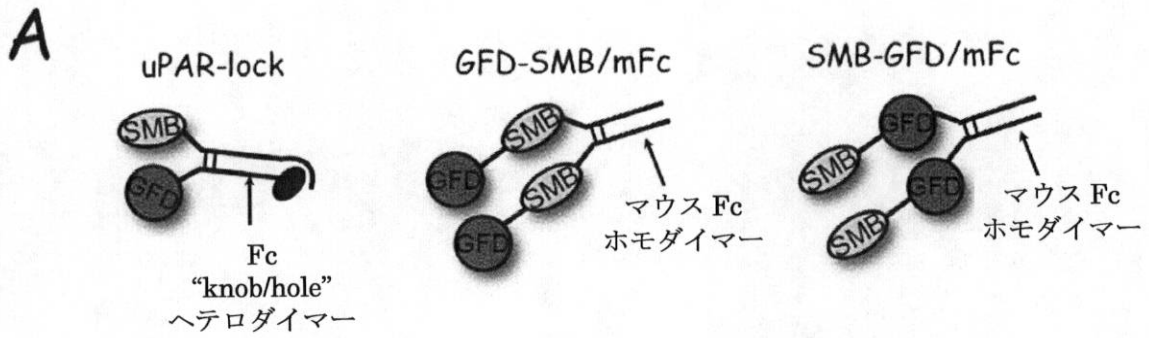


図 9A

【 図 9 B 】

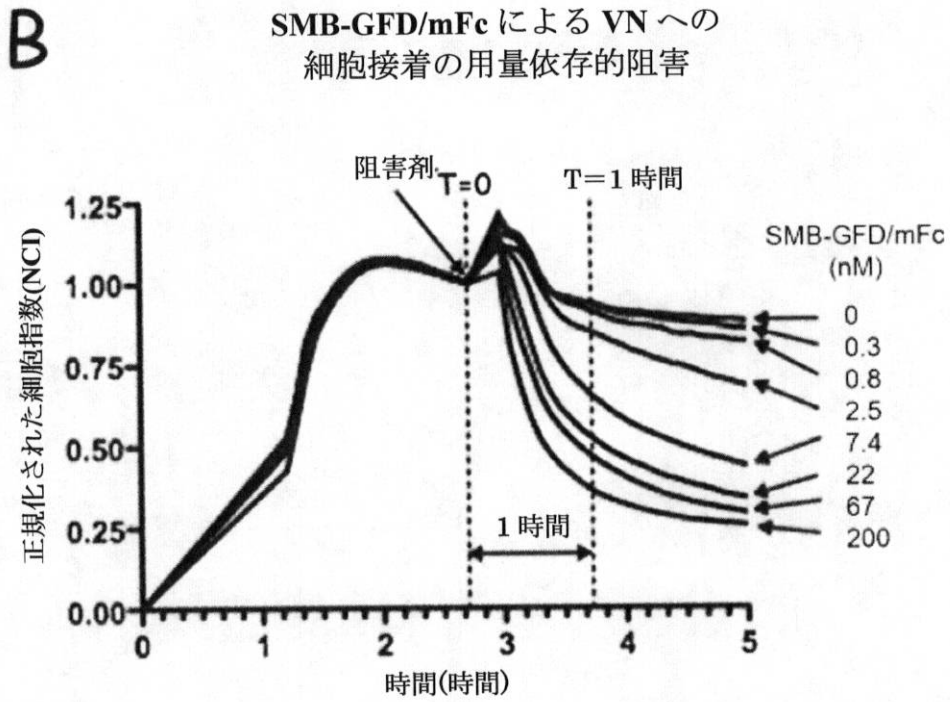


図 9B

【 図 9 C 】

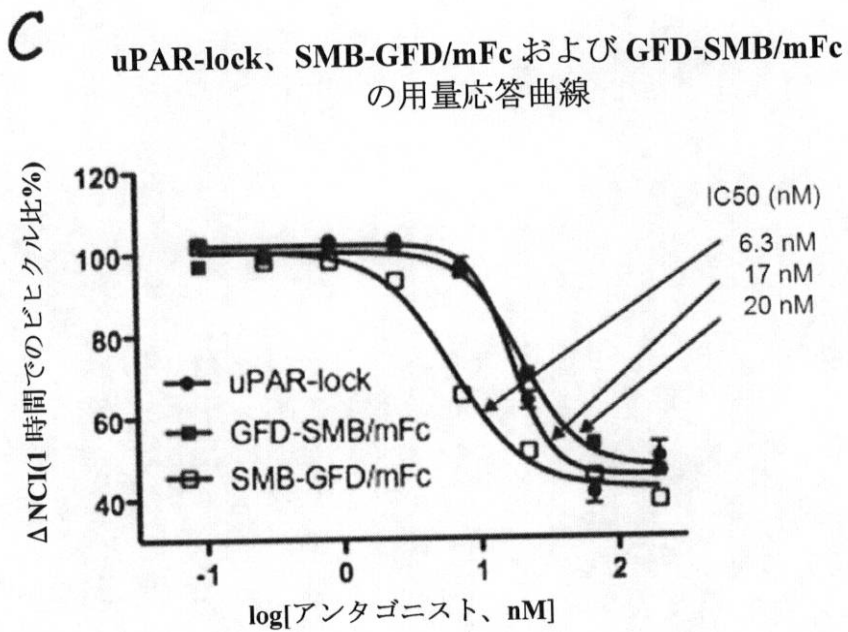


図 9C

【 図 1 0 A 】

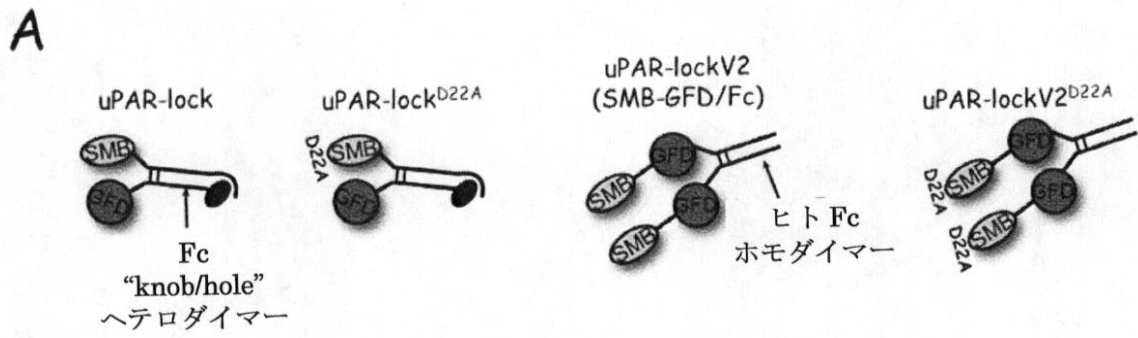


図 10A

【 図 1 0 B 】

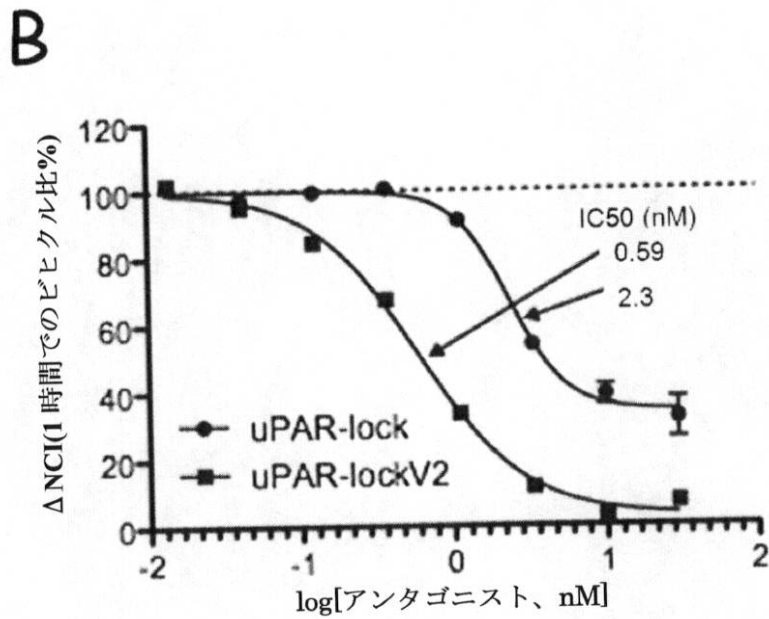


図 10B















