

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成24年12月20日(2012.12.20)

【公表番号】特表2012-508027(P2012-508027A)

【公表日】平成24年4月5日(2012.4.5)

【年通号数】公開・登録公報2012-014

【出願番号】特願2011-535765(P2011-535765)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 0 7 K	16/18	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/04	(2006.01)
G 0 1 N	33/574	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 0 7 K	16/18	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/04	
G 0 1 N	33/574	A
G 0 1 N	33/574	D
C 1 2 P	21/08	

【手続補正書】

【提出日】平成24年10月31日(2012.10.31)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

【図1】LAPC9ADからAIへの変化：1×PBS 対 1H7 対 EC4。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

【図2】N-カドヘリンに対する分類されたLAPCAIの腫瘍増殖曲線。去勢SCID

に分類された L A P C A I。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

【図3】処理されN-カドヘリンに分類された腫瘍のFACS結果。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

【図4】処理されN-カドヘリンに分類された腫瘍のさらなるFACS結果。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

【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。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

【図17】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。

【図18】P C 3 細胞の A 1 4 、 C 7 、 E 4 および D 4 ダイアボディ染色。

【図19】N-カドヘリン陰性細胞への C 7 ダイアボディの結合。

【図20】N-カドヘリン発現細胞への E 4 および D 4 ダイアボディの特異的結合。

【図21】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。

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。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

定義

「N-カドヘリンおよびE-カドヘリン」は、(1)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)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)ストリンジエントハイブリダイゼーション条件下で、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)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、靈長類、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。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0111

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0111】

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：MAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCQASGYTFTSY
YIHWVRQAPGQGF EW MG IINPSGG SAS Y A Q K F Q G R V T M T R
DTSTSTVYME L R S L R

配列番号3：MAQVQLQE SGWYFDLWGRGTPVT VSSGGGGSGGG
GSGGGGSEIVLTQSPSSL SASVGDRVTITCRASQGIRNDL
GWYQQKPGKAPKLLIYAA SSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTL
TISSLQPEDFATYYCLQDYNGWTFGQGT KVEIKR

配列番号4：MAQVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGF SFSNY
GMHWVRQAPGKGLEWVA 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
GTTVTVSSGGGSGGGS Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S
ITISCTGGRS 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
SGVSNRFSGSKSGNT

配列番号5：MAPGAAGGVGGGVVQPGRSRLSCAASGF T F S S Y
GMHWVRQAPGKGLEWVA 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 S G G G S 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
V F G G G T K L T V L G

配列番号6：MAQVQLV 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：MAQVQLVQSGAEVKRPGASVRISCKASGYPFTTY
PIHWVRQAPGQGLEWMGGINPNSGATKNVQKFQGRVTMTA
DT 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 S G G G S 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 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 : MAQVQLVQSGAEVKKPGESLEISCKGSGYSFANN
WIGWVRQMPGKGLEWMGSIYPGDSDVRYSRSFQGHVTISA
DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARHRVAYSGYDAFDIW
GQGTMVTVSSGGGGSGGGGSGGGSSVLTQDPAVSVALGQ
TVRITCQGDSLRSYYPSWYQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSG
IPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADEADYYCHSRDRSGNQ
VLFGGGTAKVTVLG

配列番号 9 : MAQVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSY
GMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGNSNKYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGGEGGVWGGTQGTTV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPSTLSAS

いくつかの態様において、本発明は、scFv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-SGGGSGGGGS(配列番号10)をSGGGGS(配列番号11)と置き換えた。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

[0 1 3 3]

実施例 1 : ヒト N - カドヘリンに特異的なヒト S c F v 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.Wainberg)。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(配列番号12)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。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 1 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 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

pSyn1 にクローニングされた *Scfv* およびダイアボディを、タンパク質発現のために、*TG1* 細菌にトランスフェクトした。細菌を 0.5 O.D._{600 nm} の密度まで

増殖させ、1 mMのIPTG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 HIS(配列番号12)タグタンパク質をNi-NTAカラム上で精製した。溶離したタンパク質をPBS濃縮液に対して透析し、フィルターで濾過した。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0142

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0142】

図17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プレートを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 µl/ml	$8*10^{11}$	$2*10^6$	$2.5*10^{-6}$	
ラウンド2	40 µl/ml	$5*10^{10}$	$2*10^5$	$4*10^{-6}$	1.6
ラウンド3	20 µl/ml	$5*10^{11}$	$4*10^6$	10^{-5}	2.5
ラウンド4	20 µl/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 µl/ml	$8*10^{11}$	$2*10^7$	$1.25*10^{-5}$	
ラウンド2	40 µl/ml	$5*10^{10}$	10^5	$2*10^{-6}$	0.2
ラウンド3	20 µl/ml	$5*10^{11}$	$5*10^4$	10^{-7}	0.05
ラウンド4	20 µl/ml	$3.5*10^{11}$	$5*10^5$	$1.4*10^{-6}$	1.4

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0148

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0148】

D4ダイアボディ(D4Db)を生産し、PC3およびDU145染色について、E4Dbと比較した(図18)。E4DbおよびD4Dbの両方は、PC3を染色し、DU145に対して陰性であった。PC3のD4Db染色は、E4Dbより強かった(図20)。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0149

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0149】

図18に示されるとおり、N-カドヘリン陽性細胞(PC3)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) 。

【手続補正 1 4 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 0】

図 1 9 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) 。

【手続補正 1 5 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 1】

図 2 0 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 - ピオチン、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) 。

【手続補正 1 6 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 5 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 5 2】

図 2 1 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。