

(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2012-508027

(P2012-508027A)

(43) 公表日 平成24年4月5日 (2012. 4. 5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 16/18 (2006. 01)	C O 7 K 16/18	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006. 01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006. 01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/21 (2006. 01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2011-535765 (P2011-535765)
 (86) (22) 出願日 平成21年11月10日 (2009. 11. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年7月7日 (2011. 7. 7)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/063881
 (87) 国際公開番号 W02010/054377
 (87) 国際公開日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)
 (31) 優先権主張番号 61/113, 042
 (32) 優先日 平成20年11月10日 (2008. 11. 10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592130699
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 The Regents of The
 University of Calif
 ornia
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 07, オークランド, フランクリン スト
 リート 1111, 5ティーエイチ フロ
 ア
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100084146
 弁理士 山崎 宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 N-カドヘリンに対する完全ヒト抗体

(57) 【要約】

本出願は、癌における治療および診断方法のための N
 - カドヘリンに対する完全ヒト抗体を提供する。

N-Cadherin Knockdown Leads to Downregulation Of Activated Akt

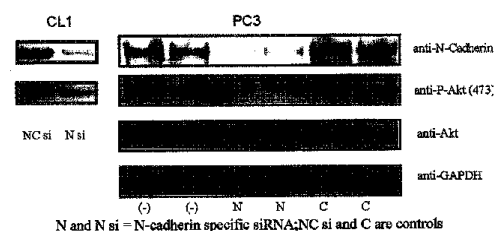


FIG. 15

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号：1 のアミノ酸配列を含む、N - カドヘリンの細胞外ドメイン 4 に結合することができるモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

フラグメントが s c F v である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

フラグメントがダイアボディである、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号：2、3、4、5、6、7、8 または 9 のアミノ酸配列を含む、N - カドヘリンの細胞外ドメイン 1 - 3 に結合することができるモノクローナル抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項 5】

フラグメントが s c F v である、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 6】

フラグメントがダイアボディである、請求項 4 に記載の抗体。

【請求項 7】

癌患者を処置する方法であって、

(a) N - カドヘリントタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体由来の試験組織サンプルを得て、

20

(b) 癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおける N - カドヘリントタンパク質の存在もしくは非存在または量を測定し、それにより、N - カドヘリントタンパク質を発現する該癌を診断し、ここで、N - カドヘリントタンパク質は正常または低レベルで発現するか、または一部の細胞により発現するか、または過剰発現する、そして

(c) 有効量の請求項 1 または 4 に記載の N - カドヘリン抗体またはフラグメントを、N - カドヘリントタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体に投与する

工程を含む方法。

【請求項 8】

該組織サンプルが前立腺または膀胱組織である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

該癌が前立腺癌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

該癌が膀胱癌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

該癌がホルモン抵抗性前立腺癌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

該抗体がホルモン抵抗性前立腺癌を阻止する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

該抗体が癌幹細胞を阻止する、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 14】

該癌が転移性癌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 15】

該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 16】

抗体が s c F v である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 17】

抗体がダイアボディである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 18】

癌患者を診断する方法であって、

50

(a) N - カドヘリンタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体由来の試験組織サンプルを得て、

(b) サンプルを有効量の請求項 1 または 4 に記載の N - カドヘリン抗体またはフラグメントと接触させることにより、癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおける N - カドヘリンタンパク質の存在もしくは非存在または量を測定し、それにより、N - カドヘリンタンパク質を発現する該癌を診断する、ここで、N - カドヘリンタンパク質は正常または低レベルで発現するか、または一部の細胞により発現するか、または過剰発現する工程を含む方法。

【請求項 19】

10

癌幹細胞を同定する方法であって、

(a) N - カドヘリンタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体由来の試験組織サンプルを得て、

(b) 請求項 1 または 4 に記載の抗体を使用して、癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおける癌幹細胞の存在または非存在を測定する、ここで、N - カドヘリンタンパク質は正常または低レベルで発現するか、または一部の幹細胞により発現し、そして過剰発現しない工程を含む方法。

【請求項 20】

20

該組織サンプルが前立腺または膀胱組織である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

該癌が前立腺癌である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

該癌が膀胱癌である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 23】

該癌がホルモン抵抗性前立腺癌である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 24】

該癌が転移性癌である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 1 または 4 に記載の配列をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸 30

【請求項 26】

請求項 25 に記載の核酸を含む、単離されたベクター。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2008 年 11 月 10 日に出版された米国仮出願第 61 / 113, 042 号 40
(これは、出典明示により本明細書に包含させる) の利益を主張する。

【0002】

連邦支援研究または開発下で作成された発明の権利に関する言及

NIH/NCI SOMI Training Grant, R25 CA 098010, M. Phelps/A. Wu, Directors

NIH/NCI UCLA Prostate SPOR, P50 CA 092131, R. Reiter/A. Wu。該政府機関は本発明における一定の権利を有する。

【0003】

コンパクトディスクで添付により提出された「配列表」、表またはコンピュータプログラムリストへの言及

該当なし。

50

【背景技術】

【0004】

発明の背景

前立腺癌は、最も一般的な悪性腫瘍であり、アメリカ男性において癌関連死の第2位の原因である。前立腺癌は、生物学および臨床的に多様な疾患である。この悪性腫瘍を有する男性の大部分は、個体の自然寿命に影響し得ない増殖遅延型腫瘍を有しているが、他は急速進行性転移性腫瘍にかかる。P S Aスクリーニングは、特異性の欠如およびどの患者がホルモン抵抗性転移性疾患を発症する危険性があるかを予測することができないことにより制限される。診断のためにより小さいP S A値を主張する最近の研究は、前立腺癌診断の数を増加させ、無痛性癌患者 対 侵襲性癌患者の同定をさらに複雑にし得る (Pungliaら., N Engl J Med, 349: 335-342 (2003))。臨床結果と相関するか、または侵襲性疾患の可能性がある患者を同定する新規血清および組織マーカーが、早急に必要である (Welshら., Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 3410-3415 (2003))。

10

【0005】

最近の発現プロファイリング研究は、転移性 対 非転移性腫瘍に関する発現特性が原発性腫瘍に存在し得ることを示唆する (Ramaswamyら., Nat Genet, 33: 49-54 (2003); Sotiriouら., Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 10393-10398 (2003))。腫瘍が特定の臓器へ転移しやすくなるさらなる特徴は、ある頻度で原発性腫瘍に存在することでもある (Kangら., Cancer Cell, 3: 537-549 (2003))。これらの最近の観察は、前転移性または前ホルモン抵抗性前立腺癌の新規マーカーが初期段階の疾患において同定され得ることを示唆する。これらのマーカーは、また、転移性またはホルモン抵抗性前立腺癌の進行の生物学において役割を果たし得る。結果と相関し、前立腺癌の進行の生物学において役割を果たす原発性腫瘍に存在する遺伝子の最近の例は、E Z H 2およびL I Mキナーゼを含む (Varamballyら., Nature, 419: 624-629 (2002); Yoshiokaら., Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 7247-7252 (2003))。しかしながら、これら2つの遺伝子のいずれもが分泌されない。

20

【0006】

ホルモン抵抗性前立腺癌の新規候補血清または組織マーカーを同定するために、本発明者らは、以前に、対のホルモン依存性およびホルモン抵抗性前立腺癌の異種移植片の遺伝子発現プロファイルを比較した。L A P C - 9異種移植片は、免疫不全マウスにおける去勢後の造骨性(osteoblastic bone)転移およびアンドロゲン依存性から非依存性への進行から確立された (Craftら., Cancer Research, In Press (1999))。それは、以前に、前立腺癌における候補治療標的を同定するために使用されている。特異的に発現される遺伝子が確認され、次に分泌または細胞表面タンパク質に対して配列相同性に関して試験された。N - カドヘリンは、癌のマーカーとして同定されている。ホルモン抵抗性前立腺癌および膀胱癌の両方において発現される、N - カドヘリンの同定、特性化および初期検証は、以前に報告されている (W O / 2 0 0 7 / 1 0 9 3 4 7)。

30

【0007】

胚形成において観察することができる細胞移動の1つの型は、個々の細胞または細胞の小集団の細胞外マトリックスを介する移動のために細胞間接触の喪失を必要とする。このプロセスは、上皮間葉転換 (E M T) と呼ばれる。E M Tは、また、病理学的状態、例えば、上皮性起源の腫瘍細胞の運動性および浸潤性表現型の獲得において生じる。E M Tの特徴は、E - カドヘリンの喪失およびN - カドヘリン接着分子のデノボ発現である。N - カドヘリンは、腫瘍細胞生存、移動および浸潤を促進し、高レベルのN - カドヘリン発現は、しばしば、予後不良と関連する。N - カドヘリンは、また、内皮細胞において発現され、正常血管および腫瘍 - 関連血管新生血管の成熟および安定化において必須の役割を果たす。N - カドヘリンが癌における治療標的の可能性があることを示唆する実験的証拠が増加している。

40

【0008】

N - カドヘリンの機能は、分子レベルで研究されている。N - カドヘリンのN - 末端細

50

胞外領域（１６０から７２４ a . a ）は、５つのドメイン（ＥＣＤ１ - ＥＣＤ５）からなる。ＥＣＤ１およびＥＣＤ２は、細胞内接着のために必要な最小ドメインであるが、全ての細胞外ドメインが含まれるとき、接着のレベルは増強される。加えて、研究によって、ＥＣＤ４の６９アミノ酸部分が細胞接着ではなく移動および移動度において重要であることが見出された（Kim et al. J Cell Biol 2000）。

【０００９】

したがって、本発明は、限定はしないが、前立腺癌および膀胱癌を含む、Ｎ - カドヘリンを発現する癌の診断、予後診断および処置におけるＮ - カドヘリンを標的とする組成物および方法を提供する。Ｎ - カドヘリンの細胞外ドメインに特異的である抗体、およびそのフラグメントも、また、本明細書に記載されている。

10

【発明の概要】

【００１０】

発明の概要

本出願は、癌、例えば、前立腺および膀胱癌における治療および診断方法のためのＮ - カドヘリンに対する完全ヒト抗体を提供する。

【図面の簡単な説明】

【００１１】

【図１】連続パニングラウンドを介する抗 - Ｎ - カドヘリンファージ抗体の濃縮。

【００１２】

【図２】ＰＣ３細胞のＡ１４、Ｃ７、Ｅ４およびＤ４ダイアボディ染色。

20

【００１３】

【図３】Ｎ - カドヘリン陰性細胞へのＣ７ダイアボディの結合。

【００１４】

【図４】Ｎ - カドヘリン発現細胞へのＥ４およびＤ４ダイアボディの特異的結合。

【００１５】

【図５】ＬＡＰＣ９ ＡＩ 腫瘍における^{1 2 4} I 標識Ｄ４ Ｄｂの腫瘍局在。

【００１６】

【図６】Ｎ - カドヘリンはＮＦ - κ Ｂを活性化する。

【００１７】

【図７】Ｎ - カドヘリンはＮＦ - κ Ｂを活性化する。

30

【００１８】

【図８】Ｎ - カドヘリンはＣ１細胞の細胞表面上に発現する。

【００１９】

【図９】ＮＦ - κ Ｂは、Ｎ - カドヘリン陽性細胞（Ｃ１）の核に局在する。

【００２０】

【図１０】Ｎ - カドヘリン発現は、ＩＬ - ６、ＩＬ - ８、ＴＧＦ β 2 およびｂｃ１ - 2 の誘導を引き起こす。

【００２１】

【図１１】誘導遺伝子とＮ - カドヘリンレベルとの相関関係。

【００２２】

【図１２】Ｎ - カドヘリンノックダウンは、ＩＬ - ６およびＩＬ - ８の下方制御を引き起こす。

40

【００２３】

【図１３】Ｎ - カドヘリン抗体処理後のＮＦ - κ Ｂ活性。

【００２４】

【図１４】ＰＣ３細胞におけるＮcad、４８時間抗体インキュベーション。

【００２５】

【図１５】Ｎ - カドヘリンノックダウンは、活性化されたAktの下方制御を引き起こす。

【００２６】

50

【図 16】N - カドヘリン特異的抗体は、活性化され、次に A k t 活性化を下方制御する。

【発明を実施するための形態】

【0027】

発明の詳細な説明

本発明者らは、本明細書において、癌患者を処置する方法および癌幹細胞を同定する方法であって、癌細胞においてN - カドヘリンタンパク質が正常または低レベルで発現されるか、または一部の癌細胞により発現され、過剰発現されない方法を報告する。加えて、本発明者らは、本明細書において、N - カドヘリンの細胞外ドメインに特異的である抗体、およびそのフラグメントを報告する。

10

【0028】

N - カドヘリン発現は、前立腺および膀胱癌浸潤および転移ならびにホルモン抵抗性疾患への前立腺癌の進行の一因となり得る。N - カドヘリンは、単独ならびにm T O RおよびE G F Rの他の小分子阻害剤と組み合わせての両方で治療的に標的化することができる。N - カドヘリンの標的化は、浸潤性および転移性前立腺癌を予防または制御することを助けることができる。

【0029】

本発明は、処置および診断のための標的であるN - カドヘリンが、正常組織と比較して過剰発現する必要がないという知見に関する。それは、低レベルで発現され得、また、一部の細胞のみにより発現されることもある。本発明者らは、わずか5 %の前立腺癌細胞におけるN - カドヘリンの標的化が、去勢抵抗性への前立腺癌の進行を阻止するために十分であることを見出した。

20

【0030】

本発明は、また、癌幹細胞における標的としてのN - カドヘリンに関する。本発明者らは、5 %以下の細胞におけるN - カドヘリンの標的化が腫瘍の進行を阻止するために十分であることを見出した。この知見は、N - カドヘリンが癌幹細胞のマーカーであり、これらの幹細胞上のN - カドヘリンの阻害が全体として腫瘍の増殖を阻止するために十分であるという仮説と一致する。

【0031】

本発明は、さらに、癌幹細胞マーカーであることと一致するN - カドヘリン発現細胞が、N - カドヘリン非発現細胞よりもさらに腫瘍形成性である知見に関する。N - カドヘリン陽性細胞は、N - カドヘリン陰性細胞を生じることができ、また、N - カドヘリンが癌幹細胞の新規マーカーであるという理論と一致する。最後に、腫瘍は、増殖するために、N - カドヘリンを上方制御するか、または獲得しなければならない。すなわち、腫瘍幹細胞は、腫瘍形成性になるために、上皮間葉転換の特性を獲得しなければならない。

30

【0032】

したがって、N - カドヘリンは、とりわけ有望な治療標的である。それは、細胞表面上に見出され、多数の上皮性腫瘍において発現し、浸潤性、転移性および恐らくアンドロゲン非依存性に関連する。したがって、N - カドヘリンに対する抗体は、限定はしないが、泌尿生殖器癌（膀胱、前立腺）を含む上皮癌、さらに特に、それらの浸潤性または転移性形態の処置における使用のために特に好ましい物質である。いくつかの態様において、N - カドヘリンの細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体が好ましい。さらなる態様において、N - カドヘリンの第1の細胞外ドメイン（E C 1）、第1および第2のドメインの部分、第1から第3のドメインまたは第4の細胞外ドメインが、これらの癌の処置において好ましい。いくつかの態様において、細胞外ドメイン4が、機能調整性および浸潤性の可能性において重要であることが見出されているため（Kimら, J Cell Biol. 151(6):193-206 (2000)参照、種々のN - カドヘリンドメインの定義に関して、その全体を出典明示により包含させる）、細胞外ドメイン4に対する抗体の使用が、これらの処置において特に好ましい。

40

【0033】

50

本明細書において、本発明者らは、2つの非依存性N - カドヘリン組換えタンパク質、すなわち、N - カドヘリン細胞外ドメイン1から3 (ECD 1 - 3) およびN - カドヘリンの第4のドメイン (ECD 4) に特異的なヒトScFvの選択および特性を記載する。2つの非依存性スクリーンを、該分子の接着および移動表現型に影響することができる特定の試薬を生産、ならびにN - カドヘリン発現細胞を標的とするための試薬を生産する目的で設計した。第4パニングラウンド由来の個々のファージクローンを、ELISAおよびフローサイトメトリーにより特徴付けた。特異的な結合剤をシーケンシングし、選択されたクローンのいくつかを小さい二価抗体フラグメント (ダイアボディ) に再構築した。該ダイアボディは、N - カドヘリン発現細胞への特異的結合を示す。

【0034】

本明細書に記載されている抗 - N - カドヘリンフラグメントは、種々の形状およびサイズのヒト全抗体または操作された抗体を製造され得るときの基本的な構成要素であり、この主要な特性は、N - カドヘリンタンパク質に特異的に結合する能力である。これらの抗体は、N - カドヘリンタンパク質を発現する前立腺、膀胱または他の癌の処置または診断のために使用することができる。腫瘍におけるN - カドヘリン発現が、腫瘍細胞自体または何らかの周辺の間質 (筋肉、繊維芽細胞、血管など) によるものであるかに注意することが重要である。本発明者らは、以前に、N - カドヘリンが、前立腺、膀胱および他の癌の浸潤、増殖、転移および進行の重要な生物学的決定因子であり、重要な診断、予後診断および治療標的であることを示している。N - カドヘリンに対するマウスモノクローナル抗体は、癌の動物モデルにおいて腫瘍増殖、転移、浸潤およびアンドロゲン非依存性への進行を阻止することができる。容易に全抗体または操作された抗体に再構築することができるヒトScFvの見出したことは、抗体に対する免疫応答を刺激することなしに、癌を標的とする能力を提供する。

【0035】

本発明者らは、知る限りにおいて、前立腺および他の癌を診断および処置する目的で導かれたN - カドヘリンに対する初めてのヒト抗体フラグメントを記載する。本発明は、前立腺および膀胱ならびに他の癌の進行においてN - カドヘリンが関与するという本発明者らのグループにより開発された先行技術、ならびに治療的にそれを標的化するという概念を前提とする。ファージディスプレイは、抗体フラグメントの単離のためによく確立された技術を表す。本明細書で使用される非免疫ファージライブラリーは、Dr. JD Marks at UC, San Franciscoにより開発された。

【0036】

本発明は、N - カドヘリンを認識する一本鎖フラグメントの単離および特性化を表す。これらは、癌の診断または処置のために使用することができる、一本鎖フラグメントとして使用するか、またはより大きなフラグメント、例えば、全IgGに再構築することができる。

【0037】

記載されているとおり、本発明は、より大きな構築物に再構築でき、前立腺および他の癌におけるN - カドヘリンを認識するために使用することができる、推定診断および治療有用性を有する多くの候補フラグメントを記載している。これらの抗体は、それら自体 (裸の抗体) により、または、治療、画像もしくは他の目的のために腫瘍への送達のために放射性同位体、ナノ粒子、リポソーム、ウイルスもしくは他のあらゆる「負荷」と組み合わせる使用することができる。フラグメントは、N - カドヘリンを発現する腫瘍に対するあらゆる治療または画像診断法の特異性を増加させるために使用することができる。

【0038】

本発明者らの知っている限りでは、N - カドヘリンに対する抗体が、このような腫瘍を標的化するあらゆる他の既知の方法より優れている治療活性を有することを初めて示す。本発明の利点は、抗体フラグメントが非免疫原性およびヒトであり、さらなる修飾なしに患者に使用することができることである。また、N - カドヘリンを認識するフラグメントは、容易にほとんどあらゆる目的のために操作することができるという柔軟性の利点を有

10

20

30

40

50

する。

【0039】

定義

「N - カドヘリンおよびE - カドヘリン」は、(1) 本明細書に記載されている、例えば、図7、8および9のそれぞれに記載されているそれぞれの参照核酸によってコードされるポリペプチドまたはアミノ酸配列に対し、好ましくは少なくとも約25、50、100、200、500、1000またはそれ以上のアミノ酸の領域にわたって、約60%以上のアミノ酸配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、好ましくは91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%またはそれ以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有する、(2) 図7、8および9のそれぞれに記載されている参照アミノ酸配列を含む免疫原、それらのそれぞれの免疫原性フラグメント、およびそれらのそれぞれの保存的に修飾された変異体に対する抗体、例えば、ポリクローナル抗体に特異的に結合する、(3) ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で、図7、8および9のそれぞれに記載されている参照アミノ酸配列をコードする核酸、およびそれらのそれぞれの保存的に修飾された変異体に特異的にハイブリダイズする、(4) 図7、8および9のそれぞれに示されている参照核酸配列に対し、好ましくは少なくとも約25、50、100、150、200、250、500、1000またはそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって、約95%以上の、好ましくは約96%、97%、98%、99%またはそれ以上の核酸配列同一性を有する核酸配列を有する、核酸、例えば、遺伝子、pre-mRNA、mRNAおよびポリペプチド、多型変異体、対立遺伝子、変異体ならびに種間相同体を示す。ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列は、一般的に、霊長類、例えば、ヒト、齧歯動物、例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジを含むが、これらに限定されない、哺乳動物または他の哺乳動物由来である。本発明の核酸およびタンパク質は、天然または組換え分子の両方を含む。

10

20

30

40

50

【0040】

「癌」は、ヒト癌および癌腫、肉腫、腺癌、リンパ腫、白血病など、例えば、固形腫瘍およびリンパ癌、腎臓、乳房、肺、腎臓、膀胱、大腸、卵巣、前立腺、脾臓、胃、脳、頭頸部、皮膚、子宮、精巣、食道および肝臓癌、非ホジキンおよびホジキンリンパ腫を含むリンパ腫、白血病および多発性骨髄腫を示す。「泌尿生殖器癌」は、腎臓、膀胱、尿路、尿道、前立腺、陰茎、精巣、外陰、陰、子宮頸および卵巣組織を含むが、これらに限定されない、尿路および生殖器組織のヒト癌を示す。

【0041】

本明細書において処置される癌は、N - カドヘリンの過剰活性化により特徴付けられるものであり得る。あるいは、本明細書において処置される癌は、N - カドヘリンタンパク質が正常または低レベルで発現するものか、またはN - カドヘリンタンパク質が一部の細胞により発現し、N - カドヘリンタンパク質が過剰発現しないものであり得る。本発明の1つの態様において、診断または予後アッセイは、患者の癌がN - カドヘリンの発現により特徴付けられるか否かを測定するために実施される。このような増幅/発現を測定するための種々のアッセイが考慮され、免疫組織化学、FISHおよびshed抗原アッセイ、サザンブロット法またはPCR技術を含む。さらに、N - カドヘリン発現または増幅は、インビボ診断アッセイを使用して、例えば、検出する分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体)で標識される分子(例えば、抗体)を投与し、外部から標識の局在に関して患者をスキャンすることにより、評価され得る。いくつかの態様において、処置される癌は、まだ浸潤性でないが、N - カドヘリンを発現する。

【0042】

「治療耐性」癌、腫瘍細胞および腫瘍は、化学療法、ホルモン治療、放射線治療および免疫療法を含む、アポトーシス - 介在(例えば、死受容体細胞シグナル伝達、例えば、Fasリガンド受容体、TRAIL受容体、TNF - R1、化学療法剤、放射線を介する)および非アポトーシス介在(例えば、毒性薬剤、化学物質)癌治療のいずれか、または両

方に耐性または難治性となっている癌を示す。

【0043】

「過剰発現」は、試験組織サンプルにおけるN - カドヘリン、LY6 - EおよびE - カドヘリンのRNAまたはタンパク質発現が、それぞれ、コントロール組織サンプルにおけるN - カドヘリン、LY6 - EおよびE - カドヘリンのRNAまたはタンパク質発現よりも顕著に高いことを示す。1つの態様において、組織サンプルは自己である。浸潤性、転移性、ホルモン非依存性（例えば、アンドロゲン非依存性）または処置に対して抵抗性もしくははその高い可能性と関連する癌性試験組織サンプル（例えば、膀胱、前立腺）は、一般的に、転移への進行の可能性があまりない患者由来の癌組織または正常（すなわち、非癌）組織サンプルと比較して、少なくとも2倍高いN - カドヘリンまたはLY6 - EのmRNAまたはタンパク質の発現、しばしば3、4、5、8、10倍まで、またはそれ以上高いN - カドヘリンまたはLY6 - Eの発現を有する。このような違いは、試験およびコントロールサンプルでほぼ同様に負荷されたゲルのバンドを見たとき、容易に明らかにされ得る。増加した量のN - カドヘリンまたはLY6 - Eを発現する前立腺癌は、浸潤性になる可能性、転移する可能性、またはアンドロゲン非依存性もしくはは処置難治性癌へ進行する可能性が高い。原発性腫瘍におけるN - カドヘリンまたはLY6 - E陽性細胞の少ない割合が、再発および転移の高い危険性を有する腫瘍を同定し得る可能性があるため、種々のカットオフは、N - カドヘリンまたはLY6 - E陽性と関連がある。「過剰発現する」、「過剰発現」または「過剰発現された」なる用語は、互換的に、正常細胞と比較して、通常、癌細胞において検出的により良いレベルで転写されるか、または翻訳される遺伝子を示す。したがって、過剰発現は、タンパク質およびRNAの両方の過剰発現（増加した転写、転写後プロセッシング、翻訳、翻訳後プロセッシング、変化した安定性、および変化したタンパク質分解による）、ならびに変化したタンパク質トラフィック・パターン（増加した核局在）による、および、例えば、基質の酵素加水分解増加におけるような、増加した機能活性による局所的過剰発現を示す。過剰発現は、また、正常細胞または比較細胞（例えば、BPH細胞）と比較して、50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上であり得る。

【0044】

「N - カドヘリンを発現する癌」および「N - カドヘリンの発現と関連する癌」なる用語は、互換的に、上記定義にしたがってN - カドヘリンを発現する癌細胞または組織を示す。

【0045】

「癌関連抗原」または「腫瘍特異的マーカー」または「腫瘍マーカー」なる用語は、互換的に、正常細胞と比較して、癌細胞において優先的に発現される分子（一般的に、タンパク質、炭水化物または脂質）を示し、これは、癌細胞に対する薬理学的物質の優先的標的化のために有用である。マーカーまたは抗原は、細胞表面上で、または細胞内に発現させることができる。しばしば、癌関連抗原は、正常細胞と比較して、癌細胞において最小分解で、例えば、正常細胞と比較して2倍発現、3倍発現またはそれ以上で発現されるか、または安定化している分子である。しばしば、癌関連抗原は、癌細胞において不適当に合成される分子、例えば、正常細胞上で発現される分子と比較して、欠失、付加または変異を含む分子である。しばしば、癌関連抗原は、もっぱら癌細胞において発現され、正常細胞において合成または発現されない。典型的な細胞表面腫瘍マーカーは、乳癌に対してタンパク質c - erbB - 2およびヒト上皮細胞増殖因子受容体（HER）、前立腺癌に対してPSMA、ならびに乳房、卵巣および結腸直腸を含む多数の癌において炭水化物ムチンを含む。典型的な細胞内腫瘍マーカーは、例えば、変異した腫瘍抑制遺伝子または細胞周期タンパク質、例えば、p53を含む。

【0046】

E - カドヘリンは、浸潤性になる可能性、転移する可能性、またはアンドロゲン非依存性もしくはは処置難治性癌へ進行する可能性のある癌患者由来の組織サンプルにおける癌性組織サンプルにおいて、逆に一般的に過少発現である(underexpress)。この過少発現は、

10

20

30

40

50

2 倍、3 倍、4 倍または少なくとも 5 倍であり得る。このような違いは、試験およびコントロールサンプルでほぼ同様に負荷されたゲルのバンドを見たとき、容易に明らかにされ得る。したがって、浸潤性になる可能性、転移する可能性、またはアンドロゲン非依存性もしくは処置難治性癌へ進行する可能性のある癌における組み合わせた N - カドヘリン / E - カドヘリン値は、さらに高く、少なくとも 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍または 20 倍高い。原発性腫瘍における N - カドヘリン陽性細胞の少ない割合が、再発および転移の高い危険性を有する腫瘍を同定し得る可能性があるため、種々のカットオフは N - カドヘリン陽性 / e - カドヘリン陰性と関連がある。

【0047】

「アゴニスト」は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合し、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または発現を刺激するか、増加するか、活性化するか、促進するか、活性化を増強するか、増感するか、または上方調節する物質を示す。

10

【0048】

「アンタゴニスト」は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を阻害するか、またはそれらに結合し、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を部分的または全体的に刺激を阻止するか、減少するか、防止するか、活性化を遅延するか、不活性化するか、鈍感にするか、または下方調節する物質を示す。

【0049】

発現または活性の「阻害剤」、「活性剤」および「調節剤」は、それぞれ、発現または活性に関してインビトロおよびインビボアッセイを使用して同定される阻害、活性化、または調節分子、例えば、リガンド、アゴニスト、アンタゴニストならびにそれらの相同体および模擬体を示すために使用される。「調節剤」なる用語は、阻害剤および活性剤を含む。阻害剤は、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を阻害するか、または結合して、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を部分的または全体的に刺激または酵素活性を阻止するか、減少するか、防止するか、活性化を遅延するか、不活性化するか、鈍感にするか、または下方調節する物質、例えば、アンタゴニストを示す。活性剤は、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現を誘導するか、もしくは活性化するか、または結合して、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性または発現を刺激するか、増加するか、開くか、活性化するか、促進するか、活性化または酵素活性を増強するか、増感するか、または上方調節する物質、例えば、アゴニストを示す。調節剤は、天然および合成リガンド、アンタゴニスト、アゴニスト、小化学分子などを含む。阻害剤および活性剤を同定するためのアッセイは、例えば、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの存在または非存在下で細胞に推定調節化合物を与え、次に本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチド活性における機能効果を測定することを含む。可能性のある活性剤、阻害剤または調節剤で処理される本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含むサンプルまたはアッセイは、効果の程度を試験するために、阻害剤、活性剤または調節剤なしのコントロールサンプルと比較する。コントロールサンプル（調節剤で未処理）は、100%の相対活性値を割り当てる。阻害は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性値が、コントロールと比較して、約80%、所望により50%または25 - 1%であるとき、達成される。活性化は、本発明のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性値が、コントロールと比較して、110%、所望により150%、所望により200 - 500%または1000 - 3000%以上であるとき、達成される。

20

30

40

【0050】

本明細書において使用される「試験化合物」または「薬剤候補」または「調節剤」または文法的な同等物なる用語は、天然または合成のいずれかのあらゆる分子、例えば、タンパク質、オリゴペプチド（例えば、約5から約25アミノ酸長、好ましくは約10から20または12から18アミノ酸長、好ましくは12、15または18アミノ酸長）、有機小分子、多糖類、脂質、脂肪酸、ポリヌクレオチド、RNAi、siRNA、抗体、オリ

50

ゴヌクレオチドなどを表す。試験化合物は、十分な範囲の多様性を提供する試験化合物のライブラリー、例えば、コンビナトリアルまたはランダムライブラリーの形態であり得る。試験化合物は、所望により、融合パートナー、例えば、標的化合物、レスキュー(rescue)化合物、二量化化合物、安定化化合物、アドレス可能な化合物および他の官能基に結合させる。通常、有用な特性を有する新規化学物質は、例えば活性を阻害する、いくつかの所望の特性または活性を有する試験化合物(「リード(lead)化合物」と呼ばれる)を同定し、リード化合物の変異体を創造し、これらの変異体化合物の特性および活性を評価することにより生産される。しばしば、ハイスループット・スクリーニング(HTS)方法が、このような分析のために使用される。

【0051】

「有機小分子」は、約50ダルトンを越え約2500ダルトン未満、好ましくは約2000ダルトン未満、好ましくは約100から約1000ダルトン、さらに好ましくは約200から約500ダルトンの分子量を有する、天然または合成のいずれかの有機分子を示す。

【0052】

細胞毒性剤は、「細胞周期特異的」または「抗有糸分裂」または「細胞骨格-相互作用」薬剤を含む。これらの用語は、互換的に、有糸分裂において細胞を阻止するあらゆる薬理的物質を示す。このような薬剤は化学療法に有用である。一般的に、細胞周期特異的薬剤は、細胞骨格タンパク質チューブリンに結合し、チューブリンが微小管に重合する能力を阻止し、中期で細胞分裂の停止をもたらす。典型的な細胞周期特異的薬剤は、ビンカアルカロイド、タキサン類、コルヒチンおよびポドフィロトキシンを含む。典型的なビンカアルカロイドは、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンおよびビノレルビンを含む。典型的なタキサン類は、パクリタキセルおよびドセタキセルを含む。細胞骨格相互作用剤の他の例は、2-メトキシエストラジオールを含む。

【0053】

「siRNA」または「RNAi」は、siRNAが遺伝子または標的遺伝子と同じ細胞中で発現したとき、二本鎖RNAが遺伝子または標的遺伝子の発現を減少させるか、または阻害する能力を有する、二本鎖RNAを形成する核酸を示す。したがって、「siRNA」または「RNAi」は、相補鎖により形成される二本鎖RNAを示す。二本鎖分子を形成するためにハイブリダイズするsiRNAの相補部分は、一般的に、実質的または完全同一性を有する。1つの態様において、siRNAは、標的遺伝子と実質的または完全同一性を有し、二本鎖siRNAを形成する核酸を示す。一般的に、siRNAは、少なくとも約15-50ヌクレオチド長である(例えば、二本鎖siRNAのそれぞれの相補配列は、15-50ヌクレオチド長であり、二本鎖siRNAは、約15-50塩基対長、好ましくは約20-30塩基ヌクレオチド、好ましくは約20-25または約24-29ヌクレオチド長、例えば、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチド長である)。

【0054】

siRNA分子およびベクターの設計および作製は、当業者によく知られている。例えば、適当なsiRNAを設計するための有効なプロセスは、mRNA転写産物のAUG開始コドンで開始し(例えば、図5参照)、AAジヌクレオチド配列に対してスキャンすることである(Elbashirら、EMBO J 20: 6877-6888 (2001)、参照)。それぞれのAAおよび3'隣接ヌクレオチドは、siRNA標的部位の可能性がある。隣接部位配列の長さはsiRNAの長さを決定する。例えば、19個の隣接部位は、21ヌクレオチド長のsiRNAを与える。UUジヌクレオチド3'オーバーハングを有するsiRNAが、しばしば、非常に有効である。このアプローチは、また、ヘアピンsiRNAを転写するためにRNA pol IIIの使用が可能である。RNA pol IIIは、4-6個のヌクレオチドポリ(T)地域で転写を終了し、短ポリ(U)テイルを有するRNA分子を創造する。しかしながら、他の3'末端ジヌクレオチドオーバーハングを有するsiRNAは、また、有効にRNAiを誘導することができ、該配列は、経験的に選択され得る。選

10

20

30

40

50

択性に関して、他のコード配列と16 - 17個以上の隣接する塩基対の相同性を有する標的配列は、BLASTサーチ (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST、参照)を行うことにより回避することができる。

【0055】

s i R N Aは、直接投与することができ、またはR N A iを誘導するために使用することができる s i R N A 発現ベクターを、異なる設計基準で有することができる。ベクターは、短スペース配列により分離される2つの逆方向反復および転写を終わらせるために働くたくさんのTを有する末端を挿入することができる。発現されるR N A 転写産物は、短ヘアピン s i R N A に折りたたまれることが予期される。s i R N A 標的配列の選択、推定ヘアピンのステムをコードする逆方向反復の長さ、逆方向反復の順序、ヘアピンのループをコードするスペース配列の長さおよび組成物、ならびに5' - オーバーハングの存在または非存在は、変化することができる。s i R N A 発現カセットの好ましい順序は、センス鎖、短スペースおよびアンチセンス鎖である。これらの種々のステム長(例えば、15から30)を有するヘアピン s i R N A が適当であり得る。ヘアピン s i R N A のセンスおよびアンチセンス鎖に連結しているループの長さは、種々の長さ(例えば、3から9ヌクレオチドまたはそれ以上)を有し得る。ベクターは、s i R N A をコードするヌクレオチド配列に作動可能に連結したプロモーターおよび発現エンハンサーまたは他の調節エレメントを含み得る。「コントロール配列」なる表現は、特定の宿主生物において作動可能に連結したコード配列の発現のために必要であるD N A 配列を示す。原核生物に適当であるコントロール配列は、例えば、プロモーター、所望によりオペレーター配列およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが知られている。調節エレメントが応答性である外部要因を加えるか、または制御することにより、遺伝子の発現をオンまたはオフにすることを臨床医が可能にするように、これらの制御エレメントは設計され得る。

10

20

【0056】

所望の治療遺伝子コードおよびコントロール配列を含む適当なベクターの構築は、当該分野でよく知られている標準ライゲーションおよび制限技術を使用する(Maniatisら., *in* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)、参照)。単離されたプラスミド、D N A 配列または合成オリゴヌクレオチドは、開裂され、調整され、所望の形態に再結合される。

30

【0057】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係に置かれているとき、「作動可能に連結した」である。例えば、ポリペプチドの分泌に係するプレタンパク質として発現されるとき、プレ配列または分泌リーダーに対するD N A は、ポリペプチドに対するD N A に作動可能に連結しており、配列の転写に影響するとき、プロモーターまたはエンハンサーは、コード配列に作動可能に連結しており、または、翻訳を促進するように位置しているとき、リボソーム結合部位は、コード配列に作動可能に連結している。一般的に、「作動可能に連結した」は、連結されているD N A 配列が互いに近く、分泌リーダーの場合、隣接しており、リーディング相にあることを意味する。しかしながら、エンハンサーは隣接していなくてもよい。連結は、便利な制限酵素認識部位でライゲーションにより達成される。このような部位が存在しないとき、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを慣用の形式にしたがって使用する。

40

【0058】

「機能効果を測定すること」は、間接的または直接的に本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチドの影響下でパラメーターを増加または減少させる化合物についてアッセイすること、例えば、物理化学的または表現型効果を測定することを示す。このような機能効果は、当業者に知られている任意の手段、例えば、タンパク質に対する分光学的(例えば、蛍光、吸光度、屈折率)、流体力学的(例えば、形)、クロマトグラフまたは溶解度特性の変化、タンパク質の誘導マーカーまたは転写活性化を測定すること、結合活性または結合アッセイ、例えば、抗体への結合を測定すること、リガンド結合親和性における変

50

化を測定すること、カルシウム流入の測定、本発明のポリペプチドの酵素生成物の蓄積または基質の枯渇の測定、酵素活性、例えば、キナーゼ活性における変化、本発明のポリペプチドのタンパク質レベルにおける変化の測定、RNA安定性の測定、G-タンパク質結合、GPCRリン酸化または脱リン酸化、シグナル変換、例えば、受容体-リガンド相互作用、セカンド・メッセンジャー濃度（例えば、cAMP、IP3または細胞内Ca²⁺）、例えば、化学発光、蛍光、比色反応、抗体結合、誘導マーカーおよびリガンド結合アッセイを介する、下流またはレポーター遺伝子発現の同定（CAT、ルシフェラーゼ、-gal、GFPなど）により測定することができる。

【0059】

可能性のある活性剤、阻害剤または調節剤で処理される本明細書に記載されている核酸またはタンパク質を含むサンプルまたはアッセイは、阻害の程度を試験するために、阻害剤、活性剤または調節剤なしのコントロールサンプルと比較する。コントロールサンプル（阻害剤で未処理）は、100%の相対タンパク質活性値を割り当てる。阻害は、活性値が、コントロールと比較して、約80%、好ましくは50%、さらに好ましくは25-0%であるとき、達成される。活性化は、活性値が、コントロール（活性剤で未処理）と比較して、110%、さらに好ましくは150%、さらに好ましくは200-500%（すなわち、コントロールと比較して、2から5倍高い）、さらに好ましくは1000-3000%以上であるとき、達成される。

【0060】

「生物学的サンプル」は、組織学的目的のために採取した組織切片、例えば、生検および解剖検体、および凍結切片を含む。このようなサンプルは、血液および血液分画または産物（例えば、血清、血漿、血小板、赤血球など）、唾液、組織、培養細胞、例えば、初代培養物、移植片、および形質転換細胞、ふん便、尿などを含む。生物学的サンプルは、一般的に、真核生物、より好ましくは哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、チンパンジーまたはヒト、ウシ、イヌ、ネコ、齧歯動物、例えば、モルモット、ラット、マウス、ウサギ、または鳥類、は虫類、または魚類から得られる。

【0061】

「生検」は、診断または予後評価のための組織サンプルを取り出すプロセス、および組織標本自体を示す。当該分野で知られているあらゆる生検技術を、本発明の診断および予後診断方法に適用することができる。適用される生検技術は、数ある因子のなかでも、評価される組織型（すなわち、前立腺、リンパ節、肝臓、骨髄、血球）、腫瘍のサイズおよび型（すなわち、固形または懸濁（すなわち、血液または腹水））に依存する。典型的な生検技術は、切除生検、切開生検、針生検、外科生検および骨髄生検を含む。「切除生検」は、周囲のほんのわずかの正常組織と共に全腫瘍塊を取り出すことを示す。「切開生検」は、腫瘍の断面直径を含むくさび形の組織の取り出しを示す。内視鏡検査または蛍光透視法により行われる診断または予後診断は、腫瘍塊の「コア針生検」または一般的に腫瘍塊内から細胞懸濁を得る「細針吸引生検」を必要とし得る。生検技術は、例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasperら編、第16版、2005, Chapter 70, およびPart Vに記載されている。

【0062】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列との関係において、「同一」または「同一性」なる用語は、下記のデフォルトパラメーターを用いるBLASTまたはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを使用して、または手動アラインメントおよび目視検査により測定される場合（例えば、NCBIウェブサイト <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> など参照）、同一の2つ以上の配列または部分配列、または同じアミノ酸残基またはヌクレオチドを特定のパーセント有する2つ以上の配列または部分配列（すなわち、比較ウィンドウまたは指定領域にわたって最大に対応するように比較およびアラインした場合に、特定の領域にわたって、約60%同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の同一性）を示す。次に、このような配列は、「実質的に同一」である

10

20

30

40

50

と言う。この定義は、また、試験配列について示すか、または適用され得る。該定義は、また、欠失および/または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列を含む。以下に記載されているとおり、好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを説明することができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約 25 アミノ酸またはヌクレオチド長である領域にわたって、さらに好ましくは 50 - 100 アミノ酸またはヌクレオチド長である領域にわたって存在する。

【0063】

配列比較のために、一般的に 1 つの配列が参照配列として作用し、それに対して試験配列を比較する。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験および参照配列をコンピュータに入力し、必要ならば、部分座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメータを指定する。好ましくは、デフォルトプログラムパラメータを使用できるか、または代替のパラメータを指定することができる。次に、配列比較アルゴリズムが、プログラムパラメータに基づいて、参照配列と比較した試験配列に対する配列同一性パーセントを計算する。

10

【0064】

本明細書において使用される「比較ウィンドウ」は、2 つの配列を最適にアラインした後、1 つの配列が同数の連続位置の参照配列と比較され得る、20 から 600、通常、約 50 から約 200、さらに通常、約 100 から約 150 からなる群から選択される連続位置の数のいずれか 1 つのセグメントに対する言及を含む。比較のための配列のアラインメントの方法は、当該分野でよく知られている。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) の局所的相同性アルゴリズム、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) の相同性アラインメントアルゴリズム、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988) の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピューターでの手段 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI の G A P、B E S T F I T、F A S T A および T F A S T A)、または手動アラインメントおよび目視検査 (例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel ら., eds. 1995 supplement)、参照) により行うことができる。

20

【0065】

配列同一性パーセントおよび配列類似性を決定するために適当なアルゴリズムの好ましい例は、B L A S T および B L A S T 2 . 0 アルゴリズムであり、これらはそれぞれ Altschul ら., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) および Altschul ら., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) に記載されている。本発明の核酸およびタンパク質に対する配列同一性パーセントを決定するために、B L A S T および B L A S T 2 . 0 を、本明細書に記載されているパラメータを用いて使用する。B L A S T 分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から公的に入手できる。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列中の同じ長さのワードとアラインしたとき、ある正の値の閾値スコア T とマッチするか、または満足させるいずれかである検索配列における長さ W の短いワードを同定することにより、高いスコアリング配列ペア (H S P) を同定することを含む。T は、近隣ワードスコア閾値 (Altschul ら., (上記) 参照) と呼ばれる。これらの最初の近隣ワードヒットが、それらを含むより長い H S P をを見つけるための検索を開始するための種として作用する。このワードヒットは、累積アラインメントスコアを増加することができる限り、それぞれの配列に沿って両方向に延長される。累積スコアは、核酸配列について、パラメータ M (マッチする残基のペアに対するリワードスコア (reward score)、常に > 0) および N (マッチしない残基に対するペナルティスコア (penalty score)、常に < 0) を使用して計算する。アミノ酸配列について、スコアリングマトリクスを使用して累積スコアを計算する。それぞれの方向でのワードのヒットの延長は、累積アラインメントスコアがその到達した最大値から数量 X まで低下したとき、累積スコアが 1 つ以上の負のスコアリング残基のアラインメントの累積によってゼロもしくはそれ以下になったとき、または、いずれかの配

30

40

50

列の末端に達したときに停止する。B L A S T アルゴリズムパラメーター W、T および X は、アラインメントの感度およびスピードを決定する。B L A S T N プログラム（核酸配列に対して）は、デフォルトとしてワード長（W）11、期待値（E）10、M = 5、N = -4 および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列について、B L A S T P プログラムは、デフォルトとしてワード長3 および期待値（E）10を、そして B L O S U M 6 2 スコアリング・マトリックス（Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)、参照）は、アラインメント（B）50、期待値（E）10、M = 5、N = -4、および両方の鎖の比較を使用する。

【0066】

「核酸」は、一もしくは二本鎖形態のいずれかにおけるデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドおよびそれらのポリマー、およびそれらの相補体を示す。該用語は、合成、天然または非天然であり、参照核酸と同様の結合特性を有し、参照ヌクレオチドと同様の方法において代謝される既知のヌクレオチド類似体または修飾された骨格残基もしくはは連結を含む核酸を包含する。このような類似体の例は、ホスホロチオエート、ホスホロアミダート、メチルホスホナート、キラル-メチルホスホナート、2-O-メチルリボヌクレオチド、ペプチド-核酸（PNA）を含むが、これらに限定されない。

【0067】

他に記載のない限り、特定の核酸配列は、また、それらの保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）および相補配列、ならびに明白に示されている配列を暗に含む。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択された（または全ての）コドンの第3の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生産することにより、達成され得る（Batzerら., Nucleic Res. 19:5081 (1991); Ohtsukaら., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossoliniら., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。核酸なる用語は、遺伝子、cDNA、mRNA、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドと互換的に使用される。

【0068】

特定の核酸配列は、また、「スプライス変異体」を暗に含む。同様に、核酸によってコードされる特定のタンパク質は、核酸のスプライス変異体によってコードされる任意のタンパク質を暗に含む。「スプライス変異体」は、その用語が示唆するように、遺伝子の選択的スプライシングの産物である。転写後、最初の核酸転写産物は、異なる（別の）核酸スプライス産物が異なるポリペプチドをコードするようにスプライスされ得る。スプライス変異体の生産のためのメカニズムは変化するが、エクソンの選択的スプライシングを含む。リードスルー（read-through）転写により同じ核酸に由来する別のポリペプチドもまた、この定義により包含される。スプライス産物の組換え形態を含むスプライシング反応の全ての産物が、この定義に含まれる。カリウムチャンネルスプライス変異体の例は、Leicherら., J. Biol. Chem. 273(52):35095-35101 (1998)に記載されている。

【0069】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」なる用語は、本明細書で互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを示す。該用語は、1個以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工化学模擬体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用する。

【0070】

「アミノ酸」なる用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様の様式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模擬体を示す。天然アミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるもの、ならびに後に修飾されたアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、-カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造を有する、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基に結合している炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを示す。このような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有する

10

20

30

40

50

が、天然アミノ酸と同じ基本的な化学構造を維持している。アミノ酸模擬体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様の様式で機能する化学化合物を示す。

【0071】

アミノ酸は、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨される、一般的に知られている3文字記号または1文字記号のいずれかにより、本明細書に記載され得る。同様に、ヌクレオチドも、一般的に受け入れられている1文字記号により記載され得る。

【0072】

「保存的に修飾された変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用する。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾された変異体は、同一または実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を示し、または核酸がアミノ酸配列をコードしていないとき、実質的に同一の配列を意味する。遺伝子コードの縮重のため、多くの機能的に同一の核酸が、任意の所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定される全ての位置で、そのコドンは、コードするポリペプチドを変化させることなく、記載されている対応するコドンのいずれかに変化させることができる。このような核酸変異は、保存的に修飾された変異の1種である「サイレント変異」である。ポリペプチドをコードする本明細書の全ての核酸配列は、また、核酸の全ての可能なサイレント変異を意味する。当業者は、核酸のそれぞれのコドン（通常メチオニンのための唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンのための唯一のコドンであるTGGを除く）を、機能的に同一の分子を得るために修飾することができることを理解している。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のそれぞれのサイレント変異は、実際のプローブ配列に対してではなく、発現産物に対して、それぞれの記載されている配列に潜在している。

【0073】

アミノ酸配列について、当業者は、コードされた配列中の1つのアミノ酸または数パーセントのアミノ酸を変化、付加または欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加が「保存的に修飾された変異体」であることを理解している（ここで、該変化は化学的に類似のアミノ酸でのアミノ酸の置換をもたらす）。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当該分野でよく知られている。このような保存的に修飾された変異体は、さらに、本発明の多型変異体、種間相同体および対立遺伝子を除外しない。

【0074】

下記8個のグループは、それぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含む。1) アラニン(A)、グリシン(G)、2) アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、3) アスパラギン(N)、グルタミン(Q)、4) アルギニン(R)、リジン(K)、5) イソロイシン(I)、ロイシン(L)、メチオニン(M)、バリン(V)、6) フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)、7) セリン(S)、スレオニン(T)、および8) システイン(C)、メチオニン(M)（例えば、Creighton, Proteins (1984)、参照）。

【0075】

「標識」または「検出可能部分」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的または他の物理的手段により検出可能な組成物である。例えば、有用な標識は、³²P、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、一般的にELISAにおいて使用されるもの）、ビオチン、ジゴキシゲニンまたはハプテンおよび、例えば、放射性標識をペプチドに組み込むことにより検出可能にできるか、またはペプチドと特異的に反応性である抗体を検出するために使用できるタンパク質を含む。

【0076】

「組換え」なる用語は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関して使用されるとき、該細胞、核酸、タンパク質またはベクターが異種核酸もしくはタン

10

20

30

40

50

パク質の導入または天然核酸もしくはタンパク質の変化により修飾されているか、または該細胞がそのように修飾された細胞由来であることを示す。したがって、例えば、組換え細胞は、細胞の天然（非組換え）形態内で見出されない遺伝子を発現するか、または天然遺伝子を発現しても異常に発現するか、もしくは全く発現しない。

【0077】

「異種」なる用語は、核酸の部分に関して使用されるとき、核酸が本来は互いに同じ関係において見出されない2つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、一般的に、新規機能性核酸を作るために配置された関係のない遺伝子由来の2つ以上の配列、例えば、1つの起源由来のプロモーターおよび別の起源由来のコード領域を有する核酸が、組換え的に生産される。同様に、異種タンパク質は、タンパク質が本来は互いに同じ関係において見出されない2つ以上の部分配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

10

【0078】

「ストリンジェントハイブリダイゼーション条件」なる用語は、プローブが、一般的に核酸の複合混合物中で、その標的部分配列にハイブリダイズするが、他の配列にハイブリダイズしない条件を示す。ストリンジェント条件は配列依存性であり、異なる状況において異なる。より長い配列は、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションのための大規模なガイドは、Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of Hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993)において見出される。一般的に、ストリンジェント条件は、規定のイオン強度pHにて特定の配列に対する熱融点（ T_m ）より約5 - 10 低く選択される。 T_m は、標的に相補的なプローブの50%が平衡状態で標的配列にハイブリダイズする温度（規定のイオン強度、pHおよび核酸濃度下）である（標的配列が過剰に存在するとき、 T_m で、50%のプローブが平衡状態で占有される）。ストリンジェント条件は、また、脱安定化剤、例えば、ホルムアミドの添加で達成され得る。選択的または特異的ハイブリダイゼーションに関して、陽性シグナルは、バックグラウンドの少なくとも2倍、バックグラウンドの好ましくは10倍のハイブリダイゼーションである。典型的なストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、以下のとおりであり得る。50%のホルムアミド、5×SSCおよび1%のSDS、42 でインキュベーション、または5×SSC、1%のSDS、65 でインキュベーション、および65 で0.2×SSCおよび0.1%のSDSで洗浄。

20

30

【0079】

ストリンジェント条件下で互いにハイブリダイズしない核酸は、それらがコードするポリペプチドが実質的に同一であるとき、まだ実質的に同一である。これは、例えば、核酸のコピーが遺伝子コードで認められている最大コドン縮重を使用して創造されるとき、起こる。このような場合、核酸は、一般的に、中程度のストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。典型的な「中程度のストリンジェントハイブリダイゼーション条件」は、40%のホルムアミド、1MのNaCl、1%のSDSのバッファー中で37 でハイブリダイゼーション、および1×SSC中で45 での洗浄を含む。陽性ハイブリダイゼーションは、バックグラウンドの少なくとも2倍である。当業者は、代替りのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を、同様のストリンジェンシーの条件を提供するために利用できることを容易に理解している。ハイブリダイゼーションパラメータを決定するためのさらなるガイドラインは、多数の文献、例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubelら., John Wiley & Sonsにおいて提供される。

40

【0080】

PCRに関して、約36 の温度が低ストリンジェンシー増幅のために典型的であるが、アニーリング温度は、プライマー長に依存して約32 から48 の間で変化し得る。高ストリンジェンシーPCR増幅に関して、約62 の温度が典型的であるが、高ストリンジェンシーアニーリング温度は、プライマー長および特異性に依存して約50 から約65 で変化し得る。高および低ストリンジェンシー増幅の両方のために典型的なサイクル条件は、変性期90 - 95 で30秒 - 2分、アニーリング期30秒 - 2分持続、お

50

よび伸長期約 72 で 1 - 2 分を含む。低および高ストリンジェンシー増幅反応のためのプロトコールおよびガイドラインは、例えば、Innisら. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y. で提供される。

【0081】

「抗体」は、抗原に特異的に結合し、認識する免疫グロブリン遺伝子由来のフレームワーク領域を含むポリペプチドまたはそのフラグメントを示す。認識されている免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、エプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタまたはエプシロンとして分類され、これらは順に、それぞれ、免疫グロブリンクラス、I g G、I g M、I g A、I g D および I g E を定義する。一般的に、抗体の抗原結合領域は、結合の特異性および親和性において非常に重要である。

10

【0082】

典型的な免疫グロブリン（抗体）の構造単位は、テトラマーを含む。それぞれのテトラマーは、それぞれの対が 1 つの「軽」（約 25 kD）および 1 つの「重」鎖（約 50 - 70 kD）を有する 2 つの同一の対のポリペプチド鎖からなる。それぞれの鎖の N - 末端は、主に抗原認識を担う約 100 から 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定義する。可変軽鎖（V_L）および可変重鎖（V_H）なる用語は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖を示す。

【0083】

20

抗体は、例えば、無傷の免疫グロブリンまたは種々のペプチダーゼでの消化により生産される多くの十分に特徴付けられた断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合より下流で抗体を消化し、それ自体、ジスルフィド結合により V_H - C_H 1 に結合した軽鎖である F a b のダイマーである F (a b) ' ₂ を生産する。F (a b) ' ₂ は、穏やかな条件下で還元されて、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊し、それにより、F (a b) ' ₂ ダイマーを F a b ' モノマーに変換し得る。F a b ' モノマーは、本質的にヒンジ領域の一部を有する F a b である (Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993) 参照)。種々の抗体フラグメントが無傷抗体の消化に関して定義されているが、当業者は、このようなフラグメントが化学的に、または組換え DNA 方法論を使用することによりデノボ合成され得ることを理解している。したがって、本明細書において使用される抗体なる用語は、また、全抗体の修飾により生産された抗体フラグメント、または組換え DNA 方法論を使用してデノボ合成されたもの（例えば、一本鎖 F v ）、またはファージディスプレイライブラリーを使用して同定されたものを含む（例えば、McCaffertyら., Nature 348:552-554 (1990)、参照）。

30

【0084】

本発明の適当な抗体の製造および本発明による、例えば、組換え、モノクローナルまたはポリクローナル抗体の使用のために、当該分野で知られている多数の技術を使用することができる（例えば、Kohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975); Kozborら., Immunology Today 4: 72 (1983); Coleら., pp. 77-96 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988); および Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (2d ed. 1986)、参照）。興味ある抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を細胞からクローニングすることができ、例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、組換えモノクローナル抗体を生産するために使用することができる。モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子ライブラリーも、ハイブリドーマまたは血漿細胞から作成することができる。重鎖および軽鎖遺伝子産物のランダムな組合せは、異なる抗原特異性を有する抗体の大きなプールを生産する（例えば、Kuby, Immunology (3rd ed. 1997)、参照）。一本鎖抗体または組換え抗体の生産のための技術（米国特許第 4, 946, 778 号、米国特許第 4, 816, 567 号）を、本発明のポリペプチドに対する抗体を生産する

40

50

ために適応させることができる。また、トランスジェニックマウス、または他の生物、例えば、他の哺乳動物をヒト化またはヒト抗体を発現させるために使用し得る（例えば、米国特許第 5,545,807 号；第 5,545,806 号；第 5,569,825 号；第 5,625,126 号；第 5,633,425 号；第 5,661,016 号、Marks ら., *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg ら., *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild ら., *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); および Lonberg & Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)、参照）。あるいは、ファージディスプレイ技術を、選択された抗原に特異的に結合する抗体およびヘテロマー Fab フラグメントを同定するために使用することができる（例えば、McCafferty ら., *Nature* 348:552-554 (1990); Marks ら., *Biotechnology* 10:779-783 (1992)、参照）。抗体は、また、二重特異性、すなわち、2 つの異なる抗原を認識することができるように作成することができる（例えば、WO 93/08829、Traunecker ら., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); および Suresh ら., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)、参照）。抗体は、また、ヘテロ接合体、例えば、共有結合した 2 つの抗体、または免疫毒素（例えば、米国特許第 4,676,980 号、WO 91/00360; WO 92/200373; および EP 03089、参照）であることもできる。

10

【0085】

非ヒト抗体をヒト化または霊長類化(primatizing)する方法は、当該分野でよく知られている。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から導入される 1 個以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、一般的に輸入(import)可変ドメインから得られる輸入残基と称される。ヒト化は、本質的に、Winter らの方法（例えば、Jones ら., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann ら., *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen ら., *Science* 239:1534-1536 (1988) および Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)、参照）にしたがって、齧歯動物 CDR をヒト抗体の対応する配列の代わりに用いることにより行うことができる。したがって、このようなヒト化抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に小さいなものが非ヒト種由来の対応する配列により置換されているキメラ抗体（米国特許第 4,816,567 号）である。実際には、ヒト化抗体は、一般的に、いくつかの CDR 残基および恐らくいくつかの FR 残基が齧歯動物抗体の類似部位由来の残基により置換されているヒト抗体である。

20

30

【0086】

「キメラ抗体」は、(a) 抗原結合部位(可変領域)が、異なる、もしくは変化したクラス、エフェクター機能および/もしくは種の定常領域、またはキメラ抗体に新規特性を与える全く異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、増殖因子、薬剤などに連結するように、定常領域またはその部分が変化しているか、置換されているか、または交換されている、または(b)可変領域またはその部分が、異なる、もしくは変化した抗原特異性を有する可変領域で変化しているか、置換されているか、もしくは交換されている、抗体分子である。本発明の好ましい抗体および本発明の使用のための好ましい抗体は、ヒト化および/またはキメラモノクローナル抗体を含む。

【0087】

1 つの態様において、抗体は、「エフェクター」部分に接合する。エフェクター部分は、標識部分、例えば、放射性標識または蛍光標識を含む多数の分子であり得るか、または治療部分であり得る。1 つの局面において、抗体は、タンパク質の活性を調節する。このようなエフェクター部分は、抗腫瘍剤、毒素、放射性医薬品、サイトカイン、二次抗体または酵素を含むが、これらに限定されない。さらに、本発明は、本発明の抗体がプロドラッグを細胞毒性剤に変換する酵素に連結している態様を提供する。

40

【0088】

免疫抱合体を、エフェクター部分を N - カドヘリン陽性細胞、特に、N - カドヘリンまたは Ly 6 タンパク質を発現する細胞に標的化するために使用することができる。このような違いは、試験およびコントロールサンプルでほぼ同様に負荷されたゲルのバンドを見

50

たとき、容易に明らかにできる。細胞毒性剤の例は、リシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノプシド(tenoposide)、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラセンジオン、アクチノマイシンD、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素(PE)A、PE40、アブリンおよびグルココルチコイドおよび他の化学療法剤、ならびに放射性同位体を含むが、これらに限定されない。適当な検出可能マーカーは、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素を含むが、これらに限定されない。

【0089】

いくつかの態様において、本発明は、N-カドヘリンに対する抗体を提供する。N-カドヘリン抗体は、癌(例えば、前立腺または膀胱癌)を処置するために、単独で、またはエフェクター部分と接合して全身的に使用され得る。毒物、例えば、リシンと接合させたN-カドヘリン抗体、ならびに非接合抗体は、N-カドヘリン含有前立腺癌細胞に自然に標的化される有用な治療剤であり得る。このような抗体は、浸潤の阻止において有用であり得る。本発明の使用のための適当なN-カドヘリン抗体は、GC4、1H7、1F12、2B3を含むが、これらに限定されない。

【0090】

さらに、本発明のモノクローナル抗体のいずれかの抗原結合領域を含む本発明の組換えタンパク質は、癌を処置するために使用することができる。このような条件において、組換えタンパク質の抗原結合領域は、治療活性を有する第2のタンパク質の少なくとも機能的に活性な部分に結合される。第2のタンパク質は、酵素、リンホカイン、オンコスタチンまたは毒素を含むことができるが、これらに限定されない。適当な毒素は、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノプシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラセンジオン、アクチノマイシンD、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素(PE)A、PE40、リシン、アブリン、グルココルチコイドおよび放射性同位体を含む。

【0091】

抗体に治療剤を接合するための技術は、よく知られている(例えば、Arnonら., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeldら. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstromら., "Antibodies For Drug Delivery" in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinsonら. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pincheraら. (eds.), pp. 475-506 (1985);およびThorpeら., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)、参照)。

【0092】

タンパク質またはペプチドに言及する場合、抗体に「特異的に(または選択的に)結合する」、または「特異的に(または選択的に)免疫反応性」なるフレーズは、しばしばタンパク質および他の生物学的物質の不均一な集団中で、そのタンパク質の存在を決定する結合反応を示す。したがって、指定された免疫測定法条件下で、特定の抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、より一般的にバックグラウンドの10から100倍以上で特定のタンパク質に結合する。このような条件下での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質に対する特異性に関して選択される抗体を必要とする。例えば、ポリクローナル抗体は、選択された抗原と特異的に免疫反応性であり、他のタンパク質と特異的に免疫反応性ではないポリクローナル抗体のみを得るように、選択することができる。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を減ずることにより達成され得る。種々の免疫測定法形式が、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISA免疫測定法は、タンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために日常的に使用される(特異的な免疫反応を測定するために使用することができる免疫測定法フォーマットおよび条件の記載に関して、例えば、Harlow & Lane, Using Ant

ibodies, A Laboratory Manual (1998) 参照)。

【0093】

本明細書における「治療有効用量または量」は、投与する目的の効果を生じる用量を意味する。正確な用量および処方、処置の目的に依存し、既知の技術を使用して当業者により確かめることができる(例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Gennaro, Editor (2003)およびPickar, Dosage Calculations (1999)参照)。

【0094】

「薬学的に許容される塩」または「薬学的に許容される担体」なる用語は、本明細書に記載されている化合物に見出される特定の置換基に依存して、比較的に非毒性の酸または塩基で製造される活性化合物の塩を含むことを意味する。本発明の化合物が比較的に酸性の官能基を含むとき、塩基付加塩は、溶媒を用いずに、または適当な不活性溶媒中で、このような化合物の中性型を十分な量の所望の塩基と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容される塩基付加塩の例は、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アンモニウム、有機アミノまたはマグネシウム塩または同様の塩を含む。本発明の化合物が比較的に塩基性の官能基を含むとき、酸付加塩は、溶媒を用いずに、または適当な不活性溶媒中で、このような化合物の中性型を十分な量の所望の酸と接触させることにより得ることができる。薬学的に許容される酸付加塩の例は、塩酸、臭化水素酸、硝酸、炭酸、炭酸一水素酸、リン酸、リン酸一水素酸、リン酸二水素酸、硫酸、硫酸一水素酸、ヨウ化水素酸または亜リン酸などのような無機酸由来の塩、ならびに酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、マレイン酸、マロン酸、安息香酸、コハク酸、スベリン酸、フマル酸、乳酸、マンデル酸、フタル酸、ベンゼンスルホン酸、p-トリルスルホン酸、クエン酸、酒石酸、メタンスルホン酸などのような比較的に非毒性の有機酸由来の塩を含む。アルギネート(arginate)などのようなアミノ酸の塩、ならびにグルクロン酸またはガラクトン酸(galactunoric acid)などのような有機酸の塩も含む(例えば、Bergeら., Journal of Pharmaceutical Science 66:1-19 (1977)参照)。本発明の特定の化合物は、化合物を塩基または酸付加塩のいずれかに変換することが可能な塩基性および酸性官能基の両方を含む。当業者に知られている他の薬学的に許容される担体は、本発明に適當である。

【0095】

化合物の中性型は、慣用の方法において、塩を塩基または酸と接触させ、親化合物を単離することにより再生され得る。化合物の親形態は、特定の物理的特性、例えば、極性溶媒中の溶解度において種々の塩形態と異なるが、それ以外は、該塩は、本発明の目的のための化合物の親形態と同等である。

【0096】

塩形態に加えて、本発明は、プロドラッグ形態である化合物を提供する。本明細書に記載されている化合物のプロドラッグは、生理学的条件下で容易に化学変化して、本発明の化合物を提供する化合物である。さらに、プロドラッグは、エキソピボ環境下で化学的または生化学的方法により本発明の化合物に変換され得る。例えば、プロドラッグは、適当な酵素または化学試薬と共に経皮的パッチリザーバー中に置かれたとき、本発明の化合物にゆっくり変換され得る。

【0097】

本発明の特定の化合物は、非溶媒和物形態ならびに水和物形態を含む溶媒和物形態で存在することができる。一般的に、溶媒和物形態は、非溶媒和物形態と同等であり、本発明の範囲内に包含されることを意図される。本発明の特定の化合物は、多結晶または非結晶形態で存在し得る。一般的に、全ての物理的形態は、本発明により考えられる使用のための同等であり、本発明の範囲内であると意図される。

【0098】

本発明の特定の化合物は、不斉炭素原子(光学中心)または二重結合を有する。ラセミ体、ジアステレオマー、幾何異性体および個々の異性体は、全て、本発明の範囲内に包含

10

20

30

40

50

されることを意図される。

【0099】

上皮間葉転換 (EMT) は、上皮性腫瘍細胞による間質特性の獲得を示す。癌において、EMT は、浸潤性および運動性行動と関連し、転移の基礎を成す中心プロセスであり得る。EMT は、予後不良と関連し、多重転写因子、例えば、SNAI1、SLUG および TWIST が介在する。

E - カドヘリンは、浸潤性および転移性固形腫瘍において一般的に喪失している上皮性細胞間接着と関連する細胞表面タンパク質である。

【0100】

詳細な態様

本発明は、癌患者を処置する方法を提供する。該方法は、一般的に、(a) N - カドヘリンタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体由来の試験組織サンプルを得て、(b) 癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおける N - カドヘリンタンパク質の存在もしくは非存在または量を測定し、それにより、N - カドヘリンタンパク質を発現する該癌を診断し、ここで、N - カドヘリンタンパク質は正常または低レベルで発現するか、または一部の細胞により発現し、過剰発現しない、および (c) 有効量の N - カドヘリン抗体を N - カドヘリンタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体に投与する工程を含む。一般的に、組織サンプルは血清であるが、生検由来の組織、特に前立腺組織または膀胱組織を含む泌尿生殖器組織でもあり得る。通常、該抗体はモノクローナル抗体である。癌を有さないことが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、より高いレベル、例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、4倍またはそれ以上の N - カドヘリンタンパク質が試験組織サンプル中で検出されるとき、N - カドヘリンタンパク質または mRNA 転写産物を発現する癌に対する陽性診断が示される。検出方法は、例えば、当該分野で知られている標準 ELSA 技術 (Gosling, Immunoassays: A Practical Approach, 2000, Oxford University Press に概説される) を使用して実施することができる。検出は、一次抗体または二次抗体を、例えば、放射性同位体、蛍光標識、酵素または当該分野で知られている他のあらゆる検出可能な標識で標識化することにより達成される。

【0101】

他の態様において、検出方法は、N - カドヘリンタンパク質または mRNA 転写産物を発現する患者由来の試験組織サンプルを、N - カドヘリン核酸にそれぞれ特異的にハイブリダイズする第1のオリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドのプライマーセットと接触させ、サンプルにおける N - カドヘリン核酸を増幅させ、N - カドヘリンタンパク質または mRNA 転写産物を発現する癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおける N - カドヘリン核酸の存在または非存在を決定することにより行うことができる。また、通常、組織サンプルは血清であるが、生検由来の組織、特に前立腺または膀胱組織を含む泌尿生殖器組織でもあり得る。癌を有さないことが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、より高いレベルの N - カドヘリン転写 RNA が試験組織サンプル中で検出されるとき、N - カドヘリンタンパク質または mRNA 転写産物を発現する癌に対する陽性診断が示される。

【0102】

該方法は、前立腺および膀胱癌の処置における特定の適用を見出す。1つの態様において、該方法は、ホルモン抵抗性または治療耐性癌に適用される。特定の態様において、該方法は、転移性癌に適用される。例えば、N - カドヘリンタンパク質および/または mRNA の差次的発現の比較を、N - カドヘリンタンパク質または mRNA 転写産物を発現する癌を有する個体の癌の段階を決定するために使用することができる。

【0103】

処置は、一般的に、許容される投与経路、例えば、静脈内注射 (IV) を介する抗 N -

10

20

30

40

50

カドヘリン抗体の有効用量での反復投与を含む。用量は、癌の型、および癌の重症度、グレードまたは段階、使用される薬剤の結合親和性および半減期、患者におけるN - カドヘリン発現の程度、循環性シェッド(shed) N - カドヘリン抗原の程度、所望の定常状態の抗体濃度レベル、処置の頻度ならびに本発明の処置方法と組み合わせて使用される化学療法剤の影響を含むが、これらに限定されない当業者により一般的に理解されている種々の因子に依存する。典型的な1日用量は、約0.1から100mg/kgの範囲であり得る。1週あたり10 - 500mgの範囲のmAbの用量が有効であり、耐容性良好であり得るが、より高い1週用量でさえ有効であり、および/または耐容性良好であり得る。適当な用量の定義における主な決定因子は、特定の状況において治療的に有効であるために必要な特定の薬剤の量である。反復投与が、腫瘍阻害または退縮を達成するために必要であり得る。最初の負荷用量がより高くてもよい。最初の負荷用量は注入として投与され得る。周期的な維持用量が同様に投与されてよく、但し、最初の用量は耐容性良好である。

10

【0104】

薬剤の直接投与も可能であり、特定の状況において利点を有し得る。例えば、膀胱癌腫の処置のために、薬剤は膀胱に直接注射され得る。膀胱に直接投与された薬剤は迅速に患者から排出されるため、抗原性の重大な合併症を伴うことなく、有効に非ヒトまたはキメラ抗体を使用することが可能であり得る。

【0105】

いくつかの態様において、本発明は、癌細胞の増殖を阻害するために有効な量で、N - カドヘリントタンパク質を認識し、結合する抗体またはそのフラグメントで対象を処置するか、または癌細胞と該抗体またはそのフラグメントとを接触させることにより、癌、特にN - カドヘリンを発現する癌を処置するか、またはN - カドヘリントタンパク質を発現する癌細胞の増殖を阻害する方法を提供する。いくつかの態様において、癌細胞は、前立腺癌細胞または膀胱癌細胞である。接触する抗体は、モノクローナル抗体および/またはキメラ抗体であり得る。いくつかの態様において、キメラ抗体は、ヒト免疫グロブリン定常領域を含む。いくつかの態様において、抗体は、ヒト抗体であるか、またはヒト免疫グロブリン定常領域を含む。さらなる態様において、抗体フラグメントは、Fab、F(ab)₂、またはFvを含む。他の態様において、フラグメントは、抗原結合領域を有する組換えタンパク質を含む。

20

【0106】

上記態様のいずれかにおいて、化学療法剤および/または放射線療法をさらに施すことができる。いくつかの態様において、患者は、また、ホルモンアンタゴニスト治療を受ける。抗体または抗体フラグメントと患者の接触は、患者の静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、腫瘍内に、または皮内に抗体を投与することにより可能である。いくつかの態様において、患者は、泌尿生殖器癌(例えば、膀胱癌、前立腺癌)を有する。上記のいくつかの態様において、患者は、前立腺癌に罹患しており、所望によりさらにホルモン除去治療を受ける。いくつかの態様において、接触は、癌または転移癌に直接、抗体を投与することを含む。

30

【0107】

いくつかの態様において、本発明は、癌患者を処置する方法を提供する。該方法は、一般的に、(a) N - カドヘリントタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体由来の試験組織サンプルを得て；(b) 癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおけるN - カドヘリントタンパク質の存在もしくは非存在または量を測定し；それにより、N - カドヘリントタンパク質を発現する癌を診断し、ここで、N - カドヘリントタンパク質は正常または低レベルで発現するか、または一部の細胞により発現し、過剰発現しない；(c) 癌が浸潤性、転移性、ホルモン非依存性または処置難治性になる可能性があるか否かを決定し；(d) 癌が浸潤性、転移性、ホルモン非依存性または処置難治性になる可能性が高いか否かにしたがって、化学療法剤、免疫療法剤、ホルモン治療または放射線治療を施すことを含む。

40

【0108】

50

いくつかの態様において、化学療法剤は、リシン、リシン A 鎖、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノブシド、ピンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラセンジオン、アクチノマイシン D、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素 (P E) A、P E 4 0、アブリン、アルブリン (arbrin) A 鎖、モデクシン A 鎖、アルファ - サルシン、ゲロニン (gelonin)、ミトゲリン (mitogellin)、レトストリクトシン (retstrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン、キュリシン (curicin)、クロチン、カリケアマイシン、サボナリア・オフィシナリス (sapaonaria officinalis) 阻害剤、マイタンシノイドおよびグルココルチコイド (glucocorticoidricin) からなる群から選択することができる。

【 0 1 0 9 】

本発明は、さらに、癌幹細胞を同定する方法を提供する。該方法は、一般的に、(a) N - カドヘリンタンパク質を発現する癌を有する危険性がある個体由来の試験組織サンプルを得て；(b) 癌に対して陰性であることが知られている個体由来のコントロール組織サンプルと比較して、試験組織サンプルにおける癌幹細胞の存在または非存在を決定し；ここで、N - カドヘリンタンパク質は正常または低レベルで発現するか、または幹細胞の一部により発現し、過剰発現しないことを含む。

【 0 1 1 0 】

いくつかの態様において、本発明は、以下のアミノ酸配列を含む、N - カドヘリンの細胞外ドメイン 4 に結合することができるモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。

配列番号 1 : M A Q V Q L V Q S G G G L A Q P G G S L R L S C A A S G F T F S R
H A M I W V R Q A P G K G L E W V S S I S G S S D S T S Y A D S V K G R F T I S
R D N S K N T L Y L Q M N T L R A E D T A V Y Y C A K A T G Y S Y Y Y G M D V W
G P G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S L
G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A T T L Q
H G V P S R F S G S G S G T D F S L T I S S L Q P E D F A I Y F C Q Q A H S F P
P T F G G G T K L E I K R

【 0 1 1 1 】

いくつかの態様において、本発明は、以下の群から選択されるアミノ酸配列を含む、N - カドヘリンの細胞外ドメイン 1 - 3 に結合することができるモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。

配列番号 2 : M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C Q A S G Y T F T S Y
Y I H W V R Q A P G Q G F E W M G I I N P S G G S A S Y A Q K F Q G R V T M T R
D T S T S T V Y M E L R S L R

配列番号 3 : M A Q V Q L Q E S G W Y F D L W G R G T P V T V S S G G G G S G G G
G S G G G G S E I V L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N D L
G W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L
T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q D Y N G W T F G Q G T K V E I K R

配列番号 4 : M A Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F S F S N Y
G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G R V K S Y A D A V K G R F T I S R
D N S E N I L Y V Q I D S L R V E D T A V Y Y C A R R G G D H A A G M D V W G Q
G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S
I T I S C T G G R S D I G G Y N Y V S W Y Q Q H P G K A P K L M I Y D V G N R P
S G V S N R F S G S K S G N T

配列番号 5 : M A P G A A G G V G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y
G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T X V Y Y C A R L E Y S S S S R A F D V W G
Q G T T V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S S E L T Q D P A V S V A L G Q T
V R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y G K N N R P S G I
P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R D S S G N H V

10

20

30

40

50

V F G G G T K L T V L G

配列番号 6 : M A Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F

配列番号 7 : M A Q V Q L V Q S G A E V K R P G A S V R I S C K A S G Y P F T T Y
P I H W V R Q A P G Q G L E W M G G I N P N S G A T K N V Q K F Q G R V T M T A
D T S I R T A Y M E L S R L T S D D T A V Y Y C A R G E G D T G S Y L G G Y W G
L G T L V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S S E L T Q D P A V S V A L G Q T
V R I T C Q G D S L R S Y Y A S W Y Q Q K P G R A P L L V I Y G K N I R P S G I
P D R F S G S S S G N S A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C N S R D R S G N Y L
F G V G T K V T V L G

配列番号 8 : M A Q V Q L V Q S G A E V K K P G E S L E I S C K G S G Y S F A N N
W I G W V R Q M P G K G L E W M G S I Y P G D S D V R Y S R S F Q G H V T I S A
D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R H R V A Y S G Y D A F D I W
G Q G T M V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S S V L T Q D P A V S V A L G Q
T V R I T C Q G D S L R S Y Y P S W Y Q Q K P G Q A P V L V I Y G K N N R P S G
I P D R F S G S S S G N T A S L T I T G A Q A E D E A D Y Y C H S R D R S G N Q
V L F G G G T K V T V L G

配列番号 9 : M A Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y
G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R
D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R V G G E G G V W G Q G T T V
T V S S G G G G S G G G G S G G G G S D I V M T Q S P S T L S A S

いくつかの態様において、本発明は、s c f vである、N - カドヘリンの細胞外ドメイン 1 - 3 または N - カドヘリンの細胞外ドメイン 4 に結合することができる抗体フラグメントを提供する。いくつかの態様において、本発明は、ダイアボディである、N - カドヘリンの細胞外ドメイン 1 - 3 または N - カドヘリンの細胞外ドメイン 4 に結合することができる抗体フラグメントを提供する。ダイアボディを生産するために、リンカー S G G G S G G G G S G G G G S を S G G G G S と置き換えた。

【 0 1 1 2 】

投与方法および製剤

抗 N - カドヘリン抗体または免疫抱合体は、既知の方法、例えば、静脈内投与にしたがって、例えば、ボラスとして、または一定期間にわたる連続的な注入により、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所的または吸入経路により、ヒト患者に投与される。該抗体の静脈内または皮下投与が好ましい。該投与は、局所的または全身的であってよい。

【 0 1 1 3 】

投与のための組成物は、一般的に、薬学的に許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された、本明細書に記載されている物質（例えば、N - カドヘリン阻害剤、N - カドヘリン抗体および免疫抱合体、N - カドヘリン s i R N A およびそのベクター）を含む。種々の水性担体、例えば、緩衝食塩水などを使用することができる。これらの溶液は、滅菌され、一般的に望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、慣用のよく知られている滅菌技術により滅菌され得る。該組成物は、適当な生理学的条件に必要な薬学的に許容される補助物質、例えば、p H 調節剤および緩衝剤、毒性調節剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含み得る。これらの製剤における活性剤の濃度は、広範に変化することができ、選択される特定の投与経路および患者の必要性にしたがって、主に液量、粘性、体重などに基づいて選択される。

【 0 1 1 4 】

したがって、静脈内投与のための典型的な医薬組成物は、該物質にしたがって変化し得る。非経口的に投与することができる組成物を製造するための実際の方法は、当業者に知られ明らかであり、より詳細には Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980) のような文献に記載されている。

10

20

30

40

50

【0115】

医薬組成物は、投与の方法に依存して種々の単位投与形態において投与することができる。例えば、経口投与に適当な単位投与形態は、粉末、錠剤、丸剤、カプセルおよびトローチ剤を含むが、これらに限定されない。経口的に投与されるとき、抗体は消化から保護されるべきであることが理解される。これは、一般的に、該分子を、酸および酵素加水分解に対する耐性を与える組成物と複合体化することによるか、または適当な耐性担体、例えば、リボソームまたは防護壁中に該分子をパッケージングすることによるかのいずれかで達成される。消化から薬剤を保護する方法は、よく当該分野で知られている。

【0116】

特に、本発明で使用するための抗体および免疫抱合体および阻害剤の医薬製剤は、所望の純度を有する抗体を任意の薬学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより製造することができる。このような製剤は、凍結乾燥製剤または水性溶液であり得る。許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される用量および濃度でレシピエントに非毒性である。許容される担体、賦形剤または安定剤は、酢酸塩、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸塩、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、防腐剤、低分子量ポリペプチド、タンパク質、例えば、血清アルブミンまたはゼラチン、または親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン、およびアミノ酸、単糖類、二糖類および他の炭水化物、例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン、キレート剤、および、イオンおよび非イオン界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、および/または非イオン界面活性剤であり得る。該抗体は、0.5 - 200 mg/ml、または10 - 50 mg/mlの濃度で製剤化され得る。

【0117】

該製剤は、また、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、増殖阻害剤および抗ホルモン剤を含むさらなる活性化合物を提供し得る。該活性成分は、また、持続放出製剤（例えば、固体疎水性ポリマー（例えば、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチドの半透過性マトリックスとして製造され得る。該抗体および免疫抱合体は、また、例えば、コアセルベーション技術または界面重合化により製造されるマイクロカプセル、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル各々により、コロイド薬剤送達系（例えば、リボソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンに包含され得る。

【0118】

組成物は、治療または予防処置のために投与することができる。治療適用において、組成物を、疾患（例えば、癌）に罹患している患者に「治療有効用量」で投与する。この使用のための有効量は、疾患の重症度および患者の全身健康状態に依存する。組成物の単回または複数回投与は、患者が必要とし、耐えられる用量および頻度に依存して投与され得る。本発明の目的のための「患者」または「対象」は、ヒトおよび他の動物、特に哺乳動物の両方を含む。したがって、該方法は、ヒト治療および獣医適用の両方に適用することができる。好ましい態様において、患者は哺乳動物、好ましくは霊長類であり、最も好ましい態様において、患者はヒトである。他の既知の癌治療を、本発明の方法と組み合わせ使用することができる。例えば、本発明の使用のための組成物は、また、他の癌治療剤、例えば、5FU、ビンブラスチン、アクチノマイシンD、シスプラチン、メトトレキサートなどに対して細胞を標的化または増感するために使用され得る。

【0119】

他の態様において、本発明の方法は、他の癌治療（例えば、前立腺全摘出術）、放射線療法（体外照射または近接照射療法）、ホルモン治療（例えば、睾丸摘出、テストステロン生産を抑制するためのLHRH-類似体治療、抗-アンドロゲン治療）または化学療法と共に使用される。前立腺全摘出術は、前立腺全体およびいくつかの周辺組織の除去を含

10

20

30

40

50

む。この処置は、癌が該組織以外に広がっていないと考えられるときに一般的に使用される。放射線療法は、一般的に、未だ前立腺に限定されるか、または近くの組織に広がっている前立腺癌を処置するために使用される。疾患がさらに進行しているとき、放射線が腫瘍のサイズを減少させるために使用され得る。ホルモン治療は、しばしば、前立腺癌が前立腺以外に広がっているか、または再発している患者のために使用される。ホルモン治療の目的は、男性ホルモン、アンドロゲンの量を低くするためであり、それにより、前立腺癌を縮小させるか、または増殖をより遅くする。黄体形成ホルモン放出ホルモン (LHRH) アゴニストは、テストステロンの生産を減少させる。これらの薬剤は、1月以上に1回注射され得る。かかる2つの類似体は、ロイプロリドおよびゴセレリンである。抗アンドロゲン (例えば、フルタミド、ピカルタミドおよびニルタミド) もまた、使用され得る。全アンドロゲン遮断は、睾丸摘出またはLHRH類似体と組み合わせた抗アンドロゲンの使用を示し、s 組合せと呼ばれる。化学療法は、前立腺癌が前立腺の外側に広がっている患者およびホルモン治療が不成功であった患者のための選択肢である。全ての癌細胞を破壊することは予期されないが、腫瘍増殖を遅延させ、疼痛を減少させ得る。ホルモン治療での処置後に再発するか、または増殖し広がり続ける前立腺癌の処置において使用されるいくつかの化学療法剤は、ドキソルビシン (アドリマイシン)、エストラムスチン、エトポシド、ミトキサントロン、ビンブラスチンおよびバクリタキセルを含む。2またはそれ以上の薬剤は、しばしば、癌細胞が化学療法に対して耐性になる可能性を減少させるために併用投与される。小細胞癌腫は、ホルモン治療よりも化学療法により応答しやすい前立腺癌の珍しい型である。

10

20

【0120】

いくつかの態様において、「心臓保護剤」も、また、本発明の使用のために、N - カドヘリン抗体、N - カドヘリン結合阻害剤またはN - カドヘリン s i R N A 分子と共に投与される (米国特許第6,949,245号参照)。心臓保護剤は、患者への薬物、例えば、アントラサイクリン抗生物質の投与と関連する心筋機能障害 (すなわち、心筋症および/または鬱血性心不全) を予防するか、または減少させる化合物または組成物である。心臓保護剤は、例えば、フリーラジカル介在性心臓毒性作用を阻止するか、または減少させ得る、および/または酸化ストレス傷害を防止するか、または減少させ得る。本定義により包含される心臓保護剤の例は、鉄キレート剤、デクスラゾキサン (ICRF - 187) (Seifertら. *The Annals of Pharmacotherapy* 28:1063-1072 (1994)) ; 脂肪低下剤および/または抗酸化剤、例えば、プロブコール (Singalら. *J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1055-1063 (1995)) ; WR - 2721とも呼ばれるアミホスチン (アミノチオール2 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] エタンチオールニ水素ホスフェートエステル、およびWR - 1065と呼ばれるその脱リン酸化細胞摂取形態) およびS - 3 - (3 - メチルアミノプロピルアミノ) プロピルホスホロ - チオ酸 (WR - 151327)、Greenら. *Cancer Research* 54:738-741 (1994)、参照 ; ジゴキシシン (Bristow, M. R. In: Bristow M R, ed. *Drug-Induced Heart Disease*. New York: Elsevier 191-215 (1980)) ; ベータ遮断薬、例えば、メトプロロール (Hjalmarsonら. *Drugs* 47:Suppl 4:31-9 (1994)) ; およびShaddyら. *Am. Heart J.* 129:197-9 (1995)) ; ビタミンE ; アスコルビン酸 (ビタミンC) ; フリーラジカルスカベンジャー、例えば、オレアノール酸、ウルソル酸およびN - アセチルシステイン (NAC) ; スピントラップ化合物、例えば、アルファ - フェニル - t e r t - ブチルニトロソ (PBN) ; (Paracchiniら., *Anticancer Res.* 13:1607-1612 (1993)) ; 有機セレン化合物、例えば、P251 (Elbesen) などを含む。

30

40

【0121】

組合せ投与は、別々の製剤または単一の医薬製剤を使用する共投与、および、いずれかの順序での連続投与 (好ましくは両方の (または全ての) 活性剤が同時にそれらの生物学的活性を発揮する間に一定の期間がある) を意図する。

【0122】

N - カドヘリンタンパク質の発現および/または機能を間接的または直接的に調節する同定された分子および化合物は、N - カドヘリンを発現するそれぞれの癌の処置に有用で

50

あり得る。N - カドヘリンタンパク質調節剤は、単独で投与され得るか、または慣用の化学療法、放射線治療または免疫療法ならびに現在開発されている治療と組み合わせて共投与され得る。

【0123】

経口投与に適当な製剤は、(a) 液体溶液、例えば、希釈剤、例えば、水、塩水またはPEG 400中に懸濁された、有効量のパッケージされた核酸；(b) 液体、固体、顆粒またはゼラチンとして所定の量の活性成分をそれぞれ含むカプセル、サシェ(sachet)または錠剤；(c) 適当な液体中の懸濁液；および(d) 適当なエマルジョンからなることができる。錠剤形態は、1つ以上のラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微結晶セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸および他の賦形剤、着色剤、増量剤、結合剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、香味剤、着色剤、崩壊剤および薬学的に適合性の担体を含むことができる。トローチ(lozenge)剤形態は香味剤、例えば、スクロース中に活性成分を含むことができ、ならびに、トローチ(pastille)は不活性基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアエマルジョン中に活性成分を含むことができ、ゲルなどは、活性成分に加えて、当該分野で知られている担体を含むことができる。

10

【0124】

最適な化合物は、単独または他の適当な成分と組み合わせて、吸入を介して投与されるエアロゾル製剤(すなわち、それらは「噴霧する」ことができる)に作ることができる。エアロゾル製剤は、加圧された許容される高圧ガス、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素などの中に置くことができる。

20

【0125】

経直腸投与のための適当な製剤は、例えば、坐薬基剤でパッケージされた核酸からなる坐薬を含む。適当な坐薬基剤は、天然または合成トリグリセリドまたはパラフィン炭化水素を含む。加えて、最適な化合物と基剤、例えば、液体トリグリセリド、ポリエチレングリコールおよびパラフィン炭化水素の組合せからなるゼラチン経直腸カプセルを使用することも可能である。

【0126】

例えば、関節内(関節中)、静脈内、筋肉内、腫瘍内、皮内、腹腔内および皮下経路による、非経口投与に適当な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および意図されるレシビエントの血液で製剤を等張にする溶質を含むことができる水性および非水性等張滅菌注射液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および防腐剤を含むことができる水性および非水性滅菌懸濁液を含む。本発明の実施において、組成物は、例えば、静脈内注入により、経口的に、局所的に、腹腔内に、膀胱内にまたは髄腔内に投与することができる。非経口投与、経口投与および静脈内投与は、好ましい投与方法である。化合物の製剤は、密閉された容器、例えば、アンプルおよびバイアルで、単回用量または複数回用量で存在させることができる。

30

【0127】

注射液および懸濁液は、以前によく記載されている滅菌粉末、顆粒および錠剤から製造することができる。エキソピボ治療のために核酸により形質導入された細胞を、また、上記のとおり静脈内に、または非経口的に投与することができる。

40

【0128】

医薬製剤は、好ましくは単位投与形態である。このような形態において、製剤は、適当な量の活性成分を含む単位用量にさらに分割される。単位投与形態は、パッケージされた製剤であり得、該パッケージは、分離量の製剤、例えば、バック入り錠剤、カプセルおよびバイアルまたはアンプル中の粉末を含む。また、単位投与形態は、それ自体、カプセル、錠剤、カシェ剤またはトローチ剤であってよく、または、それはパッケージされた形態における適当な数の任意のこれらのものであってよい。組成物は、また、所望の場合、他の適合性治療剤を含むことができる。

50

【 0 1 2 9 】

好ましい医薬製剤は、持続放出製剤中で、所望により1つ以上の化学療法剤および免疫療法剤と組み合わせて、1つ以上の活性なN - カドヘリンタンパク質調節剤を送達する。一般的に、N - カドヘリン調節剤は、化学療法、放射線療法、免疫療法およびホルモン治療を含む他の細胞毒性癌治療に対する腫瘍細胞の感受性を増加させる増感剤として治療的に投与される。

【 0 1 3 0 】

癌の処置のための治療的使用において、本発明の医薬的方法に利用されるN - カドヘリン調節剤または阻害剤は、1日に約0.001mg/kgから約1000mg/kgの初期用量で投与される。約0.01mg/kgから約500mg/kg、または約0.1mg/kgから約200mg/kg、または約1mg/kgから約100mg/kg、または約10mg/kgから約50mg/kgの1日用量範囲を使用することができる。しかしながら、該用量は、患者の必要性、処置される状態の重症度、および使用される化合物に依存して変化し得る。例えば、用量は、特定の患者において診断される癌の型および段階を考慮して、経験的に決定することができる。患者に投与される用量は、本発明の文脈において、時間をかけて患者において有益な治療応答をもたらすために十分であるべきである。用量サイズは、また、経験、性質および特定の患者における特定のベクターまたは形質導入細胞型の投与に付随するあらゆる副作用の程度により決定される。特定の状態に対する適当な用量の決定は、医師の範囲内である。一般的に、処置は、化合物の最適な用量よりも少ない用量で開始される。その後、用量は、状況下で最適な効果に達するまで、少しずつ増加される。便宜上、全1日用量は、所望により、1日中で部分的に分割し、投与してもよい。

10

20

【 0 1 3 1 】

本発明の使用のための医薬製剤（例えば、N - カドヘリンsiRNA、N - カドヘリン抗体、N - カドヘリンワクチン、N - カドヘリン阻害剤および免疫抱合体）は、一般的に、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む哺乳動物に送達される。本方法を使用して処置される非ヒト哺乳動物は、飼育化した動物（すなわち、イヌ、ネコ、マウス、齧歯動物およびウサギ）および農業用動物（ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ）を含む。

【 実施例 】

【 0 1 3 2 】

実施例

以下の実施例は、説明のために提供するが、本発明を限定しない。

30

【 0 1 3 3 】

実施例1：ヒトN - カドヘリンに特異的なヒトScFvの単離および特性化

原料および方法

N - カドヘリン組換えタンパク質発現および細胞系

2つの非依存性N - カドヘリン組換えタンパク質、N - カドヘリン細胞外ドメイン1から3（ECD1 - 3）およびN - カドヘリンの第4のドメイン（ECD4）を生産した（Z Weinberg）。cDNA配列を、mRNA製造物からRT - PCRを使用してクローニングした。ECD1 - 3に対する核酸160から497および核酸489から603を細菌発現系中、6ヒスチジンタグを有するフレーム内に、およびベクター中、GSTタグを有するフレーム中にクローニングした。発現を数時間で誘導し、誘導後、ペリプラズム画分を単離し、Ni - NTAクロマトグラフィーを使用して組換えタンパク質を精製した。タンパク質を、サイズおよび純度に関してSDS - PAGEで分析した。LNCap N - カドヘリントランスフェクト細胞を生産した。完全N - カドヘリンcDNAをベクターにクローニングし、感染によりLNCapにトランスフェクトした。PC3細胞およびDU145の2つの前立腺細胞系を使用して、単離された抗 - N - カドヘリン抗体フラグメントを特徴付けた。

40

【 0 1 3 4 】

ファージライブラリーパニング

50

本発明者らは、以前に記載されている (Sheets M.D. PNAS 1998) とおりの J D M a r k s 研究室において生産された 8×10^8 メンバーを含む、ヒト一本鎖 F v (s c F v) を示す非免疫ファージライブラリーをパニングした。ファージを、N - カドヘリン組換えタンパク質に対してアフィニティー選択した。E C D 1 - 3 および E C D 4 を 2 つの免疫チューブ (N u n c) 上に別々に吸着させた。次に、免疫チューブを P B S で洗浄し、P B S 中の 4 % のミルクで室温で 2 時間ブロックし、次に、P B S で 3 回洗浄した。1 m l のアリコートファージ - ディスプレイされる s c F v ライブラリー (8×10^{11} p f u) を 1 m l の 8 % の M P B S と混合し、抗原被覆免疫チューブに加えた。免疫チューブを室温で 1 時間インキュベートした。次に免疫チューブを P B S 中の 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 で 1 回および P B S で 3 回洗浄した。ファージを、1 m l の 1 0 0 m M のトリエチルアミンで 5 分間溶離し、0 . 5 m l の 1 M の T r i s - H c l p H 7 . 4 で中和した。溶離したファージの半分をそれぞれのラウンドのために凍結し、もう半分を T G 1 細胞に感染させるために使用した。ファージ増幅および精製を、以前に記載されている (Sheets M.D. PNAS 1998) とおりに行った。選択は、第 1 のラウンドと同様のさらに 3 回のラウンドのパニングを含む。2 m l の $40 \mu l / m l$ を、ラウンド 1 および 2 のために免疫チューブを被覆するために使用し、 $20 \mu l / m l$ を、ラウンド 3 および 4 のために免疫チューブを被覆するために使用した。洗浄の回数を、ラウンド 2、3 および 4 において漸進的に増加させた。パニングのラウンド 1、2、3 由来のポリクローナルファージ抗体および第 4 ラウンド由来の個々の 9 5 クローンを、以前に記載されている (文献 Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97) とおりに E L I S A により評価した。

【 0 1 3 5 】

個々のクローンの E L I S A スクリーニング

9 5 個の個々のファージクローンのそれらの標的への結合を、E L I S A (Marks JD J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-97) (Poul M, ら. JMB Volume 301, Issue 5, Pages 1149-1161) により評価した。選択のために使用される標的を使用して、9 6 ウェル E L I S A プレートに被覆した。独特な s c F v の数を、制限酵素 B s t N I で s c F v 遺伝子をフィンガープリントすることにより決定し、D N A シーケンシングにより確認した。

【 0 1 3 6 】

ダイアボディへの s c F v の再構築

S c F v 挿入物を、N c o I および N o t I 制限酵素を使用して p H E N 1 から切り出し、同じ制限酵素部位を使用して p S y n ベクターにクローニングした。s c F v をダイアボディに再構築するために、1 5 から 5 a . a のリンカーを、スプライス重複伸長 P C R (S O E - P C R) (Yazaki PJ, ら. PEDS 2004 May;17(5):481-9) に使用した。S O E - P C R 生成物を T O P O ベクター (i n v i t r o g e n) にクローニングし、P C R により変異が生産されていないことを証明するためにシーケンシングした。最後に、N c o I および N o t I 制限酵素認識部位を使用して、ダイアボディ構築物を p S y n 1 ベクターにクローニングした。

【 0 1 3 7 】

s c F v およびダイアボディの発現および精製

p S y n 1 にクローニングされた S c F v およびダイアボディを、タンパク質発現のために、T G 1 細菌にトランスフェクトした。細菌を 0.5×10^6 c f u / m l の密度まで増殖させ、1 m M の I P T G で発現を誘導した。誘導の 4 時間後、細菌を遠沈させ、ペリプラズム画分を生成した。6 H I S タグタンパク質を N i - N T A カラム上で精製した。溶離したタンパク質を P B S 濃縮液およびフィルターに対して透析した。

【 0 1 3 8 】

生化学的特性化

精製されたタンパク質を非還元条件下で S D S - P A G E により分析した。天然構造サイズをサイズ排除カラム (S u p e r d e x 7 5) (P h a r m a c i a) により測定した。

【 0 1 3 9 】

10

20

30

40

50

フローサイトメトリー

フローサイトメトリーを、細胞 N - カドヘリンへのファージ抗体クローンおよびダイアボディの結合を評価するために行った。ファージ抗体染色のために、20 倍に濃縮した上清を使用した。ファージをヘルパーファージでレスキューしたとき、個々のクローンを 20 ml の 2 T Y 中で 0.5×10^6 の密度まで増殖させた。一晚培養後、モノクローナルファージを PEG / NaCl での沈降により上清から回収し、1 ml の PBS / 1 % BSA に再懸濁した。フローサイトメトリー染色のために、 5×10^5 細胞を 1 時間、氷上で 100 μ l の 20 x PEG 濃縮ファージ抗体クローンと共にインキュベートした。細胞をフローバッファー (PBS 1 % FBS、1 mM の EDTA、0.02 % のアジ化ナトリウム) で洗浄し、ファージ抗体クローンをモノクローナル抗 - M13 抗体 (Amersham Biosciences) で検出した。細胞を洗浄し、R - PE 接合抗 - マウス抗体で染色した。ダイアボディ染色のために、 5×10^5 細胞を 1 時間、氷上でフローバッファー中 2 μ g / ml の濃度でダイアボディと共にインキュベートした。細胞を洗浄し、ダイアボディをフローバッファー中の 1 / 100 抗 - c - Myc - ビオチン抗体で検出した。最後に、細胞を洗浄し、フローバッファー中の 1 / 40 ストレプトアビジン - R - PE (SIGMA) で染色した。

10

【0140】

インビボ試験

D4Db のタンパク質を 1.24×10^4 I で標識化し、LAPC9 AI 腫瘍を有する SCID マウスおよび PC3 腫瘍を有するヌードマウスの尾静脈に注射した。MicroPET 画像を、注射の 4 および 20 時間後に行った。生体内分布を注射の 20 時間後に行った。

20

【0141】

パニング

8.2×10^8 メンバーを含むヒト一本鎖 Fv 抗体 (scFv) を示す同じ非免疫ファージライブラリーを、独立して ECD1 - 3 - 6 His または ECD4 - 6 His 組換えタンパク質に対してパニングした。インプット、アウトプット、回収および濃縮を含むパニング結果を表 1 に示す。ECD1 - 3 に対するパニングは、ラウンド 2 から始まる早期の濃縮をもたらしたが、濃縮は、ECD4 に対する最後のパニングラウンドでのものよりも優れたものになっただけである。これらの結果は、ECD1 - 3 では第 2 のパニングラウンドでシグナルが現れたが、ECD4 では第 3 のパニングラウンドサンプルのみがシグナルを示したポリクローナル ELISA と一致する。

30

【0142】

図 1 において示されるとおり、パニングラウンド 1、2 および 3 由来のポリクローナルファージ抗体を ELISA により分析した。パニングラウンドのために使用される標的を、ELISA プレートに被覆するために使用した。ファージ抗体の結合を HRP 接合抗 M13 抗体で検出した。

表 1

【表 1】

a) ECD1-3

	固定化 タンパク質	インプット (pfu)	アウトプット (pfu)	回収	濃縮
ラウンド 1	40 μ l/ml	8×10^{11}	2×10^6	2.5×10^{-6}	
ラウンド 2	40 μ l/ml	5×10^{10}	2×10^5	4×10^{-6}	1.6
ラウンド 3	20 μ l/ml	5×10^{11}	4×10^6	10^{-5}	2.5
ラウンド 4	20 μ l/ml	2×10^{11}	5×10^8	2.5×10^{-3}	250

b) ECD4

	固定化 タンパク質	インプット (pfu)	アウトプット (pfu)	回収	濃縮
ラウンド 1	40 μ l/ml	8×10^{11}	2×10^7	1.25×10^{-5}	
ラウンド 2	40 μ l/ml	5×10^{10}	10^5	2×10^{-6}	0.2
ラウンド 3	20 μ l/ml	5×10^{11}	5×10^4	10^{-7}	0.05
ラウンド 4	20 μ l/ml	3.5×10^{11}	5×10^5	1.4×10^{-6}	1.4

【0143】

スクリーニング

95個のクローンを、ECD1-3およびECD4に関する選択の第4ラウンドから単離し、ELISAにより試験した。95個のクローンを、ECD1-3-6HISに関する選択の第4ラウンドから単離し、ECD1-3-6HISおよびECD1-3-GSTに対してスクリーニングした。ECD1-3-6HISで試験したとき、95個のクローンのうち93個は陽性であった。ECD1-3-6HISに対して陽性のクローンのうち22個は、ECD1-3-GSTに対しても陽性であった。ECD1-3-6HISおよびECD1-3-GSTの両方に対して陽性の22個のクローンをフィンガープリントし、独特なクローンを単離した。7個のクローンは、A7、C7、C12、D10、E4、E10およびG2の1つのコピーのみを有した。B12は、1つの他のコピーを有した。D4は3つの他のコピーを有し、A8は8つの他のコピーを有した。A8 NcoI-NotI挿入物は、アガロースゲル上で分析されたとき、他のクローンよりも短かった。ECD4-6HISに関する選択の第4のラウンドから単離された95個のクローンを、ECD4-6HISおよびECD1-3-6HISに対してスクリーニングした。試験された全95個のクローンは、ECD4-6HISで試験されたとき陽性であり、ECD1-3-6HISで試験されたとき陰性であった。本発明者らは、ELISAにおいてより強いシグナルを与えた8個の陽性クローンを選択し、それらをフィンガープリントした。これら8個のクローンは、同じフィンガープリントを有した。これらのクローンのうちの1つであるA1をA14と改名した。

【0144】

要約すると、本発明者らは、N-カドヘリンECD1-3組換えタンパク質を結合する10個の個々のファージクローン(A7、A8、B12、C7、C12、D4、D10、E4、E10、G2)およびN-カドヘリンECD4組換えタンパク質を結合する1個のファージクローン(A14)を選択した。

【0145】

ファージクローンの細胞表面N-カドヘリンへの結合

ELISAにより選択された11個の個々のファージクローンを、フローサイトメトリーにより、N-カドヘリン陽性細胞(PC3およびLNCaP N-カドヘリントランスフェクト細胞)の細胞結合に関して試験した。クローンは、また、N-カドヘリン陰性細胞(DU-145およびLNCap)に対する交差反応性を試験した。これらの実験のために、第2のバッチのファージ抗体を生産し、ELISAにより再試験した。選択されたクローンに対する両方のELISA結果を表2に示す。全ファージクローンは、1つのD

4を除きN - カドヘリン陽性細胞を染色したが、N - カドヘリン陰性細胞を染色しなかった。それぞれのクローンに対する平均蛍光強度を表2に示す。本発明者らは、唯一の抗 - ECD4としてA14を、ならびにダイアボディに再構築されるべき最も強い細胞染色を示すので、C7およびE4を選択した。生産されたダイアボディA14Db、C7DbおよびE4Dbを使用して、N - カドヘリン陽性および陰性細胞を染色した。フローサイトメトリーにより分析したとき、A14DbおよびE4Dbは、N - カドヘリン陽性細胞の比較的弱い染色を示したが、C7Dbは、より強い染色を示した(データは示していない)。しかしながら、C7Dbは、また、N - カドヘリン陰性細胞の染色を示す。

【0146】

これらのクローン由来のscFvタンパク質をシーケンシングした。配列を以下に示す

A14 ScFv	配列番号：1
A7 不完全 ScFv	配列番号：2
A8 切断型 ScFv	配列番号：3
B12 不完全 ScFv	配列番号：4
C7 ScFc	配列番号：5
C12 不完全 ScFv	配列番号：6
D4 ScFv	配列番号：7
E4 ScFv	配列番号：8
E10 不完全 ScFv	配列番号：9

表2

【表2】

クローン	融合タンパク質	コピー数	1 st ELISA (O.D)	2 nd ELISA (O.D)	フローサイトメトリー (MFI)
A14 (A1)	HIS ドメイン 4	1	0.32	?	57
A7	GST HIS	1	0.1 0.26	0 0.38	48
A8 (切断型)	GST HIS	9	0.17 0.25	0.05 0.11	30
B12	GST HIS	2	0.2 0.18	0.26 0.4	91
C7	GST HIS	1	0.1 0.23	0.19 0.35	110
C12	GST HIS	1	0.34 0.2	0.16 0.31	38
D4	GST HIS	4	0.31 0.38	0.15 0.24	0
D10	GST HIS	1	0.22 0.24	0.13 0.28	25
E4	GST HIS	1	0.17 0.35	0.21 0.39	216
E10	GST HIS	1	0.13 0.21	0.14 0.35	12
G2	GST HIS	1	0.09 0.26	0.06 0.14	36

表3

【表3】

	腫瘍	血液	肝臓	脾臓	腎臓	肺
LAPC9 AI	0.6	0.9	0.3	0.2	0.6	0.3
PC3	0.3	0.6	0.3	0.1	0.6	0.3

腫瘍またはマウスの注射 2 2 時間後に得られた生体内分布データ。

腫瘍 / 血液 = 0 . 7 (L A P C 9) および 0 . 5 (P C 3)

【 0 1 4 7 】

最も良い結合剤の選択

1 0 個の E C D 1 - 3 結合剤の中から最も良いものを選択するためのさらなる努力において、これらのファージクローンを生産し、L N C a P 細胞上で枯渇させ、N - カドヘリントランスフェクト L N C a P 細胞に対して 2 回パニングした。クローンをシーケンシングした。N - カドヘリントランスフェクト L N C a P 細胞の D 4 ファージクローンでの染色は陰性であったが、D 4 クローンは X コピーで見られた。

【 0 1 4 8 】

D 4 ダイアボディ (D 4 D b) を生産し、P C 3 および D U 1 4 5 染色について、E 4 D b と比較した (図 2) 。 E 4 D b および D 4 D b の両方は、P C 3 を染色し、D U 1 4 5 に対して陰性であった。P C 3 の D 4 D b 染色は、E 4 D b より強かった (図 4) 。

【 0 1 4 9 】

図 2 に示されるとおり、N - カドヘリン陽性細胞 (P C 3) をダイアボディと共にインキュベートし、染色し、フローサイトメトリーにより分析した。二次抗体のみ：抗 - C - M y c - F I T C (灰色で塗られる) 、 A 1 4 D b (破線) 、 E 4 D b (細線) 、 C 7 D b (太線) 。

【 0 1 5 0 】

図 3 に示されるとおり、N - カドヘリン陰性細胞 (D U 1 4 5) および N - カドヘリン陽性細胞 (P C 3) を C 7 D b と共にインキュベートし、染色し、フローサイトメトリーにより分析した。二次抗体のみ：抗 - C - M y c - F I T C (灰色で塗られる) 、 C 7 D b (実線) 。

【 0 1 5 1 】

図 4 に示されるとおり、N - カドヘリン陰性細胞 (D U 1 4 5) および N - カドヘリン陽性細胞 (P C 3) をダイアボディと共にインキュベートし、染色し、フローサイトメトリーにより分析した。二次抗体のみ：抗 - C - M y c - ビオチン、ストレプトアビジン R - P E (灰色で塗られる) 、 E 4 D b (破線) 、 D 4 D b (実線) 。

【 0 1 5 2 】

図 5 は、L A P C 9 A I 腫瘍における ^{1 2 4} I 標識 D 4 D b の腫瘍局在を示す。冠状断面を注射 4 時間後に記録した。

【 0 1 5 3 】

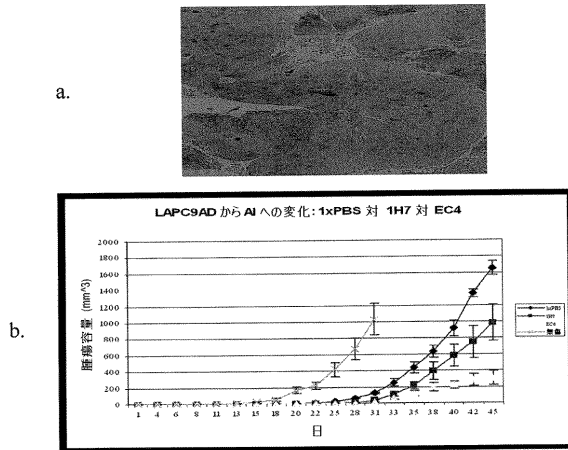
本明細書に記載されている実施例および態様が説明の目的のみであり、それらを考慮すると、それらに種々の修飾または変化が当業者に示唆され、本出願の精神および範囲ならびに特許請求の範囲内に包含されると理解される。本明細書に引用されている全ての文献、特許および特許出願は、ここに、全ての目的のためにそれら全体を出典明示により包含される。

10

20

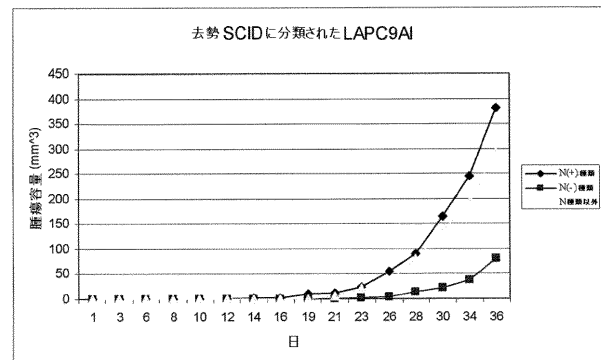
30

【図 1】

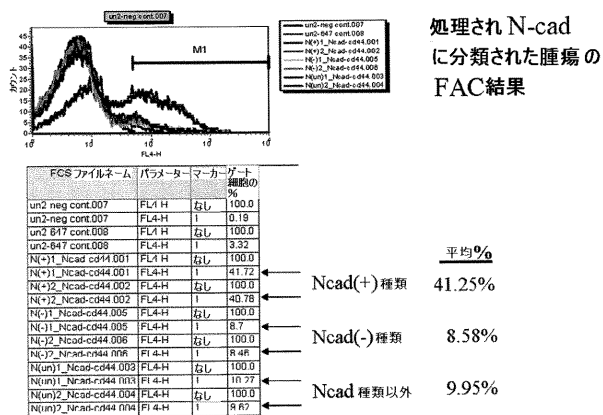


【図 2】

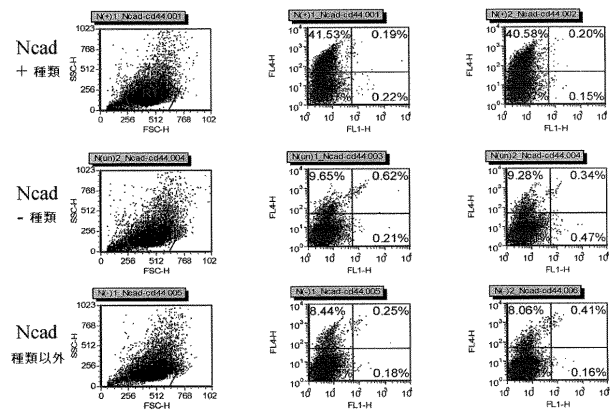
LAPC9AI 種類の腫瘍増殖曲線



【図 3】

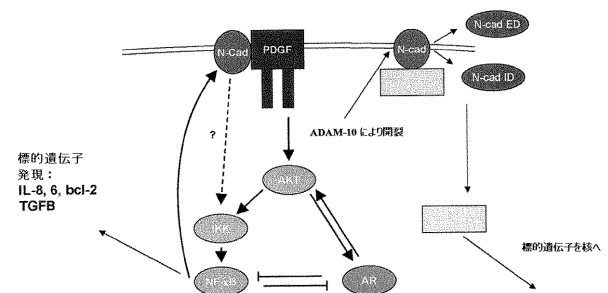


【図 4】



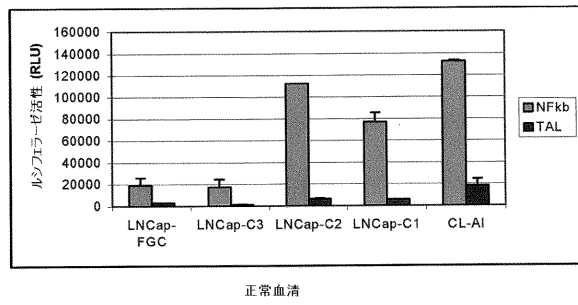
【図 5】

前立腺癌におけるN-カドヘリンシグナル伝達のモデル



【図 6】

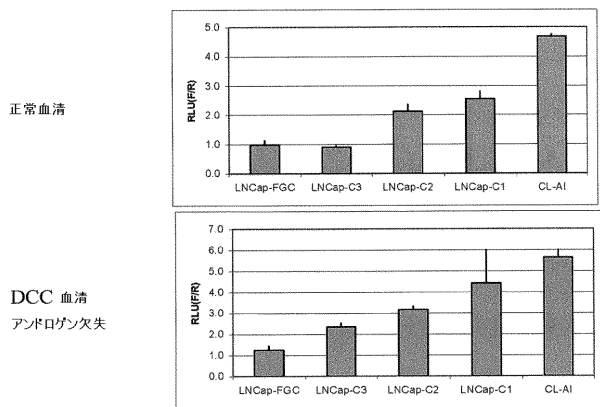
N-カドヘリンはNF- κ Bを活性化する



NF- κ B 受容体アッセイ: TAL は陰性コントロールである

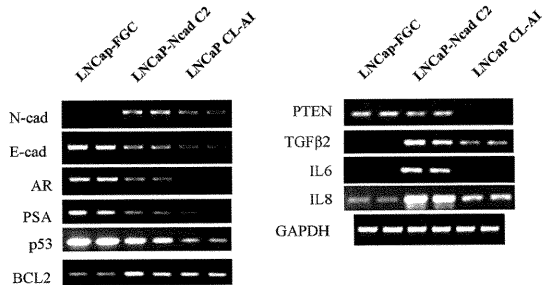
【図 7】

N-カドヘリンはNF- κ Bを活性化する



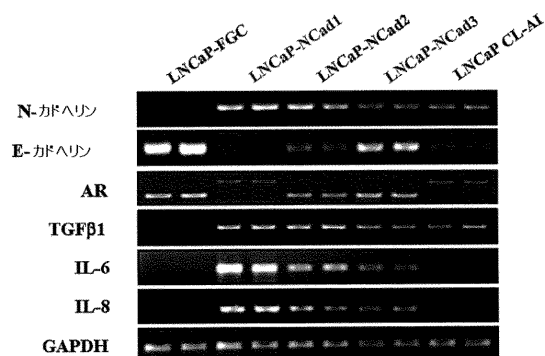
【図 10】

N-カドヘリン発現は、IL-6、IL-8、TGF- β 2 およびbcl-2の誘導を引き起こす



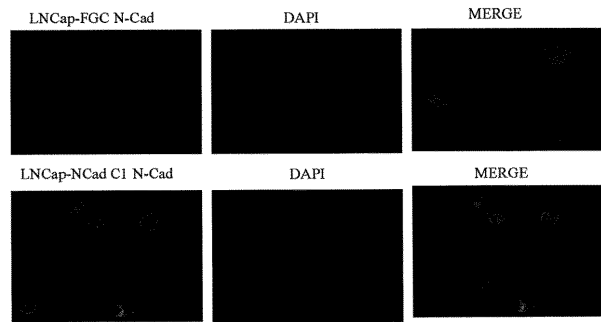
【図 11】

誘導遺伝子とN-カドヘリンレベルとの相関関係



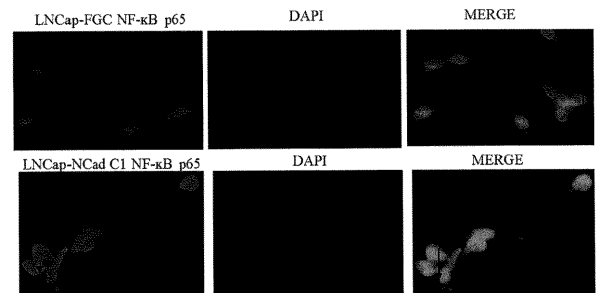
【図 8】

N-カドヘリンはC1細胞の細胞表面上に発現する



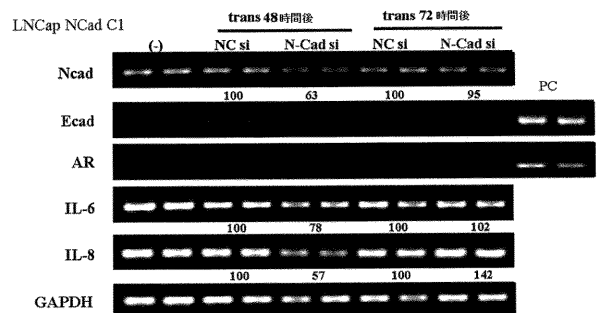
【図 9】

NF- κ BはN-カドヘリン陽性細胞(C1)の核に局在する



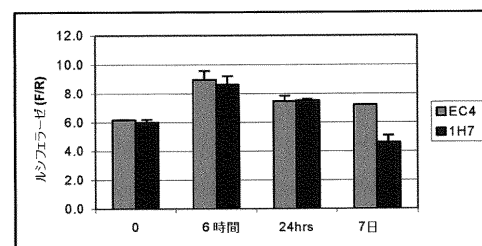
【図 12】

N-カドヘリンノックダウンは IL-6およびIL-8の下方制御を引き起こす



【図 13】

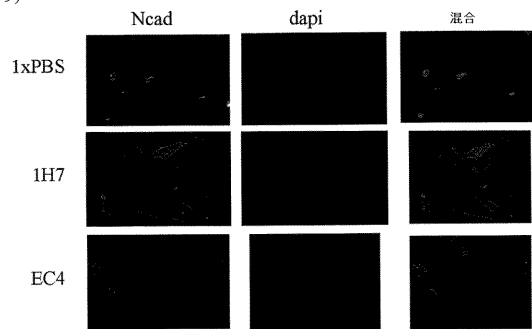
N-カドヘリン抗体処理後のNF- κ B活性



1H7の処理7日後のNF- κ B活性はわずかに減少した。これは、pAktおよびNcad発現が減少したウエスタンブロットと一致する。

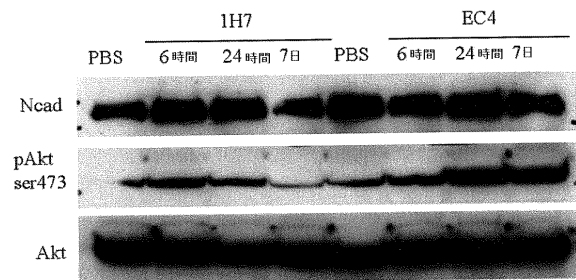
【図 1 4】

PC3細胞におけるNcad、48時間抗体インキュベーション
(以前から) (フィブロネクテン)



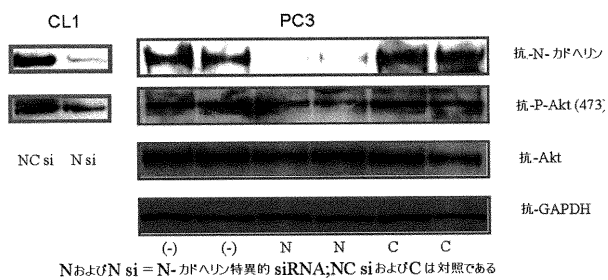
【図 1 6】

N-カドヘリン特異的抗体は活性化され
次にAkt活性化を下方制御する



【図 1 5】

N-カドヘリンノックダウンは
活性化されたAktの下方制御を引き起こす



【手続補正書】

【提出日】平成24年1月17日(2012.1.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表



【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

[2012508027000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2009/063881
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, C12N 15/13(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/18; C12Q 1/68; G01N 33/53; G01N 33/567		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal), Delphion, Pubmed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, J.-B. et al. 'N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility.' Journal of Cell Biology. Vol. 151(6), pp. 1193-1205 (11 December 2000)	1-3
Y	See p.1201, left column.	7-27
X	HARRISON, O. J. et al. 'The mechanism of cell adhesion by classical cadherins: the role of domain 1.' Journal of Cell Science. Vol. 118(Pt.4), pp. 711-721 (25 January 2005)	4-6
Y	See p. 715, left column.	7-27
Y	TRAN, N. L. et al. 'N-cadherin expression in human prostate carcinoma cell lines.' American Journal of Pathology. Vol. 155(3), pp. 787-798 (September 1999) See the abstract.	7-27
Y	US 6682901 B2 (BLASCHUK; OREST W. et al.) 27 January 2004 See the abstract.	7-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 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 20 JULY 2010 (20.07.2010)		Date of mailing of the international search report 22 JULY 2010 (22.07.2010)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, JI YUN Telephone No. 82-42-481-8288 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/063881**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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

See Extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/063881

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALEXANDER, N. R. 'N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1.' Cancer Research. Vol. 66(7), pp. 3365-3369 (1 April 2006) See the abstract.	1-27
A	WO 2007-109347 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA et al.) 27 September 2007 See the abstract.	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/063881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6682901 B2	27.01.2004	AU 1999-35906 A1	23.11.1999
		AU 1999-35906 B2	08.08.2002
		AU 1999-35907 A1	23.11.1999
		AU 1999-35907 B2	03.04.2003
		AU 2001-272717 B2	18.08.2005
		AU 2001-72717 A1	08.10.2001
		CA 2327530-A1	11.11.1999
		CA 2328112-A1	11.11.1999
		CA 2404202-A1	04.10.2001
		EP 1075494 A2	14.02.2001
		EP 1075662 A2	14.02.2001
		EP 1366076 A2	03.12.2003
		EP 1970383 A1	17.09.2008
		JP 2002-513804 A	14.05.2002
		JP 2002-513937 A	14.05.2002
		JP 2002-513937 T	14.05.2002
		JP 2004-504809 A	19.02.2004
		US 2002-0123044 A1	05.09.2002
		US 2002-0146687 A1	10.10.2002
		US 2002-0169106 A1	14.11.2002
		US 2003-0082166 A1	01.05.2003
		US 2003-0096746 A1	22.05.2003
		US 2003-0229199 A1	11.12.2003
		US 2004-0229811 A1	18.11.2004
		US 2004-0248219 A1	09.12.2004
		US 2004-0248220 A1	09.12.2004
		US 2005-0203025 A1	15.09.2005
		US 2005-0215482 A1	29.09.2005
		US 2005-0222037 A1	06.10.2005
		US 2006-0118925 A1	08.06.2006
		US 2007-0127211 A1	07.06.2007
		US 2008-0137300 A1	12.06.2008
		US 6358920 B1	19.03.2002
		US 6433149 B1	13.08.2002
		US 6472367 B1	29.10.2002
		US 6569996 B1	27.05.2003
		US 6593297 B2	15.07.2003
		US 6638911 B1	28.10.2003
		US 6680175 B2	20.01.2004
		US 6962969 B2	08.11.2005
		US 7481999 B2	27.01.2009
		US 7554190 B2	30.06.2009
		US 7663227 B2	16.02.2010
		US 7755184 B2	13.07.2010
		WO 01-72956 A2	04.10.2001
		WO 01-72956 A3	04.10.2001
		WO 2008-073707 A2	19.06.2008
		WO 2008-073707 A3	19.06.2008
		WO 2009-100374 A1	13.08.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2009/063881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007-109347 A2	27.09.2007	WO 99-57149 A2	11.11.1999
		WO 99-57565 A2	11.11.1999
		WO 99-57565 A3	11.11.1999
		WO 99-57565A3	30.03.2000
		AU 2007-227195 A1	27.09.2007
		CA 2646597-A1	27.09.2007
		EP 2004230 A2	24.12.2008
		EP 2004230 A4	20.05.2009
		JP 2009-530645 A	27.08.2009
		JP 2009-530645 T	27.08.2009
		US 2009-130108 A1	21.05.2009
		WO 2007-109347 A2	27.09.2007
		WO 2007-109347 A3	27.09.2007
		WO 2007-109347 A3	16.10.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/063881

The separate inventions found by the Search Authority are as follows:

Invention 1: A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 4 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:1. (claims 1-3; claims 7-27 partially)

Inventions 2: A monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain 1-3 of N-cadherin, comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. (4-27 partially)

Inventions 3-9: as in invention 2, but relating to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3,4,5,6,7,8, or 9. (4-27 partially)

The common technical feature among Inventions 1-9 is "a monoclonal antibody or fragment thereof capable of binding to extracellular domain of N-cadherin". However, such antibodies are already disclosed in D1(KIM et al.). Thus, the common technical feature is not considered to contribute over the prior art as a whole, and the present application does not meet the requirements of unity of invention (Rule 13.1 PCT).

Since all searchable claims could be searched without extra effort, an opinion will be formulated for the subject-matter of all inventions.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 D	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, 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, PE, 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

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100144923

弁理士 中川 将之

(74)代理人 100156111

弁理士 山中 伸一郎

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(74)代理人 100140497

弁理士 野中 信宏

(72)発明者 ロバート・イー・リーター

アメリカ合衆国 9 0 0 2 4 - 6 0 1 7 カリフォルニア州ロサンジェルス、キナード・アベニュー 1 0 5 1 1 番

(72)発明者 エリック・レビン

アメリカ合衆国 9 0 0 9 5 カリフォルニア州ロサンジェルス、ウエストウッド・プラザ 7 0 0 番

(72)発明者 アンナ・エム・ウー

アメリカ合衆国 9 1 0 4 3 カリフォルニア州シャーマン・オークス、サットン・ストリート 1 4 9 1 9 番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA44 CA04 DA02 DA06 EA04 GA11 HA01 HA17

4B064 AG27 CA02 CA12 CA19 CC24 DA01

4B065 AA26X AA90Y AA98X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA14 BB01 DD21 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA28 FA74