

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5165175号
(P5165175)

(45) 発行日 平成25年3月21日 (2013. 3. 21)

(24) 登録日 平成24年12月28日 (2012. 12. 28)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02 Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 D

A 6 1 P 35/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 51/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

請求項の数 33 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-526935 (P2002-526935)
 (86) (22) 出願日 平成13年9月11日 (2001. 9. 11)
 (65) 公表番号 特表2004-515472 (P2004-515472A)
 (43) 公表日 平成16年5月27日 (2004. 5. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/028548
 (87) 国際公開番号 W02002/022685
 (87) 国際公開日 平成14年3月21日 (2002. 3. 21)
 審査請求日 平成20年9月10日 (2008. 9. 10)
 (31) 優先権主張番号 60/231, 841
 (32) 優先日 平成12年9月11日 (2000. 9. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 399052796
 ダイナ ファーバー キャンサー インス
 ティチュート, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
 ベニュー 4 5 0
 (73) 特許権者 500034653
 ジェンザイム・コーポレーション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 4 2, ケンブリッジ, ケンダル ストリ
 ート 5 0 0
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MUC 1 細胞外ドメインおよびそれから得られた癌治療組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

MUC 1 発現癌細胞の増殖を阻害する医薬の製造のための、MUC 1 細胞外ドメイン結
 合インヒビターの使用であって；

該MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、以下：

配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸
 を含むフラグメントであって、該配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸は、D
V E T、V E T Q、E T Q F、T Q F N、Q F N Q、F N Q Y、N Q Y K、Q Y K T、Y
K T E、K T E A、T E A AおよびE A A Sからなる群より選択され、該フラグメントは
 、抗MUC 1 - P 1 抗体によって特異的に結合される、フラグメント、あるいは、配列番
号 1 に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 1 のポリペプチドから誘導され
るポリペプチド；

配列番号 4 または配列番号 5 のポリペプチド、あるいは、配列番号 4 または配列番号
5 に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 4 または配列番号 5 のポリペプチ
ドから誘導されるポリペプチド；ならびに

配列番号 1 のペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメント
 であって、ここで、該抗体は、抗MUC 1 - P 1 抗体ではない、抗体またはそのフラグメ
 ント；

からなる群より選択される、使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用であって、前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含むフラグメントであって、該配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸は、D V E T、V E T Q、E T Q F、T Q F N、Q F N Q、F N Q Y、N Q Y K、Q Y K T、Y K T E、K T E A、T E A A および E A A S からなる群より選択され、該フラグメントは、抗 MUC 1 - P 1 抗体によって特異的に結合される、フラグメント、あるいは、配列番号 1 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 1 のポリペプチドから誘導されるポリペプチドである、使用。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の使用であって、前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 4 もしくは配列番号 5 のポリペプチド、あるいは、配列番号 4 もしくは配列番号 5 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 4 または配列番号 5 のポリペプチドから誘導されるポリペプチドである、使用。

10

【請求項 4】

請求項 1 に記載の使用であって、前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 の配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントであり、ここで、該抗体は、抗 MUC 1 - P 1 抗体ではない、使用。

【請求項 5】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化されている、請求項 5 に記載の使用。

20

【請求項 7】

前記モノクローナル抗体が、ヒトの抗体である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 8】

前記抗体が、二重特異的抗体である、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 9】

請求項 4 に記載の使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、あるいは細胞溶解性免疫応答または細胞障害性免疫応答を誘導するエフェクターに結合体化される、使用。

【請求項 10】

30

請求項 9 に記載の使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、サイトカイン、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、または Ig G 1 免疫グロブリンの Fc 領域に結合体化される、使用。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の使用であって、有効量の前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、該 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物として投与される、使用。

【請求項 12】

化学療法剤または放射物の投与をさらに含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 13】

40

癌の処置のために化学療法剤または放射物と組み合わせて使用する医薬の製造のための、MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターの使用であって；

該 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、以下：

配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含むフラグメントであって、該配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸は、D V E T、V E T Q、E T Q F、T Q F N、Q F N Q、F N Q Y、N Q Y K、Q Y K T、Y K T E、K T E A、T E A A および E A A S からなる群より選択され、該フラグメントは、抗 MUC 1 - P 1 抗体によって特異的に結合される、フラグメント、あるいは、配列番号 1 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 1 のポリペプチドから誘導されるポリペプチド；

50

配列番号 4 または配列番号 5 のポリペプチド、あるいは、配列番号 4 または配列番号 5 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 4 または配列番号 5 のポリペプチドから誘導されるポリペプチド；ならびに

配列番号 1 のペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントであって、ここで、該抗体は、抗 MUC 1 - P 1 抗体ではない、抗体またはそのフラグメント；

からなる群より選択される、使用。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の使用であって、前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含むフラグメントであって、該配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸は、D V E T、V E T Q、E T Q F、T Q F N、Q F N Q、F N Q Y、N Q Y K、Q Y K T、Y K T E、K T E A、T E A A および E A A S からなる群より選択され、該フラグメントは、抗 MUC 1 - P 1 抗体によって特異的に結合される、フラグメント、あるいは、配列番号 1 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 1 のポリペプチドから誘導されるポリペプチドである、使用。

10

【請求項 15】

請求項 13 に記載の使用であって、前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 4 もしくは配列番号 5 のポリペプチド、あるいは、配列番号 4 もしくは配列番号 5 に対して 90 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 4 または配列番号 5 のポリペプチドから誘導されるポリペプチドである、使用。

20

【請求項 16】

請求項 13 に記載の使用であって、前記 MUC 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 の配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントであり、ここで、該抗体は、抗 MUC 1 - P 1 抗体ではない、使用。

【請求項 17】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 18】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化されている、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記モノクローナル抗体が、ヒトの抗体である、請求項 17 に記載の使用。

30

【請求項 20】

前記抗体が、二重特異的抗体である、請求項 16 に記載の使用。

【請求項 21】

請求項 16 に記載の使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、あるいは細胞溶解性免疫応答または細胞障害性免疫応答を誘導するエフェクターに結合体化される、使用。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、サイトカイン、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、または Ig G 1 免疫グロブリンの Fc 領域に結合体化される、使用。

40

【請求項 23】

請求項 13 に記載の使用であって、前記化学療法剤が、アルキル化剤、トポイソメラーゼインヒビター、代謝拮抗剤、チューブリン相互作用剤、抗ホルモン剤、オルニチンデカルボキシラーゼインヒビターおよびチロシンキナーゼインヒビターからなる群から選択される、使用。

【請求項 24】

MUC 1 発現癌細胞の増殖を阻害するため、または、癌の処置のために化学療法剤もしくは放射物と組み合わせて使用するための薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含む

50

フラグメントであって、該配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸は、D V E T、V E T Q、E T Q F、T Q F N、Q F N Q、F N Q Y、N Q Y K、Q Y K T、Y K T E、K T E A、T E A AおよびE A A Sからなる群より選択され、該フラグメントは、抗 M U C 1 - P 1 抗体によって特異的に結合される、フラグメント、あるいは、配列番号 1 に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 1 のポリペプチドから誘導されるポリペプチド、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 2 5】

前記ポリペプチドが、配列番号 5 のポリペプチド、あるいは、配列番号 5 に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 5 のポリペプチドから誘導されるポリペプチドである、請求項 2 4 に記載の組成物。

10

【請求項 2 6】

配列番号 4 のポリペプチド、あるいは、配列番号 4 に対して 9 0 % 以上の配列同一性を有する、配列番号 4 のポリペプチドから誘導されるポリペプチド、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、M U C 1 発現癌細胞の増殖を阻害するため、または、癌の処置のために化学療法剤もしくは放射物と組み合わせて使用するための薬学的組成物。

【請求項 2 7】

配列番号 1 のペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメント、ならびに薬学的に受容可能なキャリアを含み、ここで、該抗体は、抗 M U C 1 - P 1 抗体ではない、M U C 1 発現癌細胞の増殖を阻害するための薬学的組成物。

【請求項 2 8】

20

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 2 9】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化される、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 0】

前記モノクローナル抗体が、ヒト抗体である、請求項 2 8 に記載の組成物。

【請求項 3 1】

前記抗体が、二重特異的抗体である、請求項 2 7 に記載の組成物。

【請求項 3 2】

請求項 2 7 に記載の組成物であって、前記抗体またはそのフラグメントが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、あるいは細胞溶解性免疫応答または細胞障害性免疫応答を誘導するエフェクターに結合体化される、組成物。

30

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の組成物であって、前記抗体またはそのフラグメントが、サイトカイン、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、または I g G 1 免疫グロブリンの F c 領域に結合体化される、組成物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 0 0 年 9 月 1 1 日に提出された、仮申請連続番号第 6 0 / 2 3 1 , 8 4 1 号に対して優先権を主張する。合衆国政府は、National Cancer Institute、National Institute of Health、Department of Health and Human Serviceからの助成金番号 R 2 1 - C A 8 7 4 2 1 によって、本発明に権利を有し得る。

40

【0 0 0 2】

(本発明の分野)

本発明は、一般的には癌治療、そしてより具体的には癌治療における介入点として M U C 1 と相互作用する調節剤または薬剤の使用に関連する。

【0 0 0 3】

(本発明の背景)

ヒト M U C 1 ムチン糖タンパク質は、ほとんどの腺上皮の管腔表面において、分泌上皮細胞の先端境界で発現される (K u f e ら、1 9 8 4)。癌において、M U C 1 は細胞膜お

50

よび細胞質全体で高度に過剰発現される (K u f e ら、1984; P e r e y ら、1992)。そうであるので、癌細胞におけるMUC1発現の異常パターンは、通常先端膜に見出されるMUC1に、細胞膜全体の機能を与え得る。MUC1ムチンの顕著な特徴は、各分子において25 - 100回タンデムに反復する、糖鎖付加20アミノ酸細胞外配列を含む外部ドメインである (S t r o u s s およびD e c k e r、1992)。ムチン糖鎖付加レベルは、管上皮組織の正常細胞より、癌細胞においてより低いようである (K u f e、米国特許第5,506,343号)。この低糖鎖付加が、完全に糖鎖付加したムチンでは隠された腫瘍特異的エピトープの曝露を引き起こす。

【0004】

乳癌の90%以上が、MUC1 (ムチン、上皮膜抗原、多型上皮ムチン、ヒト乳脂肪球膜抗原、E p i s i a l i n、DF-3等としても知られる、B a r r y およびS h a r k e y、1985を参照のこと)の増加した発現を示す。いくつかの臨床試験が、腫瘍細胞の細胞表面で発現したムチン腫瘍抗原は、様々な型の癌で予後の悪いことと関連していることを示唆した (I t z k o w i t z ら、1990)。

【0005】

MUC1は膜貫通型および分泌型の療法としても発現される (F i n n ら、1995)。MUC1の反復するシアル化エピトープ (「外部ドメイン」) は、血清中に流れる (R e d d i s h ら、1996)。MUC1のN末端外部ドメイン (切断される細胞外ドメイン) は、O型糖鎖付加に供される様々な数の20アミノ酸タンデムリピートからなる。このムチンは、細胞表面のはるか上、そしてグリコカリックスを越えて伸び、他の細胞との相互作用に容易に利用可能である。MUC1のC末端領域は、37アミノ酸の膜貫通ドメインおよびチロシンリン酸化部位を含む72アミノ酸の細胞質テールを含む。約45アミノ酸の細胞外ドメインが、外部ドメインの切断後に残る。現在外部ドメインの切断を担う酵素は知られていない。外部ドメインの切断後に残る細胞外ドメイン、または「MUC1/EC D」は、典型的には以下のアミノ酸配列を含む：

T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G。

【0006】

MUC1の細胞質ドメイン (「MUC1/CD」) は、癌細胞における細胞内シグナル伝達に重要な、複数のサブドメインを含む。 - カテニンは、S A G N G G S S LモチーフでMUC1/CDに直接結合する (Y a m a m o t o ら、1997)。哺乳類上皮の接着連結部の構成成分である - カテニンは、形質膜の細胞内表面でカドヘリンと結合し、そしてw n tシグナル伝達経路の終わりから2番目の下流メディエーターとして細胞質内でシグナル伝達の役割を果たす (T a k e i c h i、1990; N o v a k およびD e d h a r、1999)。w n t経路の最終的なメディエーターは、 - カテニンおよびリンパ球エンハンサー因子/T細胞因子 (L e f / T c f) の核複合体であり、それは様々な標的遺伝子の転写を刺激する (例えばM o l e n a a r ら、1996; B r u n n e r ら、1997を参照のこと)。 - カテニン - L e f / T c f経路の欠失は、いくつかの型の癌の発達に関与している (N o v a k およびD e d h a r、1999)。

【0007】

グリコゲンシンターゼキナーゼ3 (G S K 3) はまたMUC1/CDに直接結合し、そして - カテニン結合モチーフに隣接するD R S P Y部位のセリンをリン酸化し、それによってMUC1および - カテニン間の結合を減少させる (L i ら、1998)。それに加えて、c - S r cチロシンキナーゼもMUC1/CDのS P Y E K Vモチーフに結合およびリン酸化し、MUC1/CDと - カテニンとの間の相互作用の増加、およびMUC1/CDとG S K 3 との間の相互作用の減少を引き起こす (L i ら、2001)。

【0008】

MUC1はまた、細胞表面において上皮増殖因子受容体 (E G F - R、H E R 1) と構成的に結合し、そして活性化E G F - RはMUC1/CDのS P Y K E Vモチーフのリン酸化を誘導する (L i ら、2001 (a))。MUC1/CDのE G F - Rによるリン酸化

10

20

30

40

50

は、MUC1とc-Srcおよびβ-カテニンとの相互作用を増加させ、そしてMUC1とGSK3βとの間の相互作用を下方制御するようである。これらの結果は、MUC1がc-Src、β-カテニン、およびGSK3β経路のシグナル伝達を統合し、そして癌細胞におけるMUC1の異常な過剰発現によるこの統合されたシグナル伝達の異常調節(dysregulation)は、形質転換した表現型を促進し得るというモデルを支持する(Liら、2001(a))。

【0009】

アルマジロタンパク質p120^{cas}はまたMUC1/CDに直接結合し、p120の核局在化を引き起こす(LiおよびKufel、2001)。P120は、細胞の形質転換に関係し、そしてp120発現の変化したパターンが、癌において観察された(例えばJawaharirら、1999; Shimazuiら、1996を参照のこと)。p120はv-Srcチロシンキナーゼ基質であり、E-カドヘリンに結合し、そして転写活性化補助因子として関係する(Reynoldsら、1989; Reynoldsら、1994; DanielsおよびReynolds、1999)。p120が細胞連結部および核の両方に局在化するという観察は、β-カテニンのような、細胞接着および遺伝子転写両方の調節におけるp120の役割を支持した。MUC1およびp120の結合による細胞接着の減少は、MUC1発現腫瘍細胞の転移可能性の増加に関与し得る。

【0010】

従って、入手可能な証拠は、MUC1/CDが細胞外ドメインから核へシグナルを伝達するために機能し、そして接着レセプターおよび成長因子シグナル伝達および細胞の形質転換に関するシグナル伝達メカニズムを利用することを示す。MUC1によるシグナル伝達およびその細胞形質転換における推定される役割の調節に関連する組成物および方法を同定することが望ましい。

【0011】

(発明の要旨)

本発明は、MUC1の細胞外ドメインが内因性リガンドの結合ドメインを提供し、そしてそのような結合がMUC1の発癌性機能および癌細胞の増殖に関連するという発見に関連する、使用方法および薬学的組成物を包含する。

【0012】

広範には、本発明は、癌を処置する組成物および方法に関し、これらは、MUC1/EC D調節性の細胞増殖のアンタゴニストからなるかまたはこのアンタゴニストを含む、薬剤または治療方法を使用する。好ましくは、この方法および組成物は、MUC1/EC Dに結合する薬剤、またはMUC1の発癌性機能を活性化するMUC1/EC Dリガンドに結合する薬剤を含む。

【0013】

従って、本発明の1つの局面は、有効な量のMUC1/EC Dアンタゴニストを投与する工程を包含する、癌細胞の増殖を阻害する方法を提供する。MUC1/EC Dアンタゴニストは、細胞表面に提示されるMUC1/EC Dの量をダウンレギュレートもしくは抑制するか、またはMUC1/EC Dへの結合に利用可能な野生型MUC1/EC Dリガンドのレベルをダウンレギュレートする薬剤であるか、および/あるいは、MUC1/EC D結合インヒビターである。「MUC1/EC D結合インヒビター」とは、MUC1/EC DへのMUC1野生型リガンド(適切には、これらには、ニューレグリン(neuregulin)2アイソフォーム5(配列番号2)、ニューレグリン2アイソフォーム6(配列番号3)、およびその適切なフラグメントが含まれ得る)の結合を阻害する化合物、またはMUC1/EC Dへの配列番号4内のエピトープに結合する抗体の結合を阻害する化合物を意味する。ニューレグリン2アイソフォーム5(配列番号2)およびニューレグリン2アイソフォーム6(配列番号3)の適切なフラグメントは、MUC1/EC Dに結合するフラグメントである。MUC1/EC D結合インヒビターは、そのような結合を阻害する抗体、ポリペプチド、および小分子を含む。「MUC1/EC D-P1結合インヒビター」とは、MUC1/EC Dへの配列番号4内のエピトープに結合する抗体の結合の阻

10

20

30

40

50

害によって同定される、MUC1/ECD結合インヒビターを意味する。

【0014】

本発明の1つの実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、配列番号1のポリペプチド、または以下のような配列番号1の少なくとも4個連続するアミノ酸を含むフラグメントである：TINV、NVHD、VHDV、DVET、VETQ、ETQF、TQFN、QFNQ、FNQY、NQYK、QYKT、YKTE、KTEA、TEAA、EAAAS、AASR、ASRY、SRYN、RYNL、YNLT、NLTI、LTIS、TISD、ISDV、SDVS、DVSV、VSVS、SVSD、VSDV、SDVP、DVPF、VPFP、PFPF、FPFS、PFS A、FSAQ、SAQS、AQSG、QSGA、およびSGAG。他の実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、前述のペプチドの保存的改変体である。別の実施形態において、MUC1/ECD結合インヒビターは、配列番号4、配列番号5、またはその保存的改変体のポリペプチドである。

10

【0015】

本発明の別の実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、MUC1/ECD配列（配列番号1）の1以上のエピトープに結合する抗体である。本発明の他の実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、配列番号2または配列番号3内のエピトープに結合する抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。モノクローナル抗体は、ヒト化され得るか、またはヒトモノクローナル抗体であり得る。これはまた、二重特異性（bispecific）抗体であり得るか、または抗原結合領域を含むフラグメントであり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、化学療法剤、放射性同位元素、毒素、あるいは細胞溶解または細胞傷害性免疫反応を誘導するエフェクターに結合体化される。そのような結合体は、サイトカイン、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、またはIgG1免疫グロブリンのFc領域を含み得る。

20

【0016】

別の実施形態において、この方法はさらに、MUC1/ECDアンタゴニストと組み合わせた、化学療法剤または放射線の投与を包含する。化学療法剤としては、代表的には、アルキル化剤、トポイソメラーゼインヒビター、代謝拮抗物質、チューブリン相互作用因子、抗ホルモン剤、オルニチンデカルボキシラーゼインヒビター、およびチロシンキナーゼインヒビターが挙げられる。

30

【0017】

種々の実施形態において、癌細胞は、皮膚癌細胞、前立腺癌細胞、肺癌細胞、脳癌細胞、乳癌細胞、卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、結腸癌細胞、胃癌細胞、および白血病細胞からなる群から選択される。

【0018】

本発明の別の局面は、哺乳動物において腫瘍の増殖を抑制する方法であって、この方法は、治療的な量の化学療法剤または放射線および有効量のMUC1/ECDアンタゴニストを投与することを包含する。好ましい実施形態において、哺乳動物はヒトである。1つの実施形態において、その方法は、難治性の腫瘍を治療するための方法であって、この方法は、1以上の化学療法剤での処置の後に、治療的な量の化学療法剤または放射線および有効量のMUC1/ECDアンタゴニストを投与することを包含する。種々の実施形態において、腫瘍は、皮膚、前立腺、肺、脳、乳房、卵巣、子宮頸、肝臓、膵臓、結腸、胃、または造血系の腫瘍である。

40

【0019】

本発明の他の局面は、MUC1/ECDアンタゴニストおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物に関する。アンタゴニストが、MUC1/ECD結合インヒビターである場合、薬学的組成物は、配列番号1のポリペプチド、またはその少なくとも4個連続するアミノ酸を含むフラグメント、あるいはそれらの保存的改変体であり得る、MUC1/ECD結合インヒビター、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。いくつかの実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、配列番号4、配列番号5、または

50

その保存的変体のポリペプチドであり得る。他の実施形態において、薬学的組成物は、MUC1/EC D結合インヒビターであって、かつ配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

【0020】

本発明はまた、MUC1/EC D結合インヒビター活性をスクリーニングする方法を包含する。1つの実施形態は、MUC1/EC Dへのリガンドの結合を阻害する化合物を同定する方法を包含し、この方法は、以下の工程を包含する：(a)配列番号1または配列番号5を含むポリペプチドを提供する工程；(b)このポリペプチドを、試験化合物およびMUC1の細胞外ドメインに対するリガンドと接触させる工程であって、このリガンドは、MUC1媒介性癌細胞増殖を刺激するMUC1/EC Dに対する抗体、およびMUC1/EC Dに結合しそして癌細胞増殖を刺激する野生型リガンドからなる群から選択される、工程；および(c)MUC1/EC Dの抗体または野生型リガンドの結合が、適切なコントロールと比較して減少されるか否かを決定する工程。適切なコントロールとしては、試験化合物が除外されたアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、MUC1媒介性癌細胞増殖を刺激するMUC1/EC D抗体は、配列番号4内のエピトープに結合する抗体である。他の実施形態において、野生型リガンドとしては、適切には、ニューレグリン2アイソフォーム5(配列番号2)およびその適切なフラグメント、およびニューレグリン2アイソフォーム6(配列番号3)およびその適切なフラグメントが挙げられ得、ここで、適切なフラグメントは、配列番号1に結合しかつ適切な増殖刺激活性を有するフラグメントである。

【0021】

別の実施形態は、MUC1発現癌細胞の増殖を阻害する化合物を同定する方法であり、この方法は、以下の工程を包含する：(a)MUC1発現癌細胞の集団を提供する工程；(b)このMUC1発現癌細胞の集団を、試験化合物およびMUC1の細胞外ドメインに対するリガンドと接触させる工程であって、このリガンドは、MUC1媒介性癌細胞増殖を刺激するMUC1/EC Dに対する抗体、およびMUC1/EC Dに結合しそして癌細胞増殖を刺激する野生型リガンドからなる群から選択される、工程；および(c)MUC1発現癌細胞の集団の増殖が、適切なコントロールと比較して減少されるか否かを決定する工程。適切なコントロールとしては、試験化合物が除外されたアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。1つの実施形態において、MUC1媒介性癌細胞増殖を刺激するMUC1/EC D抗体は、配列番号4内のエピトープに結合する抗体である。他の実施形態において、野生型リガンドとしては、適切には、ニューレグリン2アイソフォーム5(配列番号2)およびその適切なフラグメント、およびニューレグリン2アイソフォーム6(配列番号3)およびその適切なフラグメントが挙げられ得、ここで、適切なフラグメントは、配列番号1に結合しかつ適切な増殖刺激活性を有するフラグメントである。

【0022】

本発明はまた、MUC1/EC Dの発現をダウンレギュレートする化合物を同定する方法を提供する。この方法は、以下の工程を包含する：(a)MUC1発現癌細胞の集団を提供する工程；(b)このMUC1発現癌細胞の集団を試験化合物と接触させる工程；(c)抗MUC1/EC D抗体を使用して、このMUC1発現癌細胞においてMUC1/EC Dを含むポリペプチドを同定する工程；および(d)MUC1/EC Dを含むポリペプチドの発現が、試験化合物が排除されたコントロールと比較して減少されるか否かを決定する工程。

【0023】

本発明はまた、前述の方法によって同定された化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物を包含する。

【0024】

(発明の詳細な説明)

(I. ポリペプチド)

本発明のポリペプチドは、合成技術、あるいはゲノムクローニング法またはcDNAクローニング方法を使用する組換え技術によって作製され得る。ポリペプチドは、固相ペプチド合成または溶液相ペプチド合成を使用して、慣用的に合成され得る。化学的合成によって比較的短いポリペプチド（例えば、P0（配列番号9）、P1（配列番号4）、P2（配列番号6）、およびP3（配列番号7））を調製する方法は、当該分野で周知である。このようなポリペプチドは、例えば、市販の装置および試薬（例えば、Milligen（Bedford, Mass）、またはApplied Biosystems - Perkin Elmer（Foster City, CA）から入手可能な装置および試薬）を使用する、固相ペプチド合成技術によって産生され得る。あるいは、このようなポリペプチドのセグメントを、固相合成によって調製し、そしてDawsonら（1994）によって記載されるようなセグメント縮合方法を使用して共に連結させ得る。このようなポリペプチドの化学的合成中に、置換されるべき残基を異なるアミノ酸モノマーで置き換えることによって、任意のアミノ酸置換が、簡単に達成され得る。

10

【0025】

野生型MUC1/ECドリガンドポリペプチドは、本明細書中実施例3で例示されるように同定され得る。次いで、組換えMUC1/ECドリガンドを、当該分野で公知の方法によって調製し得る。

【0026】

本発明のポリペプチドは、改変体ポリペプチドを含む。「改変体」ポリペプチドによって、その配列中の1以上の部位における1以上のアミノ酸の欠失または付加；あるいはその配列中の1以上の部位における1以上のアミノ酸の置換によって改変されたポリペプチド配列が意図される。本発明によって包含される改変体ポリペプチドは、それらが由来するポリペプチドの所望の生物学的活性を保持する。このような改変体は、それらが由来するポリペプチドのアミノ酸配列に対する、少なくとも40%、50%、60%、70%、一般的には、少なくとも75%、80%、85%、好ましくは、約90%～95%またはそれ以上、そしてより好ましくは、約98%またはそれ以上の配列同一性を有する。天然ポリペプチド配列と改変体配列と間の配列同一性パーセント（相同性とも呼ばれる）は、SmithおよびWaterman（1981）のアルゴリズムを用いる、Gapプログラム（Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix（登録商標）、Genetics Computer Group, University Research Park, Madison, Wisconsin）を用いて、2つの配列を比較することによって決定され得る。

20

30

【0027】

本発明のポリペプチドにはまた、1以上の保存的置換を有する改変体ポリペプチドが包含される。アミノ酸置換を保存的であると分類するために、アミノ酸を以下のようにグループ化する：グループI（疎水性側鎖）：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile；グループII（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr；グループIII（酸性側鎖）：asp、glu；グループIV（塩基性側鎖）asn、gln、his、lys、arg；グループV（鎖の配向に影響を与える残基）：gly、pro；およびグループVI（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。保存的置換は、同じクラスのアミノ酸間の置換を含む。

40

【0028】

ポリペプチドの化学的誘導体も本発明に含まれる。「化学的誘導体」とは、官能性側鎖基の反応によって化学的に誘導体化された1以上の残基を有する、対象ポリペプチドをいう。このような誘導体化された残基としては、例えば、遊離アミノ基が、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成するように誘導体化された分子が挙げられる。遊離カルボキシル基は、塩、メチルエステルおよびエチルエステルまたは他の型のエステル、あるいはヒドラジドを形成するように誘導体化され得る。遊離の水酸基は、O-アシル誘導体またはO-アルキル誘導体を形成するように誘導体化され得る。ヒスチジンのイミダゾ

50

ール基は、N - インベンジルヒスチジン (N - i m b e n z y l h i s t i d i n e) を形成するように誘導体化され得る。

【 0 0 2 9 】

本明細書中で使用される用語「ポリペプチド」は、アミノ酸の分子鎖を示し、そして特定の長さの生成物について言及しない。

【 0 0 3 0 】

(I I . 抗体)

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、そして特に、それらが所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体 (全長モノクローナル抗体を含む) 、ポリクローナル抗体、多重特異的抗体 (例えば、二重特異性 (b i s p e c i f i c) 抗体) および抗体フラグメントが含まれる。

10

【 0 0 3 1 】

ポリクローナル抗体を生成する方法は、当該分野において周知である。簡単には、抗原性組成物で動物を免疫し、そしてその免疫された動物から血清を回収することによって、ポリクローナル抗体が調製される。広範囲の動物種 (ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモットおよびヤギを含む) が、抗血清の産生のために使用され得る。

【 0 0 3 2 】

当該分野において周知であるように、所定の組成物は、その免疫原性において異なり得る。従って、しばしば、ポリペプチド免疫原をキャリアに結合させることによって達成され得るように、宿主免疫系をブーストする必要がある。例示的かつ好ましいキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン (K L H) およびウシ血清アルブミン (B S A) である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンのような他のアルブミンも、キャリアとして使用され得る。ポリペプチドをキャリアタンパク質へ結合体化させる手段は、当該分野で周知であり、そしてこれらには、グルタルアルデヒド、m - マレイミドベンゾイル - N - ヒドロキシスクシニミドエステル、カルボジイミド、およびビスジアゾ化ベンジジンが挙げられる。また当該分野において周知であるように、特定の免疫原組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知である、免疫反応の非特異的刺激因子の使用によって増強され得る。例示的かつ好ましいアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント (殺菌した *M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s* を含む、免疫反応の非特異的刺激因子) 、不完全フロイントアジュバントおよび水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

20

30

【 0 0 3 3 】

免疫された動物の血清は、種々の適用に使用され得るか、または所望の抗体画分を、周知の方法 (例えば、固体マトリクスに結合された別の抗体またはペプチドを使用する、アフィニティークロマトグラフィー) によって精製され得る。

【 0 0 3 4 】

モノクローナル抗体 (M A b) は、周知の技術 (例えば、本明細書中において参考として援用される、米国特許第 4 , 1 9 6 , 2 6 5 号において例示される技術) を用いて容易に調製され得る。代表的には、この技術は、選択された免疫原組成物 (例えば、精製または部分的に精製された発現ポリペプチド) で適切な動物を免疫する工程を包含する。免疫組成物は、抗体産生細胞を効果的に刺激する様式で投与される。

40

【 0 0 3 5 】

モノクローナル抗体 (M A b) を生成する方法は、一般的には、ポリクローナル抗体を調製する手順と同じ手順で開始する。ラットの使用は、特定の利点を提供し得るが (G o d i n g , 1 9 8 6) 、マウスが、好ましい。B A L B / c マウスは、最も慣用的に使用され、そして一般的に、より高いパーセントの安定な融合物を生成する。

【 0 0 3 6 】

免疫後、抗体を産生する能力を有する体細胞 (詳細には、Bリンパ球 (B 細胞)) を、M A b 生成プロトコールにおける使用のために選択する。これらの細胞は、生検脾臓、扁桃またはリンパ節から得られ得るか、または末梢血サンプルから得られ得る。脾臓細胞およ

50

び末梢血細胞が、好ましい。しばしば、動物のパネルを免疫して、そして最も高い抗体力価を有する動物の脾臓を取り出し、そしてその脾臓からリンパ球を得る。

【0037】

次いで、免疫された動物由来の抗体産生Bリンパ球を、不死骨髄腫細胞（一般的には、免疫された動物と同じ種の骨髄腫細胞）の細胞と融合する。ハイブリドーマ産生融合手順で使用するために適切な骨髄腫細胞株は、好ましくは、非抗体産生であり、高い融合効率を有し、そして所望の融合された細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を支持する特定の選択培地において増殖不可能にする、酵素欠損を有する。選択されたハイブリドーマを連続的に希釈し、そして個々の抗体産生細胞株にクローニングし、次いで、これらが無制限に増殖させてM A bを提供する。

10

【0038】

本発明に従って、本発明のモノクローナル抗体のフラグメントを、ペプシンまたはパバインのような酵素による消化および/または化学的還元によるジスルフィド結合の切断を含む方法によって、上記で記載したように産生されたモノクローナル抗体から得られ得る。あるいは、本発明によって包含されるモノクローナル抗体フラグメントは、自動化合成機を用いて合成され得るか、またはE . c o l i または他の組換え微生物および細胞系における、全長遺伝子または遺伝子フラグメントの発現によって合成され得る。

【0039】

本発明はまた、種々の抗体結合体を包含する。フルオレセインマーカ－との結合体は、当該分野で公知の方法（例えば、結合試薬の存在下での結合体化、またはイソチオシアネートと反応させることによって）によって調製される。金属キレートとの結合体は、同様に産生される。抗体が結合体化され得る他の部分としては、本明細書中で参考として援用される、G a n s o w、1991において記載されるような、¹³¹I、⁹⁰Y、¹⁰⁵Rh、⁴⁷Sc、⁶⁷Cu、²¹²Bi、²¹¹At、¹⁸⁸Re、¹⁰⁹Pd、⁴⁷Sc、²¹²Pbおよび¹⁵³Smなどのような放射性核種が挙げられる。

20

【0040】

本発明のモノクローナル抗体はまた、従来の化学療法剤（例えば、代謝拮抗物質、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質またはアルキル化剤）に結合され得る。標的化するために抗体に結合され得る薬物としては、ドキソルピシン、シクロホスファミド、シスプラチン、アドリマイシン、エストラムスチン、フルオロウラシル、エチニルエストラジオール、ミトキサントロン、メトトレキサート、フィナステリド（f i n a s t e r i d e）、タキソールおよびメゲストロールのような化合物が挙げられる。結合の方法は、共有結合によって直接的であり得るか、または連結分子を介して間接的であり得、そして一般的には、選択された特定の薬物について当該分野で公知であり、そして種々の二官能性タンパク質結合剤を用いて作製される。このような試薬の例は、S P D P、I T、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、ジメチルアジピミデート（a d i p i m i d a t e）H C l）、活性エステル（例えば、ジスクシニミジルスベレート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビスアジド（b i s a z i d o）化合物（例えば、ビス（R - アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビスジアゾニウム誘導体（例えば、ビス（R - ジアゾニウムベンゾイル）エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トリレン2,6 - ジイソシアネート）、ビス活性化（b i s - a c t i v e）フッ素化合物（例えば、1,5 - ジフルオロ - 2,4 - ジニトロベンゼン）である（例えば、本明細書中で参考として援用される、T h o r p eら、1982を参照のこと）。

30

40

【0041】

本発明の抗体はまた、細胞溶解または細胞傷害性免疫反応を誘導する、種々の毒素分子またはエフェクター（例えば、I g G 1免疫グロブリン）と結合体化され得る。従って、2つの成分は、種々の周知の化学手順のいずれかによって化学的に結合させ得る。例えば、その連結は、ヘテロ二官能性架橋剤（例えば、S P D P、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなど）によるものであり得る。毒素分子もまた、組換え手段（単鎖抗体の産生を介する）によって、抗体またはその結合領域に融合され得る。タンパク質鎖をコードする遺

50

伝子は、当業者に公知の任意のクローニング手順によって、cDNA形態またはゲノム形態でクローニングされ得る（例えば、Sambrookら、1989を参照のこと）。種々の免疫毒素の組換え産生は、当該分野で周知であり、そして例えば、Thorpeら、1982(a)、Waldman、1991、およびPastanら、1992（これら全ては、本明細書中で参考として援用される）において見出され得る。種々の毒素分子が、本明細書中に記載の抗体結合体または融合タンパク質における、細胞傷害性ドメインとしての使用に適切である。免疫毒素の毒性成分として有用であることが公知の任意の毒素（好ましくは、組換え発現され得るタンパク質毒素）が、使用され得る。細胞傷害性ドメインとして特に有用なのは、細菌毒素（例えば、シュードモナス外毒素A（PE）、ジフテリア毒素、志賀毒素および志賀様毒素）、ならびに植物および真菌由来のリボソーム不活性化毒素（リシン、-サルシン、レストリクトシン（restrictotoxin）、マイトジェリン（mitogellin）、トリカンソシン（tricanthosin）、サポリン-G（saporin-G）、サポリン-1、モモリジン（momordin）、ゲロニン（gelonin）、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、モデシン（modeccin）、およびGenetically Engineered Toxins、A. Frankel編、Marcel Dekker, Inc.、1992（本明細書中で参考として援用される）に記載される他の毒素）、およびそれらのタンパク質の任意の組換え誘導体である（本明細書中で参考として援用される、Olsnes、1981；米国特許第4,675,382号；および米国特許第4,894,443号を参照のこと）。

10

20

【0042】

抗体はまた、二重特異性抗体であり得、これは、MUC1/ECDおよび抗原の両方を認識し、この抗原は、サイトカイン（例えば、IL-1、TNF およびCD16、CD2、CD3L.C.、CD28）の放出を促進し、次いで、これらが、それぞれ、IFNまたはTNFの放出を活性化する。

【0043】

本発明のMAbは、非ヒト（例えばマウス）MAbの「ヒト化」形式を含むキメラMAbを含む。ヒト化MAbは、最低限の非ヒト免疫グロブリン由来の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの部分について、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、そこでレシピエントの超可変領域由来の残基が、望ましい特異性、親和性および能力を有する、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類のような非ヒト種（ドナー抗体）の超可変領域由来の残基で置換されている。ある場合には、ヒト免疫グロブリンの枠組み残基が、対応する非ヒト残基で置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見出されない残基を含み得る。これらの修飾を、抗体の性能をさらに精密にするために行なう。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、そして典型的には2つの可変ドメインを実質上全て含む。ここで全ての、または実質上全ての超可変領域は非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、そして全ての、または実質上全ての枠組み領域はヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、任意で、少なくとも免疫グロブリン定常領域（Fc）の一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのものを含む（Jonesら、1986；Riechmannら、1988；およびPresta、1992を参照のこと）。本発明の治療的方法において、完全ヒトMAbが好ましい。

30

40

【0044】

本発明の「一本鎖Fv」または「sFv」抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメインを含む。ここでこれらのドメインは1本のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Fvポリペプチドはさらに、sFvが抗原結合に望ましい構造を形成するのを可能にする、VHおよびVLドメイン間のポリペプチドリンカーを含む（Pluckthun、1994を参照のこと）。

【0045】

（III. スクリーニングおよび診断アッセイ）

本発明は、様々なリガンドのMUC1/ECDへの結合を阻害する化合物を同定する方法

50

を提供する。結合リガンドは、ニューレグリン2アイソフォーム5（配列番号2）、ニューレグリン2アイソフォーム6（配列番号3）およびMUC1/ECDに結合するいずれかのアイソフォームの断片、および好ましい実施形態においては、配列番号4中のエピトープに結合する抗体を含む。

【0046】

1つの実施形態において、スクリーニング方法は、インビトロ競合的結合アッセイを利用する。ここで前述のリガンドの、配列番号1または配列番号5を含むポリペプチドへの結合を阻害する試験化合物の能力を評価する。そのようなアッセイにおいて、MUC1/ECD由来の配列、配列番号1または配列番号5を含むポリペプチドを、別のタンパク質と結合し得るか、または融合タンパク質、例えば本明細書中において実施例3で例示されるGST-MUC1/ECD融合タンパク質として産生し得る。他の適当な結合物および融合タンパク質を、当該分野で公知の手順を利用して、当業者が作製し得る。ポリペプチドまたはMUC1/ECDリガンドを、放射性同位元素または蛍光標識（例えばフィコエリトリンおよびアロフィコシアニンのようなフィコピリンタンパク質、フルオレセインおよびテキサスレッド）で標識し得る。あるいは、ペルオキシダーゼのような酵素を使用して、そしてビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジンの系によって直接または間接的に結合し得る。試験化合物の導入時に減少した結合が、競合的結合を示す。

【0047】

リガンドのMUC1/ECDへの結合を阻害する化合物が、調節剤、すなわちニューレグリン2アイソフォーム5または6によるMUC1/ECD結合によって開始される生物学的活性のアンタゴニストまたはアゴニストであり得る。例えば、ポリペプチドP1（配列番号4）に対して産生された抗体は、野生型リガンドの結合を阻害すると予測されるが、MUC1/ECD結合部位に関してはアゴニストとして作用する。すなわち、それは癌細胞の増殖を刺激する。対照的に、MUC1/ECDポリペプチド配列番号1のような適当な化合物は、内因性野生型リガンドに結合して、それによってMUC1/ECDへの結合を阻害し、そして結果としてアンタゴニストとして作用する。すなわち、そうでなければMUC1/ECDリガンドの結合時に観察される癌細胞の増殖を阻害または減少させる。

【0048】

代替のスクリーニングアッセイは、MUC1発現癌細胞の増殖に関してアンタゴニストおよびアゴニスト活性を示す、MUC1/ECD結合阻害剤間を区別し得る。その方法は、MUC1陽性癌細胞、好ましくはヒト癌細胞の集団を必要とする。これは、MUC1を構成的に発現する細胞集団であり得るが、その集団は好ましくはMUC1を発現するように遺伝子工学的に作成した細胞型である。後者は、適当なコントロール細胞、例えば空のベクターで遺伝子工学的に操作した細胞を提供することに関して、そしてまたMUC1変異体を発現する細胞の構築を可能にするために、より用途が広い。遺伝子工学的に操作したMUC1癌細胞の例は、本明細書中で実施例2および4において例示されるような、SW480およびHCT116結腸癌細胞を含むがこれに限らない。MUC1/ECDリガンド誘導細胞増殖の阻害は、アンタゴニスト活性を有する試験化合物を示す。コントロールは、空のベクターで遺伝子工学的に操作した癌細胞（すなわちMUC1陰性）のインキュベーション、または試験化合物もしくはMUC1/ECDリガンドいずれかの非存在下におけるMUC1陽性細胞のインキュベーションを含み得る。後者のコントロールの1つは、アゴニストを同定する、すなわち試験化合物が存在し、そしてMUC1/ECDリガンドが存在しないインキュベーションで癌細胞増殖の刺激が観察される。アゴニスト活性の特異性を、操作したMUC1陰性細胞の使用によって確立する。

【0049】

さらに別のスクリーニングアッセイは、MUC1の細胞内ドメインのMUC1/ECDリガンド誘導リン酸化をモニターする。代替のスクリーニング方法論は、MUC1/ECDリガンドが誘導する、MUC1とEGF-R、s-Src、-カテニン、GSK3またはp120との結合のモニタリングを採用する。そのようなリン酸化およびタンパク質結合をモニターする方法は、Liら（1998）、Liら（2001）、Liら（200

10

20

30

40

50

1(a))ならびにLiおよびKuf e(2001)で記載され、これらは全て本明細書中で参考文献に組み込まれる。

【0050】

本発明はまた、MUC1/EC Dの発現をダウンレギュレートする化合物を同定する方法を提供する。本発明のいくつかの実施形態において、MUC1/EC Dに対する標識抗体を利用して、当該分野で公知の方法を用いて、フローサイトメトリーまたは免疫組織化学によって適当な細胞系統におけるMUC/EC Dの発現を視覚化する。あるいは、MUC1の発現を、免疫プロットングによって、または全細胞RNAを標識DNAプローブで、例えば本明細書中の実施例7で記載したようにプローブすることによって推定し得る。

【0051】

MUC1/EC Dの発現の推定を、診断方法論にも使用し得る。ここで、MUC1/EC Dに対する抗体を利用して、患者由来の細胞上のまたはその中のMUC1/EC Dの発現を調査する。そのような抗体を、患者における癌細胞を画像化するためにも利用し得る。画像化を、抗MUC1/EC D抗体を例えば放射性標識で標識すること、およびこの抗体を患者に注入すること、および当該患者の体内でこの抗体の位置をモニターすることによって行なう。

【0052】

(IV. 化学療法剤との組み合わせ)

本発明は、化学療法剤と組み合わせたMUC1/EC Dアンタゴニストの使用を含む。いかなる特定の理論にも制限されないが、MUC1はある化学療法剤によって誘導される遺伝子毒性ストレスに対するアポトーシス反応を阻害し、そしてそれによってそのような薬剤に対する抵抗性を誘導する。MUC1/EC Dアンタゴニストを使用して、化学療法剤に対するMUC1により媒介されるこの反応を軽減して、それによってそのような薬剤の有効性を増強し得る。これに関して、MUC1/EC Dアンタゴニストは、癌化学療法の後に残ったかまたは再発した癌を含む、化学療法剤に抵抗性の癌細胞の治療に有用である。前述の原理はまた、MUC1/EC Dアンタゴニストおよび電離放射線との組み合わせにも関係する。

【0053】

本発明の方法で有用な化学療法剤は、癌細胞を殺すおよび/または増殖を阻害するのに活性であることが知られている組成物および化合物の全範囲を含む。作用機構によってグループ分けした化学療法剤は、DNA相互作用薬剤、代謝拮抗物質、チューブリン相互作用薬剤、抗ホルモン剤、抗ウイルス剤、ODC阻害剤およびヒドロキシウレアのような他の細胞毒を含む。これら薬剤のいずれも本発明の方法で使用するのに適当である。

【0054】

DNA相互作用薬剤は、アルキル化剤、例えばシスプラチン、シクロホスファミド、アルトレタミン；プレオマイシンのようなDNA鎖切断薬剤；インターカレートするトポイソメラーゼII阻害剤、例えばダクチノマイシンおよびドキシソルピシン；エトポシドおよびテニポシドのようなインターカレートしないトポイソメラーゼII阻害剤；およびDNAの浅い溝に結合するプリカマイシンを含む。

【0055】

アルキル化剤は、細胞DNA、RNA、およびタンパク質分子、およびより小さいアミノ酸、グルタチオンおよび同様の化学物質と共有結合的な化学的付加物を形成する。一般的に、これらのアルキル化剤は、核酸、タンパク質、アミノ酸、またはグルタチオンのアミノ基、カルボキシル基、リン酸基、メルカプト基のような、細胞構成成分の求核性原子と反応する。癌治療におけるこれらアルキル化剤の機構および役割はよく理解されていない。典型的なアルキル化剤は、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；チオテパのようなアジリジン；ブスルファンのようなメタンスルホン酸エステル；カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシンのようなニトロソウレア；シスプラチン、カルボプラチンのような白金複合体；マイトマイシンおよびプロカルバジン、ダカルバジンおよ

10

20

30

40

50

びアルトレタミン (al tret emine) のような生物還元性 (bioreduct i ve) アルキル化剤；プレオマイシンを含む DNA 鎖切断薬剤を含む。

【0056】

トポイソメラーゼは、複製の間に一過性の DNA 鎖切断を始めて、鎖の自由な回転を可能にする、普遍的に存在する細胞酵素である。これら酵素の機能は、DNA の複製過程に決定的である。それら無しでは、DNA らせんのねじれたひずみが自由な回転を妨げ、DNA 鎖は適当に分離することができず、そして細胞は最後には分裂せずに死ぬ。Topo I は DNA 一本鎖切断の 3' 末端に結合し、一方 Topo II は二本鎖 DNA 切断の 5' 末端に結合する。DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤は、以下のものを含む：アムサクリン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、イダルピシンおよびミトザントロンのようなインターカレーター；エトポシドおよびテポシドのようなノンインターカレーター；イリノテカン (CPT - II) およびトポテカンを含むカンプトテシン (camptothecin)。代表的な DNA の浅い溝に結合する薬剤はプリカマイシンである。

10

【0057】

代謝拮抗物質は、一般的には、2つの主要な機構の1つまたは他方によって、核酸の産生を阻害することによって細胞毒性活性を発揮する。いくつかの薬剤は、DNA 合成の直接の前駆体であるデオキシリボヌクレオシド 3リン酸の産生を阻害して、従って DNA 複製を阻害する。いくつかの化合物は、プリンまたはピリミジンに十分似ているので、同化ヌクレオチド経路においてそれらを置換し得る。これらのアナログを次いで、それらの正常な対応物の代わりに、DNA および RNA へ置換し得る。本明細書中で有用な代謝拮抗物質は以下のものを含む：メトトレキサートおよびトリメトレキサートのような葉酸アンタゴニスト；フルオロウラシル、フルオロデオキシウリジン、アザシチジン、シタラビン、およびフロクスウリジンのようなピリミジンアンタゴニスト；メルカプトプリン、6 - チオグアニン、フルダラビン、ペントスタチンを含むプリンアンタゴニスト；シタラビン、フルダラビンを含む糖修飾アナログ；ヒドロキシウレアを含むリボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤。

20

【0058】

チューブリン相互作用薬剤は、ポリマー化して細胞微小管を形成するタンパク質であるチューブリンの特定の部位に結合することによって細胞分裂を阻害する。微小管は重要な細胞構造ユニットである。相互作用薬剤がタンパク質に結合すると、細胞は適当に微小管を形成できない。チューブリン相互作用薬剤は、ビンクリスチンおよびビンブラスチン、アルカロイドおよびタキサン（バクリタキセルおよびドセタキセル (docetaxel)）の両方を含む。

30

【0059】

その作用機構は異なるが、タキサンおよびビンカアルカロイドは両方とも、細胞微小管に対してその生物学的効果を発揮する。タキサンは、紡錘形微小管のタンパク質サブユニットであるチューブリンのポリマー化を促進するように作用する。その最終的な結果は、微小管の脱ポリマー化の阻害であり、それは安定な、そして非機能的な微小管の形成を引き起こす。これは、微小管システム内の動的平衡を破壊し、そして細胞周期を後期 G₂ および M 期で停止させて、細胞複製を阻害する。

40

【0060】

タキサンと同様に、ビンカアルカロイドも、細胞内の微小管システムに影響を与えるように作用する。タキサンと対照的に、ビンカアルカロイドはチューブリンに結合して、そしてチューブリンサブユニットが微小管へポリマー化するのを阻害または予防する。ビンカアルカロイドはまた、微小管の脱ポリマー化を誘導し、それは微小管の組み立てを阻害して、そして細胞の中期での停止を媒介する。ビンカアルカロイドはまた、核酸およびタンパク質合成；アミノ酸、環状 AMP、およびグルタチオン合成；細胞呼吸にも効果を発揮し、そしてより高い濃度で免疫抑制活性を発揮する。

【0061】

50

抗ホルモン剤は、最終レセプター臓器においてホルモン作用を阻害することによって細胞毒性活性を発揮する。いくつかの異なる型の新生物が、細胞増殖のためにホルモン刺激を必要とする。抗ホルモン剤は、ホルモン作用を阻害することによって、新生物細胞から複製するために必要な刺激を奪う。細胞がそのライフサイクルの最後に達したら、それらは通常分裂およびさらなる悪性細胞を産生することなく死ぬ。抗ホルモン剤は、典型的には天然の供給源由来であり、そしてエストロゲン、結合型エストロゲンおよびエチニルエストラジオールおよびジエチルスチルベストロール (diethylstilbestrol)、クロロトリアニセンおよびイデネストロール (ideneestrol) ; カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロン、およびメゲストロールのようなプロゲステン ; テストステロン、プロピオン酸テストステロンのようなアンドロゲン ; フルオキシメステロン、メチルテストステロンを含む。

10

【0062】

副腎コルチコステロイドは、天然副腎コルチゾールまたはヒドロコルチゾン由来である。それらはその抗炎症性の有用性、およびいくつかの有糸分裂を阻害し、そしてDNA合成を停止させる能力のために使用される。これらの化合物は、プレドニゾン、デキサメタゾン、メチルプレドニゾン、およびプレドニゾンを含む。Leutinizin 放出ホルモン薬剤またはゴナドトロピン放出ホルモンアンタゴニストは、主に前立腺癌の治療において使用される。これらは、酢酸ロイプロリドおよび酢酸ゴセレリンを含む。それらは、精巣におけるステロイドの生合成を阻害する。

【0063】

20

抗ホルモン剤は、タモキシフェンのような抗エストロゲン剤、フルタミドのような抗アンドロゲン剤、およびミトーテンおよびアミノグルテチミドのような抗副腎薬剤を含む。

【0064】

ODC (またはオルニチンデカルボキシラーゼ) 阻害剤は、新生物細胞増殖に重要なポリアミン生合成の律速酵素である、ODCの活性を減少させるまたは他の方法で阻害することによって癌細胞および前癌細胞の増殖を阻害する。特に、オルニチンがポリアミン、ブトレシンに変換され、続いてブトレシンがスペルミジンおよびスペルミンに変換される、ポリアミンの生合成は、様々な癌および癌細胞系統において新生物増殖で必要不可欠な生化学的発生であるようであり、そしてそのような新生物細胞におけるODC活性の阻害またはODCの減少は、そのような細胞におけるポリアミンレベルを抑制して細胞増殖の停止 ; より分化した細胞形態、および細胞老化および死さえ引き起こすことが示された。これに関して、ODCまたはポリアミン合成阻害剤は、癌の再発または前癌細胞から癌細胞への転換を防ぐように機能する、細胞毒性または細胞溶解薬剤よりも細胞毒性の高い薬剤であると考えられる。適当なODC阻害剤は、エフロルニチンまたは - ジフルオロメチル - オルニチン、経口で利用可能な不可逆性ODC阻害剤、ならびに前臨床および臨床研究の様々な段階にある様々なポリアミンアナログである。

30

【0065】

他の細胞毒素は、細胞機能の維持または細胞有糸分裂に必要な様々な細胞過程に干渉または阻害する薬剤、およびアポトーシスを促進する薬剤を含む。これに関して、ヒドロキシウレアは酵素リボヌクレオチドレダクターゼの阻害剤を通して作用するようであり、一方アスパラギナーゼはアスパラギンを非機能的なアスパラギン酸に酵素的に変換して、それによって腫瘍におけるタンパク質合成を阻害する。

40

【0066】

本発明のMUC1/ECDAンタゴニストの組成物をまた、トラスツズマブ (ハーセプチン (H)) のようなHER-2に対する抗体と組み合わせて使用し得る。それに加えて、本発明はまた、チロシンキナーゼ阻害剤のような、表皮成長因子受容体相互作用薬剤と組み合わせて、MUC1ドメインアンタゴニストを使用することも含む。チロシンキナーゼ阻害剤は、適当にイマチニブ (imatinib) (Novartis)、OSI-774 (OSI Pharmaceuticals)、ZD-1839 (AstraZeneca)、SU-101 (Sugen) およびCP-701 (Cephalon) を含む

50

。

【 0 0 6 7 】

本発明の治療方法において使用される場合、選択された化学療法剤は、現在市販のあらゆる処方で、そして単一薬剤の使用のために認可されたラベルの用法以下または以内に含まれる投与量で、簡便に使用し得ることが企図される。

【 0 0 6 8 】

(V . 電離放射線)

本発明において、「電離放射線」という用語は、電離（電子の獲得または損失）を産生するために、十分なエネルギーを有する、または核相互作用によって十分なエネルギーを発生させ得る粒子または光子を含む放射線を意味する。典型的なおよび好ましい電離放射線は、X線である。X線を標的組織または細胞に伝達する手段は、当該分野で周知である。所定の細胞において必要な電離放射線の量は、一般的にはその細胞の性質に依存する。有効な量の放射線を決定する手段は、当該分野で周知である。本明細書中で使用される、電離放射線の「有効な量」という用語は、本発明のMUC1 / ECDアンタゴニストと組み合わせて、任意でさらに化学療法剤と組み合わせて与えた時に、細胞の損傷または死を産生する電離放射線の量を意味する。

【 0 0 6 9 】

X線の投与量範囲は、延長した期間（3から4週間）に50～200レントゲンの1日投与量から、2000～6000レントゲンの単回投与の範囲である。放射性同位体の投与量範囲は広く様々であり、そして同位体の半減期、放出される放射線の強さおよび型、ならびに新生物細胞による取り込みに依存する。

【 0 0 7 0 】

外部の手段に加えて、放射線を組織へ伝達するあらゆる適当な手段を本発明において採用し得る。例えば、まず腫瘍の抗原と免疫反応する放射性標識抗体を提供すること、続いて有効な量の放射性標識抗体を腫瘍へ送達することによって、放射線を伝達し得る。それに加えて、放射性同位体を、電離放射線を組織または細胞へ送達するために使用し得る。

【 0 0 7 1 】

(V I . MUC1 / ECD発現のダウンレギュレーション)

本発明はまた、MUC1 / ECD発現をダウンレギュレートする化合物を含む。1つのそのような化合物は、イソクマリンNM-3（2-（8-ヒドロキシ-6-メトキシ-1-オキソ-1H-2-ベンゾピラン-3-イル）プロピオン酸）である。NM-3およびMUC1 / ECDの発現をダウンレギュレートするのに適当な他のイソクマリンが、米国特許第6,020,363号において開示され、それは全体として本明細書中で参考文献に組み込まれる。他の適当な化合物は、2-メトキシエストラジオールおよび2-ヒドロキシエストラジオール（hydroxyestradiol）のような、2-置換エストラジオール化合物を含む。これらおよび他の適当なエストラジオール誘導体が、米国特許第6,239,123号において開示され、それは全体として本明細書中で参考文献に組み込まれる。MUC1 / ECD発現をダウンレギュレートするのに適当な他の化合物は、下記で記載するように、MUC1をコードする核酸分子を標的にしたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。

【 0 0 7 2 】

(V I I . アンチセンスオリゴヌクレオチド)

本発明はまた、MUC1ならびにニューレグリン2アイソフォーム5および6のようなMUC1 / ECD野生型リガンドをコードする核酸分子の機能を調節するのに使用するために、アンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドを採用する。MUC1発現の阻害は、MUC1 / ECDリガンドとの結合に利用可能なMUC1 / ECDのレベルを減少させる。MUC1 / ECDの内因性リガンドの発現の阻害は、そのようなリガンドのMUC1 / ECDへの結合に付随する癌細胞に対する増殖効果を阻害または減少させる。アンチセンス方法論は、核酸は「相補的配列」と対を作る傾向があるという事実を利用する。相補的とは、ポリヌクレオチドは、標準的なワトソン-クリック相補的ルールによって塩基対形

10

20

30

40

50

成し得るものであることを意味する。本発明のオリゴヌクレオチドは、情報配列、すなわちタンパク質をコードするもの、および5'非翻訳領域、3'非翻訳領域、5'キャップ領域およびイントロン/エキソン連結部のような他の関連するリボヌクレオチドに対して完全にまたは部分的に標的化し得る。従って、本発明は、MUC1および/またはニューレグリン2アイソフォーム5および6のようなMUC1/ECN野生型リガンドをコードする核酸、好ましくはmRNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供する。mRNAへの干渉の全体効果は、ニューレグリンアイソフォーム5および/または6の発現の調節である。そのような調節を、当該分野で慣習的である方法で測定し得る。それに加えて、癌細胞増殖または腫瘍増殖に対する効果を評価し得る。

【0073】

オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸配列に100%相補的である必要はないことが理解される。オリゴヌクレオチドの標的に対する結合が標的分子の正常機能に干渉して有用性の損失を引き起こし、そして特異的な結合が望ましい条件下で、すなわちインビボアッセイまたは治療的处理の場合には生理的条件下で、非標的配列に対するオリゴヌクレオチドの非特異的な結合を避けるのに十分な程度の相補性が存在する場合、オリゴヌクレオチドは特異的にハイブリダイズ可能である。

【0074】

本発明によるアンチセンス化合物は、好ましくは約4から約50の核塩基を含む。約8から約30の結合した核塩基を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドが特に好ましい。本発明によって使用されるオリゴヌクレオチドを、固相合成の周知の技術によって簡便におよび慣習的に作成し得る。本発明の文脈において、「オリゴヌクレオチド」という用語は、リボ核酸またはデオキシリボ核酸のオリゴマーまたはポリマーをさす。この用語は、天然に存在する核塩基、糖および共有結合的な糖間(inter-sugar)(骨格)結合からなるオリゴヌクレオチド、および同様に機能する天然に存在しない部分を有するオリゴヌクレオチドを含む。そのような修飾または置換オリゴヌクレオチドは、例えば増強された細胞取り込み、増強された標的への結合、およびヌクレアーゼ存在下での増加した安定性のような望ましい性質のために、多くの場合天然型よりも好ましい。いくつかの好ましい修飾オリゴヌクレオチドの例は、ホスホロチオエート、ホスホトリエステル、ホスホン酸メチル、短鎖アルキルまたはシクロアルキル糖間(inter-sugar)結合、または短鎖ヘテロ原子または複素環の糖間(inter-sugar)結合を含むものを含む。

【0075】

本発明のオリゴヌクレオチドの、別のさらなるまたは代替の修飾は、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増強する1つまたはそれ以上の親油性部分へのオリゴヌクレオチドの化学的結合を含む。そのような親油性部分を、オリゴヌクレオチドのいくつかの異なる位置で、オリゴヌクレオチドに結合し得る。いくつかの好ましい位置は、3'末端ヌクレオチドの糖の3'位、5'末端ヌクレオチドの糖の5'位、およびあらゆるヌクレオチドの糖の2'位を含む。本発明のアンチセンス化合物はまた、薬剤学的に許容可能な塩およびプロドラッグを含む生物学的に同等な化合物を含む。

【0076】

「特異的にハイブリダイズ可能な」および「相補的な」という用語は、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび標的核酸配列の間の安定なおよび特異的な結合を引き起こすのに十分な相補性の程度を示すために使用される。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸配列に100%相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドの標的への結合が、標的分子の正常機能に干渉して有用性の損失および産物タンパク質の発現の減少を引き起こし、そしてオリゴヌクレオチドの非標的配列に対する非特異的な結合を避けるのに十分な程度の相補性が存在する場合、オリゴヌクレオチドは「特異的にハイブリダイズ可能」であると考えられる。

【0077】

ニューレグリン2タンパク質ファミリーは、多くの選択的スプライシングアイソフォームからなる(Ringら、1999)。ニューレグリン2アイソフォーム5および6のコー

10

20

30

40

50

ド配列は、各タンパク質の最初の416アミノ酸をコードするニューレグリン2遺伝子のエキソン1から6まで同じヌクレオチド配列を共有するが、アイソフォーム5のカルボキシ末端10アミノ酸およびアイソフォーム6のカルボキシ末端6アミノ酸をコードする配列において異なっている。エキソン1から6までのコードDNA配列は、それぞれ配列番号10から配列番号15までに組み込まれる。アイソフォーム5および6の最初の416アミノ酸をコードする配列は、配列番号10のヌクレオチド313から1012、配列番号11のヌクレオチド51-222、配列番号12のヌクレオチド230-348、配列番号13のヌクレオチド100から220、配列番号14のヌクレオチド111から187、および配列番号15のヌクレオチド123から181である。アイソフォーム5およびアイソフォーム6のカルボキシ末端をコードする配列は、それぞれ配列番号16のヌクレオチド132から164、および配列番号17のヌクレオチド30から50である。

10

【0078】

配列番号16および配列番号17は、明らかに他のニューレグリン遺伝子産物によって共有されないので、好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号16のヌクレオチド132と164との間、または配列番号17のヌクレオチド30から50までの領域に相補的な少なくとも4ヌクレオチドの配列を含む。より好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号16のヌクレオチド132と164との間、または配列番号17のヌクレオチド30から50までの領域に相補的な少なくとも8ヌクレオチドの配列を含む。

【0079】

20

他の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号第10番のヌクレオチド313から1012までの領域、または配列番号第11番のヌクレオチド51-222の領域、または配列番号第12番のヌクレオチド230-348の領域、または配列番号第13番のヌクレオチド100から220までの領域、または配列番号第14番のヌクレオチド111から187までの領域、または配列番号第15番のヌクレオチド123から181までの領域に相補的な少なくとも4ヌクレオチドの配列を含む。別の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、前述のヌクレオチド配列の1つの領域に相補的な少なくとも8ヌクレオチドである。

【0080】

他の実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号第10番から17番までの非コード領域に相補的な、少なくとも4ヌクレオチドの配列、および好ましくは少なくとも8ヌクレオチドの配列を含む。

30

【0081】

本発明の他の実施形態において、MUC1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号第18番に相補的な少なくとも4ヌクレオチドの配列を含む。好ましい実施形態において、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号第18番に相補的な少なくとも8ヌクレオチドの配列を含む。

【0082】

本発明はまた、前述のアンチセンスオリゴヌクレオチドの転写物の産生を指示する発現調節システムを含む発現ベクターを含む。それに加えて、本発明は、前述のアンチセンスオリゴヌクレオチドの1つを提供すること、およびそのようなオリゴヌクレオチドを、標的配列を含む核酸と、オリゴヌクレオチドの核酸へのハイブリダイゼーションを可能にする条件下で接触させることを含む、ハイブリダイゼーション方法を提供する。前述のアンチセンスオリゴヌクレオチドの1つを提供すること、および標的配列を含むmRNAを含む細胞を提供すること、およびオリゴヌクレオチドを細胞へ導入することを含む、mRNAの翻訳を阻害する方法も含まれる。ここでオリゴヌクレオチドは細胞内でmRNAの翻訳を阻害する。

40

【0083】

本発明の別の局面は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む医薬品組成物を提供する。

50

【 0 0 8 4 】

(V I I I . ワクチン)

本発明はまた、MUC1/ECDPепチド、例えば配列番号1またはその断片の、宿主哺乳類が宿主自身のMUC1/ECDPに対して作用するポリペプチドに対する抗体を産生する、ワクチンにおける使用を含む。ここでそのような断片は配列番号1の4つまたはそれ以上の連続するアミノ酸を含む。ワクチン調製技術は、Duffy (1 9 8 0) およびそこで引用された参考文献によって記載されたように当該分野で一般的に公知である。それらは全て本明細書中で参考として援用される。

【 0 0 8 5 】

MUC1/ECDPепチドを、タンパク質またはFicollのようなキャリア分子に結合し得る。キャリアタンパク質は、好ましくは少なくとも約40,000ダルトン、そしてより好ましくは少なくとも約60,000ダルトンの分子量を有するものである。ワクチン処方、薬学的に受容可能なキャリアを含み得、そしてまた処方の免疫原性を増強するために、水中油型システムまたは当該分野で公知の他のシステムのような、アジュバントシステムを含み得る。ペプチドまたは結合物は胃で分解され得るので、ワクチンは、好ましくは非経口的に投与される(例えば皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射)。投与量は、ワクチンの特異的活性に依存し、そして慣用的な実験によって容易に決定し得る。処方を、単位投与量または複数投与量容器、例えば密閉アンプルおよびバイアルで提供し得、そして使用の直前に滅菌液体キャリアの添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存し得る。

【 0 0 8 6 】

(I X . 処方)

本発明の組成物および方法で採用される、結合阻害剤またはオリゴヌクレオチドを含むMUC1/ECDPアンタゴニストを、様々な従来の薬剤学的な処方物に処方し、そして治療の必要がある癌患者に、経口、静脈内、動脈内、非経口、または腹腔内を含む、従来採用された薬剤投与経路のいずれか1つによって投与し得る。

【 0 0 8 7 】

経口投与のために、本発明の組成物を、例えば不活性な希釈剤と、または吸収可能な食べられるキャリアと処方し得る、または硬いまたは軟らかい殻のゼラチンカプセルに封入し得る、または錠剤に圧縮し得る、または食事療法の食物に直接混合し得る。経口治療的投与のために、活性化化合物を、賦形剤と混合して、そして摂取可能な錠剤、バッカル錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ、オブラート等の形式で使用し得る。そのような組成物および調製物は、もちろん様々であり得、そして簡便に単位重量の約2から約60%の間であり得る。そのような治療的に有用な組成物中の活性化化合物の量は、適当な投与量が得られるものである。

【 0 0 8 8 】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル等はまた、以下のものを含み得る：結合剤、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチン；リン酸ジカルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、およびスクロース、ラクトース、またはサッカリンのような甘味料を加え得る、またはペパーミント、冬緑油、またはチェリー香料のような香料。投与量単位がカプセルのためである場合、それは、上記の型の材料に加えて、液体キャリアを含み得る。様々なほかの材料が、コーティングとして、または投与量単位の物理的な形式を他の方法で改変するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルを、セラック、糖、または両方でコートし得る。シロップまたはエリキシルは、活性化化合物、甘味料としてスクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素およびチェリーまたはオレンジ味のような香料を含み得る。もちろん、投与量単位形式を調製するのに使用されるあらゆる材料は、薬剤学的に純粋および採用される量において実質上無毒性でなければならない。それに加えて、他の化学療法化合物を、徐放性調製物および処方物に混合し得る。

【 0 0 8 9 】

オリゴヌクレオチドを含む処方物に関して、コロイド分散システムを、オリゴヌクレオチドのインビボでの安定性を増強するために、および／またはオリゴヌクレオチドを特定の臓器、組織、または細胞型に標的化するために、伝達媒体として使用し得る。コロイド分散システムは、高分子複合体、ナノカプセル、マイクロスフィア、ビーズおよび水中油型エマルジョン、ミセル、混合ミセル、リポソームおよび特徴的でない構造の脂質：オリゴヌクレオチド複合体を含む脂質に基づくシステムを含むがこれに限らない。

【 0 0 9 0 】

注射可能な使用に適当な、本発明の組成物の医薬品組成物は、滅菌水性溶液または分散、および滅菌注射可能溶液または分散を即座に調製するための滅菌粉末を含む。全ての場合において、その形式は無菌でなければならず、そしてそれぞれ注入力 (s y r i n g a b i l i t y) が存在する程度流動的でなければならない。それは製造および保存の条件下で安定でなければならず、そして細菌および真菌のような微生物の混入作用に対して保存されなければならない。キャリアは、例えばレシチンのようなコーティングの使用によって、分散の場合には必要な粒子サイズの維持によって、そして界面活性剤の使用によって、含む溶媒または分散媒であり得る。微生物作用の予防は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。多くの場合、等張化剤、例えば糖または塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射可能組成物の延長した吸収が、吸収を遅延させる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物の使用によって達成され得る。

【 0 0 9 1 】

滅菌注射可能溶液を、本発明の組成物を必要な量で適当な溶媒に、必要であるように上記で列挙した様々な他の成分と共に混合し、続いて過滅菌することによって調製する。一般的に、分散を、様々な滅菌活性成分を、基本的な分散媒を含む滅菌媒体および上記で列挙した必要な他の成分と混合することによって調製する。滅菌注射可能溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術であり、それは活性成分プラス前に滅菌ろ過したその溶液からのさらなる望ましい成分の粉末を産生する。

【 0 0 9 2 】

本明細書中で使用される「薬学的に受容可能なキャリア」は、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張化剤および吸収遅延剤等を含む。薬学的に活性な物質のためにそのような媒体および薬剤を使用することは、当該分野で周知である。あらゆる従来の媒体または薬剤が活性成分と不適合である以外は、治療的組成物におけるその使用が企図される。補助的な活性成分も、組成物に混合し得る。

【 0 0 9 3 】

(X . 治療方法)

本発明の方法によって適当に治療し得る腫瘍は、脳 (神経膠芽腫、髄芽腫、星状細胞腫、乏突起膠腫、上衣腫)、肺、肝臓、脾臓、腎臓、リンパ節、小腸、膵臓、血液細胞、結腸、胃、乳房、子宮内膜、前立腺、精巣、卵巣、皮膚、頭部および頸部、食道、骨髄、血液および他の組織の腫瘍を含むがこれに限らない。腫瘍は、転移性および非転移性として区別し得る。前悪性病変も、本発明の方法で適当に治療し得る。

【 0 0 9 4 】

本発明の M U C 1 / E C D アнтаゴニストによる治療は、数秒から数週の範囲の間隔で照射および／または化学療法の前または後に行ない得る、および／またはそのような治療と同時に投与し得る。M U C 1 / E C D アнтаゴニストおよび照射および／または化学療法が細胞に別々に適用される実施形態において、有意な時間が各伝達の間に終了せず、2つまたは3つの処置の組み合わせが依然として細胞に対して有利な組み合わせた効果を発揮し得ることを保証するために工程を行わなければならない。そのような場合、細胞を治療薬剤または様相と、お互いの 0 . 1 から 2 5 時間以内に、より好ましくはお互いの 1 から 4 時間以内に、接触させることが企図される。約 1 時間から約 2 時間の遅延時間が最も

好ましい。しかし、ある状況において、治療期間を有意に延長することが望ましい。ここで各投与の間に数日（2、3、4、5、6、または7）または数週（1、2、3、4、5、6、7、または8）が経過する。あらゆる場合において、本発明は、MUC1/ECDアンタゴニストを、電離放射線および/または化学療法剤の前に、後に、または同時に与え得ることを企図する。

【0095】

いくつかの化学療法剤は、癌細胞と化学療法剤の接触の0.5から12時間後に、癌細胞におけるMUC1の発現を誘導する。従って、いくつかの実施形態において、MUC1/ECD結合阻害剤、特に任意で毒素または放射性核種に結合したMUC1/ECD配列（配列番号1）に対する抗体の投与は、癌細胞における増加したMUC1の発現と調和する。他の実施形態において、化学療法剤以外の薬剤を使用して、MUC1結合阻害剤、特に任意で毒素または放射性核種に結合したMUC1/ECD配列（配列番号1）に対する抗体による治療の前にMUC1の発現を増加させ得る。

10

【0096】

本発明の方法において、採用されるMUC1/ECDアンタゴニストの実際の投与量は、治療される癌の型および重症度、およびMUC1/ECDアンタゴニストおよび選択された他の治療様相または複数の様相の相加的または相乗的治療効果を含む、様々な因子に依存する。

【0097】

（本発明の実施例）

20

（実施例1：ペプチド）

MUC1発現細胞において典型的に見出される、MUC1/ECDポリペプチド配列を、配列番号1で提供する。多くのポリペプチド配列が、標準的な技術によって合成された。これらは、MUC1/ECDのポリペプチド断片である、ペプチドP1（配列番号2）、P2（配列番号5）、およびP3（配列番号6）を含む。P1（配列番号2）は、カルボキシル末端に付加したシステインを有する、MUC1/ECD（配列番号1）のアミノ酸5から20に相当する。P2（配列番号5）は、カルボキシル末端に付加したシステインを有する、MUC1/ECD（配列番号1）のアミノ酸13から28に相当する。P3（配列番号6）は、カルボキシル末端にシステインを有する、MUC1/ECD（配列番号1）のアミノ酸27から44に相当する。それに加えて、合成ポリペプチド配列、配列番号7は、カルボキシル末端に付加したシステインを有する、MUC1/ECD（配列番号1）のアミノ酸6から24を組み込む。合成ポリペプチドP0（配列番号8）は、MUCタンパク質でMUC1/ECDのアミノ末端のすぐ前に存在する19アミノ酸配列を組み込み、そして潜在的な切断部位を提示する。システインを、MUC1配列で存在するように、配列のカルボキシル末端に再び付加した。

30

【0098】

（実施例2：抗MUC1-P1抗体）

（A．抗体の産生）

ポリペプチドP1（配列番号4）は、QYKモチーフおよびサイトカイン受容体のリガンド結合ドメインに対する他の配列ホモログを含む（Zrihan-Lichtら、1994）。ポリクローナル抗体を、ウサギにおいて、KLHに結合体化したポリペプチドP1（配列番号4）に対して産生した。血清を、標準的な方法によって調製した。

40

【0099】

ポリクローナル抗体を、ポリペプチド配列番号7に対しても産生した。ここで免疫原は、ポリペプチド配列番号7をKLHに結合することによって形成した。抗体を、3402-1および3402-2と呼ばれる2匹のウサギから得た。血清およびアフィニティー精製抗体調製物を両方とも標準的な方法論によって調製した。

【0100】

（B．抗MUC1-P1抗体によるヒト癌細胞の刺激）

ヒトZR-75-1癌細胞を、10%胎仔ウシ血清（FBS）を含むRPMI1640培

50

地中で80%のコンフルエンスまで増殖させ、そして6穴プレートにウェルあたり 1×10^4 細胞で移した。0.1% FBSを含む培地で一晚の飢餓状態の後、抗MUC1-P1抗体を、図1に示した量で各ウェルに加え、そして48時間インキュベートした。0.1% FBSの存在下でさらに3日間インキュベートした後、細胞数を定量した。図1に示すように、抗MUC1-P1は、用量依存的な様式で、ZR-75-1細胞の増殖を刺激する。

【0101】

抗MUC1-P1抗体刺激の特異性を評価するために、ヒトMUC1-陰性SW480結腸癌細胞を安定にトランスフェクトして、空のベクター(SW480/V)またはMUC1(SW480/MUC1)を発現させた。SW480結腸癌細胞を、リポフェクタミド(lipofectamide)を用いて、pCMV-IE-ak1-dhfrベクターまたはpCMV-IE-ak1-dhfr-MUC1のいずれかでトランスフェクトした(Ligtenburgerら、1992)。細胞を800 μ g/mlのG418(ネオマイシン)の存在下で増殖させ、そして単一細胞集団まで連続的に希釈した。MUC1(SW480/MUC1)を発現する単一細胞クローンを選択した。両方のSW480細胞型を、10%のFBSを含むDMEM中で80%コンフルエンスまで増殖させ、そして6穴プレートにウェルあたり 5×10^4 細胞をまいた。0.1%のFBSを含む培地中で一晚飢餓状態にした後、抗MUC1-P1抗体を示した濃度で加え、そして48時間インキュベートした。さらに1日インキュベートした後細胞数を定量した(全体で3日間)。図2で示すように、抗MUC1-P1はSW480/MUC1細胞の増殖を刺激するが、SW480/V細胞は刺激しない。これらの発見は、抗MUC1-P1抗体は、MUC1と特異的に相互作用することによって、ヒト癌細胞の増殖を刺激することを確認する。

【0102】

(実施例3：内因性MUC1 ECDリガンド)

抗MUC1-P1はヒト癌細胞の増殖を刺激するという発見は、天然MUC1 ECDリガンドの潜在的な存在を示唆する。この可能性を調査するために、ZR-75-1細胞を、MUC1リガンドの潜在的な供給源としてスクリーニングした。ZR-75-1細胞を0.1%のFBSを含むRPMI 1640培地で72時間培養し、そして次いで上清を調製することによって馴化培地を調製した。馴化培地を、以前に記載したように0.1% FBSを含むDMEで増殖停止させたSW480/VおよびSW480/MUC1細胞に加えた。馴化培地を、図3に示した濃度で加え、そして細胞を3日間維持してから細胞数を定量した。図3に示すように、ZR-75-1細胞は、MUC1への結合によって癌細胞増殖を刺激する、可溶性リガンドを発現する。

【0103】

可溶性MUC1リガンドを同定するために、MUC1/ECD(配列番号1)およびグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)を含む融合タンパク質を調製した。GSTを以下のようなプライマーのセットを用いてPCRによって増幅した：

5'-ATTAGGCTAGCCTGGTTCCGCGTG GTTCTATGTC C C C TATACTAGGTTA-3'、および5'-CAAGGGGATCCCTACGGAACCA GATCCGATTTTGG-3'。そしてpET-11dのNhe1およびBamH1部位の間に挿入した(「pET-11d-GSTベクター」)。MUC1/ECDを、以下のようなプライマーのセットを用いてPCRによって増幅した：

5'-TCTGGCCATGGGAGAAAGGTACCATCAAT-3'、および5'-AGCGCGCTAGCCCCAGCCTGGCA C C C CAGC-3'、そしてpET11d-GSTベクターのNco1およびNhe1部位の間に挿入した(「pET11d-GST-MUC1/ECD」ベクター)。

【0104】

pET11d-GST-MUC1/ECDまたはpET11d-GSTで形質転換した、対数増殖するE.coli BL21(D3)plysS細胞を、0.1mMのイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドと、25℃で6時間インキュベートすることによ

10

20

30

40

50

って、GST融合タンパク質を調製した。細胞をペレット化して、20%のスクロース、5 mMのMgCl₂、0.5%のNP-40を含むPBSに再懸濁して、次いで超音波処理した。10,000 × gで30分間、4℃で遠心することによって破片を除去した。上清をバルク(bulk)グルタチオンセファロース4Bにかけて、そして4℃で4時間インキュベートして、その後洗浄およびカラムに充填した。融合タンパク質を、50 mMのTris-HCl、pH 9.5中10 mMのグルタチオンで溶出した。精製融合タンパク質を、PBSで透析した。

【0105】

培養細胞の細胞質ゾル画分を、40 mMのEDTAを含むPBS中にZR-75-1細胞を回収することによって調製した。PBSで洗浄した後、細胞を氷冷ホモジナイズ緩衝液(20 mMのHepes-KOH、pH 7.5、10 mMのKCl、1.5 mMのMgCl₂、1 mMのジチオトレイトール、1 mMのEGTA、1 mMのEDTA、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche))に再懸濁して、そして氷上に15分間置いた。懸濁液をDounceホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを、1,000 × gで5分間、4℃で遠心した。上清を細胞質ゾル画分として回収し、そして0℃で保存した。

【0106】

GST-MUC1/ECD融合タンパク質(1.8 mg)を、400 μlのグルタチオン-セファロース4Bに固定化し、それをカラムに充填して、そして緩衝液A(30 mMのTris-HCl、pH 7.5、5 mMのMgCl₂、1 mMのEDTA、および1 mMのジチオトレイトール)で平衡化した。細胞質ゾル画分を、グルタチオン-セファロース4Bカラムを通すことによってまず予備清澄化(preclear)し、そしてついでGST-MUC1/ECDアフィニティークラムにかけて、それを次いで2 × 10 mlの緩衝液Aで2回洗浄した。カラムに結合したタンパク質を、2 mlの緩衝液B(0.15 MのNaClを含む緩衝液A)を加えることによって溶出し、そしてそれぞれ0.4 mlの画分を回収した。2番目および3番目の画分を混合して、そしてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけた。コントロールとして、GSTタンパク質(1.5 mg)を400 μlのグルタチオン-セファロース4Bに固定化し、そして実験を上記で記載したように行なった。その結果は、MUC1/ECDは45 kDaのタンパク質に結合することを示した。同様の実験をヒトMCF-7乳癌細胞の溶解物で行い、MUC1/ECDの45 kDaタンパク質との結合を確認した。

【0107】

GST-MUC1/ECD吸着質からの45 kDaをゲルから摘出し、アセトニトリルで脱水し、そして次いで100 mMの重炭酸アンモニウムで再水和した。次いでゲルの断片を、12.5 ng/μlのトリプシン/50 mMの重炭酸アンモニウムに懸濁した。消化を37℃で10-12時間行なった。トリプシン消化ペプチドの塊を、Voyager DE-PRO(Perceptive Biosystem Inc.、Framingham, MA)を用いて、マトリクス補助レーザー脱離/電離-飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF-MS)によって分析した。ML-1およびML-2と呼ばれる2つの関連するペプチドが、マスフィンガープリンティングによって同定された。ML-1(配列番号3)およびML-2(配列番号4)の配列は、2つのニューレグリンアイソフォーム、それぞれNRG2スプライスアイソフォーム5およびNRG2スプライスアイソフォーム6に関して以前に開示されたものである。

【0108】

(実施例4：癌遺伝子としてのMUC1)

(A. MUC1は軟寒天において増殖を支持する)

MUC1の発現は、悪性表現型の発現に関して機能的に有意であることが示された。MUC1を安定に発現する細胞系統を産生した。HCT116結腸癌細胞を、pIRES-puro2ベクターまたはpIRES-puro2-MUC1で、リポフェクタミン(lipofectamine)によってトランスフェクトし、ピューロマイシン抵抗性に関し

10

20

30

40

50

て選択した。空のベクター（HCT116/V）またはMUC1（HCT116/MUC1）のいずれかを安定に発現する単クローンを有する、ヒトMUC1 - 陰性HCT116結腸癌細胞で研究を行なった。HCT116/VおよびHCT116/MUC1細胞を、軟寒天における足場独立性増殖に関してアッセイした。細胞（ 1×10^5 / 60 mm 皿）を、10%のFBSを添加した0.33%のアガロースを含むDMEM培地に懸濁し、そしてアガロースプラグ（10%のFBSを添加したDMEM中0.5%のアガロース）上に重ねた。細胞を4週間インキュベートし、その間新しい培地を毎週プレートに加えた。直径が70 μ mより大きなコロニーを4週間後に計測した。野生型MUC1の発現は、HCT116/V細胞で得られるものと比較して、コロニーのサイズおよび数の著しい増加と関連していた。これらの発見は、SW480/VおよびSW480/MUC1細胞で行なった同様の研究によって確認された。ここでMUC1の発現は再びSW480細胞の足場独立性増殖を支持することが示された。

10

【0109】

（B. MUC1はヌードマウスにおけるヒト腫瘍形成を支持する）

インビボにおけるヒト腫瘍増殖に対するMUC1の効果を評価するために、5から6週齢の無胸腺Balb/c/nudeマウス（Taconic, Germantown, NY）の右脇腹に、 1×10^6 のHCT116/VまたはHCT116/MUC1細胞を皮下注射した。腫瘍（4匹のマウス/グループ）を1週間に2回測定した。腫瘍体積を、以下の式によって計算した： $1/2$ （長さ \times 巾²）。腫瘍体積が2 cm³を超えた時、実験を終了した。時間中の腫瘍体積の測定は、HCT116/V細胞増殖を少ししか示さなかった。対照的に、HCT116/MUC1腫瘍の増殖は著しく増加した。

20

【0110】

（実施例5：MUC1の発現は酸化および遺伝子毒性ストレスによって誘導される）

MUC1が酸化ストレスに反応して誘導されるかどうかを決定するために、MCF-7細胞を過酸化水素で処理した。細胞溶解物を、抗DF3/MUC1抗体を用いて免疫ブロッキングによって分析した。MCF-7細胞を溶解緩衝液（50 mMのTris、pH 7.6、150 mMのNaCl、1 mMのPMSF、3 mMのNaF、1 mMのバナジン酸ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤を含む1 mMのDTT、および1%のNP-40または1%のBrij-96のいずれか）に、30分間氷上で懸濁することによって、溶解物を調製した。溶解物を遠心によって透明にし、そして等量のタンパク質をSDS-PAGEによって分析した。次いでタンパク質をニトロセルロースフィルターに移し、そして0.05%のTween-20を含むPBS中5%の無脂肪粉乳中でインキュベートすることによってブロックし、そして抗MUC1抗体でプローブした（Pandeyら、1995）。抗アクチンをコントロールとして使用した。その結果は、アクチン発現のレベルに対しては過酸化水素の影響はなかったが、MUC1は酸化ストレスに反応して迅速におよび一過性に誘導されることを示した。

30

【0111】

同様の研究を、遺伝子毒性薬剤を用いて行なった。その結果は、MCF-7細胞のダウノルビシンによる処理は、MUC1の迅速および一過性の誘導と関連し、そしてアクチンの発現とは関連しないことを示した。入手可能な証拠は、MUC1は、タキソール、シスプラチン、および電離放射線を含む様々な細胞毒性薬剤によって誘導されることを示す。

40

【0112】

（実施例6：MUC1は、酸化および遺伝子毒性ストレスに対するアポトーシス反応を阻害する）

MUC1が酸化ストレスに対するアポトーシス反応を阻害するかどうかを決定するために、空のベクターまたはMUC1を安定に発現するHeLa細胞を、1 mMの過酸化水素で1時間処理した。DNA内容を、エタノール固定細胞をヨウ化プロビジウムで染色し、そしてFACSscan（Beckton Dickinson）によってモニターすることによって評価した。サブG1 DNA内容を有する細胞の数を、MODFIT LTプログラム（Verity Software House, Topsam, ME）で決定し

50

た(Yuanら、1997)。細胞を、フローサイトメトリーによって、アポトーシスのマーカーとしてサブG1DNAの誘導に関して分析した。図4に示すように、その結果は、MUC1は酸化ストレスに対するアポトーシス反応を阻害することを示す。

【0113】

0.01mMのタキソールで20時間処理した細胞におけるアポトーシスの誘導を、空のベクターまたはMUC1を発現するHeLa細胞のサブG1DNA内容を測定することによって評価した。図4に示すように、酸化ストレスと同様、タキソール誘導アポトーシスはMUC1の発現によって阻害された。

【0114】

(実施例7：MUC1発現に対するNM-3の効果)

MCF-7細胞を、100~400 μ g/mlのNM-3(2-(8-ヒドロキシ-6-メトキシ-1-オキソ-1H-2-ベンゾピラン-3-イル)プロピオン酸)で48時間処理した。DF3抗原レベルを、DF3MAbを用いてイムノプロット分析によって視覚化した(Kufe、米国特許第5,506,343号、本明細書中で参考として援用される)。

【0115】

未処理細胞に比べて、NM-3処理細胞におけるDF3抗原の細胞内レベルの減少が観察された。ZR-75-1およびBT-20細胞系統において同様の結果が見出された。細胞内DF3抗原のNM-3による減少は、用量および時間依存的であることが示された。NM-3がMUC1 DF3抗原の細胞外局在化を損傷したかどうかを決定するために、NM-3処理後の細胞培養培地上清中およびMCF-7細胞上の抗原レベルを調査した。DF3抗原のレベルは、両方の局在において抑制された。これらの発見は、NM-3はMUC1タンパク質の発現を阻害することを示唆する。

【0116】

NM-3のMUC1発現に対する効果は転写レベルで検出可能かどうかを決定するために、ハイブリダイゼーション研究を行なった。³²P標識DF3 DNAプローブは、MCF-7細胞に対する48時間のNM-3処理の後、全細胞RNAにおいて4.5および7.0kbの2つの転写物にハイブリダイズした。両方のmRNAのレベルは、MCF-7細胞をNM-3の非存在下でインキュベートしたコントロールと比較して減少した。ZR-75-1およびBT-20細胞系統を用いて同じ結果が観察された。これらの発見は、DF3の発現は、それらの細胞系統に対するNM-3処理の後、転写レベルで調節されることを示唆する。

【0117】

NM-3が細胞表面タンパク質の発現も阻害するのかどうかを決定するために、NM-3処理後の表皮成長因子受容体(EGF-R)発現のレベルを、MCF-7、ZR-75-1、およびBT-20細胞系統で試験した。細胞をNM-3の非存在下でインキュベートしたコントロールと比較して、NM-3処理後にEGF-R発現に検出可能な変化はなかった。これらの結果は、表面分子発現の阻害なしに、NM-3のMUC1発現に対する選択的な効果を示す。

【0118】

本発明は、詳細な説明および実施例によって示している。実施例は例のみであり、そして本発明の範囲を制限すると解釈され得ない。当業者は、添付の特許請求の範囲によって記載される本願発明のプロセスの等価物を認識し、これらは、特許請求の範囲に記載される発明の範囲および意図に含まれる。

【0119】

(参考文献)

以下の参考文献は、例示的な手順または他の詳細な捕捉を提供する範囲で、本明細書中で参考として具体的に援用される。

【0120】

【表1】

10

20

30

40

50

Barry & Sharkey, *Hum. Pathol.*, 16:225-7, 1985.

Brunner *et al.*, *Nature*, 385:829-833, 1997.

Daniels & Reynolds, *Mol. Cell. Biol.*, 19:3614-23, 1999.

Dawson *et al.*, *Science* 266:776, 1994.

Duffy, in *Vaccine Preparation Techniques*, Noyes Data Corporation of Park Ridge, N.J., 1980.

Finn *et al.*, *Immunol. Rev.* 145:61-89, 1995.

Gansow, *Int. J. Rad Appl. Instrum. [B]*, *Nucl. Med. Biol.* 18:369-381, 1991.

Goding, In: *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, pp. 60-61, 1986.

Itzkowitz *et al.*, *Cancer*, 66:1960-6, 1990.

Jawhari *et al.*, *J. Pathol.*, 189:180-85, 1999.

Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525, 1986.

Kufe *et al.*, *Hybridoma*, 3:223-232, 1984.

Li *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 18:7216-24, 1998.

Li *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276:6061-64, 2001.

Li *et al.*, *J. Biol Chem*, e-publication manuscript C100359200, August 1, 2001(a).

Li & Kufe, *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 281, 440-43, 2001.

Ligtenburger *et al.*, *Cancer Res.*, 15:2318-2324, 1992.

Molenaar *et al.*, *Cell*, 86:391-399, 1996.

Novak & Dedhar, *Cell Mol. Life Sci.*, 523-37, 1999.

Olsnes & Pihl, *Pharmac. Ther.* 25:355-381, 1981.

Pandey *et al.*, *Cancer Res.*, 55:4000-4003, 1995.

Pastan *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 61:331-354, 1992.

Perey *et al.*, *Cancer Res.*, 52:2563-68, 1992.

10

20

30

Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113:269-315, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, 1994.

Presta, *Curr. Op. Struct Biol.* 2:593-596, 1992.

Reddish *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.*, 42:303-9, 1996.

Reynolds *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9:629-38, 1989.

Reynolds *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 14:8333-41, 1994.

Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329, 1988.

Ring *et al.*, *Human Genet.*, 104:326-32, 1999.

Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.

Shimazui *et al.*, *Cancer Res.*, 56:4154-58, 1996.

Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482-489, 1981.

Strouss & Decker, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 27:57-92, 1992.

Takeichi, *Annu. Rev. Biochem.*, 59:237-52, 1990.

Thorpe *et al.*, *Immunological Rev.* 62:119-158, 1982.

Thorpe *et al.*, *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, pp. 168-190 Academic Press, NY 1982(a).

Waldmann, *Science*, 252:1657, 1991.

Yamamoto *et al.*, *J. Biol. Chem.* 272:12492-94, 1997.

Yuan *et al.*, *PNAS*, 94:1437-1440, 1997.

Zrihan-Licht, *et al.*, *FEBS Let.*, 356:130-36, 1994.

U.S. Pat. No. 4,675,382

U.S. Pat. No. 4,894,443,

U.S. Pat. No. 5,506,343

10

20

30

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに説明するために含まれる。本発明は、本明細書中で提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせ、これらの1以上の図面を参照することによってより良好に理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、Z R - 7 5 - 1 乳癌細胞の増殖に対する抗 M U C 1 - P 1 抗体の効果を示す。

【図2】 図2は、空のベクター (S W 4 8 0 / V) または M U C 1 (S W 4 8 0 / M U C 1) を安定に発現する S W 4 8 0 細胞の増殖に対する抗 M U C 1 - P 1 抗体の効果を示す。

40

【図3】 図3は、空のベクター (S W 4 8 0 / V) または M U C 1 (S W 4 8 0 / M U C 1) を安定に発現する S W 4 8 0 細胞の増殖に対する Z R - 7 5 - 1 馴化培地の効果を示す。

【図4】 図4は、空のベクター (H e L a / V) または M U C 1 (H e L a / M u c 1) を安定に発現する H e L a 細胞の H ₂ O ₂ およびタキソール誘導アポトーシスに対する M U C 1 の効果を示す。結果を、3つの別々の実験のアポトーシス % (平均 ± S E) として表す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kufe, Donald W.
Ohno, Tsuneya

<120> MUC1 EXTRACELLULAR DOMAIN AND CANCER TREATMENT COMPOSITIONS AND
METHODS DERIVED THEREFROM

<130> MUC1 APPLICATION

<150> 60/231,841

<151> 2000-09-11

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr
1 5 10 15

Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser
 20 25 30

Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly
 35 40 45

<210> 2

<211> 426

10

20

30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Gln Val Cys Cys Ser Ala Leu Pro Pro Pro Pro Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Arg Cys Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Arg
 20 25 30

10

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gly Ser Ser Ser Arg
 35 40 45

Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser Ile Ser Arg Pro Ala Ala Pro Pro Glu
 50 55 60

20

Pro Arg Pro Gln Gln Gln Pro Gln Pro Arg Ser Pro Ala Ala Arg Arg
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Arg Ser Arg Ala Ala Ala Ala Gly Gly Met Arg Arg Asp
 85 90 95

Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val Ser Leu Ala Cys
 100 105 110

30

Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala Tyr Lys Ala Pro
 115 120 125

Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro Ala Gly Gly Ser

130 135 140

Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly Arg Val Ala Leu
145 150 155 160

Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly Gly Leu Gln Arg
165 170 175

Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu Glu Arg Asn Gln
180 185 190

Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro Leu Val Phe Lys
195 200 205

Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn Leu Lys Lys Glu
210 215 220

Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg Pro Lys Leu Lys
225 230 235 240

Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys Gln Ser Leu Lys
245 250 255

Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr Arg Trp Phe Lys
260 265 270

Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg Ile Lys Tyr Gly
275 280 285

10

20

30

Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys Val Lys Val Glu
290 295 300

Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu Gly Lys Asp
305 310 315 320

Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser Thr Thr Leu Ser
325 330 335

10

Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr
340 345 350

Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly Ile Asn Gln Leu
355 360 365

Ser Cys Lys Cys Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg Cys Leu Glu Lys
370 375 380

20

Leu Pro Leu Arg Leu Tyr Met Pro Asp Pro Lys Gln Ser Val Leu Trp
385 390 395 400

Asp Thr Pro Gly Thr Gly Val Ser Ser Ser Gln Trp Ser Thr Ser Pro
405 410 415

30

Lys Pro Arg Ser Cys Thr Arg Arg Gly Ser
420 425

<210> 3

<211> 422
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Gln Val Cys Cys Ser Ala Leu Pro Pro Pro Pro Leu Glu Lys
 1 5 10 15

Gly Arg Cys Ser Ser Tyr Ser Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Arg
 20 25 30

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Glu Ser Gly Ser Ser Ser Arg
 35 40 45

Ser Ser Ser Asn Asn Ser Ser Ile Ser Arg Pro Ala Ala Pro Pro Glu
 50 55 60

Pro Arg Pro Gln Gln Gln Pro Gln Pro Arg Ser Pro Ala Ala Arg Arg
 65 70 75 80

Ala Ala Ala Arg Ser Arg Ala Ala Ala Ala Gly Gly Met Arg Arg Asp
 85 90 95

Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val Ser Leu Ala Cys
 100 105 110

Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala Tyr Lys Ala Pro
 115 120 125

10

20

30

Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro Ala Gly Gly Ser
 130 135 140

Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly Arg Val Ala Leu
 145 150 155 160

Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly Gly Leu Gln Arg
 165 170 175

10

Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu Glu Arg Asn Gln
 180 185 190

Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro Leu Val Phe Lys
 195 200 205

Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn Leu Lys Lys Glu
 210 215 220

20

Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg Pro Lys Leu Lys
 225 230 235 240

Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys Gln Ser Leu Lys
 245 250 255

30

Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr Arg Trp Phe Lys
 260 265 270

Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg Ile Lys Tyr Gly
 275 280 285

Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys Val Lys Val Glu
290 295 300

Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile Leu Gly Lys Asp
305 310 315 320

Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser Thr Thr Leu Ser
325 330 335

10

Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr Ala Lys Ser Tyr
340 345 350

Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly Ile Asn Gln Leu
355 360 365

Ser Cys Lys Cys Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg Cys Leu Glu Lys
370 375 380

20

Leu Pro Leu Arg Leu Tyr Met Pro Asp Pro Lys Gln Ser Val Leu Trp
385 390 395 400

Asp Thr Pro Gly Thr Gly Val Ser Ser Ser Gln Trp Ser Thr Ser Pro
405 410 415

30

Ser Thr Leu Asp Leu Asn
420

<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 4

His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser
1 5 10 15

10

Cys

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 5

His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser
1 5 10 15

20

30

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 6

Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp
1 5 10 15

Cys

10

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 7

20

Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser
1 5 10 15

Gly Ala Cys

<210> 8

30

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 8

Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg
 1 5 10 15

Tyr Asn Leu

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 9

Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala
 1 5 10 15

Phe Arg Glu Cys

20

<210> 10

<211> 1054

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccctgcagaa gccgcgctcc ctactcggtc cgggggcaga gggggcgcca gagagcaagt 60

gggcggggcgt cccatcctcc gcacccctct ccaggctcctg gcgcacaggg tgggagcgct 120

10

20

30

```

gcgctgcgcc gcgctgcgca tgcgggcccg ctgcccgcct gcccctgcc ctagctgggc 180
cacctccccg ggctgccggt ggagggctaa gaggcgctaa cgttacgctg ttcccggttt 240
tccagcgggc tctgtttccc ctccaaggc ggcggcggct gagcggcgga gcccccaaa 300
tggcctggcc agatgcggca ggtttgctgc tcagcgtgc cgcgcgcgcc actggagaag 360
ggtcgggtgca gcagctacag cgacagcagc agcagcagca gcgagaggag cagcagcagc 420
agcagcagca gcagcgagag cggcagcagc agcaggagca gcagcaacaa cagcagcatc 480
tctcgtcccc ctgcgcccc agagccggcg ccgcagcaac agccgcagcc ccgcagcccc 540
gcagccccga gagccgcgcg cgtttgcga gccgcagccg ccggcgccat gaggcgcgac 600
ccggcccccg gcttctccat gctgctcttc ggtgtgtgc tcgcctgcta ctgcgccagc 660
ctcaagtcag tgcaggacca ggcgtacaag gcacccgtgg tggcggaggg caaggtagc 720
gggctgggtc cagccggcgg ctccagctcc aacagcaccg gagagccgcc cgcctcgggt 780
cgggtggcgt tggtaaaggc gctggacaag tggccgctcc ggagcggggg gctgcagcgc 840
gagcaggtga tcagcgtggg ctctgtgtg ccgctcgaaa ggaaccagcg ctacatcttt 900
ttcctggagc ccacggaaca gcccttagtc tttaagacgg cctttgcccc cctcgatacc 960
aacggcaaaa atctcaagaa agaggtgggc aagatcctgt gcactgactg cggtagtcg 1020
ccccctccct ttgctggaga aaggggggag gggc 1054

```

10

20

30

<210> 11
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> Homo sapien

<400> 11
gcaactgcccc taccaccacc gtgtcacct acctgccttg taaccacag ccaccggcc 60

caagttgaag aagatgaaga gccagacggg acaggtgggt gagaagcaat cgctgaagtg 120

tgaggcagca gccggtaatc ccagccttc ctaccgttg ttcaaggatg gcaaggagct 180

caaccgcagc cgagacattc gcatcaaata tggcaacggc aggtaaagcaa tatccagcct 240

gtcctccatc caagcagctg cctccctcc tctcgagaag gagtggcctg aactgggcag 300

aggccagggc tgtgccccca gactcaccca tgggaaccagt ccagcccct ctccatactc 360

cccttctctg ccactcccag ctttcttct gcagctcggg gacctcttg tcatggtgg 419

10

<210> 12
<211> 493
<212> DNA
<213> Homo sapien

20

<400> 12
gccactagtc ctgccctgtg ttgtcctaag ggcccaaggc tccctgcagc tgcagggact 60

ccgtgcccc cctggactcc agaaattgct ggggggaggg aatctccttc ccatctaagc 120

tgcagggcca ctgtggctct gtggagagag gcaaccgctg ggtgactgct ggggagccac 180

agccggccct ggctcagcc tctccccctt ttatccctc cctaaccaga aagaactcac 240

gactacagtt caacaagggtg aaggtggagg acgctgggga gtatgtctgc gaggccgaga 300

acatcctggg gaaggacacc gtccggggcc ggcctttacgt caacagcggg aggtggggcc 360

agacagaggg aagggtccta gaggggtttg gcagggcggg ccagtggccc ccagccctt 420

ggggcctgca tgtgatccat ctgcactca actccctcc ctctgctgc tgccatatca 480

30

agccctagat ctc

493

<210> 13

<211> 350

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 13

ggtcattcttc cagttttgac gtggggcatg aaggagatga ttcctggggc ctagggatag 60

10

tctcagtgcg tcactggcac atgtctctca taccctcagt gagcaccacc ctgtcatcct 120

ggtcggggca cggccggaag tgcaacgaga cagccaagtc ctattgcgtc aatggaggcg 180

tctgtacta catcgagggc atcaaccagc ttccttgcaa gtaagtgacc agtaggggtg 240

ggcatgggag caagaacagg gtaggagatg ctgggtcaga agtggagggc tctaggaaaa 300

gagggttcca agccactgac aagaggtccc caaggggtgt agacaggaag 350

20

<210> 14

<211> 326

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 14

aagtgcctga cttggttttt ctcattcacc actgtgcact ttgatttcta accttagcct 60

cgcggatgat gccagtttgt tctgtgattt ttccctttt ccttctccag atgtccaaat 120

30

ggattcttcg gacagagatg tttggagaaa ctgcctttgc gattgtacat gccagatcct 180

aagcaaagta tgtttgaaga tacaaacaca agtccttgct ccttagaaag cttctgggtg 240

cagtccccc aatgtagggc atagggccag ggggtgttgt tgttttgatc tttggctgtt 300

ttgttttgggtt tctcttttct tttttg

326

<210> 15

<211> 310

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 15

aatacaaatg gtaacgggtg caaggaaccc agctggcatt ggcaggagcc cgtgccgggg 60

10

tggtgcaatg cctgtgtctt gctatcctgg ctctctcttt ctggttttct ttcttttgggt 120

aggtgtcctg tgggatacac cggggacagg tgtcagcagt tcgcaatggt caacttctcc 180

agtatgtctc tttcttctat ttcttctctt ccttgggtgac tgacagtctc cccctgggga 240

gggatggggc cttgcttagc aagactaggg ggagatgtag aggggtgtct gcgctcctta 300

gaggagacgg 310

20

<210> 16

<211> 259

<212> DNA

<213> Homo sapien

<400> 16

ggatggaaag gagctgggca ggacctgagc tggggagagc ctatggcttt gggggcaaag 60

gggtctctgc accactatcc ctatgggggtt tgcctcctgc cccaccctc acatctaccc 120

30

tacctctgca gaagccgagg agctgtacca gaagagggtc ctgaccatca cgggcatctg 180

cgtggctctg ctggctgtgg gcatcgtctg tgtgggtggc tactgcaaga ccaagtgagt 240

gtcactcact caagctggg 259

<210> 17
<211> 258
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 17
ttgtgaccct cgctcttctg cactgccaga gcaccttgga ttgaattaa agggatatgaa 60

acctctgtgt gtcactcagc accatctgcg tggccctctt ccacagcctc cgatgccatg 120

tgtgctgaat gtttggtttc ctttccaaaa aatggaaaag ggatgattcc aaaaatctct 180

cctggcccca tcgagatgtc ctatcataaa ctacgttgat ttagcaggag acgaaagaag 240

ctcatgaaca gaagggca 258

10

<210> 18
<211> 8181
<212> DNA
<213> Homo sapien

20

<220>
<221> misc_feature
<222> (6890)..(7960)
<223> definition of "n" in this sequence is unavailable at this time

<220>
<221> misc_feature
<222> (6890)..(7960)
<223> unknown nucleotide

30

<400> 18
gaattcagaa ttttagacct tttggccttg gggccatcc tggagaccct gaggtctaag 60

ctacagcccc tcagccaacc acagaccctt ctctggctcc caaaaggagt tcagtcccag 120
 aggggtgtca cccacccttc agggatgaga agttttcaag gggattact caggcactaa 180
 cccaggaag gatgacagca cattgccata aagttttggt tgttttctaa gccagtgcaa 240
 ctgcttatct tagggatttt ccgggatagg gtggggaagt ggaaggaatc ggcgagtaga 300
 agagaaagcc tgggaggggt gaagttaggg atctagggga agtttggtc atttggggat 360
 gcgggtgggg gaggtgctgg atggagttaa gtgaaggata gggtgctga gggaggatgc 420
 ccgaagtcct cccagacca ctactcacg gtggcagcgg cgacactcca gtctatcaaa 480
 gatccgccgg gatggagagc caggaggcgg gggctgccc tgaggtagcg gggaggccgg 540
 ggggccgggg ggcggacggg acgagtgcaa tattggcggg ggaaaaaaca acactgcacc 600
 gcgtccgctc cctcccgccc gcccgggccc ggatccgct cccaccgcc tgaagccggc 660
 ccgacccgga acccgggccg ctggggagtt gggttcacct tggaggccag agagacttgg 720
 cgcccggaag caaagggaat ggcaaggggg aggggggagg gagaacggga gtttgcgag 780
 tccagaaggc cgctttccga cgccggggcg ttgcgcgcgc ttgctcttta agtactcaga 840
 ctgcgcggcg cgagccgtcc gcatggtgac gcgtgtccca gcaaccgaac tgaatggctg 900
 ttgcttgcca atgccgggag ttgaggtttg gggccgcca cctagctact cgtgtttct 960
 ccggcctgcg agttgggggg ctccgcctc cccggccgc tectgggcgc gctgacgtca 1020
 gatgtcccca cccgcccag cgctgcccc aagggtctcg ccgcacaaa agctcgccct 1080
 cgggcgccgg cgcgggggcg agagcgggtg tctctgcct gctgatctga tgagctcaa 1140
 tcccgctcct cgccgaagtg tttttaagt gttctttcca acctgtgtct ttggggctga 1200

10

20

30

gaactgtttt ctgaatacag gcggaactgc ttccgtcggc ctagaggcac gctgcgactg 1260
 cgggacccaa gttccacgtg ctgcccgggc ctgggatagc ttccctccct cgtgcactgc 1320
 tgccgcacac acctcttggc tgtcgcgcac tacgcacctc acgtgtgctt ttgcccccg 1380
 ctacgtgcct acctgtcccc aataccactc tgctcccaa aggatagttc tgtgtccgta 1440
 aatcccatc tgtcacccca cctactctct gccccccct tttttgttt gagacggagc 1500
 tttgtctgt cggccaggct ggagtgaat ggccgatct cggctcactg caacctccgc 1560
 ctcccggtt caagcgattc tcctgcctca gcctcctgag tagctgggt tacagcgccc 1620
 gccaccacgc tcggctaatt ttgtagtct ttagtagaga cgaggtttca ccatcttggc 1680
 caggctggc ttgaaccct gacctgtga tccactcgc tcggccttcc aaagtgttg 1740
 gattacgggc gtgacgaccg tgccacgcac ctgcctctta agtacataac ggccacaca 1800
 gaacgtgtc aactccccg ccacgcttc aagtcctct cccacatacc tcggtgcccc 1860
 ttccacatac ctcaggacc caccgctta gctccatttc ctccagacgc caccaccag 1920
 cgtcccgag tgccccctc taaagctcc agccgtccac catgctgtc gttcctccct 1980
 ccctggccac ggcagtgacc ctctctccc gggcctgct tcctctcgc gggtctgct 2040
 gcctcactta ggcagcgctg cccttactcc tctccgccc gtccgagcgg cccctcagct 2100
 tcggcgcca gcccgcaag gctcccggtg accactagag ggcgggagga gctcctggcc 2160
 agtggtgag agtggaagg aaggacccta gggttcatg gagccaggt ttactccct 2220
 aagtggaaat ttcttcccc actcctcctt ggctttctcc aaggagggaa cccaggtgc 2280
 tggaaagtcc ggctggggg gggactgtg gttcagggga gaacgggtg tggaacggga 2340

10

20

30

cagggagcgg ttagaagggt ggggctattc cgggaagtgg tggggggagg gagcccaaaa 2400
 ctagcaccta gtccactcat tatccagccc tcttatttct cggccgctct gcttcagtgg 2460
 acccggggag ggcggggaag tggagtggga gacctagggg tgggcttccc gaccttgctg 2520
 tacaggacct cgacctagct ggctttgttc cccatcccca cgttagtgtg tgccctgagg 2580
 ctaaaactag agcccagggg ccccaagttc cagactgccc ctccccctc ccccgagacc 2640
 agggagtggc tggtgaaagg gggaggccag ctggagaaca aacgggtagt caggggggtg 2700
 agcgattaga gcccttgtag cctaccagg aatgggtggg gaggaggagg aagaggtagg 2760
 aggtagggga gggggcgggg ttttgcacc tgtcacctgc tcgctgtgcc tagggcgggc 2820
 gggcggggag tggggggacc ggtataaagc ggtaggcgcc tgtgcccgt ccacctetca 2880
 agcagccagc gcctgcctga atctgttctg cccctcccc acccatttca ccaccacat 2940
 gacaccgggc acccagtctc ctttcttctt gctgctgtc ctcacagtgc ttacaggtag 3000
 ggggcacgag gtggggagtg ggctgccctg cttagggtgg cttcgtggtc tttctgtggg 3060
 ttttgcctcc tggcagatgg caccatgaag ttaaggtaag aattgcagac agaggctgcc 3120
 ctgtctgtgc cagaaggagg gagaggctaa ggacaggctg agaagagttg cccccaacct 3180
 tgagagtggg taccaggggc aagcaaagt cctgtagaga agtctagggg gaagagagta 3240
 gggagaggga aggcttaaga ggggaagaaa tgcaggggcc atgagccaag gcctatgggc 3300
 agagagaagg aggcctgtgc agggaaggag gcttccaacc caggggttac tgaggctgcc 3360
 cactccccag tcctcctggc attatttctc tgggtggccag agcttatatt ttcttcttgc 3420
 tcttattttt ccttcataaa gaccaacctc tatgacttta acttcttaca gctaccacag 3480

10

20

30

ccctaacc cgcaacagtt gttacagggt ctgggtcatgc aagctctacc ccagggtggag 3540
 aaaaggagac ttgggtacc cagagaagtt cagtggccag ctctactgag aagaatgctg 3600
 tgagtatgac cagcagcgta ctctccagcc acagccccgg ttcagggtcc tccaccactc 3660
 agggacagga tgtcactctg gcccggcca cggaaccagc ttcagggtca gctgccacct 3720
 ggggacagga tgtcacctcg gtcccagtca ccaggccagc cctgggtctc accaccccg 3780
 cagcccacga tgtcacctca gcccggaca acaagccagc cccgggtctc accgcccc 3840
 cagcccacgg tgtcacctcg gcccggaca ccaggccggc cccgggtctc accgcccc 3900
 cagcccacgg tgtcacctcg gcccggaca ccaggccggc cctgggtctc accgcccc 3960
 cagtcacaa tgtcacctcg gctcagggt ctgcatcagg ctccagctct actctggtgc 4020
 acaacggcac ctctgccagg gctaccacaa cccagccag caagagcact ccattctcaa 4080
 ttcccagcca ccactctgat actcctacca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg 4140
 ccagtagcac tcaccatagc acggtacctc ctctcacctc ctccaatcac agcacttctc 4200
 cccagttgtc tactggggtc tcttctttt tctgtcttt tcacatttca aacctccagt 4260
 ttaattcctc tctggaagat cccagcaccg actactacca agagctgcag agagacattt 4320
 ctgaaatggt gagtatggc ctttccttcc ccattgtccc ctgaagcagc catcagaact 4380
 gtccacaccc ttgcatcaa gcccaggtcc tttccctctc acccagttt ttgcagattt 4440
 ataaacaagg gggttttctg ggcctctcca atattaagtt cagggtacagt tctgggtgtg 4500
 gaccagtggt ggtggttggg ggggtgggtg gtgggtcatga ccgtaggagg gactggtgca 4560
 ctaaggttg ggggaagagt gctgagccag agctgggacc cgtgggtgaa gtgcccattt 4620

10

20

30

ccctgtgacc aggccaggat ctgtggtggt acaattgact ctggccttcc gagaaggtag 4680
 catcaatgtc cagcagctgg agacacagtt caatcagtat aaaacggaag cagcctctcg 4740
 atataacctg acgatctcag acgtcagcgg tgaggctact tccctggctg cagccagcac 4800
 catgccgggg cccctctcct tccagtgtct gggtccccgc tctttcctta gtgctggcag 4860
 cgggaggggc gcctcctctg ggagactgcc ctgaccactg cttttccttt tagtgagtga 4920
 tgtgccattt cctttctctg cccagtctgg ggctgggggt ccaggctggg gcctcgcgt 4980
 gctggtgctg gtctgtgttc tggttgcgt ggccattgtc tatctcattg ccttggtag 5040
 tgcagtcctt ggccctgac agagcccccc ggtagaaggc actccatggc ctgccataac 5100
 ctccatctc cccaggctgt ctgtcagtg cgcgaaaga actacgggca gctggacatc 5160
 ttccagccc gggataccta ccctctatg agcgagtacc ccacctacca caccatggg 5220
 cgctatgtc cccctagcag taccgatcgt agccctatg agaaggtag attggcccc 5280
 acaggccagg ggaagcagag ggtttggtg ggcaaggatt ctgaagggg tacttgaaa 5340
 acccaaagag cttggaagag gtgagaagt gcgtgaagt agcaggggag ggccctggca 5400
 ggatgaggg cagaggtcag aggagtcttg ggggacaggc ctgggaggag actatggaag 5460
 aaagggggcc tcaagaggga gtggccccac tgccagaatt cctaaaagat cattggcgt 5520
 ccacattcat gctggctggc gctggctgaa ctgggtgccac cgtggcagtt ttgtttgtt 5580
 ttgctttttt gcaccagag gcaaaatggg tggagcacta tgccagggg agcccttccc 5640
 gaggagtccc aggggtgagc ctctgtgcc ctaatcatc cctaggaatg gagggtagac 5700
 cgagaaaggc tggcataggg ggaggtttcc caggtagaag caagaagaag tgtcagcaga 5760

10

20

30

ccagggtgagc gtgggtgccca gtgggggttct tgggagcttc aaggaagcaa ggaacgctcc 5820
 ctcccttccctc tccctggctct tctctatggg acctagtaaa taattactgc agccacctga 5880
 ggctggaaaa ccactccagg tgggggagga gagagtttag ttttcttgct cctattttcc 5940
 tcctcctgga gacctccctc tctcggtctt acaagacac agatacacc cgcccccaa 6000
 aacacacaca cacacacaca cacacacacc tccctaggct ggaacagcag agaattggagg 6060
 gacaaggggg ctgattagag ccaagaagag ggagtgaagg agagcagagg gaggagggca 6120
 gccctgttta cagtcacctg gctgggtggg tggcaggtgc tctctctgaa ttaacccttt 6180
 gagagctggc caggactctg gactgattac ccagcctgg ggtggcatcc aggggctcta 6240
 ggaggtacct tttgctctc accctggatc tcttttccct ccaccagggt ttctgcaggt 6300
 aatgggtggca gcagcctctc ttacacaaac ccagcagtg cagccacttc tgccaacttg 6360
 taggggcacg tcgcccgtg agctgagtg ccagccagtg ccattccact ccactcaggt 6420
 tcttcagggc cagagcccct gcaccctggt tgggctggg agctgggagt tcaggtgggc 6480
 tgctcacacg tccttcagag gccccacaa tttctcgac acttctcagt gtgtggaagc 6540
 tcatgtgggc cctgaggct catgcctggg aagtgttggt gtgggggctc ccaggaggac 6600
 tggcccagag agccctgaga tagcggggat cctgaactgg actgaataaa acgtggtctc 6660
 ccactggcgc caacttctga tctttcatct gtgaccgtg ggcagcaggg cgtcagaatg 6720
 tgtgtgaggg ggctggggga ggagacaggg aggccaggag gcagtaagga gcgagtttgt 6780
 ttgagaagca ggagatgtga ggaggaggtg acattgggga gtaggggtgg cctgaggagc 6840
 cacctctggc taaccctggc agcacaagag gaaggaggaa acgaaacca ggcnggcttt 6900

10

20

30

ggagggctag cgtgactggg ctccgtgact gagctctgtg tgccagtggc tctcccctct 6960
 cctgcgctgg cccacgacct ccttgccctt ggcatgggtg cccccagggt gctctattct 7020
 tagctgtccg ggtgtgaagt aaatccttgg gcagtataa cagcccagag tcaacagggt 7080
 tgagataagc agaggctggg tcagatccgg gcgctggcac caggcccagc cccctccctg 7140
 accccggctn cccaccagc ctgctgcccc tggggtggnc tccacaacac cctgggaatg 7200
 ggggaagtgt tctggttccc tgacctttt ggcccaggca cgttgctgt ccctcgaccg 7260
 cattccccca gggcctgtgc tgcaggcctg gaagccctga ttggggcctg ccaccagcag 7320
 ccagagagct atgttcctg gcagctgtga tgcgctcagg ccggggccagg acacgtgtgg 7380
 caggaggctt agagcacctg cctggggcct tctctctca ggcaccagat ccattggttg 7440
 ctctgccta gaaccacagc ctagcaccct tgctccctcc cgcctaccac acccagcaca 7500
 gaaactcaca ggaatgattg cgctcagggg aggcagagat gtgcctggca tcacagttta 7560
 ttgtttataa accatgacaa taacagctgt tgctcagcac aggcctagca gagccactg 7620
 cagggggacg gcagcgggca ccagaggcct tgcctggccc aacccaatgg gaacaccag 7680
 actcagctgg gtccccaagg gagacttggc acattggcat ggggtgtggg caggtaaagc 7740
 atgcaagagg gagaagagg acataagggg catgcggtg cggggtgttg ggacccaat 7800
 aaataaagca ggatgacagg gtccccttcc cctcaccagg aatgcctgac agcgtccagc 7860
 cccaaagcct gcctgtccca aggctgtagt tcagcatcaa cagggcaggg agcttggcag 7920
 ggcaagggca gagctggaga tcatgcccag tnttcagggt gccctccctc ccaatcagcc 7980
 tggggggcac aggacaggga tggagaaggg gctctctcca tggcttgggt aacatgcaa 8040
 aggcaggta tagggcagac tcagtggggg tgggggcctg gctaacaagc aatggagaga 8100
 acggggggcca tccagagagg ttggcagaag agagccctg ggtcaagaga aaactttggg 8160
 gaagacaaga cacgggagaa g 8181

10

20

30

40

【図 1】

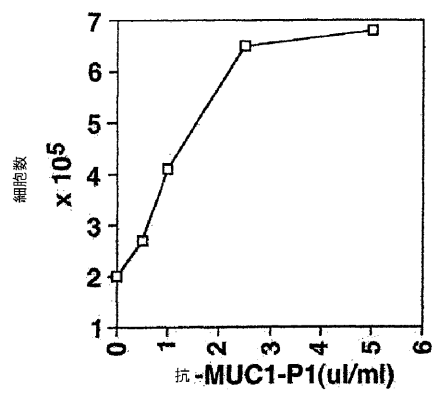


FIG. 1

【図 2】

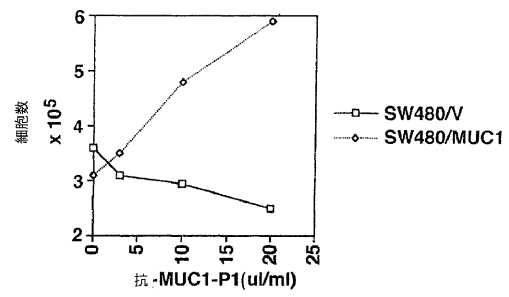


FIG. 2

【図 3】

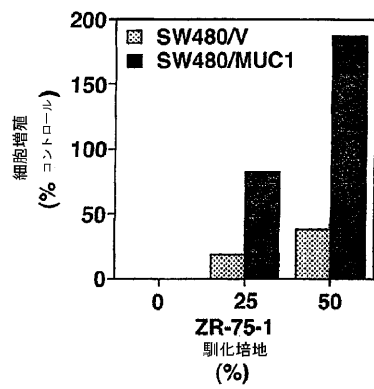


FIG. 3

【図 4】

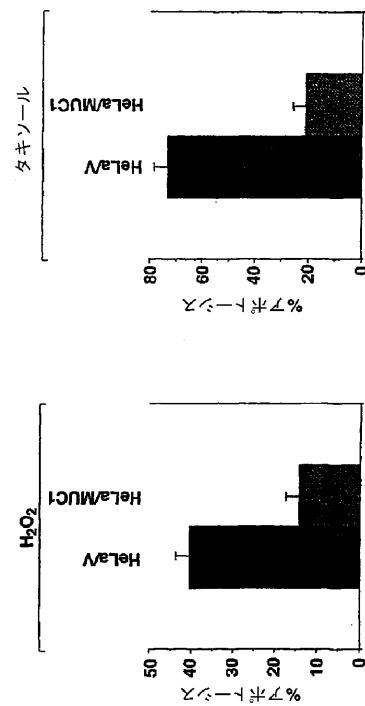


FIG. 4

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 35/66	(2006.01)	A 6 1 K 43/00	
A 6 1 K 36/00	(2006.01)	A 6 1 K 35/66	
A 6 1 K 31/704	(2006.01)	A 6 1 K 35/78	
A 6 1 K 31/475	(2006.01)	A 6 1 K 31/704	
		A 6 1 K 31/475	
		A 6 1 K 39/395	V

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 クフェ , ドナルド ダブリュー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 8 1 , ウェレスリー , グローブ ストリート 1
7 9

(72)発明者 大野 典也

東京都港区西新橋 3 - 2 5 - 8

審査官 宮坂 隆

(56)参考文献 国際公開第 0 0 / 0 0 0 8 2 8 (WO , A 1)

国際公開第 0 0 / 0 3 4 4 6 8 (WO , A 1)

Cancer Res. , 1 9 9 8 年 , Vol.58 , pp.5577-81

J. Biol. Chem. , 1 9 9 8 年 , Vol.273 , pp.10874-9

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

A61K 45/00-45/08

A61K 38/00-38/58

A61K 39/00-39/44

A61P 35/00-35/04

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	MUC1细胞外结构域和由其获得的癌症治疗组合物		
公开(公告)号	JP5165175B2	公开(公告)日	2013-03-21
申请号	JP2002526935	申请日	2001-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	点击铁唐纳德在AW 大野 典也		
申请(专利权)人(译)	Kufe, 唐纳德W... 大野 典也		
当前申请(专利权)人(译)	Dana Farber癌症研究所有限公司 Genzyme公司		
[标]发明人	クフェドナルドダブリュー 大野典也		
发明人	クフェ, ドナルド ダブリュー. 大野 典也		
IPC分类号	A61K38/00 A61K39/395 A61P35/00 A61K45/00 A61K51/00 A61K35/66 A61K36/00 A61K31/704 A61K31/475 G01N33/50 A61K39/00 A61K45/06 C07K14/47 C07K16/28 C07K16/30 C12N15/09 C12N15/11 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/3092 A61K38/00 A61K2039/505 C07K14/4727 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/3015 C07K2317/34 C07K2317/74 C12N2310/111 C12N2310/14 C12N2310/53		
FI分类号	A61K37/02.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P35/00 A61K45/00 A61K43/00 A61K35/66 A61K35 /78 A61K31/704 A61K31/475 A61K39/395.V		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/231841 2000-09-11 US		
其他公开文献	JP2004515472A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于抑制癌细胞增殖和用配体与MUC1细胞外结构域结合的拮抗剂治疗肿瘤的组合物和方法，这种结合与MUC1的致癌功能有关。

