

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6908381号
(P6908381)

(45) 発行日 令和3年7月28日 (2021.7.28)

(24) 登録日 令和3年7月5日 (2021.7.5)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C O 7 K 16/30 (2006.01)	C O 7 K 16/30 Z N A
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08

請求項の数 13 (全 108 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-549460 (P2016-549460)	(73) 特許権者	399052796
(86) (22) 出願日	平成27年1月29日 (2015.1.29)		ダイナ ファーバー キャンサー インス
(65) 公表番号	特表2017-505625 (P2017-505625A)		ティチュート, インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成29年2月23日 (2017.2.23)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/013410		2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
(87) 国際公開番号	W02015/116753		ベニュー 4 5 0
(87) 国際公開日	平成27年8月6日 (2015.8.6)	(73) 特許権者	511095713
審査請求日	平成30年1月22日 (2018.1.22)		ジーナス オンコロジー リミテッド ラ
(31) 優先権主張番号	61/933,001		イアビリティ カンパニー
(32) 優先日	平成26年1月29日 (2014.1.29)		アメリカ合衆国 6 0 6 1 4 イリノイ州
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		シカゴ ノース ラシーン アベニュー
前置審査		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MUC1-C/細胞外ドメイン (MUC1-C/ECD) に対する抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗腫瘍薬物に連結されており、かつ配列番号: 2によって規定されるMUC1-C細胞外ドメイン (MUC1-C/ECD) に選択的に結合するIgG抗体であって、

配列番号: 76、77、および78のCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに配列番号: 79、80、および81のCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み、

酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) で評価される場合、

(i) 配列番号: 2のアミノ酸配列からなるMUC1-C/ECDポリペプチドに対する抗体の反応性が、配列番号: 33、34、及び35によってそれぞれ規定されるペプチドのいずれによっても競合的に阻害されず、かつ

(ii) 配列番号: 2のアミノ酸配列からなるMUC1-C/ECDポリペプチドに対する抗体の反応性が、配列番号: 2のアミノ酸配列における19位のアスパラギン酸 (D) のグルタミン酸 (E) への変異によって部分的に減少する、
抗体。

【請求項 2】

一本鎖可変フラグメント、キメラ抗体、Fabフラグメント、MUC1-C/ECDおよび個別の癌細胞表面抗原に対する特異性を有する組換え抗体、マウス抗体、マウスIgG、ヒト化抗体、またはヒト化IgGである、請求項1記載の抗体。

【請求項 3】

(a) 標識をさらに含む；および／または

(b) ナノ粒子もしくはリポソームに抱合されている
請求項1記載の抗体。

【請求項4】

標識が、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素である、請求項3記載の抗体。

【請求項5】

抗腫瘍薬物が、
(a) 光解離性リンカーもしくは酵素的に切断されるリンカーを介して抗体に連結されている；および／または
(b) 毒素、化学療法剤、ラジオアイソトープ、サイトカイン、もしくは酵素である、
請求項1記載の抗体。

10

【請求項6】

重鎖および軽鎖が、
(a) それぞれ、配列番号：73および75と90%もしくはそれ以上の配列同一性を有する；または
(b) それぞれ、配列番号：72および74と85%もしくはそれ以上の配列同一性を有する核酸によってコードされる、
請求項1記載の抗体。

【請求項7】

請求項1または5記載の抗体を含む、MUC1陽性癌細胞を有する対象において癌を治療するための薬学的組成物。

20

【請求項8】

MUC1陽性癌細胞が、固形腫瘍細胞、白血病、骨髄腫、転移性癌細胞、多剤（multiply drug）耐性癌細胞、または再発癌細胞である、請求項7記載の薬学的組成物。

【請求項9】

固形腫瘍細胞が、肺癌細胞、脳腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、乳癌細胞、皮膚癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、子宮癌細胞、子宮頸癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、または食道癌細胞である、請求項8記載の薬学的組成物。

【請求項10】

白血病または骨髄腫が、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫である、請求項8記載の薬学的組成物。

30

【請求項11】

第二の抗癌剤または治療と組み合わせて使用される、請求項7記載の薬学的組成物。

【請求項12】

第二の抗癌剤または治療が

(a) 化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、もしくは毒素療法より選択される；および／または

(b) 細胞内MUC1機能を阻害する、
請求項11記載の薬学的組成物。

【請求項13】

第二の抗癌剤または治療が、第一の作用物質と同時、または第一の作用物質の前および／もしくは後に与えられる、請求項11記載の薬学的組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2014年1月29日に申請された米国仮出願第61/933,001号に対する優先権の恩典を主張するものであり、その全内容は参照により本明細書によって組み入れられる。

【0002】

40KB（Microsoft Windows（登録商標）で測定されたもの）である「GENUP0032WO_ST25.txt」と名付けられたファイルに含有され、かつ2015年1月29日に作成された配列表は、電

50

子提出によって本明細書とともに申請され、かつ参照により本明細書に組み入れられる。

【0003】

1. 発明の分野

本発明は、概して、医学、腫瘍学、および免疫療法学の分野に関係する。特に、MUC1陽性癌を検出するおよび治療することにおける使用のための免疫試薬の開発に関する。

【背景技術】

【0004】

2. 発明の背景

ムチンは、主として上皮細胞によって発現される広範囲にわたってO-グリコシル化されたタンパク質である。分泌型および膜結合型のムチンは、毒素、微生物、および外部環境との界面で生じる他の形態のストレスによって誘導されるダメージから上皮細胞の頂端境界を保護する物理的バリアを形成する。膜貫通型ムチン1 (MUC1) は、また、その細胞質ドメインを介して細胞の内部にシグナルを送達し得る。MUC1は、ウニ精子タンパク質-エンテロキナーゼ-アグリニン (SEA) ドメインの存在を除いて、他の膜結合型ムチンと配列類似性を有しない (Duraismy et al., 2006)。それに関して、MUC1は単一ポリペプチドとして翻訳され、次いでSEAドメインにおいて自己切断を受ける (Macao, 2006)。

【0005】

MUC1は、癌におけるその役割のために、本発明者らおよび他者によって広範囲にわたって研究されている。上述のように、ヒトMUC1は、小胞体において単一ポリペプチドとして翻訳されかつN末およびC末のサブユニット (MUC1-NおよびMUC1-C) に切断される、ヘテロ二量体糖タンパク質である (Ligtenberg et al., 1992; Macao et al., 2006; Levitin et al., 2005)。大部分のヒト癌腫において見出されるMUC1の異常な過剰発現 (Kufe et al., 1984) は、足場非依存的成長および腫瘍形成能を付与する (Li et al., 2003a; Huang et al., 2003; Schroeder et al., 2004; Huang et al., 2005)。他の研究により、MUC1の過剰発現は、酸化ストレスおよび遺伝毒性抗癌剤によって誘導されるアポトーシスに対する耐性を付与することが実証されている (Yin and Kufe, 2003; Ren et al., 2004; Raina et al., 2004; Yin et al., 2004; Raina et al., 2006; Yin et al., 2007)。

【0006】

拘束型および分泌型のムチンのファミリーは、上皮細胞表面の保護バリアを提供することに機能を果たす。上皮層へのダメージとともに、細胞はヘレグリン誘導性修復プログラムを開始させるため、近隣細胞との間の密着接合が分断されかつ極性が失われる (Vermeer et al., 2003)。MUC1-Nは細胞表面からのシェディングを受け (Abe and Kufe, 1989)、MUC1-Cを細胞の内部への環境ストレスシグナルの変換因子として機能させる。これに関して、MUC1-CはErbB受容体ファミリーのメンバーと細胞表面複合体を形成し、かつMUC1-Cは、ヘレグリン刺激に応答して核に標的化される (Li et al., 2001; Li et al., 2003c)。MUC1-Cは、MUC1細胞質ドメイン (CD) とカテニンファミリーのメンバーとの間の直接相互作用を介して、ErbB受容体およびWntシグナル伝達経路を統合することにおいても機能を果たす (Huang et al., 2005; Li et al., 2003c; Yamamoto et al., 1997; Li et al., 1998; Li et al., 2001; Li and Kufe, 2001)。他の研究により、MUC1-CDは、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β 、c-Src、プロテインキナーゼC δ 、およびc-Ablによってリン酸化されることが実証されている (Raina et al., 2006; Li et al., 1998; Li et al., 2001; Ren et al., 2002)。前述の相互作用のいずれかを阻害することは、MUC1関連癌に対する治療的介入の潜在的地点となる。

【発明の概要】

【0007】

ゆえに、本発明に従って、配列番号：2によって規定されるMUC1-C/細胞外ドメイン (MUC1-C/ECD) に選択的に結合する抗体が提供され、該抗体は、

- (a) IgG抗体であり；
- (b) 癌細胞成長を阻害し；
- (c) 癌細胞死を誘導し；

10

20

30

40

50

(d) それぞれ、各々が配列番号：3、4、および5、もしくは6、7、および8、もしくは27、28、および29、もしくは42、43、および44、もしくは45、46、および47、もしくは48、49、および50と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに各々が配列番号：9、10、および11、もしくは12、13、および14、もしくは30、31、および32、もしくは51、52、および53、もしくは54、55、および56、もしくは57、58、および59と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み；

(e) それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、もしくは68と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変重鎖、および配列番号：17、21、25、62、66、70と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変軽鎖を含み；かつ/または

(f) それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、もしくは69と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変重鎖、および配列番号：18、22、26、63、67、もしくは71と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変軽鎖を含む。

【0008】

重鎖および軽鎖は、それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、または68と、および17、21、25、62、66、または70と85%、90%、95%、または99%の相同性を有し得る。重鎖および軽鎖は、それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、または69と、および18、22、26、63、67、または71と85%、90%、95%、または99%の相同性を有する核酸によってコードされ得る。一態様において、抗体は、配列番号：33、34、または35に結合しない。

【0009】

抗体は、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、キメラ抗体、またはFabフラグメントであり得る。抗体は、MUC1-C/ECDおよび個別の癌細胞表面抗原に対する特異性を有する組換え抗体であり得る。抗体は、マウス抗体、IgG、ヒト化抗体、またはヒト化IgGであり得る。抗体は、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素などの標識をさらに含み得る。抗体は、光解離性リンカーまたは酵素的に切断されるリンカーを介して該抗体に連結されたものなど、それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含み得る。抗腫瘍薬物は、毒素、ラジオアイソトープ、サイトカイン、または酵素であり得る。抗体は、ナノ粒子またはリポソームに抱合され得る。細胞死の誘導には、抗体依存性細胞傷害または補体介在性細胞傷害が含まれ得る。

【0010】

対象におけるMUC1陽性癌細胞と上記で記載される抗体とを接触させる工程を含む、癌を治療する方法も提供される。MUC1陽性癌細胞は、肺癌細胞、脳腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、乳癌細胞、皮膚癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、子宮癌細胞、子宮頸癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、皮膚癌細胞、もしくは食道癌細胞などの固形腫瘍細胞であり得る、または急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、もしくは多発性骨髄腫などの白血病もしくは骨髄腫であり得る。

【0011】

方法は、MUC1陽性癌細胞と、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、または毒素療法など、第二の抗癌剤または治療とを接触させる工程をさらに含み得る。第二の抗癌剤または治療は、細胞内MUC1機能を阻害し得る。第二の抗癌剤または治療は、第一の作用物質と同時に与えられ得る、または第一の作用物質の前および/もしくは後に与えられ得る。MUC1陽性癌細胞は、転移性癌細胞、多剤 (multiply drug) 耐性癌細胞、または再発癌細胞であり得る。

【0012】

抗体は、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、キメラ抗体、またはFabフラグメントであり得る。抗体は、MUC1-C/ECDおよび個別の癌細胞表面抗原に対する特異性を有する組換え抗体であり得る。抗体は、マウス抗体、IgG、ヒト化抗体、またはヒト化IgGであり得る。抗体は、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素などの標識をさらに含み得る。抗体は、光解離性リンカーまたは酵素的に切断されるリンカ

10

20

30

40

50

ーを介して該抗体に連結されたものなど、それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含み得る。抗腫瘍薬物は、毒素、ラジオアイソトープ、サイトカイン、または酵素であり得る。抗体は、ナノ粒子またはリポソームに抱合され得る。

【0013】

(i) 配列番号：2によって規定されるMUC1-C/細胞外ドメイン（MUC1-C/ECD）に選択的に結合する第一の一本鎖抗体であって、該抗体は、

(a) IgG抗体であり；

(b) 癌細胞成長を阻害し；

(c) 癌細胞死を誘導し；

(d) それぞれ、各々が配列番号：3、4、および5、もしくは6、7、および8、もしくは27、28、および29、もしくは42、43、および44、もしくは45、46、および47、もしくは48、49、および50と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに各々が配列番号：9、10、および11、もしくは12、13、および14、もしくは30、31、および32、もしくは51、52、および53、もしくは54、55、および56、もしくは57、58、および59と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み；

(e) それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、もしくは68と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変重鎖、および配列番号：17、21、25、62、66、70と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変軽鎖を含み；かつ/または

(f) それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、もしくは69と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変重鎖、および配列番号：18、22、26、63、67、もしくは71と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変軽鎖を含む、第一の一本鎖抗体；ならびに

(ii) TまたはB細胞に結合する第二の一本鎖抗体を含む融合タンパク質も提供される。

【0014】

第二の一本鎖抗体は、CD3に、T細胞に、またはB細胞に結合し得る。融合タンパク質は、標識または治療成分をさらに含み得る。一態様において、第一の一本鎖抗体は、配列番号：3、4、または5に結合しない。

【0015】

別の態様において、

(i) 配列番号：2によって規定されるMUC1-C/細胞外ドメイン（MUC1-C/ECD）に選択的に結合する一本鎖抗体可変領域を含むエクストドメインであって、該抗体は、

(a) IgG抗体であり；

(b) 癌細胞成長を阻害し；

(c) 癌細胞死を誘導し；

(d) それぞれ、各々が配列番号：3、4、および5、もしくは6、7、および8、もしくは27、28、および29、もしくは42、43、および44、もしくは45、46、および47、もしくは48、49、および50と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに各々が配列番号：9、10、および11、もしくは12、13、および14、もしくは30、31、および32、もしくは51、52、および53、もしくは54、55、および56、もしくは57、58、および59と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み；

(e) それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、もしくは68と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変重鎖、および配列番号：17、21、25、62、66、70と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変軽鎖を含み；かつ/または

(f) それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、もしくは69と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変重鎖、および配列番号：18、22、26、63、67、もしくは71と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変軽鎖、そしてそれとともに、該一本鎖抗体可変領域のC末端に付着した

柔軟性のあるヒンジを含む、エクトドメイン；

(ii) 膜貫通ドメイン；ならびに

(iii) エンドドメインであって、該エンドドメインは、該一本鎖抗体可変領域がMUC1と係合した場合にシグナル変換機能を含む、エンドドメインを含むキメラ抗原受容体が提供される。

【0016】

膜貫通およびエンドドメインは、同じ分子に由来し得る。エンドドメインは、CD3-ζドメインまたは高アフィニティーFcεRIを含む。柔軟性のあるヒンジは、CD8αまたはIg由来のものであり得る。このキメラ抗原受容体を発現する細胞も提供される。一態様において、一本鎖可変領域は、配列番号：3、4、または5に結合しない。

10

【0017】

本明細書において記載される任意の方法または組成物を、本明細書において記載される他の任意の方法または組成物に対して実行し得ることが企図される。

【0018】

特許請求の範囲および/または本明細書において、「a」または「an」という単語の使用は、「含む (comprising)」という用語と合わせて用いられる場合に「1つ」を意味し得るが、それは、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは1つを上回る」という意味とも矛盾しない。「約」という単語は、明記された数のプラスまたはマイナス5%を意味する。

20

【0019】

[本発明1001]

配列番号：1によって規定されるMUC1-C細胞外ドメイン (MUC1-C/ECD) に選択的に結合する抗体であって、

(a) IgG抗体であり；

(b) 癌細胞成長を阻害し；

(c) 癌細胞死を誘導し；

(d) それぞれ、各々が配列番号：3、4、および5、もしくは6、7、および8、もしくは27、28、および29、もしくは42、43、および44、もしくは45、46、および47、もしくは48、49、および50、もしくは76、77、および78と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに各々が配列番号：9、10、および11、もしくは12、13、および14、もしくは30、31、および32、もしくは51、52、および53、もしくは54、55、および56、もしくは57、58、および59、もしくは79、80、および81と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み；

30

(e) それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、68、もしくは73と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変重鎖、および配列番号：17、21、25、62、66、70、もしくは75と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変軽鎖を含み；かつ/または

(f) それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、69、もしくは72と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変重鎖、および配列番号：18、22、26、63、67、71、もしくは74と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変軽鎖を含む、抗体。

40

[本発明1002]

一本鎖抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1003]

単一ドメイン抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1004]

キメラ抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1005]

Fabフラグメントである、本発明1001の抗体。

[本発明1006]

50

MUC1-C/ECDおよび個別の癌細胞表面抗原に対する特異性を有する組換え抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1007]

マウス抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1008]

マウス抗体がIgGである、本発明1007の抗体。

[本発明1009]

ヒト化抗体である、本発明1001の抗体。

[本発明1010]

ヒト化抗体がIgGである、本発明1009の抗体。

10

[本発明1011]

標識をさらに含む、本発明1001の抗体。

[本発明1012]

標識が、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素である、本発明1011の抗体。

[本発明1013]

それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含む、本発明1001の抗体。

[本発明1014]

抗腫瘍薬物が、光解離性リンカーを介して抗体に連結されている、本発明1013の抗体。

[本発明1015]

抗腫瘍薬物が、酵素的に切断されるリンカーを介して抗体に連結されている、本発明1013の抗体。

20

[本発明1016]

抗腫瘍薬物が、毒素、ラジオアイソトープ、サイトカイン、または酵素である、本発明1013の抗体。

[本発明1017]

重鎖および軽鎖がそれぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、68、または73と、および17、21、25、62、66、70、または75と85%、90%、95%、または99%の相同性を有する、本発明1001の抗体。

[本発明1018]

重鎖および軽鎖がそれぞれ、配列番号：14、18、24、61、65、69、または72と、および18、22、26、63、67、71、または74と85%、90%、95%、または99%の相同性を有する核酸によってコードされる、本発明1001の抗体。

30

[本発明1019]

ナノ粒子またはリポソームに抱合されている、本発明1001の抗体。

[本発明1020]

細胞死の誘導が、抗体依存性細胞傷害または補体介在性細胞傷害を含む、本発明1001の抗体。

[本発明1021]

対象におけるMUC1陽性癌細胞と本発明1001の抗体とを接触させる工程を含む、癌を治療する方法。

40

[本発明1022]

MUC1陽性癌細胞が固形腫瘍細胞である、本発明1021の方法。

[本発明1023]

固形腫瘍細胞が、肺癌細胞、脳腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、乳癌細胞、皮膚癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、子宮癌細胞、子宮頸癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、皮膚癌細胞、または食道癌細胞である、本発明1022の方法。

[本発明1024]

MUC1陽性癌細胞が白血病または骨髄腫である、本発明1021の方法。

[本発明1025]

50

白血病または骨髄腫が、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫である、本発明1024の方法。

[本発明1026]

MUC1陽性癌細胞と第二の抗癌剤または治療とを接触させる工程をさらに含む、本発明1021の方法。

[本発明1027]

第二の抗癌剤または治療が、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、または毒素療法より選択される、本発明1026の方法。

[本発明1028]

第二の抗癌剤または治療が、細胞内MUC1機能を阻害する、本発明1026の方法。

10

[本発明1029]

第二の抗癌剤または治療が、第一の作用物質と同時に与えられる、本発明1026の方法。

[本発明1030]

第二の抗癌剤または治療が、第一の作用物質の前および/または後に与えられる、本発明1026の方法。

[本発明1031]

MUC1陽性癌細胞が、転移性癌細胞、多剤 (multiply drug) 耐性癌細胞、または再発癌細胞である、本発明1021の方法。

[本発明1032]

抗体が一本鎖抗体である、本発明1021の方法。

20

[本発明1033]

抗体が単一ドメイン抗体である、本発明1021の方法。

[本発明1034]

抗体がキメラ抗体である、本発明1021の方法。

[本発明1035]

抗体がFabフラグメントである、本発明1021の方法。

[本発明1036]

抗体が、MUC1-C/ECDおよび個別の癌細胞表面抗原に対する特異性を有する組換え抗体である、本発明1021の方法。

[本発明1037]

抗体がマウス抗体である、本発明1021の方法。

30

[本発明1038]

マウス抗体がIgGである、本発明1037の方法。

[本発明1039]

抗体がヒト化抗体である、本発明1021の方法。

[本発明1040]

ヒト化抗体がIgGである、本発明1039の方法。

[本発明1041]

抗体が、それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含む、本発明1021の方法。

[本発明1042]

40

抗腫瘍薬物が、光解離性リンカーを介して抗体に連結されている、本発明1041の方法。

[本発明1043]

抗腫瘍薬物が、酵素的に切断されるリンカーを介して抗体に連結されている、本発明1041の方法。

[本発明1044]

抗腫瘍薬物が、毒素、ラジオアイソトープ、サイトカイン、または酵素である、本発明1041の方法。

[本発明1045]

抗体が標識をさらに含む、本発明1021の方法。

[本発明1046]

50

標識が、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素である、本発明1045の方法。

[本発明1047]

重鎖および軽鎖がそれぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、68、または73と、および17、21、25、62、66、70、または75と85%、90%、95%、または99%の相同性を有する、本発明1021の方法。

[本発明1048]

重鎖および軽鎖がそれぞれ、配列番号：14、18、24、61、65、69、または72と、および18、22、26、63、67、71、または74と85%、90%、95%、または99%の相同性を有する核酸によってコードされる、本発明1021の方法。

[本発明1049]

抗体がリボソームまたはナノ粒子に抱合されている、本発明1021の方法。

[本発明1050]

抗体が、抗体依存性細胞傷害または補体介在性細胞傷害などによる細胞死の誘導をもたらす (results in)、本発明1021の方法。

[本発明1051]

(i) 配列番号：1によって規定されるMUC1-C/細胞外ドメイン (ECD) に選択的に結合する第一の一本鎖抗体であって、

(a) IgG抗体であり；

(b) 癌細胞成長を阻害し；

(c) 癌細胞死を誘導し；

(d) それぞれ、各々が配列番号：3、4、および5、もしくは6、7、および8、もしくは27、28、および29、もしくは42、43、および44、もしくは45、46、および47、もしくは48、49、および50、もしくは76、77、および78と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに各々が配列番号：9、10、および11、もしくは12、13、および14、もしくは30、31、および32、もしくは51、52、および53、もしくは54、55、および56、もしくは57、58、および59、もしくは79、80、および81と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み；

(e) それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、68、もしくは73と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変重鎖、および配列番号：17、21、25、62、66、70、もしくは75と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変軽鎖を含み；かつ/または

(f) それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、69、もしくは72と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変重鎖、および配列番号：18、22、26、63、67、71、もしくは74と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変軽鎖を含む、第一の一本鎖抗体；ならびに

(ii) TまたはB細胞に結合する第二の一本鎖抗体を含む融合タンパク質。

[本発明1052]

第二の一本鎖抗体がCD3に結合する、本発明1051の融合タンパク質。

[本発明1053]

第二の一本鎖抗体がT細胞に結合する、本発明1051の融合タンパク質。

[本発明1054]

第二の一本鎖抗体がB細胞に結合する、本発明1051の融合タンパク質。

[本発明1055]

融合タンパク質が標識または治療用成分をさらに含む、本発明1051の融合タンパク質。

[本発明1056]

(i) 配列番号：1によって規定されるMUC1-C/細胞外ドメイン (MUC1-C/ECD) に選択的に結合する一本鎖抗体可変領域を含むエクストドメインであって、該抗体が、

10

20

30

40

50

(a) IgG抗体であり；
 (b) 癌細胞成長を阻害し；
 (c) 癌細胞死を誘導し；
 (d) それぞれ、各々が配列番号：3、4、および5、もしくは6、7、および8、もしくは27、28、および29、もしくは42、43、および44、もしくは45、46、および47、もしくは48、49、および50、もしくは76、77、および78と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変重鎖、ならびに各々が配列番号：9、10、および11、もしくは12、13、および14、もしくは30、31、および32、もしくは51、52、および53、もしくは54、55、および56、もしくは57、58、および59、もしくは79、80、および81と90%もしくはそれを上回る割合の相同性を有するCDR1、CDR2、およびCDR3領域を含む可変軽鎖を含み；

10

(e) それぞれ、配列番号：15、19、23、60、64、68、もしくは73と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変重鎖、および配列番号：17、21、25、62、66、70、もしくは75と80%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する可変軽鎖を含み；かつ/または

(f) それぞれ、配列番号：16、20、24、61、65、69、もしくは72と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変重鎖、および配列番号：18、22、26、63、67、71、もしくは74と70%もしくはそれを上回る割合の相同性を有する核酸によってコードされる可変軽鎖、そしてそれとともに、該一本鎖抗体可変領域のC末端に付着した柔軟性のあるヒンジを含む、エクストドメイン；

20

(ii) 膜貫通ドメイン；ならびに

(iii) 該一本鎖抗体可変領域がMUC1と係合した場合のシグナル変換機能を含むエンドドメイン

を含むキメラ抗原受容体。

[本発明1057]

膜貫通およびエンドドメインが同じ分子に由来する、本発明1056の受容体。

[本発明1058]

エンドドメインが、CD3- ζ ドメインまたは高アフィニティーFc ϵ RIを含む、本発明1056の受容体。

[本発明1059]

柔軟性のあるヒンジが、CD8 α またはIg由来のものである、本発明1056の受容体。

30

[本発明1060]

本発明1056のキメラ抗原受容体を発現する細胞。

[本発明1061]

膜貫通およびエンドドメインが同じ分子に由来する、本発明1060の細胞。

[本発明1062]

エンドドメインが、CD3- ζ ドメインまたは高アフィニティーFc ϵ RIを含む、本発明1060の細胞。

[本発明1063]

柔軟性のあるヒンジが、CD8 α またはIg由来のものである、本発明1060の細胞。

40

本発明の他の目的、特質、および利点は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、この詳細な説明から、本発明の精神および範囲の内での様々な変化および改変が当業者に明らかになるであろうため、詳細な説明および具体的な例は、本発明の具体的な態様を示すと同時に、単なる例証として与えられることが理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、かつ本発明のある特定の局面をさらに実証するために含まれる。本発明は、本明細書において提示される具体的な態様についての詳細な説明と組み合わせて、これらの図面のうちの1つまたは複数を参照することにより、よ

50

りよく理解され得る。

【0021】

(図1) (図1A) MUC1-C/ECDのアミノ酸配列(58aa: 配列番号: 2)。(図1B) mFc-リンカー-MUC1-C/ECD-シグナル配列構築物は、CHO-K1細胞において安定して発現した。タンパク質をCHO細胞のスーパーから精製し、かつそれを用いてマウスに免疫付与する。同じタンパク質を用いて、マウスをブーストした。血清力価を判定し、かつ陽性力価に従って、脾臓を融合させてハイブリドーマを作出した。

(図2) (保留)

(図3) MUC1-C/ECDタンパク質由来の3種の重複ペプチドを合成して、ELISAアッセイを用いた陽性Mabクローンに関する線状エピトープマッピングにおいて用いた。3種のペプチドに関する配列は、

P1:SVVVQLTLAFREGTINVHDTVET (配列番号: 33);

P2:VETQFNQYKTEAASRYNLTISD (配列番号: 34);

P3:TISDVSVDVPPFSAQSGAG (配列番号: 35)

である。

(図4) (上記で記載される)いくつかの点変異体を有するMUC1-C/ECD cDNAを作出した(ECD-WT-配列番号: 2; ECD-L6A-配列番号: 36; ECD-L8A-配列番号: 37; ECD-L6, 8A-配列番号: 38; ECD-Q23V-配列番号: 39; ECD-Q26V-配列番号: 40; ECD-N36A-配列番号: 41)。CHO-K1細胞にこれらのcDNAのそれぞれを個々にトランスフェクトして、タンパク質を発現させかつ分泌させた。タンパク質を精製し、かつそれを用いて、ELISAアッセイを用いた陽性Mabクローンに関する立体構造的エピトープを規定する。陽性対照は、CHO-K1細胞から発現されかつ精製されたwt mFc-MUC1-C/ECDタンパク質である。

(図5) (保留)

(図6) (図6A) 免疫付与の後、マウスを採血し、かつ免疫血清を、MUC1-C/ECDタンパク質を用いた免疫ブロッキングによって解析した。MUC1-C/CDタンパク質を陰性対照として用いた。(図6B) Mabクローン8E1、8F1、2A6、および6A6を、CHO-K1細胞から精製されたmFc-およびhFc-MUC1-C/ECDタンパク質を用いた免疫ブロッキングによって解析した。二次Ab: 抗マウスHRP (F(ab)2特異的) (1:5000)。(図6C) MUC1陰性293T細胞、NSC LC H-1975、ならびにMCF-7およびZR-75-1乳癌腫の細胞溶解物を、クローン6A6抗体を用いた免疫ブロッキングによって解析した。

(図7) Mabクローン8E1、6A6、2G11、および2H11を、細菌から産生されかつ精製されたmFc-MUC1-C/ECD (p58-mFc)、MUC1-SEAドメイン (p62-mFc)、およびp62単独のタンパク質を用いた免疫ブロッキングによって解析した。

(図8) Mabクローン8E1、6A6、2G11、および2H11を、細菌から精製されたmFc-MUC1-C/ECD (p58-mFc)、MUC1-SEAドメイン (p62-mFc)、およびp62単独のタンパク質を用いた免疫ブロッキングによって解析した。

(図9) Mabクローン8E1、6A6、2G11、および2H11を、細菌から精製されたmFc-MUC1-C/ECD (p58-mFc)、MUC1-SEAドメイン (p62-mFc)、およびp62単独のタンパク質を用いた免疫ブロッキングによって解析した。

(図10) Mabクローン8E1、6A6、および陽性対照DF3を、MV4-11、MOLM-14 (AML); U266、RPMI8226 (多発性骨髄腫)、および原発性AML細胞を用いたフローサイトメトリーによって解析した。

(図11) Mabクローン8E1および6A6を、K562/CsiRNAおよびK562/MUC1siRNA CML細胞を用いたフローサイトメトリーによって解析した。

(図12) 37℃で3時間、H-1975非小細胞肺癌腫細胞を用いた、FITC標識抗MUC1-C/ECD Mab 8E1の内在化。後期エンドソーム/リソソーム小胞 (矢印) におけるキャッピングおよび点状染色。

(図13) 37℃で3時間、H-1975非小細胞肺癌腫細胞を用いた、FITC標識抗MUC1-C/ECD Mab 6A6の内在化。後期エンドソーム/リソソーム小胞 (矢印) におけるキャッピングお

10

20

30

40

50

よび点状染色。

(図14) 37℃で3時間、ZR-75-1乳癌腫細胞を用いた、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6の内在化。

(図15) 4℃または37℃で3時間、MUC1陰性HEK-293T細胞を用いた、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6のたとえあったとしてもわずかな染色。

(図16) 37℃で3時間、MOLM-14 AML細胞を用いた、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体8E1の内在化。

(図17) 37℃で3時間、K562/MUC1siRNAおよびK562/CsiRNA CML細胞を用いた、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体8E1の内在化。

(図18) 4℃でZR-75-1乳癌腫細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6の原形質膜染色、およびRFP初期エンドソームマーカーとのその共局在。 10

(図19) 37℃でZR-75-1乳癌腫細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6の内在化、およびRFP-エンドサイト(endocyte)マーカーとのその共局在。

(図20) 37℃でH-1975 NSCLC細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6の内在化、およびRFP-エンドサイトマーカーとのその共局在(矢印)。

(図21) 37℃でH-1975 NSCLC細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体8E1の内在化、およびRFP-エンドサイトマーカーとのその共局在(矢印)。

(図22) 37℃でH-1975 NSCLC細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体8E1の内在化、およびRFP-リソソームマーカーとのその共局在(矢印)。

(図23) 37℃でH-1975 NSCLC細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6の内在化、およびRFP-リソソームマーカーとのその共局在(矢印)。 20

(図24) 37℃で3時間、マウスNSCLC(KW-814)細胞を用いた、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体6A6の内在化。

(図25) 37℃で3時間、K562 CML細胞を用いた、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体8E1および6A6の内在化。IgG標識化を陰性対照として用いた。RFP-リソソームIFを陽性対照として用いた。

(図26) 37℃における、RFP-エンドサイトマーカーをトランスフェクトされたH-1975 NSCLC細胞の免疫蛍光(右のパネル)。Alexa Fluor 488標識アイソタイプ対照IgG抗体とともにインキュベートした、RFP-エンドサイトマーカーをトランスフェクトされたH-1975細胞の染色(中央のパネル)。 30

(図27) 37℃における、RFP-リソソームマーカーをトランスフェクトされたH-1975 NSCLC細胞の免疫蛍光(右のパネル)。Alexa Fluor 488標識アイソタイプ対照IgG抗体とともにインキュベートした、RFP-リソソームマーカーをトランスフェクトされたH-1975細胞の染色(中央のパネル)。

(図28) 37℃でH-1975 NSCLC細胞における、Alexa Fluor 488標識抗MUC1-C/ECD抗体8E1の内在化、およびRFP-リソソームマーカーとのその共局在。

(図29) マウス384免疫付与からの抗体クローンの選択。

(図30) 細菌において作製されたMUC1タンパク質との、抗MUC1-C/ECD抗体の相互作用。

(図31) HCT-116/ベクター細胞およびHCT-116/MUC1細胞を、7B8またはマウスIgGとともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン(fluorescein)抱合型抗体(Santa Cruz Biotechnology)とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACScanによって検出した。結果は、HCT-116/ベクター細胞(MUC1陰性)とは対照的に、MUC1陽性HCT-116/MUC1細胞において、7B8の強力な反応性が見られたことを実証している。 40

(図32) ZR-75-1乳癌腫細胞を、7B8またはマウスIgGとともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン抱合型抗体(Santa Cruz Biotechnology)とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACScanによって検出した。結果は、IgG対照とは対照的に、7B8がZR-75-1細胞と強力に反応したことを実証している。 50

(図33) ZR-75-1乳癌腫細胞、MCF-7乳癌腫細胞、およびHCT-116/MUC1結腸癌腫細胞を7B8とともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン抱合型抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACSscanによって検出した。結果は、7B8がこれらすべての細胞タイプと強力に反応したことを実証している。

(図34) MDA-MB-468/CshRNAおよびMDA-MB-468/MUC1shRNA三重乳癌腫細胞、MCF-7乳癌腫細胞を、IgGまたは7B8のいずれかとともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン抱合型抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACSscanによって検出した。結果は、MDA-MB-468/MUC1shRNA (MUC1が下方調節された) 細胞とは対照的に、MUC1陽性MDA-MB-468/CshRNA細胞において、7B8の強力な反応性が見られたことを実証している。

10

(図35) ZR-75-1乳癌腫細胞、MCF-7乳癌腫細胞、およびHCT-116/MUC1結腸癌腫細胞を、2B11とともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン抱合型抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACSscanによって検出した。結果は、2B11が3種すべての細胞タイプと強力に反応したことを実証している。

(図36) ZR-75-1乳癌腫細胞、MCF-7乳癌腫細胞、およびHCT-116/MUC1結腸癌腫細胞を、4G5とともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン抱合型抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACSscanによって検出した。結果は、4G5が3種すべての細胞タイプと強力に反応したことを実証している。

20

(図37) HCT116/MUC1野生型細胞およびHCT116/MUC1-CQC→AQA変異体細胞を、7B8とともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリン-フルオレセイン抱合型抗体 (Santa Cruz Biotechnology) とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACSscanによって検出した。結果は、両方の細胞タイプとの7B8の強力な反応性を実証しており、7B8の結合にはMUC1-C/MUC1-Cホモ二量体化を要しないことを示している。

(図38) プレートに抗原をコーティングすることによってELISAアッセイを実施し、ならびに多数の種々の濃度の精製抗体7B8、4G5、および2B11との反応性。結合曲線は、3種すべての抗体との同程度の反応性を実証している。

30

(図39) 7B8、2B11、および4G5クローンからの結果の概要。

(図40) プレートに野生型抗原および種々の変異体タンパク質 (LTL→ATA; QFNQ→AFNQおよびQFNA) をコーティングすることによってELISAアッセイを実施し、種々の精製抗体7B8、4G5、および2B11との反応性。変異体タンパク質に対する種々の抗体クローンの感度が、図に記載されている。

(図41) 2B11クローンの重鎖および軽鎖由来のCDR領域についての配列解析。

(図42) 4G5クローンの重鎖および軽鎖由来のCDR領域についての配列解析。

(図43) 7B8クローンの重鎖および軽鎖由来のCDR領域についての配列解析。

(図44) 結腸癌腫のFFPE切片における、7B8抗体を用いたIHC解析。

40

(図45) 細胞溶解物全体を用いたウェスタンブロッティングにおける7B8抗体の性能を解析し、かつ結果は、MUC1-Cタンパク質との抗MUC1-C/ECD抗体の特異的反応性を実証している。293T細胞はMUC1を発現せず、それゆえウェスタンブロット解析における陰性。

(図46) 2B11、7B8、および4G5抗体を用いて、ELISAアッセイを実施した。結果は、ペプチドのいずれかによる、これら3種の抗体の反応性の阻害がないことを実証しており、エпитープが線状ではないことを示している。

(図47) 7B8および3D1クローンの線状エпитープマッピング：重複ペプチド。MUC1-C/ECD領域 (58アミノ酸) 全体にわたる3種の重複ペプチドを合成した。プレートにMUC1-C/ECD抗原をコーティングし、かつP1、P2、またはP3ペプチドの存在下または非存在下で、7B8または3D1精製抗体とともにインキュベートして、ELISAアッセイを実施した。

50

(図48) 点変異体を用いた、7B8および3D1の立体構造的エピトープマッピング。MUC1-C/ECD領域において、8種の決定的な個々の点変異体を作成し、かつそれぞれのタンパク質を精製した。別個の96ウェルプレートに、これら8種の精製タンパク質をコーティングした。7B8および3D1精製抗体をこれらのプレートのそれぞれとインキュベートし、かつELISAアッセイを実施した。

(図49) 7B8および3D1の立体構造的エピトープマッピング。ZR-75-1乳癌腫細胞をATCCから入手し、かつ10%熱不活性化ウシ胎仔血清+抗生物質を有するDMEM中で維持した。細胞を、精製MUC1-C/ECDタンパク質または相当量のPBSのいずれかとともにインキュベートした。インキュベーションの後、7B8または3D1抗体を添加し、かつ細胞をフローサイトメトリー解析のために調製した。DF3抗体を陽性対照として用い、かつ抗MUC1-C/CD抗体(CD1)を陰性対照として用いた。適当な工程の後、細胞をフローによって解析した。

(図50) ハイブリドーマ441.3.3D1.D6.D11.B1.F10のモノクローナル抗体シーケンシング。凍結ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出し、かつ該RNAからcDNAを合成した。次いで、PCRを実施して、抗体の可変領域(重鎖および軽鎖)を増幅し、次いでそれを標準的なクローニングベクター内に別個にクローニングしかつシーケンシングした。正しいVHおよびVLインサートサイズを有する5個の単一コロニーをシーケンシングした。リーダーアミノ酸配列(重鎖)およびリーダーアミノ酸配列(軽鎖)が通常テキストで図に示されており、CDRに下線が引かれ、かつフレームワーク領域は太字である。重鎖=配列番号: 82; 軽鎖=配列番号: 83。

(図51) 7B8および3D1抗体の抗体-薬物抱合体(ADC)、ならびにこれらの抗体-薬物抱合体の生物学的活性。

(図52) 提供されたハイブリドーマ536064-1の全RNAについてのアガロースゲル電気泳動。(図52A) DNA Marker III。(図52B) レーンM、DNA Marker III; レーンR、536064-1の全RNA。

(図53) 536064-1のPCR産物についてのアガロースゲル電気泳動。レーンM、DNA Marker III; レーン1、V_H 536064-1; レーン2、V_L 536064-1。

【発明を実施するための形態】

【0022】

例証的な態様の説明

本発明者らは、MUC1-Cタンパク質の外部ドメインのシェディングを受けない58アミノ酸部分に対する抗体を作った。これらの抗体は、MUC1-Cのこの部分に選択的に結合し、かつそのようなものとして、N末領域の切断後のMUC1の活性を遮断する機会を提示することが実証されている。N末MUC1ドメインの切断後でさえ、それらを用いて、MUC1発現癌細胞に治療用搭載物を送達することもできる。本発明のこれらのおよび他の局面は、下記でより詳細に記載される。

【0023】

I. MUC1

A. 構造

MUC1は、正常な分泌上皮細胞の頂端境界に発現されるムチン型糖タンパク質である(Kufe et al., 1984)。MUC1は、小胞体における単一ポリペプチドとしての翻訳および2つのサブユニットへの前駆体の切断の後、ヘテロ二量体を形成する(Ligtenberg et al., 1992)。切断は、自己触媒過程によって仲介され得る(Levitani et al., 2005)。>250kDaのMUC1 N末(MUC1 N-ter、MUC1-N)サブユニットは、高度に保存された変動を有して不完全でありかつO-結合型グリカンによって修飾される、可変数の20アミノ酸縦列反復を含有する(Gendler et al., 1988; Siddiqui et al., 1988)。MUC1-Nは、58アミノ酸の細胞外領域、28アミノ酸の膜貫通ドメイン、および72アミノ酸の細胞質ドメイン(CD)を含む約23kDaのC末サブユニット(MUC1 C-ter、MUC1-C)との二量体化によって細胞表面に拘束される(Merlo et al., 1989)。それは、本発明の抗体が結合するMUC1-C/ECDの58アミノ酸部分(斜体)である。ヒトMUC1-C配列が下記で示されている。

SVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPG
 WGIALLVLCVLCVLAIVYLIALLAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHT
 HGRYPSPSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL (配列番号: 1)

【0024】

太字の配列はCDを表し、かつ下線が引かれた部分は、オリゴマー阻害ペプチドである。癌腫への正常な上皮の形質転換とともに、MUC1は、サイトゾルにおいておよび細胞膜全体にわたって異常に過剰発現される (Kufe et al., 1984; Perey et al., 1992)。細胞膜に関連付けられたMUC1は、クラスリン介在性エンドサイトーシスによってエンドソームに標的化される (Kinlough et al., 2004)。加えて、MUC1-Cは、核 (Baldus et al., 2004; Huang et al., 2003; Li et al., 2003a; Li et al., 2003b; Li et al., 2003c; Wei et al., 2005; Wen et al., 2003) およびミトコンドリア (Ren et al., 2004) に標的化されるが、MUC1-Nはそうではない。

【0025】

B. 機能

MUC1-Cは、ErbB受容体ファミリーのメンバー (Li et al., 2001b; Li et al., 2003c; Schroeder et al., 2001)、およびWntエフェクター、 β -カテニン (Yamamoto et al., 1997) と相互作用する。上皮成長因子受容体およびc-Srcは、Y-46上でMUC1細胞質ドメイン (MUC1-CD) をリン酸化し、それによってMUC1と β -カテニンとの結合を増加させる (Li et al., 2001a; Li et al., 2001b)。MUC1と β -カテニンとの結合は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β およびプロテインキナーゼC δ によっても調節される (Li et al., 1998; Ren et al., 2002)。MUC1は、核内で β -カテニンと共局在し (Baldus et al., 2004; Li et al., 2003a; Li et al., 2003c; Wen et al., 2003)、かつWnt標的遺伝子の転写を共活性化する (Huang et al., 2003)。他の研究により、MUC1は、また、p53に直接結合しかつp53標的遺伝子の転写を調節することが示されている (Wei et al., 2005)。留意すべきことに、MUC1-Cの過剰発現は、足場非依存的成長および腫瘍形成能を誘導するのに十分である (Huang et al., 2003; Li et al., 2003b; Ren et al., 2002; Schroeder et al., 2004)。

【0026】

II. モノクローナル抗体の産生

A. 一般的な方法

MUC1-C/ECDに対する抗体は、当技術分野において周知である標準的な方法によって産生され得る (例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 米国特許第4,196,265号を参照されたい)。モノクローナル抗体 (MAb) を作出するための方法は、一般的に、ポリクローナル抗体を調製するためのものと同じ方針に沿って始まる。これら両方の方法に対する第一の工程は、適当な宿主の免疫付与、または先行する自然感染が理由で免疫がある対象の同定である。当技術分野において周知であるように、免疫付与のための所与の組成物は、その免疫原性の点で変動し得る。したがって、ペプチドまたはポリペプチド免疫原をキャリアに共役させることによって達成され得る、宿主免疫系をブーストすることがしばしば必要である。例示的な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 (KLH) およびウシ血清アルブミン (BSA) 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などの他のアルブミンも、キャリアとして用いられ得る。ポリペプチドをキャリアタンパク質に抱合するための手段は当技術分野において周知であり、かつグルタルアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル (maleimidobencoyl) -N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、およびビス-ジアゾ化 (biazotized) ベンジジンを含む。また当技術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知られる、免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって増強され得る。例示的なかつ好ましいアジュバントには、完全フロイントアジュバント (殺傷された結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を含有する、免疫応答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含まれる。

【0027】

ポリクローナル抗体の産生において用いられる免疫原組成物の量は、免疫原の性質ならびに免疫付与に用いられる動物によって変動する。多様な経路を用いて、免疫原を投与することができる（皮下、筋肉内、皮内、静脈内、および腹腔内）。ポリクローナル抗体の産生は、免疫付与後の様々な時点において、免疫付与された動物の血液をサンプリングすることによってモニターされ得る。第二のブースター注入も与えられ得る。適切な力価が達成されるまで、ブーストおよび力価測定のプロセスを繰り返す。所望のレベルの免疫原性が得られた時点で、免疫付与された動物を採血し得、そして単離されかつ保管された血清および/または該動物を用いて、MAbを作出することができる。

10

【0028】

免疫付与の後、MAb作出プロトコールにおける使用のために、抗体、具体的にはBリンパ球（B細胞）を産生する潜在力を有する体細胞を選択する。これらの細胞は、生検された脾臓もしくはリンパ節から、または循環血から獲得され得る。次いで、免疫付与された動物由来の抗体産生Bリンパ球と、不死の骨髓腫細胞の細胞、一般的には免疫付与された動物と同じ種のもの、またはヒト細胞もしくはヒト/マウスキメラ細胞とを融合させる。ハイブリドーマ産生融合手順における使用に適した骨髓腫細胞株は、好ましくは抗体非産生性であり、高い融合効率を有し、かつ所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの成長を支持するある特定の選択培地中でその後成長し得ない状態にする酵素欠陥を有する。

20

【0029】

当業者に公知であるように、多数の骨髓腫細胞のうちのいずれか1種が用いられ得る（Goding, pp.65-66, 1986; Campbell, pp.75-83, 1984）。例えば、免疫付与された動物がマウスである場合、P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7、およびS194/5XX0 Bu1を用い得；ラットに関しては、R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F、および4B210を用い得；そしてU-266、GM1500-GRG2、LICR-LO N-HMy2、およびUC729-6はすべて、ヒト細胞融合に関して有用である。1つの特定のマウス骨髓腫細胞はNS-1骨髓腫細胞株（P3-NS-1-Ag4-1とも称される）であり、それは、細胞株レポジトリ番号GM3573を依頼することによって、NIGMSヒト遺伝子変異体細胞レポジトリ（Human Genetic Mutant Cell Repository）から容易に入手可能である。用いられ得る別のマウス骨髓腫細胞株は、8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫SP2/0非産生細胞株である。より最近では、KR12（ATCC CRL-8658）；K6H6/B5（ATCC CRL-1823）；SHM-D33（ATCC CRL-1668）；およびHMA2.5（Posner et al., 1987）を含めた、ヒトB細胞との使用のためのさらなる融合パートナー株が記載されている。本発明における抗体は、SP2/0株のIL-6分泌性誘導体であるSP2/0/mIL-6細胞株を用いて作出された。

30

【0030】

抗体産生性の脾臓またはリンパ節の細胞と骨髓腫細胞とのハイブリッドを作出するための方法は、通常、体細胞と骨髓腫細胞とを2:1の比率で混合する工程を含むが、とはいえ該比率は、細胞膜の融合を促進する1種または複数種の作用物質（化学的または電氣的）の存在下で、それぞれ約20:1～約1:1に変動し得る。センダイウイルスを用いた融合法がKohler and Milstein (1975; 1976) によって記載されており、かつ37% (v/v) PEGなどのポリエチレングリコール（PEG）を用いたものがGeftter et al. (1977) によって記載されている。電氣的に誘導される融合法の使用も適当である（Goding, pp.71-74, 1986）。

40

【0031】

融合手順は、通常、約 1×10^{-6} ～ 1×10^{-8} という低い頻度で、生存能力があるハイブリッドを産生する。しかしながら、生存能力がある融合ハイブリッドは、選択培地中で培養することによって親の非融合（infused）細胞（特に、通常無限に分割し続ける非融合骨髓腫細胞）と区別されるため、これは問題を引き起こさない。選択培地は、一般的に、組織培養培地中でヌクレオチドのデノボ合成を遮断する作用物質を含有するものである。例示的なかつ好ましい作用物質は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートは、プリンおよびピリミジンの両方のデノ

50

ボ合成を遮断し、一方でアザセリンは、プリン合成のみを遮断する。アミノプテリンまたはメトトレキサートが用いられる場合、ヌクレオチドの供給源として、培地にヒポキサンチンおよびチミジンを補充する（HAT培地）。アザセリンが用いられる場合、培地にヒポキサンチンを補充する。B細胞供給源が、エプスタイン・バールウイルス（EBV）を形質転換されたヒトB細胞株である場合、ウアバインを添加して、骨髓腫に融合していないEBV形質転換株を除去する。

【0032】

好ましい選択培地は、HATまたはウアバインを含むHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を作動させ得る細胞のみが、HAT培地中で生存することができる。骨髓腫細胞は、サルベージ経路の主要な酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）に欠陥があり、かつそれらは生存することができない。B細胞はこの経路を作動させ得るが、それらは培養下で限定された寿命を有し、かつ一般的に約2週間以内に死滅する。したがって、選択培地中で生存し得る細胞のみが、骨髓腫およびB細胞から形成されるそれらのハイブリッドである。本明細書にあるように、融合に用いられるB細胞の供給源がEBV形質転換B細胞の株である場合、EBV形質転換B細胞は薬物殺傷に感受性である一方で、用いられる骨髓腫パートナーはウアバイン耐性であるように選出されるため、ウアバインもハイブリッドの薬物選択に用いられる。

【0033】

培養することにより、特異的ハイブリドーマが選択される由来のハイブリドーマの集団が提供される。典型的に、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートにおいて単一クローン希釈によって細胞を培養し、それに続いて（約2〜3週間後に）個々のクローン上清を所望の反応性について試験することによって実施される。アッセイは、放射免疫アッセイ、酵素免疫アッセイ、細胞傷害アッセイ、プラークアッセイ、ドット免疫結合アッセイなど、高感度で簡易でかつ迅速であるべきである。

【0034】

次いで、選択されたハイブリドーマを連続希釈またはフローサイトメトリー選別によって単一細胞選別し、かつ個々の抗体産生細胞株にクローン化し、次いでクローンを無限に繁殖させて、mAbを提供することができる。MAB産生のために、細胞株は2つの基本的な方式で活用され得る。ハイブリドーマのサンプルを動物（例えば、マウス）（しばしば、腹腔腔内）に注入し得る。任意で、注入前に、動物を炭水化物、とりわけプリスタン（テトラメチルペンタデカン）などの油でプライムする。この方式においてヒトハイブリドーマが用いられる場合、SCIDマウスなどの免疫不全マウスに注入して、腫瘍拒絶を阻止することが最適である。注入された動物は、融合した細胞ハイブリッドによって産生される特異的モノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。次いで、血清または腹水など、動物の体液を採集して、高濃度のMABを提供することができる。個々の細胞株をインビトロで培養することもでき、そこではMABは培養培地中に天然に分泌され、そこからそれらは高濃度で容易に獲得され得る。あるいは、ヒトハイブリドーマ細胞株をインビトロで用いて、細胞上清中に免疫グロブリンを産生することができる。細胞株を血清不含培地中での成長に順応させて、高純度のヒトモノクローナル免疫グロブリンを回収し得る能力を最適化することができる。

【0035】

所望の場合、いずれかの手段によって産生されたMABは、濾過、遠心分離、およびFPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーなどの様々なクロマトグラフィー法を用いてさらに精製され得る。本発明のモノクローナル抗体のフラグメントは、ペプシンもしくはパインなどの酵素による消化、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によるものを含めた方法によって、精製モノクローナル抗体から獲得され得る。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、自動ペプチド合成機を用いて合成され得る。

【0036】

分子クローニング手法を用いて、モノクローンを作出し得ることも企図される。これに

10

20

30

40

50

関しては、RNAをハイブリドーマ株から単離し得、そして抗体遺伝子をRT-PCRによって獲得し得かつ免疫グロブリン発現ベクター内にクローニングし得る。あるいは、組み合わせ免疫グロブリンファージミドライブラリーを、細胞株から単離されたRNAから調製し、かつ適当な抗体を発現するファージミドを、ウイルス抗原を用いてふるい分けすることによって選択する。従来のハイブリドーマ技法を上回るこの手法の利点は、およそ 10^4 倍もの多くの抗体が単一ラウンドで産生され得かつスクリーニングされ得ること、ならびに適当な抗体を見出す好機をさらに増加させるH鎖およびL鎖の組み合わせによって、新たな特異性が生み出されることである。

【0037】

本発明において有用な抗体の産生を教示する、それぞれが参照により本明細書に組み入れられる他の米国特許には、組み合わせ手法を用いたキメラ抗体の産生を記載している米国特許第5,565,332号；組換え免疫グロブリン調製を記載している米国特許第4,816,567号；および抗体-治療用作用物質抱合体を記載している米国特許第4,867,973号が含まれる。

【0038】

B. 本発明の抗体

本発明に従った抗体は、まず第一に、この場合にはMUC1-C/ECDに対する、特にSVVVQLTLAFREGTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAG

（配列番号：2）に対するものである、それらの結合特異性によって規定され得る。当業者であれば、当業者に周知の技法を用いて所与の抗体の結合特異性/アフィニティーを査定することによって、そのような抗体が、本特許請求の範囲の範囲内に入るかどうかを判定することができる。

【0039】

一態様において、抗体は、免疫グロブリンG（IgG）抗体アイソタイプである。ヒトにおける血清免疫グロブリンのおよそ75%に相当するため、IgGは循環中に見出される最も豊富な抗体アイソタイプである。IgG分子は、形質B細胞によって合成されかつ分泌される。ヒトには、血清中でのそれらの豊富さの順序で名付けられた4つのIgGサブクラス（IgG1、2、3、および4）が存在する（IgG1が最も豊富である）。Fc受容体に対する高いアフィニティーを有するからアフィニティーなしまでの範囲。

【0040】

IgGは、血中および細胞外液中で見出される主要な抗体アイソタイプであり、それが身体組織の感染を制御するのを可能にする。ウイルス、細菌、および真菌に相当する、多くの種類の病原体に結合することによって、IgGは感染から身体を保護する。それは、いくつかの免疫メカニズムを介してこれを行う：IgG介在性の病原体の結合は、凝集を介してそれらの固定化およびまとまった結合を引き起こす；病原体表面のIgGコーティング（オプソニン化として知られる）により、食作用を有する免疫細胞によるそれらの認識および摂取が可能となる；IgGは、病原体除去をもたらす免疫タンパク質産生のカスケードである、補体系の古典的経路を活性化する；IgGは、毒素にも結合しかつ中和する。IgGは、抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）および細胞内抗体介在性タンパク質分解においても重要な役割を果たし、それはTRIM21（ヒトにおける、IgGに対する最大のアフィニティーを有する受容体）に結合して、印付けられたビリオンをサイトゾル内のプロテアソームへ向かわせる。IgGは、II型およびIII型過敏症とも関連している。IgG抗体は、クラススイッチおよび抗体応答の成熟の後に作出され、ゆえに主として二次免疫応答に参加する。IgGはサイズが小さい単量体として分泌され、それが組織に簡単に浸み込むのを可能にする。それは、ヒト胎盤を通じた通過を容易にする受容体を有する唯一のアイソタイプである。母乳中に分泌されるIgAとともに、胎盤を通じて吸収された残りのIgGは、新生児に、それ自身の免疫系が発達する前に液性免疫を提供する。初乳、とりわけウシ初乳は、高いパーセンテージのIgGを含有する。病原体に対する先行免疫を有する個体において、IgGは、抗原刺激の約24～48時間後に出現する。

【0041】

別の局面において、抗体は、それらの結合特異性を決定するそれらの可変配列によって

10

20

30

40

50

規定され得る。例が下記で提供される。

【0042】

(表1) 抗体CDR配列

抗体	重鎖	軽鎖
6A6 CDR1	GFSLTYYG.... 配列番号: 3	QSLVHNNGDTY. 配列番号: 9
6A6 CDR2	IWSDGST... 配列番号: 4	KVSNRFS.. 配列番号: 10
6A6 CDR3	AKNYLGSLDY 配列番号: 5	SQTHVPLT 配列番号: 11
8F1/8E1 CDR1	EYEFPSHD.... 配列番号: 6	QSLVHSNGNTY. 配列番号: 12
8F1/8E1 CDR2	INSDGGST.. 配列番号: 7	KVSNRFS... 配列番号: 13
8F1/8E1 CDR3	VRLLYGNVMDY 配列番号: 8	SQTHVPLT 配列番号: 14
2H11 CDR1	GYTFTGYSMH 配列番号: 27	RSSQSLVHSNGNTYLH 配列番号: 30
2H11 CDR3	WINTETGEPTYDDFKG 配列番号: 28	KVSNRFS 配列番号: 31
2H11 CDR3	GTGGDD 配列番号: 29	SQGTHVPPT 配列番号: 32
7B8 CDR1	GHTFTSYWMH 配列番号: 42	CRASESVQYSGTSLMH 配列番号: 51
7B8 CDR3	EINPSNGRTYYNENFKT 配列番号: 43	GASNVET 配列番号: 52
7B8 CDR3	DGDYVSGFAY 配列番号: 44	QQNWKVPWT 配列番号: 53
4G5 CDR1	GFSLSTSGMGVS 配列番号: 45	CKASQSVGNVYA 配列番号: 54
4G5 CDR2	HIYWDDKRYNPSLKS 配列番号: 46	FASNRYS 配列番号: 55
4G5 CDR3	GVSSWFPY 配列番号: 47	QQHYIFPYT 配列番号: 56
2B11 CDR1	GFTFNYFWIE 配列番号: 48	CKASENVGTYVS 配列番号: 57
2B11 CDR2	EILPGTGSTNYNEKFKG 配列番号: 49	GASNRYT 配列番号: 58
2B11 CDR3	YDYTSSMDY 配列番号: 50	GQSYSPWT 配列番号: 59
3D1 CDR1	NFWMN 配列番号: 76	RASQSIGTSIH 配列番号: 79
3D1 CDR2	QIYPGDGDTNYNGKFKG 配列番号: 77	YASESIS 配列番号: 80
3D1 CDR3	SYRSAWFAY 配列番号: 78	QQSNNWPLT 配列番号: 81

【0043】

さらに、抗体配列は、下記でより詳細に記述される方法を任意で用いて、上記で提供される配列から変動し得る。例えば、(a) 可変領域は、軽鎖の定常ドメインから隔離され得る、(b) アミノ酸は上記で示されるものから変動し得るが、それによって残基の化学的特性に劇的に影響を及ぼすわけではない（いわゆる保存的置換）、(c) アミノ酸は、上記で示されるものから所与のパーセンテージ変動し得る、例えば80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%相同である、という点にお

10

20

30

40

50

いて、アミノ配列は、上記で示されるものから変動し得る。あるいは、抗体をコードする核酸は、(a) 軽鎖の定常ドメインから隔離され得る、(b) 上記で示されるものから変動し得るが、それによって、コードされる残基を変化させるわけではない、(c) 上記で示されるものから所与のパーセンテージ変動し得る、例えば70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%相同である、または(d) 約50℃～約70℃の温度において約0.02M～約0.15M NaClによって提供されるものなど、低塩および/もしくは高温の条件によって例示される高いストリンジェンシー条件下でハイブリダイズし得る能力によって、上記で示されるものから変動し得る。

【0044】

アミノ酸配列において保存的变化を作製する際、アミノ酸の疎水性 (hydropathic) 指標が考慮され得る。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与することにおける疎水性アミノ酸指標の重要性は、当技術分野において一般的に理解されている (Kyte and Doolittle, 1982)。アミノ酸の相対的な疎水性特徴は、結果として生じるタンパク質の二次構造に寄与し、それが今後は、タンパク質と他の分子、例えば酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原などとの相互作用を規定することが認められている。

【0045】

類似したアミノ酸の置換は、親水性に基づいて効果的に作製され得ることも当技術分野において理解されている。参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号は、その近接アミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の最大の局所的平均親水性が、該タンパク質の生物学的特性と相関することを明記している。米国特許第4,554,101号において詳述されているように、以下の親水性値がアミノ酸残基に割り当てられている：塩基性アミノ酸：アルギニン (+3.0)、リジン (+3.0)、およびヒスチジン (-0.5)；酸性アミノ酸：アスパラギン酸 (+3.0±1)、グルタミン酸 (+3.0±1)、アスパラギン (+0.2)、およびグルタミン (+0.2)；親水性非イオン性アミノ酸：セリン (+0.3)、アスパラギン (+0.2)、グルタミン (+0.2)、およびスレオニン (-0.4)；含硫アミノ酸：システイン (-1.0) およびメチオニン (-1.3)；疎水性非芳香族アミノ酸：バリン (-1.5)、ロイシン (-1.8)、イソロイシン (-1.8)、プロリン (-0.5±1)、アラニン (-0.5)、およびグリシン (0)；疎水性芳香族アミノ酸：トリプトファン (-3.4)、フェニルアラニン (-2.5)、およびチロシン (-2.3)。

【0046】

アミノ酸は、同程度の親水性を有する別のものに置換され得、かつ生物学的にまたは免疫学的に改変されたタンパク質を産生し得ると理解されている。そのような変化において、その親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるものは特に好ましく、かつ±0.5以内のものはさらに特に好ましい。

【0047】

上記で概説されるように、アミノ酸置換は、一般的にアミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばそれらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。前述の様々な特徴を考慮に入れる例示的な置換は、当業者に周知であり、かつアルギニンおよびリジン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびスレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンを含む。

【0048】

C. 抗体配列の操作

様々な態様において、発現の改善、交差反応性の改善、オフターゲット結合の軽減、または補体の活性化もしくは免疫細胞 (例えば、T細胞) の動員などの1つもしくは複数の天然エフェクター機能の無効化などの多様な理由で、同定された抗体の配列を操作することを選び得る。特に、IgM抗体をIgG抗体に転向し得る。以下は、抗体操作のための関連技法についての一般的記述である。

【0049】

ハイブリドーマを培養し得、次いで細胞を溶解し得、かつ全RNAを抽出し得る。RTとともにランダムヘキサマーを用いて、RNAのcDNA複製物を作出し得、次いで、すべてのヒト

10

20

30

40

50

可変遺伝子配列を増幅することが予想されるPCRプライマーの多重混合物を用いてPCRを実施し得る。PCR産物をpGEM-T Easyベクター内にクローニングし得、次いで標準的なベクター用プライマーを用いた自動DNAシーケンシングによってシーケンスし得る。結合および中和のアッセイを、ハイブリドーマ上清から収集された抗体を用いて実施し得、かつプロテインGカラムを用いたFPLCによって精製し得る。重鎖および軽鎖Fv DNAをクローニングベクターからLonza pConIgG1またはpConK2プラスミドベクター内にサブクローニングすることによって、組換え全長IgG抗体を作出し得、293 Freestyle細胞またはLonza CHO細胞にトランスフェクトし得、そしてCHO細胞上清から収集しかつ精製し得る。

【0050】

最終的なcGMP製造過程と同じ宿主細胞および細胞培養の過程で産生される抗体の迅速な入手可能性は、過程開発プログラムの継続期間を短縮する可能性を有する。Lonzaは、CHO細胞における少量（最高50g）の抗体の迅速な産生のための、CDACF培地中で成長したプールされたトランスフェクタントを用いた包括的方法を開発している。実際の一過性システムよりもわずかに遅いものの、利点には、より高い産物濃度、ならびに産生細胞株と同じ宿主および過程の使用が含まれる。使い捨てバイオリアクター内でモデル抗体を発現させる、GS-CHOプールの成長および産生力の例：流加培養様式で作動される使い捨てバッグバイオリアクター培養（5Lの運転容量）において、トランスフェクションの9週間以内に、2 g/Lの収穫抗体濃度が達成された。

【0051】

pConベクター（商標）は、抗体全体を再発現させるための簡単な方式である。定常領域ベクターは、pEEベクター内にクローニングされた広範な免疫グロブリン定常領域ベクターを与えるベクターのセットである。これらのベクターは、ヒト定常領域を有する全長抗体の簡単な構築およびGS System（商標）の利便性を与える。

【0052】

抗体分子には、例えばmAbのタンパク質分解による切断によって産生されるフラグメント（F(ab')、F(ab')₂など）、または例えば組換え手段により産生可能な一本鎖免疫グロブリンが含まれるであろう。そのような抗体誘導体は一価である。一態様において、そのようなフラグメントを互いに、または他の抗体フラグメントもしくは受容体リガンドと組み合わせ、キメラ結合分子を形成することができる。重要なことに、そのようなキメラ分子は、同じ分子の異なるエピトープに結合する能力を有する置換基を含有し得る。

【0053】

ヒト療法において用いられる場合にいかなる免疫反応をも減衰させるために、非ヒト宿主において産生された抗体を「ヒト化する」ことが望ましくあり得る。そのようなヒト化抗体は、インビトロまたはインビボの背景で研究され得る。ヒト化抗体は、例えば抗体の免疫原性部分を、対応するが非免疫原性の部分で置き換えることによって産生され得る（すなわち、キメラ抗体）。PCT出願第PCT/US86/02269号；EP出願第184,187号；EP出願第171,496号；EP出願第173,494号；PCT出願第WO 86/01533号；EP出願第125,023号；Sun et al. (1987)；Wood et al. (1985)；およびShaw et al. (1988)、その参考文献のすべては参照により本明細書に組み入れられる。「ヒト化」キメラ抗体の一般的な概説はMorrison (1985)によって提供されており、それも参照により本明細書に組み入れられる。あるいは、「ヒト化」抗体は、CDRまたはCEA置換によって産生され得る。Jones et al. (1986)；Verhoeven et al. (1988)；Beidler et al. (1988)、そのすべては参照により本明細書に組み入れられる。

【0054】

関連した態様において、抗体は、開示される抗体の誘導体、例えば開示される抗体におけるもの同一のCDR配列を含む抗体（例えば、キメラ、ヒト化、またはCDRグラフト化抗体）である。さらにさらなる態様において、抗体は完全ヒト組換え抗体である。

【0055】

本発明は、アイソタイプ改変も企図する。異なるアイソタイプを有するようにFc領域を改変することによって、異なる機能性が達成され得る。例えば、IgG₄に変化させることに

10

20

30

40

50

より、他のアイソタイプに伴う免疫エフェクター機能を低下させ得る。

【0056】

改変抗体は、標準的な分子生物学的技法による発現またはポリペプチドの化学的合成を含めた、当業者に公知の任意の技法によって作製され得る。組換え発現のための方法が、本文書における他の箇所に対処されている。

【0057】

D. 発現

本発明に従った核酸は、任意で他のタンパク質配列に連結された抗体をコードする。本出願において使用するとき、「MUC1-C抗体をコードする核酸」という用語は、全細胞核酸から遊離した単離されている核酸分子を指す。ある特定の態様において、本発明は、本明細書において明示される配列のいずれかによってコードされる抗体に関する。

【0058】

(表2) コドン

アミノ酸			コドン			
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
システイン	Cys	C	UGC	UGU		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG		
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU		
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU		
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
リジン	Lys	K	AAA	AAG		
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC CUG CUU
メチオニン	Met	M	AUG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU		
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG		
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC CGG CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC UCG UCU
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
トリプトファン	Trp	W	UGG			
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU		

【0059】

本発明のDNAセグメントには、上記で記載される配列の生物学的機能等価のタンパク質およびペプチドをコードするものが含まれる。そのような配列は、核酸配列内、ゆえにコードされるタンパク質内に天然に存在することが知られるコドン冗長性およびアミノ酸機能等価性の結果として生じ得る。あるいは、機能等価のタンパク質またはペプチドは、組換えDNA技術の適用により創出され得、そこでのタンパク質構造の変化は、交換されているアミノ酸の特性についての考慮に基づいて操作され得る。人間によって設計される変化は、部位指向性突然変異誘発技法の適用により導入され得る、または下記で記載されるように、無作為に導入され得かつ後に所望の機能についてスクリーニングされ得る。

【0060】

ある特定の態様内において、発現ベクターを採用してMUC1-Cリガンド捕捉体を発現させて、それから発現されるポリペプチドを産生しかつ単離する。他の態様において、発現ベクターを遺伝子療法において用いる。発現は、ベクター内で適当なシグナルが提供されることを要し、それには、宿主細胞において関心対象の遺伝子の発現を推進する、ウイルスおよび哺乳類供給源の両方由来のエンハンサー/プロモーターなど、様々な調節エレメン

トが含まれる。宿主細胞においてメッセンジャーRNAの安定性および翻訳可能性を最適化するように設計されるエレメントも規定される。薬物選択マーカーの発現をポリペプチドの発現に関連付けるエレメントであるように、産物を発現する永久的な安定した細胞クローンを確立するためのいくつかの優性薬物選択マーカーの使用のための条件も提供される。

【0061】

本出願を通して、「発現構築物」という用語は、配列をコードする核酸の一部またはすべてが転写され得る遺伝子産物をコードする核酸を含有する任意のタイプの遺伝子構築物を含むことを意味する。転写産物はタンパク質に翻訳され得るが、それは必要であるわけではない。ある特定の態様において、発現には、遺伝子の転写および遺伝子産物へのmRNAの翻訳の両方が含まれる。他の態様において、発現には、関心対象の遺伝子をコードする核酸の転写のみが含まれる。

10

【0062】

「ベクター」という用語は、それが複製され得る細胞内への導入のために、その中に核酸配列を挿入し得るキャリア核酸分子を指すために用いられる。核酸配列は「外因性」であり得、それは、ベクターが導入されている細胞にとってそれが外来物であること、または配列が、細胞内におけるしかしながら該配列が普通見出されない宿主細胞核酸内の箇所における配列と相同であることを意味する。ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルス、および植物ウイルス）、および人工染色体（例えば、YAC）が含まれる。当業者であれば、両方とも参照により本明細書に組み入れられるSambrook et al. (1989)およびAusubel et al. (1994)に記載されている、標準的な組換え技法によりベクターを構築する能力を十分に備えているであろう。

20

【0063】

「発現ベクター」という用語は、転写され得る遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含有するベクターを指す。ある場合には、RNA分子は、次いでタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合、例えばアンチセンス分子またはリボザイムの産生において、これらの配列は翻訳されない。発現ベクターは、特定の宿主生物における機能的に連結されたコード配列の転写およびおそらく翻訳に必要な核酸配列を指す、多様な「制御配列」を含有し得る。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、同様に他の機能を果たしかつ下記に記載される核酸配列を含有し得る。

30

【0064】

1. 調節エレメント

「プロモーター」とは、そこで転写の開始および割合が制御される核酸配列の領域である制御配列である。それは、そこで調節タンパク質および分子がRNAポリメラーゼおよび他の転写因子などに結合し得る遺伝子エレメントを含有し得る。「機能的に位置付けされた」、「機能的に連結した」、「制御下にある」、および「転写制御下にある」という語句は、プロモーターが、核酸配列に関して正しい機能的な位置および/または配向にあって、その配列の転写開始および/または発現を制御することを意味する。プロモーターは、核酸配列の転写活性に関与するシス作用性調節配列を指す「エンハンサー」と合わせて用いられ得るまたは用いられ得ない。

40

【0065】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって獲得され得る、遺伝子または配列に天然に伴うものであり得る。そのようなプロモーターは、「内因性」と呼ばれ得る。同様に、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列に天然に伴うものであり得る。あるいは、その天然環境において核酸配列に通常伴わないプロモーターを指す組換えのまたは異種のプロモーターの制御下にコード核酸セグメントを位置付けすることによって、ある特定の利点が得られる。

【0066】

50

組換えのまたは異種のエンハンサーとは、その天然環境において核酸配列に通常伴わないエンハンサーも指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、ならびに他の任意の原核細胞、ウイルス細胞、または真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、ならびに「天然に存在」しない、すなわち異なる転写調節領域の異なるエレメントおよび/または発現を変更する変異を含有するプロモーターまたはエンハンサーが含まれ得る。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成により産生することに加えて、配列は、本明細書において開示される組成物と合わせて、PCR（商標）を含めた組換えクローニングおよび/または核酸増幅技術を用いて産生され得る（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたい）。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などの非核細胞小器官内の配列の転写および/または発現を指揮する制御配列が同様に採用され得ることが企図される。

10

【0067】

当然、発現のために選出された細胞タイプ、細胞小器官、および生物におけるDNAセグメントの発現を有効に指揮するプロモーターおよび/またはエンハンサーを採用することが重要であろう。分子生物学の技術分野における当業者であれば、一般的に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサー、および細胞タイプの組み合わせの使用を知っており、例えば参照により本明細書に組み入れられるSambrook *et al.* (1989)を参照されたい。採用されるプロモーターは、構成的であり得、組織特異的であり得、誘導性であり得、かつ/または、組換えタンパク質および/またはペプチドの大規模な産生において有利であるなど、導入されたDNAセグメントの高レベルの発現を指揮する適当な条件下で有用であり得る。プロモーターは、異種または内因性であり得る。

20

【0068】

表3は、本発明の背景において、遺伝子の発現を調節するために採用され得るいくつかのエレメント/プロモーターを列挙している。このリストは、発現の促進に関与する考え得るすべてのエレメントについて網羅的であることを意図されるわけではないが、単なるそれらの例示である。表4は、特異的刺激に応答して活性化され得る、核酸配列の領域である誘導性エレメントの例を提供している。

【0069】

（表3）プロモーターおよび/またはエンハンサー

30

プロモーター/エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞受容体	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ α および/またはDQ β	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
β -インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989

40

プロモーター/エンハンサー	参考文献
インターロイキン-2受容体	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHCクラスII 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII HLA-DRa	Sherman <i>et al.</i> , 1989
β -アクチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> , 1989
筋クレアチンキナーゼ (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
プレアルブミン(トランスサイレチン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼI	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
α -フェトプロテイン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
t-グロビン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990
β -グロビン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
神経細胞接着分子 (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
α_1 -アンチトリプシン	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび/またはI型コラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット成長ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイド A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロポニン I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
血小板由来成長因子 (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

40

プロモーター/エンハンサー	参考文献
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleigh <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
レトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celandier <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celandier <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989
パピローマウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Glue <i>et al.</i> , 1988
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
ヒト免疫不全ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspias <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
テナガザル白血病ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

(表 4) 誘導性エレメント

エレメント	誘導因子	参考文献
MT II	ホルボールエステル(TFA) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987, Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV (マウス乳癌ウイルス)	グルココルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
β -インターフェロン	ポリ(rI)x ポリ(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス5 E2	EIA	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラゲナーゼ	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメライシン	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
SV40	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
マウスMX遺伝子	インターフェロン、 ニューカッスル病ウイルス	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
α -2-マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ビメンチン	血清	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスI遺伝子H-2 κ b	インターフェロン	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, SV40ラージT抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
プロリフェリン	ホルボールエステル-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壊死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激ホルモン α 遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

【0071】

組織特異的プロモーターまたはエンハンサーの同定、ならびにそれらの活性を特徴付けるアッセイは、当業者に周知である。そのような領域の例には、ヒトLIMK2遺伝子 (Nomoto *et al.*, 1999)、ソマトスタチン受容体2遺伝子 (Kraus *et al.*, 1998)、マウス精巢上体レチノイン酸結合遺伝子 (Lareyre *et al.*, 1999)、ヒトCD4 (Zhao-Emonet *et al.*, 1998)、マウス α 2 (XI) コラーゲン (Tsumaki, *et al.*, 1998)、D1Aドーパミン受容体遺伝子 (Lee, *et al.*, 1997)、インスリン様成長因子II (Wu *et al.*, 1997)、ヒト血小板内皮細胞接着分子-1 (Almendro *et al.*, 1996) が含まれる。腫瘍特異的プロモーター

も、本発明における用途を見出すであろう。いくつかのそのようなプロモーターが、表5に明示されている。

【0072】

(表5) 癌遺伝子療法のための組織特異的プロモーター候補

組織特異的プロモーター	プロモーターが活性を有する癌	プロモーターが活性を有する正常細胞
癌胎児性抗原 (CEA)*	大部分の結腸直腸癌腫; 50%の肺癌腫; 40~50%の胃癌腫; 大部分の膵臓癌腫; 多くの乳癌腫	結腸粘膜; 胃粘膜;肺上皮; エクリン汗腺; 精巣における細胞
前立腺特異的抗原 (PSA)	大部分の前立腺癌腫	前立腺上皮
血管作動性腸管ペプチド (VIP)	大多数の非小細胞肺癌	ニューロン;リンパ球; 肥満細胞;好酸球
サーファクタントタンパク質 A (SP-A)	多くの肺腺癌細胞	II型肺細胞;クララ
ヒトachaete-scute ホモログ (hASH)	大部分の小細胞肺癌	肺における 神経内分泌細胞
ムチン-1 (MUC1)**	大部分の腺癌 (任意の組織由来)	乳房における、 ならびに呼吸器、 胃腸、および 泌尿生殖器における 腺上皮細胞
α -フェトプロテイン	大部分の肝細胞癌腫; おそらく多くの精巣癌	(ある特定の条件下の) 肝細胞;精巣
アルブミン	大部分の肝細胞癌腫	肝細胞
チロシナーゼ	大部分の黒色腫	メラニン細胞; 星細胞;シュワン細胞; 一部のニューロン
チロシン結合タンパク質 (TRP)	大部分の黒色腫	メラニン細胞; 星細胞、シュワン細胞; 一部のニューロン

10

20

30

40

ケラチン14	たぶん多くの 扁平上皮細胞癌腫 (例えば、頭頸部癌)	ケラチノサイト
EBV LD-2	頭頸部の多くの 扁平上皮細胞癌腫	上部消化器の ケラチノサイト 上部消化管の ケラチノサイト
グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP)	多くの星細胞腫	星細胞
ミエリン塩基性タンパク質(MBP)	多くの神経膠腫	希突起膠細胞
精巣特異的 アンジオテンシン変換酵素 (精巣特異的ACE)	おそらく多くの精巣癌	精子(Spermatazoa)
オステオカルシン	おそらく多くの骨肉腫	骨芽細胞
E2F調節プロモーター	ほぼすべての癌	増殖性細胞
HLA-G	多くの結腸直腸癌腫; 多くの黒色腫; おそらく多くの他の癌	リンパ球; 単球; 精母細胞; トロホブラスト
FasL	大部分の黒色腫; 多くの膵臓癌腫; 大部分の星細胞腫; おそらく多くの他の癌	活性化白血球; ニューロン;内皮細胞; ケラチノサイト; 免疫特権組織 における細胞; 肺、卵巣、肝臓、および 前立腺における 一部の細胞
Myc調節プロモーター	大部分の肺癌腫 (小細胞および非小細胞の両方); 大部分の結腸直腸癌腫	増殖性細胞 (一部の細胞タイプのみ): 乳房上皮細胞 (非増殖性を含む)

10

20

30

40

MAGE-1	多くの黒色腫； 一部の非小細胞肺癌腫； 一部の乳癌腫	精巣
VEGF	すべての癌の70% (多くの癌における 構成的過剰発現)	新血管形成の 部位における細胞 (しかし、腫瘍とは異なり、 発現は一過性で あまり強力でなくかつ 決して構成的でない)
bFGF	bFGF発現は 虚血条件によって 誘導されるため、 たぶん多くの種々の癌	虚血の部位における細胞 (しかし、腫瘍とは異なり、 発現は一過性で あまり強力でなく かつ決して構成的でない)
COX-2	大部分の結腸直腸癌腫； 多くの肺癌腫； おそらく多くの他の癌	炎症の部位 における細胞
IL-10	大部分の結腸直腸癌腫； 多くの肺癌腫； 頭頸部の多くの 扁平上皮細胞癌腫； おそらく多くの他の癌	白血球
GRP78/BiP	GRP78発現は 腫瘍特異的条件によって 誘導されるため、 たぶん多くの種々の癌	虚血の部位 における細胞
Egr-1由来のCarGエレメント	電離放射線によって 誘導されるため照射があると もしかすると大部分の腫瘍	電離放射線に 曝露された細胞； 白血球

【0073】

コード配列の効率的な翻訳には、特異的な開始シグナルも要され得る。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは近接配列が含まれる。ATG開始コドンを含めた外因性の翻訳制御シグナルが提供される必要があり得る。当業者であれば、容易にこれを決定することができかつ必要なシグナルを提供することができるであろう。インサート全体の翻訳を確実にするために、開始コドンは、所望のコード配列のリーディングフレームと「インフレーム」でなければならないことは周知である。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然または合成のいずれかであり得る。発現の効率は、適当な転写エンハンサーエレメントの包含によって増強され得る。

【0074】

10

20

30

40

50

2. IRES

本発明のある特定の態様において、内部リボソーム侵入部位（IRES）エレメントを用いて、多重遺伝子、つまりポリシストロン性のメッセージを創出する。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存的翻訳のリボソームスキャンモデルを迂回し得、かつ内部部位での翻訳を始動し得る（Pelletier and Sonenberg, 1988）。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー（ポリオおよび脳心筋炎）由来のIRESエレメント（Pelletier and Sonenberg, 1988）、同様に哺乳類メッセージ由来のIRES（Macejak and Sarnow, 1991）が記載されている。IRESエレメントは、異種のオープンリーディングフレームに連結され得る。それぞれがIRESによって分離された多数のオープンリーディングフレームと一緒に転写され得、ポリシストロン性のメッセージが創出される。効率的な翻訳のために、IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームはリボソームに接近可能である。単一メッセージを転写する単一プロモーター/エンハンサーを用いて、多数の遺伝子を効率的に発現させ得る（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,925,565号および第5,935,819号を参照されたい）。

【0075】

3. 多目的クローニングサイト

ベクターは、多数の制限酵素部位を含有する核酸領域であるマルチクローニングサイト（MCS）を含み得、そのうちのいずれかを標準的な組換え技術と合せて用いて、ベクターを消化し得る。参照により本明細書に組み入れられるCarbonelli et al., 1999、Levenson et al., 1998、およびCocea, 1997を参照されたい。「制限酵素消化」とは、核酸分子内の特異的位置でのみ機能する酵素による核酸分子の触媒的切断を指す。これらの制限酵素の多くが市販されている。そのような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。頻繁に、MCS内で切る制限酵素を用いてベクターを線状化またはフラグメント化して、外因性配列がベクターにライゲーションされるのを可能にする。「ライゲーション」とは、互いに連続的であっても連続的でなくてもよい2つの核酸フラグメント間でホスホジエステル結合を形成する過程を指す。制限酵素およびライゲーション反応を伴う技法は、組換え技術の技術分野における当業者に周知である。

【0076】

4. スプライシング部位

大部分の転写された真核生物RNA分子は、一次転写産物からイントロンを取り除くRNAスプライシングを受ける。真核生物ゲノム配列を含有するベクターは、タンパク質発現のために、転写産物の適正なプロセッシングを確実にする、ドナーおよび/またはアクセプターのスプライシング部位を要し得る（参照により本明細書に組み入れられるChandler et al., 1997を参照されたい）。

【0077】

5. 終結シグナル

本発明のベクターまたは構築物は、概して、少なくとも1つの終結シグナルを含む。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写産物の特異的終結に関与するDNA配列から構成される。ゆえに、ある特定の態様において、RNA転写産物の産生を終わらせる終結シグナルが企図される。望ましいメッセージレベルを達成するために、インビボにおいてターミネーターが必要であり得る。

【0078】

真核生物システムにおいて、ターミネーター領域は、ポリアデニル化部位を曝露するために、新たな転写産物の部位特異的切断を可能にする特異的DNA配列も含み得る。これは、転写産物の3'末端に約200個のA残基（ポリA）の伸長を付加するように、特化した内因性ポリメラーゼにシグナルを送達する。このポリAテールを修飾されたRNA分子は、より安定でありかつより効率的に翻訳されるように見える。ゆえに、真核生物を伴う他の態様において、ターミネーターは、RNAの切断のためのシグナルを含むことが好ましく、かつターミネーターシグナルは、メッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。ターミネーターおよび/またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセージレベルを増

強し、かつ/またはカセットから他の配列までの読み通しを最小限にする働きをし得る。

【0079】

本発明における使用のために企図されるターミネーターには、例えばウシ成長ホルモンターミネーターなどの遺伝子の終結配列、または例えばSV40ターミネーターなどのウイルス終結配列を例えば含むがそれらに限定されない、本明細書において記載されるまたは当業者に公知である任意の公知の転写のターミネーターが含まれる。ある特定の態様において、終結シグナルは、配列の切り取りなどによる、転写可能なまたは翻訳可能な配列の欠如であり得る。

【0080】

6. ポリアデニル化シグナル

10

発現、特に真核生物の発現においては、典型的に、転写産物の適正なポリアデニル化をもたらすポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実践の成功に決定的ではないと思われ、かつ/または任意のそのような配列が採用され得る。好ましい態様は、好都合でありかつ/または様々な標的細胞において上手く機能することが知られる、SV40ポリアデニル化シグナルおよび/またはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化は、転写産物の安定性を増加させ得る、または細胞質輸送を促し得る。

【0081】

7. 複製の起点

宿主細胞においてベクターを繁殖させるために、それは、そこで複製が開始される特異的核酸配列である、複製部位の1つまたは複数の起点（しばしば、「ori」と称される）を含有し得る。あるいは、宿主細胞が酵母である場合、自律複製配列（ARS）が採用され得る。

20

【0082】

8. 選択可能なマーカーおよびスクリーニング可能なマーカー

本発明のある特定の態様において、本発明の核酸構築物を含有する細胞は、発現ベクター内にマーカーを含めることによって、インビトロまたはインビボで同定され得る。そのようなマーカーは、発現ベクターを含有する細胞の簡単な同定を可能にする、細胞に同定可能な変化を付与する。一般的に、選択可能なマーカーは、選択を可能にする特性を付与するものである。陽性選択可能なマーカーは、マーカーの存在によりその選択が可能となるものであり、一方で陰性選択可能なマーカーは、その存在によりその選択が阻止されるものである。陽性選択可能なマーカーの例は、薬物耐性マーカーである。

30

【0083】

通常、薬物選択マーカーの包含は、形質転換体のクローニングおよび同定に役立ち、例えばネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択可能なマーカーである。条件の実行に基づいて形質転換体の判別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、その根拠が比色分析であるGFPなどのスクリーニング可能なマーカーを含めた他のタイプのマーカーも企図される。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などのスクリーニング可能な酵素も利用され得る。当業者であれば、おそらくFACS解析と合わせて、どのように免疫学的マーカーを採用するのかも知っているであろう。用いられるマーカーは、それが、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限り、重要ではないと思われる。選択可能なマーカーおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

40

【0084】

9. ウイルスベクター

ある特定のウイルスベクターが、効率的に細胞に感染しまたは侵入し、宿主細胞ゲノム内に組み込まれ、かつウイルス遺伝子を安定して発現する能力は、多数の異なるウイルスベクターシステムの開発および適用につながっている（Robbins et al., 1998）。エクス

50

ビボおよびインビボにおける遺伝子移入のためのベクターとしての使用のために、ウイルスシステムが現在開発されつつある。例えば、癌、嚢胞性線維症、ゴーシェ病、腎疾患、および関節炎などの疾患の治療のために、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レトロウイルス、およびアデノ随伴ウイルスベクターが現在評価されつつある (Robbins and Ghivizzani, 1998; Imai et al., 1998; 米国特許第5,670,488号)。下記で記載される様々なウイルスベクターは、特定の遺伝子療法適用に応じて、特異的な利点および不利な点を提示する。

【0085】

アデノウイルスベクター

特定の態様において、発現構築物の送達のために、アデノウイルス発現ベクターが企図される。「アデノウイルス発現ベクター」とは、(a) 構築物のパッケージングを支持し、かつ (b) その中にクローニングされている組織特異的または細胞特異的な構築物を最終的に発現するのに十分なアデノウイルス配列を含有するそうした構築物を含むことを意味する。

【0086】

アデノウイルスは、サイズが30~35kbに及ぶゲノムを有する、線状二本鎖DNAを含む (R eddy et al., 1998; Morrison et al., 1997; Chillon et al., 1999)。本発明に従ったアデノウイルス発現ベクターは、アデノウイルスの遺伝子操作された形態を含む。アデノウイルス遺伝子移入の利点には、非分裂細胞を含めた多種多様な細胞タイプに感染し得る能力、中型サイズのゲノム、操縦の容易さ、高い感染力、および高い力価に成長し得る能力が含まれる (Wilson, 1996)。さらに、アデノウイルスDNAは、他のウイルスベクターに伴う潜在的な遺伝毒性を有することなくエピソード様式で複製し得るため、宿主細胞のアデノウイルス感染は、染色体への組み込みをもたらさない。また、アデノウイルスは構造的に安定しており (Marienfeld et al., 1999)、かつ広範囲にわたる増幅後にゲノム再編成は検出されていない (Parks et al., 1997; Bett et al., 1993)。

【0087】

アデノウイルスゲノムの際立った特質は、初期領域 (E1、E2、E3、およびE4遺伝子)、中間領域 (pIX遺伝子、Iva2遺伝子)、後期領域 (L1、L2、L3、L4、およびL5遺伝子)、主要後期プロモーター (MLP)、逆向き末端反復 (ITR)、およびΨ配列 (Zheng, et al., 1999; Robbins et al., 1998; Graham and Prevec, 1995) である。初期遺伝子E1、E2、E3、およびE4は、感染後にウイルスから発現され、かつウイルス遺伝子発現、細胞遺伝子発現、ウイルス複製、および細胞アポトーシスの阻害を調節するポリペプチドをコードする。さらに、ウイルス感染の間にMLPが活性化され、アデノウイルスのカプシド形成に要されるポリペプチドをコードする後期 (L) 遺伝子の発現がもたらされる。中間領域は、アデノウイルスカプシドの構成要素をコードする。アデノウイルス逆向き末端反復 (ITR; 長さが100~200bp) はシスエレメントであり、かつ複製の起点として機能し、かつウイルスDNA複製に必要である。Ψ配列は、アデノウイルスゲノムのパッケージングに要される。

【0088】

遺伝子移入ベクターとしての使用のためのアデノウイルスを作出するためのよく見られる手法は、E2、E3、およびE4プロモーターの誘導に関与するE1遺伝子の欠失 (E1⁻) である (Graham and Prevec, 1995)。その後、E1遺伝子の代わりに1つまたは複数の治療用遺伝子を組換えにより挿入することができ、該治療用遺伝子の発現は、E1プロモーターまたは異種プロモーターによって推進される。次いで、E1ポリペプチドをトランスに提供する「ヘルパー」細胞株 (例えば、ヒト胎児腎臓細胞株293) において、E1⁻複製欠陥ウイルスを増幅する。ゆえに、本発明において、E1コード配列が取り除かれている箇所に形質転換構築物を導入することが好都合であり得る。しかしながら、アデノウイルス配列内での構築物の挿入の箇所は、本発明に決定的ではない。あるいは、E3領域、E4領域の一部分、またはその両方を欠失させ得、遺伝子移入における使用のために、真核細胞において作動可能なプロモーターの制御下にある異種核酸配列を、アデノウイルスゲノム内に挿入する

10

20

30

40

50

(それぞれ参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,670,488号；米国特許第5,932,210号)。

【0089】

アデノウイルスに基づくベクターは、他のベクターシステムを上回るいくつかの固有の利点を与えるものの、それらは、ベクターの免疫原性、組換え遺伝子の挿入のためのサイズ制約、および低レベルの複製によってしばしば制限される。全長ジストロフィン遺伝子および複製に要される末端反復を含み、すべてのオープンリーディングフレームを欠失した組換えアデノウイルスベクターの調製 (Haecker et al., 1996) は、上記で言及されるアデノウイルスの欠点に、いくつかの潜在的に有望な利点を与える。該ベクターは、293細胞においてヘルパーウイルスとともに高力価まで成長し、かつmdxマウスにおいて、インビトロでの筋管において、およびインビボでの筋線維においてジストロフィンを効率的に形質導入し得た。ヘルパー依存型ウイルスベクターが下記で記述される。

10

【0090】

アデノウイルスベクターを用いることにおける大きな懸案事項は、パッケージング細胞株におけるベクター産生の間または個体の遺伝子療法による治療の間の、複製能を有するウイルスの生成である。複製能を有するウイルスの生成は、意図しないウイルス感染の深刻な脅威、および患者に対する病理学的因果関係をもたらし得る。Armentanoら (1990) は、複製能を有するアデノウイルスの不注意な生成の可能性を除去すると主張した、複製欠損アデノウイルスベクターの調製を記載している (参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,824,544号)。複製欠損アデノウイルス法は、欠失されたE1領域および再配置されたタンパク質IX遺伝子を含み、ベクターは異種の哺乳類遺伝子を発現する。

20

【0091】

アデノウイルスベクターが複製欠損であるまたは少なくとも条件付きで欠損であるという要件以外、アデノウイルスベクターの性質は、本発明の実践の成功に決定的ではないと思われる。アデノウイルスは、42種の異なる公知の血清型および/またはサブグループA～Fのいずれかのものであり得る。サブグループCのアデノウイルス5型は、本発明における使用のための条件付き複製欠損アデノウイルスベクターを獲得するための好ましい開始材料である。これは、アデノウイルス5型が、それについての大量の生化学的および遺伝学的な情報が公知であるヒトアデノウイルスであり、かつそれは、ベクターとしてアデノウイルスを採用する大部分の構築に歴史的に用いられてきたためである。

30

【0092】

上記で明記されるように、本発明に従った典型的ベクターは、複製欠損でありかつアデノウイルスE1領域を有しない。アデノウイルスの成長および操縦は当業者に公知であり、かつインビトロおよびインビボで幅広い宿主範囲を呈する (米国特許第5,670,488号；米国特許第5,932,210号；米国特許第5,824,544号)。このグループのウイルスは、高い力価で、例えば1mlあたり $10^9 \sim 10^{11}$ プラーク形成単位で獲得され得、かつそれらは高度に感染性である。アデノウイルスの生活環は、宿主細胞ゲノム内への組み込みを要しない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子はエピソーム性であり、したがって宿主細胞に対する低い遺伝毒性を有する。多くの実験、革新、前臨床研究、および臨床試験が、現在、遺伝子送達ベクターとしてのアデノウイルスの使用のための検討下にある。例えば、肝疾患 (Han et al., 1999)、精神疾患 (Lesch, 1999)、神経疾患 (Smith, 1998；Hermens and Verhaagen, 1998)、冠動脈疾患 (Feldman et al., 1996)、筋疾患 (Petrof, 1998)、胃腸疾患 (Wu, 1998)、ならびに結腸直腸 (Fujiwara and Tanaka, 1998；Dorai et al., 1999)、膀胱 (Irie et al., 1999)、頭頸部 (Blackwell et al., 1999)、乳房 (Stewart et al., 1999)、肺 (Batra et al., 1999)、および卵巣 (Vanderkwaak et al., 1999) などの様々な癌に対して、アデノウイルス遺伝子送達に基づく遺伝子療法が開発されつつある。

40

【0093】

レトロウイルスベクター

50

本発明のある特定の態様において、遺伝子送達のためのレトロウイルスの使用が企図される。レトロウイルスは、RNAゲノムを含むRNAウイルスである。宿主細胞がレトロウイルスによって感染した場合、ゲノムRNAはDNA中間体に逆転写され、それが感染細胞の染色体DNA内に組み込まれる。この組み込まれたDNA中間体は、プロウイルスと呼ばれる。レトロウイルスの特定の利点は、それらが、免疫原性のウイルスタンパク質を発現することなく、宿主DNA内に組み込まれることによって、関心対象の遺伝子（例えば、治療用遺伝子）を分裂細胞に安定して感染させ得ることである。理論上、組み込まれたレトロウイルスは、感染した宿主細胞の寿命の間維持され、関心対象の遺伝子が発現される。

【0094】

レトロウイルスゲノムおよびプロウイルスDNAは、2つの長い末端反復（LTR）配列によって隣接された3つの遺伝子：gag、pol、およびenvを有する。gag遺伝子は、内部構造（マトリックス、カプシド、およびヌクレオカプシド）タンパク質をコードし；pol遺伝子は、RNA指向性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素）をコードし；かつenv遺伝子は、ウイルスエンベロープ糖タンパク質をコードする。5'および3' LTRは、ビリオンRNAの転写およびポリアデニル化を促進する働きをする。LTRは、ウイルス複製に必要な他のすべてのシス作用性配列を含有する。

【0095】

本発明の組換えレトロウイルスは、天然ウイルスの構造的な感染性遺伝子の一部が取り除かれかつその代わりに標的細胞に送達される対象となる核酸配列と置き換えられているような方式で遺伝子改変され得る（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,858,744号；米国特許第5,739,018号）。ウイルスによる細胞の感染後、ウイルスはその核酸を該細胞内に注入し、かつレトロウイルス遺伝物質は宿主細胞ゲノム内に組み込まれ得る。移入したレトロウイルス遺伝物質は、次いで、宿主細胞内で転写されかつタンパク質に翻訳される。他のウイルスベクターシステムと同様に、ベクター産生の間または療法の間の、複製能を有するレトロウイルスの生成は大きな懸案事項である。本発明における使用に適したレトロウイルスベクターは、概して、標的細胞に感染し得、それらのRNAゲノムを逆転写し得、かつ逆転写されたDNAを標的細胞ゲノム内に組み込み得るが、標的細胞内で複製して感染性レトロウイルスベクター粒子を産生し得ない欠損レトロウイルスベクターである（例えば、標的細胞内に移入したレトロウイルスゲノムは、ビリオン構造タンパク質をコードする遺伝子であるgag、および/または逆転写酵素をコードする遺伝子であるpolを欠損している）。ゆえに、プロウイルスの転写および感染性ウイルスへの会合は、適当なヘルパーウイルスの存在下において、または混入ヘルパーウイルスの同時産生なしでカプシド形成を可能にする適当な配列を含有する細胞株において生じる。

【0096】

レトロウイルスの成長および維持は、当技術分野において公知である（それぞれが参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,955,331号；米国特許第5,888,502号）。Nolanらは、異種遺伝子を含む、安定した高力価でヘルパー不含のレトロウイルスの産生を記載している（参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,830,725号）。両性（amphoteric）または同種指向性（ecotropic）の宿主範囲を有する、ヘルパー不含組換えレトロウイルスの作出に有用なパッケージング細胞株を構築するための方法、ならびに組換えレトロウイルスを用いて、インビボおよびインビトロにおいて真核細胞内に関心対象の遺伝子を導入する方法が、本発明において企図される（米国特許第5,955,331号）。

【0097】

現在、ベクター介在性遺伝子送達に関するすべての臨床試験の大多数は、マウス白血病ウイルス（MLV）に基づくレトロウイルスベクター遺伝子送達を用いている（Robbins et al., 1998; Miller et al., 1993）。レトロウイルス遺伝子送達の不利な点には、安定した感染のために進行中の細胞分裂を要すること、および大型遺伝子の送達を妨げるコーディング許容量が含まれる。しかしながら、ある特定の非分裂細胞に感染し得るレンチウイルス（例えば、HIV）、サル免疫不全ウイルス（SIV）、およびウマ伝染性貧血ウイルス（

EIAV) など、近年のベクターの開発により、遺伝子療法適用のためのレトロウイルスベクターのインビボ使用が潜在的に可能となっている (Amado and Chen, 1999; Klimatcheva et al., 1999; White et al., 1999; Case et al., 1999)。例えば、ニューロン (Miyatake et al., 1999)、腓島 (Leibowitz et al., 1999)、および筋細胞 (Johnston et al., 1999) などの非分裂細胞に感染するために、HIVに基づくベクターが用いられている。レトロウイルスを介した遺伝子の治療用送達、現在、炎症性疾患 (Moldawer et al., 1999)、AIDS (Amado and Chen, 1999; Engel and Kohn, 1999)、癌 (Clay et al., 1999)、脳血管疾患 (Weihl et al., 1999)、および血友病 (Kay, 1998) などの様々な障害の治療に対して査定されつつある。

【0098】

10

ヘルペスウイルスベクター

単純ヘルペスウイルス (HSV) I型およびII型は、70~80種の遺伝子をコードする、およそ150kbの二本鎖線状DNAゲノムを含有する。野生型HSVは、細胞に溶解的に (lytically) 感染し得、かつある特定の細胞タイプ (例えば、ニューロン) において潜伏を確立し得る。アデノウイルスと同様に、HSVも、筋肉 (Yeung et al., 1999)、耳 (Derby et al., 1999)、目 (Kaufman et al., 1999)、腫瘍 (Yoon et al., 1999; Howard et al., 1999)、肺 (Kohut et al., 1998)、神経 (Garrido et al., 1999; Lachmann and Efsthathiou, 1999)、肝臓 (Miyatake et al., 1999; Kooby et al., 1999)、および腓島 (Rabinovitch et al., 1999) を含めた多様な細胞タイプに感染し得る。

【0099】

20

HSVウイルス遺伝子は、細胞RNAポリメラーゼIIによって転写されかつ一時的に調節され、大体3つの識別可能な相または動力学的クラスにある、転写およびその後の遺伝子産物の合成をもたらす。遺伝子のこれらの相は、前初期 (IE) または α 遺伝子、初期 (E) または β 遺伝子、および後期 (L) または γ 遺伝子と呼ばれる。新たに感染した細胞の核内へのウイルスのゲノムの到着直後に、IE遺伝子が転写される。これらの遺伝子の効率的な発現は、先行するウイルスタンパク質合成を要しない。IE遺伝子の産物は、転写を活性化しかつウイルスゲノムの残りを調節するのに要される。

【0100】

治療用遺伝子送達における使用のために、HSVは複製欠損にされなければならない。複製欠損HSVヘルパーウイルス不含細胞株を作出するためのプロトコールが記載されている (それぞれが参照によりその全体として本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,879,934号; 米国特許第5,851,826号)。 $\alpha 4$ またはVmw175としても知られる1種のIEタンパク質ICP4は、ウイルス感染性およびIEから後期転写への移行の両方に絶対的に要される。ゆえに、その複雑な多機能の性質およびHSV遺伝子発現の調節における中心的役割のために、ICP4は、典型的にHSV遺伝学的研究の標的とされている。

30

【0101】

ICP4を欠失したHSVウイルスについての表現型研究により、そのようなウイルスは、遺伝子移入目的に潜在的に有用であろうことが示されている (Krisky et al., 1998a)。それらを遺伝子移入にとって望ましいものにする、ICP4を欠失したウイルスの1つの特性は、それらが、ウイルスDNA合成を指揮するタンパク質ならびにウイルスの構造タンパク質をコードするウイルス遺伝子の発現なしに、他の5種のIE遺伝子: ICP0、ICP6、ICP27、ICP22、およびICP47のみを発現することである (DeLuca et al., 1985)。この特性は、宿主細胞代謝に対する考え得る有害な影響、または遺伝子移入後の免疫応答を最小限に抑えるのに望ましい。さらに、ICP4に加えて、IE遺伝子のICP22およびICP27の欠失は、HSV細胞傷害性の低下を実質的に向上させ、かつ初期および後期ウイルス遺伝子発現を阻止した (Krisky et al., 1998b)。

40

【0102】

遺伝子移入におけるHSVの治療的潜在性は、パーキンソン病 (Yamada et al., 1999)、網膜芽細胞腫 (Hayashi et al., 1999)、脳内腫瘍および皮内腫瘍 (Moriuchi et al., 1998)、B細胞悪性腫瘍 (Suzuki et al., 1998)、卵巣癌 (Wang et al., 1998)、ならび

50

にデュシェンヌ型筋ジストロフィー (Huard et al., 1997) などの疾患に対する、様々なインビトロモデルシステムおよびインビボで実証されている。

【0103】

アデノ随伴ウイルスベクター

パルボウイルスファミリーのメンバーであるアデノ随伴ウイルス (AAV) は、遺伝子送達治療法にますます用いられつつあるヒトウイルスである。AAVは、他のウイルスシステムには見出されないいくつかの有利な特質を有する。第一に、AAVは、非分裂細胞を含めた広範な宿主細胞に感染し得る。第二に、AAVは、種々の種由来の細胞に感染し得る。第三に、AAVは、いかなるヒトまたは動物の疾患とも関連しておらず、かつ組み込みがあっても、宿主細胞の生物学的特性を変更しないように見える。例えば、ヒト集団の80~85%がAAVに曝露されていると推定される。最後に、AAVは、広範な物理的および化学的な条件において安定であり、それ自身を産生、保管、および運搬の要件に添える。

10

【0104】

AAVゲノムは、4681個のヌクレオチドを含有する線状一本鎖DNA分子である。AAVゲノムは、一般的に、長さがおおよそ145bpの逆向き末端反復 (ITR) によって各末端で隣接された内部非反復ゲノムを含む。ITRは、DNA複製の起点およびウイルスゲノムに対するパッケージングシグナルとしてを含めた多数の機能を有する。ゲノムの内部非反復部分は、AAVの複製 (rep) およびカプシド (cap) 遺伝子として知られる、2つの大きなオープンリーディングフレームを含む。repおよびcap遺伝子は、ウイルスが複製しかつウイルスゲノムをビリオン内にパッケージするのを可能にするウイルスタンパク質をコードする。少なくとも4種のウイルスタンパク質のファミリーは、それらの見かけの分子量に従って名付けられた、AAV rep領域のRep78、Rep68、Rep52、およびRep40から発現される。AAV cap領域は、少なくとも3種のタンパク質VP1、VP2、およびVP3をコードする。

20

【0105】

AAVは、AAVビリオンを形成するために、ヘルパーウイルス (例えば、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、またはワクシニア) との共感染を要するヘルパー依存型ウイルスである。ヘルパーウイルスとの共感染の非存在下において、AAVは、ウイルスゲノムが宿主細胞染色体内に挿入された潜伏状態を確立するが、感染性ビリオンは産生されない。ヘルパーウイルスによる後続感染は、組み込まれたゲノムを「レスキュー」し、それが複製しかつそのゲノムを感染性AAVビリオン内にパッケージするのを可能にする。AAVは種々の種由来の細胞に感染し得るものの、ヘルパーウイルスは、宿主細胞と同じ種のものでなければならぬ (例えば、ヒトAAVは、イヌアデノウイルスを共感染させたイヌ細胞において複製する)。

30

【0106】

AAVは、AAVゲノムの内部非反復部分を欠失させ、かつITR間に異種遺伝子を挿入することによって、関心対象の遺伝子を送達するように操作されている。異種遺伝子は、標的細胞において遺伝子発現を推進し得る異種プロモーター (構成的、細胞特異的、または誘導性) に機能的に連結され得る。異種遺伝子を含有する感染性組換えAAV (rAAV) を産生するために、適切な産生細胞株に、異種遺伝子を含有するrAAVベクターをトランスフェクトする。AAV repおよびcap遺伝子を、それらそれぞれの内因性プロモーターまたは異種プロモーターの制御下に持つ第二のプラスミドを、産生細胞に同時にトランスフェクトする。最後に、産生細胞にヘルパーウイルスを感染させる。

40

【0107】

いったんこれらの因子が集合すると、あたかもそれが野生型AAVゲノムであるかのように、異種遺伝子は複製されかつパッケージされる。結果として生じるrAAVビリオンを標的細胞に感染させた場合、異種遺伝子は標的細胞に侵入しかつそこで発現される。標的細胞は、repおよびcap遺伝子ならびにアデノウイルスヘルパー遺伝子を欠いているため、rAAVはさらに複製する、パッケージする、または野生型AAVを形成することができない。

【0108】

しかしながら、ヘルパーウイルスの使用は、いくつかの問題を提示する。第一に、rAAV

50

産生システムにおけるアデノウイルスの使用は、宿主細胞にrAAVおよび感染性アデノウイルスの両方を産生させる。混入する感染性アデノウイルスは、熱処理（56℃1時間）によって不活性化し得る。しかしながら、熱処理は、機能的rAAVビリオンの力価のおよそ50%降下をもたらす。第二に、これらの調製物中には、変動する量のアデノウイルスタンパク質が存在している。例えば、そのようなrAAVビリオン調製物において獲得される全タンパク質のおよそ50%またはそれを上回る割合は、遊離アデノウイルス線維タンパク質である。完全に取り除かれない場合、これらのアデノウイルスタンパク質は、患者から免疫応答を引き出す可能性を有する。第三に、ヘルパーウイルスを採用するAAVベクター産生法は、多量の高力価感染性ヘルパーウイルスの使用および操縦を要し、それは、特にヘルペスウイルスの使用に関して、いくつかの健康上および安全上の懸案事項を提示する。第四に、rAAVビリオン産生細胞におけるヘルパーウイルス粒子の付随産生は、多量の宿主細胞資源をrAAVビリオン産生からそらし、より低いrAAVビリオン収量を潜在的にもたらす。

10

【0109】

レンチウイルスベクター

レンチウイルスは、共通のレトロウイルス遺伝子gag、pol、およびenvに加えて、調節的または構造的な機能を有する他の遺伝子を含有する複合レトロウイルスである。潜伏感染の経過において見られるように、より高い複雑性は、ウイルスがその生活環を変調させるのを可能にする。レンチウイルスの一部の例には、ヒト免疫不全ウイルス：HIV-1、HIV-2、およびサル免疫不全ウイルス：SIVが含まれる。レンチウイルスベクターは、HIV毒性（virulence）遺伝子を多重減衰させることによって作出されており、例えばenv、vif、vpr、vpu、およびnef遺伝子を欠失させ、ベクターを生物学的に安全にする。

20

【0110】

組換えレンチウイルスベクターは、非分裂細胞に感染し得、かつインビボおよびエクシビボの両方における遺伝子移入ならびに核酸配列の発現に用いられ得る。レンチウイルスゲノムおよびプロウイルスDNAは、2つの長い末端反復（LTR）配列によって隣接された、レトロウイルスに見出される3種の遺伝子：gag、pol、およびenvを有する。gag遺伝子は、内部構造（マトリックス、カプシド、およびヌクレオカプシド）タンパク質をコードし；pol遺伝子は、RNA指向性DNAポリメラーゼ（逆転写酵素）、プロテアーゼ、およびインテグラーゼをコードし；かつenv遺伝子は、ウイルスエンベローブ糖タンパク質をコードする。5'および3' LTRは、ビリオンRNAの転写およびポリアデニル化を促進する働きをする。LTRは、ウイルス複製に必要な他のすべてのシス作用性配列を含有する。レンチウイルスは、vif、vpr、tat、rev、vpu、nef、およびvpxを含めた付加的な遺伝子を有する。

30

【0111】

5' LTRの近接は、ゲノムの逆転写に（tRNAプライマー結合部位）および粒子内へのウイルスRNAの効率的なカプシド形成に（Psi部位）必要な配列である。カプシド形成（または感染性ビリオン内へのレトロウイルスRNAのパッケージング）に必要な配列がウイルスゲノムから失われている場合、シス欠損はゲノムRNAのカプシド形成を妨げる。しかしながら、結果として生じる変異体は、依然としてすべてのビリオンタンパク質の合成を指揮し得る。

【0112】

レンチウイルスベクターは当技術分野において公知であり、Naldini et al., (1996) ; Zufferey et al., (1997) ; 米国特許第6,013,516号 ; および第5,994,136号を参照されたい。一般的に、ベクターは、プラスミドに基づくまたはウイルスに基づくものであり、かつ外来核酸を組み入れるための、選択のための、および宿主細胞内への核酸の移入のための必須の配列を運ぶように構成される。関心対象のベクターのgag、pol、およびenv遺伝子も、当技術分野において公知である。ゆえに、選択されたベクター内に関連遺伝子をクローニングし、次いでそれを用いて、関心対象の標的細胞を形質転換する。

40

【0113】

適切な宿主細胞に、パッケージング機能を持する2種またはそれを上回る種類のベクター、つまりgag、pol、およびenv、ならびにrevおよびtatをトランスフェクトする、非分

50

裂細胞に感染し得る組換えレンチウイルスが、参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,994,136号に記載されている。これは、パッケージング細胞を産出するための、ウイルスgagおよびpol遺伝子をコードする核酸を提供し得る第一のベクター、ならびにウイルスenvをコードする核酸を提供し得る別のベクターを記載している。本発明におけるSTAT-1 α 遺伝子などの異種遺伝子を提供するベクターをそのパッケージング細胞内に導入することにより、関心対象の外来遺伝子を持つ感染性ウイルス粒子を放出する産生細胞が産出される。envは、好ましくは、ヒトおよび他の種の細胞の形質導入を可能にする両種指向性 (amphotropic) エンベロープタンパク質である。

【0114】

エンベロープタンパク質と標的化のための抗体または特定のリガンドとの連結によって、組換えウイルスを特定の細胞タイプの受容体に標的化し得る。関心対象の配列 (調節領域を含む) を、特異的標的細胞上の受容体に対するリガンドをコードする別の遺伝子とともにウイルスベクター内に挿入することによって、例えばベクターは、ここでは標的的特である。

10

【0115】

ウイルスenv核酸配列を提供するベクターを、調節配列、例えばプロモーターまたはエンハンサーと機能的に関連付けする。調節配列は、例えばモロニー Maus 白血病ウイルスプロモーター-エンハンサーエレメント、ヒトサイトメガロウイルスエンハンサー、またはワクシニアP7.5プロモーターを含めた、任意の真核生物プロモーターまたはエンハンサーであり得る。ある場合には、モロニー Maus 白血病ウイルスプロモーター-エンハンサーエレメントなど、プロモーター-エンハンサーエレメントは、LTR配列の中または近接に位置する。

20

【0116】

本明細書におけるSTAT-1 α をコードするポリヌクレオチド配列など、異種または外来の核酸配列を調節核酸配列に機能的に連結する。好ましくは、異種配列をプロモーターに連結し、キメラ遺伝子をもたらす。異種核酸配列は、また、ウイルスLTRプロモーター-エンハンサーシグナルまたは内部プロモーターのいずれかの制御下にあり得、かつレトロウイルスLTR内の保持されたシグナルは、移入遺伝子の効率的な発現をなおも引き起こし得る。マーカー遺伝子を利用して、ベクターの存在についてアッセイし得、ゆえに感染および組み込みを確認し得る。マーカー遺伝子の存在は、インサートを発現するそうした宿主細胞のみの選択および成長を保証する。典型的な選択遺伝子は、抗生物質および他の毒性物質、例えばヒスチジノール、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、ネオマイシン、メトトレキサートなどに対する耐性を付与するタンパク質、および細胞表面マーカーをコードする。

30

【0117】

トランスフェクションまたは感染により、ベクターをパッケージング細胞株内に導入する。パッケージング細胞株は、ベクターゲノムを含有するウイルス粒子を産生する。トランスフェクションまたは感染のための方法は、当業者によって周知である。パッケージング細胞株へのパッケージングベクターおよび移入ベクターの共トランスフェクションの後、組換えウイルスを培養培地から回収し、かつ当業者によって用いられる標準的方法によって力価測定する。ゆえに、パッケージング構築物は、一般的にneo、DHFR、Gln合成酵素、またはADAなどの優性選択可能なマーカーと一緒に、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションによってヒト細胞株内に導入され得、その後、適当な薬物の存在下における選択およびクローンの単離が続く。選択可能なマーカー遺伝子は、構築物内のパッケージング遺伝子に物理的に連結され得る。

40

【0118】

Naldiniら (1996) のレンチウイルス移入ベクターは、インビトロで成長を停止させたヒト細胞に感染させるために、および成体ラットの脳内への直接注入後にニューロンに形質導入するために用いられている。ベクターは、インビボでマーカー遺伝子をニューロン内に移入するのに効率的であり、かつ検出可能な病変なしで長期発現が達成された。ベク

50

ターの単回注入の10ヶ月後に解析された動物は、移入遺伝子発現の平均レベルの減少を示さず、かつ組織病変または免疫反応の兆候を示さなかった (Blomer et al., 1997)。ゆえに、本発明において、エキスピボにおいて組換えレンチウイルスを感染させた細胞をグラフトし得るもしくは移植し得る、またはインピボにおいて細胞に感染させ得る。

【0119】

他のウイルスベクター

遺伝子送達のためのウイルスベクターの開発および実用性は、絶えず改善しかつ進化したつある。ポックスウイルス；例えばワクシニアウイルス (Gnant et al., 1999; Gnant et al., 1999)、アルファウイルス；例えばシンドビスウイルス、セムリキ森林ウイルス (Lundstrom, 1999)、レオウイルス (Coffey et al., 1998)、およびインフルエンザA ウイルス (Neumann et al., 1999) などの他のウイルスベクターが、本発明における使用のために企図され、かつ標的システムの不可欠な特性に従って選択され得る。

【0120】

ある特定の態様において、ワクシニアウイルスベクターが、本発明における使用のために企図される。ワクシニアウイルスは、異種遺伝子を発現するための特に有用な真核生物ウイルスベクターシステムである。例えば、組換えワクシニアウイルスが適正に操作された場合、タンパク質が合成され、プロセッシングされ、かつ原形質膜に輸送される。遺伝子送達ベクターとしてのワクシニアウイルスは、ヒト腫瘍細胞に遺伝子、例えばEMAP-II (Gnant et al., 1999) を、内耳に (Derby et al., 1999)、神経膠腫細胞に例えばp53 (Timiryasova et al., 1999) を、および様々な哺乳類細胞に例えばP₄₅₀ (米国特許第5,506,138号) を移入することが近年実証されている。ワクシニアウイルスの調製、成長、および操縦は、米国特許第5,849,304号および米国特許第5,506,138号 (それぞれ参照により本明細書に具体的に組み入れられる) に記載されている。

【0121】

他の態様において、シンドビスウイルスベクターが、遺伝子送達における使用のために企図される。シンドビスウイルスは、ベネズエラの西部および東部ウマ脳炎ウイルス (Sawai et al., 1999; Mastrangelo et al., 1999) のような重要な病原体を含む、アルファウイルス属の種である (Garoff and Li, 1998)。インピトロにおいて、シンドビスウイルスは、多様なトリ細胞、哺乳類細胞、爬虫類細胞、および両生類細胞に感染する。シンドビスウイルスのゲノムは、長さが11,703ヌクレオチドの一本鎖RNAの単一分子からなる。ゲノムRNAは感染性であり、5'末端でキャッピングされ、かつ3'末端でポリアデニル化され、そしてmRNAとして働く。ワクシニアウイルス26S mRNAの翻訳は、ウイルスプロテアーゼとおそらく宿主によってコードされるプロテアーゼとの組み合わせによって、同時翻訳的および翻訳後に切断されるポリタンパク質を産生して、3種のウイルス構造タンパク質、カプシドタンパク質 (C) および2種のエンベロープ糖タンパク質 (E1およびPE2、ビリオンE2の前駆体) を与える。

【0122】

シンドビスウイルスの3つの特質により、それが、異種遺伝子の発現のための有用なベクターであろうことが示唆される。第一に、天然および実験室の両方におけるその広い宿主範囲。第二に、遺伝子発現は宿主細胞の細胞質で生じ、そして迅速かつ効率的である。第三に、RNA合成において温度感受性変異が入手可能であり、それを用いて、感染後の様々な時間において培養物を非許容温度に単に移すことによって、異種コード配列の発現を変調し得る。シンドビスウイルスの成長および維持は、当技術分野において公知である (参照により本明細書に具体的に組み入れられる米国特許第5,217,879号)。

【0123】

キメラウイルスベクター

キメラまたはハイブリッドウイルスベクターが、治療用遺伝子送達における使用のために開発されつつあり、かつ本発明における使用のために企図される。キメラポックスウイルス/レトロウイルスベクター (Holzer et al., 1999)、アデノウイルス/レトロウイルスベクター (Feng et al., 1997; Bilbao et al., 1997; Caplen et al., 1999)、およ

【 0 1 2 4 】

【 0 1 2 5 】

10

【 0 1 2 6 】

20

【 0 1 2 7 】

30

40

50

【0128】

10. 非ウイルス性形質転換

本発明との使用のための細胞小器官、細胞、組織、または生物の形質転換のための核酸送達のための適切な方法は、本明細書において記載されるまたは当業者に公知であろう、それによって核酸（例えば、DNA）が細胞小器官、細胞、組織、または生物内に導入され得る事実上任意の方法を含むと思われる。そのような方法には、マイクロインジェクション（参照により本明細書に組み入れられるHarland and Weintraub, 1985；米国特許第5,789,215号）を含めた注入によって（それぞれが参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,994,624号、第5,981,274号、第5,945,100号、第5,780,448号、第5,736,524号、第5,702,932号、第5,656,610号、第5,589,466号、および第5,580,859号）；エレクトロポレーションによって（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,384,253号）；リン酸カルシウム沈殿によって（Graham and Van Der Eb, 1973；Chen and Okayama, 1987；Rippe et al., 1990）；DEAE-デキストラン、それに続いてポリエチレングリコールを用いることによって（Gopal, 1985）；直接超音波負荷によって（Fechheimer et al., 1987）；リボソーム介在性トランスフェクションによって（Nicolau and Sene, 1982；Fralley et al., 1979；Nicolau et al., 1987；Wong et al., 1980；Kaneda et al., 1989；Kato et al., 1991）；微弾丸衝撃によって（microprojectile bombardment）（それぞれが参照により本明細書に組み入れられるPCT出願第WO 94/09699号および第95/06128号；米国特許第5,610,042号、第5,322,783号、第5,563,055号、第5,550,318号、第5,538,877号、および第5,538,880号）；炭化ケイ素繊維による攪拌によって（それぞれが参照により本明細書に組み入れられるKaeppler et al., 1990；米国特許第5,302,523号および第5,464,765号）；またはプロトプラストのPEG介在性形質転換によって（それぞれが参照により本明細書に組み入れられるOmirulles et al., 1993；米国特許第4,684,611号および第4,952,500号）；乾燥/阻害（desiccation/inhibition）によるDNA取り込みによって（Potrykus et al., 1985）などのDNAの直接送達が含まれるが、それらに限定されるわけではない。これらなどの技法の適用を通じて、細胞小器官、細胞、組織、または生物は、安定してまたは一過性に形質転換され得る。

【0129】

注入

ある特定の態様において、核酸は、例えば皮下へ、皮内へ、筋肉内へ、静脈内へ（intravenously）、または腹腔内へのいずれかなど、1回または複数回の注入（すなわち、針による注入）を介して、細胞小器官、細胞、組織、または生物に送達され得る。ワクチンの注入の方法は、当業者に周知である（例えば、生理食塩液を含む組成物の注入）。本発明のさらなる態様は、直接マイクロインジェクションによる核酸の導入を含む。直接マイクロインジェクションは、アフリカツメガエル（*Xenopus*）卵母細胞内に核酸構築物を導入するために用いられている（Harland and Weintraub, 1985）。

【0130】

エレクトロポレーション

本発明のある特定の態様において、核酸は、エレクトロポレーションを介して、細胞小器官、細胞、組織、または生物内に導入される。エレクトロポレーションは、細胞とDNAとの懸濁物の高電圧放電への曝露を伴う。この方法のいくつかの変種において、ペクチン分解酵素などのある特定の細胞壁分解酵素を採用して、標的レシピエント細胞を、未処理細胞よりも、エレクトロポレーションによる形質転換に対してより感受性にする（参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,384,253号）。あるいは、レシピエント細胞を、機械的創傷によって、形質転換に対してより感受性にし得る。

【0131】

エレクトロポレーションを用いた真核細胞のトランスフェクションは、かなり成功している。この様式で、マウス前Bリンパ球にヒトκ-免疫グロブリン遺伝子がトランスフェクトされており（Potter et al., 1984）、そしてラット肝細胞にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子がトランスフェクトされている（Tur-Kaspa et al., 19

86)。

【0132】

例えば植物細胞などの細胞においてエレクトロポレーションによる形質転換を達成するために、細胞もしくは胚発生カルスの懸濁培養物など、いずれか砕けやすい組織を採用し得る、あるいは、未成熟胚もしくは他の組織化された組織を直接形質転換し得る。この技法において、選出された細胞の細胞壁は、それらをペクチン分解酵素（ペクトリアーゼ）または機械的創傷に制御された様式で曝露することによって、部分的に分解されると考えられる。無傷細胞のエレクトロポレーションによって形質転換されているいくつかの種の例には、トウモロコシ（米国特許第5,384,253号；Rhodes et al., 1995；D'Halluin et al., 1992）、小麦（Zhou et al., 1993）、トマト（Hou and Lin, 1996）、大豆（Christou et al., 1987）、およびタバコ（Lee et al., 1989）が含まれる。

10

【0133】

植物細胞のエレクトロポレーションによる形質転換には、プロトプラストも採用し得る（Bates, 1994；Lazzeri, 1995）。例えば、子葉由来プロトプラストのエレクトロポレーションによるトランスジェニック大豆植物の作出が、参照により本明細書に組み入れられる国際特許出願第W0 92/17598号においてDhirおよびWidholmによって記載されている。プロトプラスト形質転換が記載されている種の他の例には、大麦（Lazzeri, 1995）、モロコシ（Battraw et al., 1991）、トウモロコシ（Bhattacharjee et al., 1997）、小麦（He et al., 1994）、およびトマト（Tsukada, 1989）が含まれる。

【0134】

リン酸カルシウム。本発明の他の態様において、核酸は、リン酸カルシウム沈殿を用いて細胞に導入される。この技法を用いて、ヒトKB細胞にアデノウイルス5 DNAがトランスフェクトされている（Graham and Van Der Eb, 1973）。またこの様式で、マウスL (A9)、マウスC127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3、およびHeLa細胞にネオマイシンマーカー遺伝子がトランスフェクトされ（Chen and Okayama, 1987）、そしてラット肝細胞に多様なマーカー遺伝子がトランスフェクトされた（Rippe et al., 1990）。

20

【0135】

DEAE-デキストラン。別の態様において、核酸は、DEAE-デキストラン、それに続いてポリエチレングリコールを用いて細胞内に送達される。この様式で、レポータープラスミドが、マウス骨髄腫および赤白血病細胞内に導入された（Gopal, 1985）。

30

【0136】

超音波処理負荷

本発明の付加的な態様は、直接超音波負荷による核酸の導入を含む。LTK⁻線維芽細胞に、超音波処理負荷によってチミジンキナーゼ遺伝子がトランスフェクトされている（Fechheimer et al., 1987）。

【0137】

リポソーム介在性トランスフェクション

本発明のさらなる態様において、核酸は、例えばリポソームなどの脂質複合体内に封入され得る。リポソームとは、リン脂質二重層膜および内部の水性媒体を特徴とする小胞性構造物である。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離した多数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過度の水溶液中に懸濁された場合に自然発生的に形成される。脂質構成要素は、閉ざされた構造物の形成前に自己再編成を受け、かつ脂質二重層の間に水および溶解した溶質を封入する（Ghosh and Bachhawat, 1991）。Lipofectamine（Gibco BRL）またはSuperfect（Qiagen）と複合した核酸も企図される。

40

【0138】

インビトロにおける外来DNAのリポソーム介在性核酸送達および発現は、非常に成功している（Nicolau and Sene, 1982；Fraley et al., 1979；Nicolau et al., 1987）。培養されたニワトリ胚、HeLa、および肝細胞癌細胞における、外来DNAのリポソーム介在性送達および発現についての実現可能性も実証されている（Wong et al., 1980）。

【0139】

50

本発明のある特定の態様において、リポソームを血球凝集ウイルス（HVJ）と複合させ得る。これは、細胞膜との融合を促し、かつリポソームに封入されたDNAの細胞侵入を促進することが示されている（Kaneda et al., 1989）。他の態様において、リポソームを、核非ヒストン染色体タンパク質（HMG-1）と複合させ得るまたはそれと合わせて採用し得る（Kato et al., 1991）。さらにさらなる態様において、リポソームを、HVJおよびHMG-1の両方と複合させ得るまたはそれとともに採用し得る。他の態様において、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含み得る。

【0140】

受容体介在性トランスフェクション

なおさらに、核酸は、受容体介在性送達ビヒクルを介して、標的細胞に送達され得る。これらは、標的細胞において生じているであろう受容体介在性エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的取り込みの利点を生かす。様々な受容体の細胞タイプ特異的分布を考慮すると、この送達法は、本発明に別の程度の特異性を付加する。

【0141】

ある特定の受容体介在性遺伝子標的ビヒクルは、細胞受容体特異的リガンドおよび核酸結合作用物質を含む。他のものは、送達される対象となる核酸が機能的に付着している細胞受容体特異的リガンドを含む。いくつかのリガンドが受容体介在性遺伝子移入に用いられており（Wu and Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, EP0 0273085）、それは該技法の操作性を確立している。別の哺乳類細胞タイプの背景における特異的送達が記載されている（参照により本明細書に組み入れられるWu and Wu, 1993）。本発明のある特定の局面において、リガンドは、標的細胞集団上で特異的に発現される受容体に対応するように選出される。

【0142】

他の態様において、細胞特異的核酸標的ビヒクルの核酸送達ビヒクル構成要素は、リポソームと組み合わせた特異的結合リガンドを含み得る。送達される対象となる核酸はリポソーム内に収容され、かつ特異的結合リガンドはリポソーム膜に機能的に組み入れられる。ゆえに、リポソームは、標的細胞の受容体に特異的に結合しかつ内容物を細胞に送達する。そのようなシステムは、例えばEGF受容体の上方調節を呈する細胞への核酸の受容体介在性送達において上皮成長因子（EGF）が用いられるシステムを用いて、機能的であることが示されている。

【0143】

なおさらなる態様において、標的化送達ビヒクルの核酸送達ビヒクル構成要素は、細胞特異的結合を指揮する1種または複数種の脂質または糖タンパク質を好ましくは含むリポソームそれ自体であり得る。例えば、ガラクトース末端アシアログングリオシド（asialganglioside）であるラクトシル-セラミドがリポソームに組み入れられ、かつ肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加が観察されている（Nicolau et al., 1987）。本発明の組織特異的形質転換構築物は、同様の様式で標的細胞内に特異的に送達され得ることが企図される。

【0144】

11. 発現システム

上記で記述される組成物の少なくとも一部またはすべてを含む数々の発現システムが存在する。本発明との使用のために、原核生物および/または真核生物に基づくシステムを採用して、核酸配列、またはそれらの同族ポリペプチド、タンパク質、およびペプチドを産生することができる。多くのそのようなシステムは、商業的にかつ広く入手可能である。

【0145】

両方とも参照により本明細書に組み入れられる米国特許第5,871,986号および第4,879,236号に記載されているもの、ならびに例えばInvitrogen（登録商標）からMaxBac（登録商標）2.0という名でおおよそClontech（登録商標）からBacPack（商標）Baculovirus Expression Systemという名で購入され得るものなど、昆虫細胞/バキュロウイルスシステムは、

異種核酸セグメントの高レベルのタンパク質発現をもたらす得る。

【0146】

発現システムの他の例には、合成エクジソン誘導性受容体を伴うStratagene（登録商標）のComplete Control（商標）Inducible Mammalian Expression System、または大腸菌（*E. coli*）発現システムであるそのpET Expression Systemが含まれる。誘導性発現システムの別の例がInvitrogen（登録商標）から入手可能であり、それは、全長CMVプロモーターを用いる誘導性哺乳類発現システムである、T-Rex（商標）（テトラサイクリンにより調節される発現）システムを持する。Invitrogen（登録商標）は、ピキア・メタノリカ（*Pichia methanolica*）Expression Systemと称される酵母発現システムも提供しており、それは、メチロトロフ酵母ピキア・メタノリカにおける組換えタンパク質の高レベルの産生のために設計されている。当業者であれば、核酸配列、またはその同族ポリペプチド、タンパク質、もしくはペプチドを産生する、発現構築物などのベクターをどのように発現させるかを知っているであろう。

10

【0147】

初代哺乳類細胞培養物は、様々な方式で調製され得る。インビトロにある間および発現構築物と接触させている間に細胞を生きた状態に保つために、該細胞は、正しい比率の酸素および二酸化炭素ならびに栄養素との接触を維持し、しかしながら微生物混入から保護されることを確実にすることが必要である。細胞培養技法は、十分に文書化されている。

【0148】

前述のうちの一態様は、タンパク質の産生のための細胞を不死化するために、遺伝子移入の使用を伴う。関心対象のタンパク質に対する遺伝子を、上記で記載されるように適当な宿主細胞内に移入し得、その後適当な条件下での細胞の培養が続く。事実上任意のポリペプチドに対する遺伝子は、この様式で採用され得る。組換え発現ベクターの作出およびそこに含まれるエレメントは、上記で記述されている。あるいは、産生される対象となるタンパク質は、問題の細胞によって通常合成される内因性タンパク質であり得る。

20

【0149】

有用な哺乳類宿主細胞株の例は、VeroおよびHeLa細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣、W138、BHK、COS-7、293、HepG2、NIH3T3、RIN、およびMDCK細胞の細胞株である。加えて、挿入された配列の発現を変調する、または所望の様式で遺伝子産物を修飾しかつプロセッシングする宿主細胞系統が選出され得る。タンパク質産物のそのような修飾（例えば、グリコシル化）およびプロセッシング（例えば、切断）は、該タンパク質の機能に重要であり得る。種々の宿主細胞は、タンパク質の翻訳後プロセッシングおよび修飾に関して、特徴的かつ特異的なメカニズムを有する。適当な細胞株または宿主システムは、発現した外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを保証するように選出され得る。

30

【0150】

それぞれtk⁻、hgp⁻、またはap⁻細胞におけるHSVチミジンキナーゼ、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を含むがそれらに限定されない、いくつかの選択システムを用い得る。また、耐性を付与するdhfr；ミコフェノール酸に対する耐性を付与するgpt；アミノグリコシドG418に対する耐性を付与するneo；およびハイグロマイシンに対する耐性を付与するhygroの選択の根拠として、代謝拮抗物質耐性を用いることができる。

40

【0151】

E. 精製

ある特定の態様において、本発明の抗体を精製し得る。本明細書において用いられる「精製された」という用語は、他の構成要素から単離可能な組成物を指すことを意図され、タンパク質はその天然に獲得可能な状態と比べて任意の程度精製されている。したがって、精製されたタンパク質とは、それが天然に存在し得る環境から遊離したタンパク質も指す。「実質的に精製された」という用語が用いられる場合、この名称は、タンパク質またはペプチドが、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれを上回る割合をなすなど、組成物の主要な構成要素を形成している組成物

50

を指す。

【0152】

タンパク質精製技法は、当業者に周知である。これらの技法は、あるレベルにおける、ポリペプチド性および非ポリペプチド性画分に対する、細胞環境の粗分画を伴う。他のタンパク質からポリペプチドを分離した場合、クロマトグラフィーおよび電気泳動による技法を用いて関心対象のポリペプチドをさらに精製して、部分的なまたは完全な精製（または均一性までの精製）を達成し得る。純粋なペプチドの調製に特に適した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；等電点集束（isoelectric focusing）である。タンパク質精製のための他の方法には、硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈殿、または熱変性それに続く遠心分離によるもの；ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイト、およびアフィニティーによるクロマトグラフィー；ならびにそのようなものと他の技法との組み合わせが含まれる。

10

【0153】

本発明の抗体を精製することにおいて、原核生物または真核生物発現システムでポリペプチドを発現させ、かつ変性条件を用いてタンパク質を抽出することが望ましくあり得る。ポリペプチドは、該ポリペプチドのタグ化部分に結合するアフィニティーカラムを用いて、他の細胞構成要素から精製され得る。当技術分野において一般的に知られるように、様々な精製工程を行う順序は変化し得る、またはある特定の工程は省略され得、かつ実質的に精製されたタンパク質もしくはペプチドの調製にとって適切な方法をなおももたらし得ると思われる。

20

【0154】

一般に、完全抗体は、該抗体のFc部分に結合する作用物質（すなわち、プロテインA）を利用して分画される。あるいは、抗原を用いて、適当な抗体を同時に精製しかつ選択し得る。そのような方法は、カラム、フィルター、またはビーズなどの支持体に結合した選択作用物質をしばしば利用する。抗体を支持体に結合させ、混入物を取り除き（例えば、洗い流し）、かつ条件（塩、熱など）を適用することによって抗体は放出される。

【0155】

本開示に照らして、タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量化するための様々な方法は、当業者に公知であろう。これらには、例えば活性画分の特異的活性を判定すること、またはSDS/PAGE解析によって画分内のポリペプチドの量を査定することが含まれる。画分の純度を査定するための別の方法は、画分の特異的活性を算出し、それを初回抽出物の特異的活性と比較し、かつゆえに純度の程度を算出することである。活性の量を表すために用いられる実際の単位は、当然、精製に続くために選出された特定のアッセイ技法、および発現したタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を呈するか否かに依存する。

30

【0156】

ポリペプチドの移動は、SDS/PAGEの種々の条件によって、ときには大幅に変動し得る（Capaldi et al., 1977）。したがって、異なる電気泳動条件の下で、精製されたまたは部分的に精製された発現産物の見かけの分子量は変動し得ると解されるであろう。

【0157】

F. 一本鎖/単一ドメイン抗体

40

一本鎖可変フラグメント（scFv）とは、短い（通常、セリン、グリシン）リンカーと一緒に連結された、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の融合体である。単一ドメイン抗体としても知られるこのキメラ分子は、定常領域の取り除きおよびリンカーペプチドの導入にもかかわらず、元の免疫グロブリンの特異性を保持する。この改変は、通常、特異性を変更させる。これらの分子は、抗原結合ドメインを単一ペプチドとして発現させることが非常に好都合であるファージディスプレイを容易にするために歴史的に創出された。あるいは、scFvは、ハイブリドーマに由来するサブクローニングされた重鎖および軽鎖から直接創出され得る。単一ドメインまたは一本鎖可変フラグメントは、完全抗体分子に見出される定常Fc領域、ゆえに抗体を精製するために用いられる共通結合部位（例えば、プロテインA/G）を欠いている（一本鎖抗体はFc領域を含む）。プロテインLはκ軽鎖の

50

可変領域と相互作用するため、これらのフラグメントは、しばしばプロテインLを用いて精製/固定化され得る。

【0158】

柔軟性のあるリンカーは、一般的に、アラニン、セリン、およびグリシンなどのヘリックスおよびターン促進性アミノ酸残基から構成される。しかしながら、他の残基が同様に機能し得る。Tangら（1996）は、タンパク質リンカーライブラリーから一本鎖抗体（scFv）のための調整されたリンカーを迅速に選択する手段として、ファージディスプレイを用いた。重鎖および軽鎖可変ドメインに対する遺伝子が、可変組成の18アミノ酸ポリペプチドをコードするセグメントによって連結された、ランダムリンカーが構築された。scFvレパートリー（およそ 5×10^6 個の異なるメンバー）が繊維状ファージ上に提示され、かつハプテンによるアフィニティー選択に供された。選択された変種の集団は、結合活性の有意な増加を呈したが、相当な配列多様性を保持した。その後、1054個の個々の変種をスクリーニングすることにより、可溶性形態で効率的に産生される触媒活性を有するscFvが産出された。配列解析により、 V_H C末端の2残基後のリンカーにおける保存されたプロリン、ならびに選択された拘束体の唯一の共通の特質としての他の箇所におけるアルギニンおよびプロリンの豊富さが明らかとなった。

10

【0159】

本発明の組換え抗体は、受容体の二量体化または多量体化を可能にする配列または成分も伴い得る。そのような配列にはIgAに由来するものが含まれ、それはJ鎖と連動して多量体の形成を可能にする。別の多量体化ドメインは、Gal4二量体化ドメインである。他の態様において、鎖は、2種の抗体の組み合わせを可能にするビオチン/アビジンなどの作用物質で修飾され得る。

20

【0160】

別個の態様において、非ペプチド性リンカーまたは化学的単位を用いて受容体軽鎖および重鎖をつなぐことによって、一本鎖抗体を創出することができる。一般的に、軽鎖および重鎖は、個別の細胞において産生され、精製され、かつその後適当な形式で一緒に連結される（すなわち、重鎖のN末端は、適当な化学的ブリッジを介して、軽鎖のC末端に付着する）。

【0161】

架橋試薬を用いて、2種の異なる分子、例えば安定剤および凝固剤の官能基を結ぶ分子ブリッジを形成する。しかしながら、同じ類似体の二量体もしくは多量体、または異なる類似体から構成されるヘテロ複合体を創出し得ることが企図される。2種の異なる化合物を段階的様式で連結するために、不要なホモポリマー形成を除去するヘテロ二官能性架橋剤が用いられ得る。

30

【0162】

例示的なヘテロ二官能性架橋剤は、2種の反応基を含有する：一方は第一級アミン基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と反応し、かつ他方はチオール基（例えば、ピリジルスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応する。第一級アミン反応基を介して、架橋剤は、一方のタンパク質（例えば、選択された抗体またはフラグメント）のリジン残基と反応し得、かつチオール反応基を介して、すでに第一のタンパク質に結ばれた架橋剤は、他方のタンパク質（例えば、選択作用物質）のシステイン残基（遊離スルフィド基）と反応する。

40

【0163】

血中で適度な安定性を有する架橋剤が採用されることが好ましい。標的化作用物質と治療用/予防作用物質とを抱合するために上手く採用され得る数々のタイプのジスルフィド結合含有リンカーが公知である。立体障害を受ける（sterically hindered）ジスルフィド結合を含有するリンカーは、インビボでより大きな安定性を与えることが判明し得、作用の部位に到達する前の標的化ペプチドの放出が阻止される。ゆえに、これらのリンカーは、連結剤の1つの群である。

【0164】

50

別の架橋試薬はSMPTであり、それは、近接したベンゼン環およびメチル基によって立体障害を受けるジスルフィド結合を含有する二官能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、組織中および血中に存在し得るグルタチオンなどのチオレート陰イオンによる攻撃から該結合を保護する機能を果たし、それによって、付着した作用物質の標的部位への送達前の抱合体の切り離しを阻止するのに役立つと思われる。

【0165】

SMPT架橋試薬は、他の多くの公知の架橋試薬と同様に、システインのSHまたは第一級アミンなどの官能基（例えば、リジンのεアミノ基）を架橋し得る能力を添える。別の考え得るタイプの架橋剤には、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネートなど、切断可能なジスルフィド結合を含有するヘテロ二官能性光反応性フェニルアジドが含まれる。N-ヒドロキシスクシンイミジル基は第一級アミノ基と反応し、かつフェニルアジドは（光分解があると）任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【0166】

障害を受ける架橋剤に加えて、障害を受けないリンカーも本明細書に従って採用され得る。保護されたジスルフィドを含有しないまたは作出しないと思われる他の有用な架橋剤には、SATA、SPDP、および2-イミノチオランが含まれる（Wawrzynczak & Thorpe, 1987）。そのような架橋剤の使用は、当技術分野において十分に理解されている。別の態様は、柔軟性のあるリンカーの使用を伴う。

【0167】

米国特許第4,680,338号は、アミン含有ポリマーおよび/またはタンパク質とリガンドとの抱合体を産生するために、とりわけキレート剤、薬物、酵素、検出可能な標識などとの抗体抱合体を形成するために有用な二官能性リンカーを記載している。米国特許第5,141,648号および第5,563,250号は、多様な穏やかな条件下で切断可能である不安定結合を含有する切断可能な抱合体を開示している。このリンカーは、関心対象の作用物質をリンカーに直接結合し得、切断とともに活性作用物質の放出をもたらすという点において特に有用である。特定の使用方法には、遊離アミノ基または遊離スルフヒドリル基を、抗体などのタンパク質、または薬物に付加することが含まれる。

【0168】

米国特許第5,856,456号は、ポリペプチド構成物質を接続して、融合タンパク質、例えば一本鎖抗体を作製することにおける使用のためのペプチドリリンカーを提供している。リンカーは、長さが最高約50個のアミノ酸であり、プロリンが後に続く荷電アミノ酸（好ましくは、アルギニンまたはリジン）の少なくとも1個の発生率を含有し、かつより大きな安定性および凝集の低下を特徴とする。米国特許第5,880,270号は、多様な免疫診断技法および分離技法において有用なアミノオキシ含有リンカーを開示している。

【0169】

G. 改変抗体

1. CAR

人工T細胞受容体（キメラT細胞受容体、キメラ免疫受容体、キメラ抗原受容体（CAR）としても知られる）は、任意の特異性を免疫エフェクター細胞にグラフトする、操作された受容体である。典型的には、これらの受容体を用いて、レトロウイルスベクターによって促されるそれらのコード配列の移入とともに、モノクローナル抗体の特異性をT細胞にグラフトする。このようにして、多数の癌特異的T細胞を、養子細胞移入のために作出することができる。この手法の第I相臨床試験は、有効性を示している。

【0170】

これらの分子の最もよく見られる形態は、CD3-ζ膜貫通およびエンドドメインに融合された、モノクローナル抗体に由来する一本鎖可変フラグメント（scFv）の融合体である。そのような分子は、その標的のscFvによる認識に応答して、ζシグナルの送信をもたらす。そのような構築物の例は、（ジシアロガングリオシドGD2を認識する）ハイブリドーマ14g2aに由来するscFvの融合体である14g2a-ζである。T細胞がこの分子を発現する場合（

通常、オンコレトロウイルスベクターの形質導入によって達成される)、それらは、GD2を発現する標的細胞(例えば、神経芽細胞腫細胞)を認識しかつ殺傷する。悪性B細胞を標的とするために、研究者らは、B系統分子CD19に特異的なキメラ免疫受容体を用いてT細胞の特異性を変えている。

【0171】

免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変部分を柔軟性のあるリンカーによって融合させて、scFvを形成する。新生タンパク質を小胞体およびその後の表面発現(これが切断される)に向かわせるシグナルペプチドが、このscFvに先行する。柔軟性のあるスペーサーにより、scFvが種々の方向に向くことが可能となり、抗原結合を可能にする。膜貫通ドメインは、細胞内に突き出しかつ所望のシグナルを送信するシグナル伝達エンドドメインの元の分子に通常由来する典型的な疎水性 α ヘリックスである。

10

【0172】

I型タンパク質とは、実際には、その間で膜貫通 α ヘリックスによって連結された2つのタンパク質である。膜貫通ドメインが貫通する細胞膜脂質二重層は、外部部分(エクストドメイン)から内側部分(エンドドメイン)を隔てる作用をする。一方のタンパク質由来のエクストドメインをもう一方のタンパク質のエンドドメインに付着させることにより、前者の認識を后者のシグナルに結び付ける分子がもたらされることは、それほど驚きではない。

【0173】

エクストドメイン

20

シグナルペプチドは、新生タンパク質を小胞体に向かわせる。これは、受容体がグリコシル化されかつ細胞膜に固定されるべきである場合には必須である。任意の真核細胞シグナルペプチド配列が、通常見事に働く。一般的に、大部分のアミノ末端構成要素に天然に付着したシグナルペプチドが用いられる(例えば、軽鎖-リンカー-重鎖という配向を有するscFvでは、軽鎖の天然シグナルが用いられる)。

【0174】

抗原認識ドメインは、通常scFvである。しかしながら、多くの代替物が存在する。天然T細胞受容体(TCR) α および β 一本鎖由来の抗原認識ドメインは、単純なエクストドメイン(例えば、HIV感染細胞を認識するCD4エクストドメイン)、および(サイトカイン受容体を所持する細胞の認識につながる)連結されたサイトカインなどのより外的な認識構成要素を有するものとして記載されている。実際には、所与の標的に高アフィニティーで結合するほぼ何もかもを、抗原認識領域として用いることができる。

30

【0175】

スペーサー領域は、抗原結合ドメインを膜貫通ドメインに連結させる。それは、抗原結合ドメインが種々の方向に向いて抗原認識を促すのを可能にするのに十分柔軟であるべきである。最も単純な形態は、IgG1由来のヒンジ領域である。代替物には、免疫グロブリンのCH₂CH₃領域およびCD3の一部が含まれる。scFvに基づく大部分の構築物に関して、IgG1ヒンジで十分である。しかしながら、最良のスペーサーは、しばしば、経験的に決定される必要がある。

【0176】

膜貫通ドメイン

40

膜貫通ドメインは、膜にわたる疎水性 α ヘリックスである。一般的に、エンドドメインの最も膜近位の構成要素由来の膜貫通ドメインが用いられる。興味深いことに、CD3- ζ 膜貫通ドメインを用いることにより、天然CD3- ζ 膜貫通の荷電アスパラギン酸残基の存在に依存している因子である、天然TCR内への人工TCRの組み入れがもたらされ得る。種々の膜貫通ドメインは、種々の受容体安定性をもたらす。CD28膜貫通ドメインは、元気に発現した安定な受容体をもたらす。

【0177】

エンドドメイン

これは、受容体の「仕事を果たす先端(business end)」である。抗原認識の後、受容

50

体はクラスター化し、かつシグナルが細胞に送信される。最もよく用いられるエンドドメイン構成要素は、3つのITAMを含有するCD3- ζ である。これは、抗原が結合した後、活性化シグナルをT細胞に送信する。CD3- ζ は、十分に能力がある活性化シグナルを提供し得るわけではなく、付加的な共刺激シグナル伝達が必要とされる。例えば、キメラCD28およびOX40をCD3- ζ とともに用いて、増殖/生存シグナルを送信することができる、または3つすべてを一緒に用いることができる。

【0178】

「第一世代」CARは、典型的に、内因性TCRからのシグナルの一次送信因子である、CD3 ζ 鎖由来の細胞内ドメインを有した。「第二世代」CARは、様々な共刺激タンパク質受容体（例えば、CD28、41BB、ICOS）由来の細胞内シグナル伝達ドメインを、CARの細胞質テールに付加して、T細胞に付加的なシグナルを提供する。前臨床研究により、第二世代のCAR設計は、T細胞の抗腫瘍活性を向上させることが示されている。より最近では、「第三世代」CARは、CD3 ζ -CD28-41BBまたはCD3 ζ -CD28-OX40などの多重シグナル伝達ドメインを組み合わせて、有効性をさらに増大させる。

【0179】

CAR修飾されたT細胞は、事実上任意の腫瘍関連抗原を標的とするように操作され得るため、キメラ抗原受容体を発現するT細胞の養子移入は、有望な抗癌治療法である。この手法には、患者特異的な癌療法を多大に改善する大きな可能性がある。患者のT細胞の収集後、細胞は、該患者の腫瘍細胞上の抗原に特異的に向けられたCARを発現するように遺伝子操作され、次いで該患者に注入して戻される。CAR修飾されたT細胞の養子移入は、固有のかつ有望な癌療法であるものの、重大な安全上の懸案事項が存在する。この療法の臨床試験により、健常組織が腫瘍細胞と同じ標的抗原を発現する場合、これらCARの潜在的な毒性作用が明らかとなっており、移植片対宿主病（GVHD）と同程度の結果につながる。この問題に対する潜在的解決策は、修飾されたT細胞内に自殺遺伝子进行操作することである。このようにして、GVHDの間に自殺遺伝子を活性化するように設計されたプロドラッグの投与は、自殺遺伝子が活性化されたCAR T細胞におけるアポトーシスを誘発する。この方法は、造血幹細胞移植（HSCT）において安全にかつ有効に用いられている。CAR修飾されたT細胞の養子細胞移入の臨床応用のための自殺遺伝子療法の採択は、全体的な抗腫瘍効力を向上させると同時に、GVHDを緩和する可能性を有する。

【0180】

2. ADC

抗体薬物抱合体、つまりADCは、癌を有する人々の治療のための標的療法として設計された、新たなクラスの非常に強力な生物薬学的薬物である。ADCは、不安定結合を有する安定した化学的リンカーを介して、生物学的に活性な細胞傷害性（抗癌）の搭載物または薬物に連結された抗体（mAb全体、または一本鎖可変フラグメント、つまりscFvなどの抗体フラグメント）から構成される複合分子である。抗体薬物抱合体は、生物抱合体（bioconjugate）および免疫抱合体の例である。

【0181】

モノクローナル抗体の一意的な標的化能と細胞傷害性薬物の癌殺傷能力とを組み合わせることによって、抗体-薬物抱合体は、健常組織と罹患組織との間の高感度な判別を可能にする。これは、伝統的な化学療法剤とは対照的に、抗体-薬物抱合体は、健常細胞が重度に影響を受けにくいように、癌細胞を標的としかつ攻撃することを意味する。

【0182】

ADCに基づく抗腫瘍療法の開発において、抗癌薬物（例えば、細胞毒または細胞毒素）を、ある特定の腫瘍マーカー（例えば、理想的には腫瘍細胞の中または上にのみ見出され得るタンパク質；この場合にはMUC1）を特異的に標的とする抗体に共役させる。抗体は、身体内でこれらのタンパク質を追跡して捕らえ、かつそれら自身を癌細胞の表面に付着させる。抗体と標的タンパク質（抗原）との間の生化学的反応は、腫瘍細胞においてシグナルを誘発し、それは次いで、細胞毒素と一緒に該抗体を吸収するまたは内在化する。ADCが内在化した後、細胞傷害性薬物は放出されかつ癌を殺傷する。この標的化により、理想

的には、薬物はより低い副作用を有し、かつ他の化学療法剤よりも広い治療域を与える。

【0183】

抗体と細胞傷害性（抗癌）作用物質との間の安定した連結は、ADCの決定的な局面である。リンカーは、ジスルフィド、ヒドラゾンもしくはペプチド（切断可能）、またはチオエーテル（切断不能）を含めた化学的モチーフに基づき、かつ標的細胞への細胞傷害性作用物質の分布および送達を制御する。切断可能および切断不能なタイプのリンカーは、前臨床および臨床試験において安全であることが証明されている。ブレンツキシマブ・ベドチンは、合成抗新生物作用物質である、強力かつ非常に有害な抗微小管作用物質のモノメチルアウリスタチンE、つまりMMAEをヒト特異的CD30陽性悪性腫瘍細胞に送達する、酵素感受性切断可能リンカーを含む。その高い毒性が理由で、チューブリンの重合を遮断することによって細胞分裂を阻害するMMAEは、単剤化学療法薬物としては用いられ得ない。しかしながら、抗CD30モノクローナル抗体（cAC10、腫瘍壊死因子つまりTNF受容体の細胞膜タンパク質）に連結されたMMAEの組み合わせは、細胞外液中で安定であり、カテプシンによって切断可能であり、かつ療法にとって安全であることが判明した。他の認可されたADCであるトラスツズマブ・エムタンシンは、安定した切断不能なリンカーによって付着された、メイタンシンの誘導体である微小管形成阻害剤メルタンシン（DM-1）とトラスツズマブ抗体（ハーセプチン（登録商標）/Genentech/Roche）との組み合わせである。

10

【0184】

より優れたかつより安定したリンカーの利用可能性は、化学結合の機能を変化させている。切断可能または切断不能なリンカーのタイプは、細胞傷害性（抗癌）薬物に特異的特性を添える。例えば、切断不能なリンカーは、薬物を細胞内に保つ。結果として、抗体全体、リンカー、および細胞傷害性（抗癌）作用物質は標的癌細胞に入り、そこで抗体はアミノ酸のレベルまで分解される。結果として生じる複合体であるアミノ酸、リンカー、および細胞傷害性作用物質は、ここで、活性を有する薬物になる。対照的に、切断可能なリンカーは癌細胞内の酵素によって触媒され、そこでそれは細胞傷害性作用物質を放出する。相違点は、切断可能なリンカーを介して送達される細胞傷害性搭載物は、標的細胞から脱出し得、かつ「バイスタンダー殺傷」と称される過程において近隣癌細胞を攻撃し得ることである。

20

【0185】

現在開発中の別のタイプの切断可能なリンカーは、細胞傷害性薬物と切断部位との間に余分な分子を付加する。このリンカー技術は、研究者らが、切断動力学を変化させることを心配することなく、より高い柔軟性を有するADCを創出することを可能にする。研究者らは、ペプチドにおけるアミノ酸をシーケンシングする方法であるエドマン分解に基づき、ペプチド切断の新たな方法も開発しつつある。ADCの開発におけるさらなる方向には、安定性指数および治療指数をさらに向上させる部位特異的抱合体（TDC）、ならびにα放射線免疫抱合体および抗体抱合型ナノ粒子の開発も含まれる。

30

【0186】

3. BitES

二重特異性T細胞エンゲージャー（engager）（BiTE）は、抗癌薬物としての使用について検討されている人工二重特異性モノクローナル抗体のクラスである。それらは、癌細胞に対する宿主の免疫系、より具体的にはT細胞の細胞傷害活性を指揮する。BiTEは、Micro met AGの登録商標である。

40

【0187】

BiTEは、約55キロダルトンの単一ペプチド鎖上にある、種々の抗体の2つの一本鎖可変フラグメント（scFv）、または4種の異なる遺伝子由来のアミノ酸配列からなる融合タンパク質である。scFvの一方は、CD3受容体を介してT細胞に結合し、かつ他方は、腫瘍特異的分子、この場合にはMUC1を介して腫瘍細胞に結合する。

【0188】

他の二重特異性抗体と同様に、かつ普通のモノクローナル抗体とは異なり、BiTEは、T細胞と腫瘍細胞との間に連結を形成する。これは、MHC Iまたは共刺激分子の存在とは関

50

係なく、パーフォリンおよびグランザイムのようなタンパク質を産生することによって、T細胞に腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を発揮させる。これらのタンパク質は、腫瘍細胞に入りかつ該細胞のアポトーシスを開始させる。この作用は、腫瘍細胞に対するT細胞攻撃の間に観察される生理学的過程を模倣している。

【0189】

2010年7月の時点で臨床試験にあったBiTEには、B細胞上に発現される表面分子であるCD19に向けられた、非ホジキンリンパ腫および急性リンパ芽急性白血病の治療のためのブリナツモマブ (MT103) ; ならびにEpCAM抗原に向けられた、消化管癌および肺癌の治療のためのMT110が含まれる。

【0190】

同じ技術を利用すると、黒色腫 (MCSP特異的BiTEを用いて) および急性骨髄性白血病 (CD33特異的BiTEを用いて) を標的とすることができる。この分野における研究は、現在進行中である。新規な抗癌療法への別の道は、トラスツズマブ (HER2/neuを標的とする)、セツキシマブおよびパニツムマブ (両方ともEGF受容体を標的とする) のような現在用いられている従来の抗体のいくつかを、BiTE手法を用いて再操作することである。CD66eおよびEphA2に対するBiTEが、同様に開発されつつある。

【0191】

III. 癌の薬学的製剤および治療

A. 癌

癌は、組織由来の細胞のクローン集団の増生により生じる。発癌と呼ばれる癌の発生は、いくつかの方式でモデル化され得かつ特徴付けされ得る。癌の発生と炎症との間の関連は長い間認識されてきた。炎症応答は、微生物感染に対する宿主防御に関与し、かつまた組織の修復および再生を推進する。相当な証拠により、炎症と、癌を発生させるリスクとの間のつながりが指摘されており、すなわち慢性炎症は異形成につながり得る。

【0192】

本発明の方法を適用し得る癌細胞には、MUC1を発現する、より特にMUC1を過剰発現する、概して任意の細胞が含まれる。適当な癌細胞は、乳癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌、腎臓癌、胃癌、肝臓癌、骨癌、血液癌 (例えば、白血病またはリンパ腫)、神経組織癌、黒色腫、卵巣癌、精巣癌、前立腺癌、子宮頸癌、陰癌、または膀胱癌の細胞であり得る。加えて、本発明の方法を、広範な種、例えばヒト、非ヒト霊長類 (例えば、猿、ヒヒ、またはチンパンジー)、馬、牛、ブタ、ヒツジ、ヤギ、犬、猫、ウサギ、モルモット、アレチネズミ、ハムスター、ラット、およびマウスに適用することができる。癌は、再発性、転移性、かつ/または多剤耐性でもあり得、そして本発明の方法を特にそのような癌に適用して、それらを切除可能な状態にし得、寛解を長引かせ得もしくは再誘導し得、血管新生を阻害し得、転移を阻止し得もしくは限定し得、かつ/または多剤耐性癌を治療し得る。細胞レベルにおいて、これは、癌細胞を殺傷すること、癌細胞成長を阻害すること、またはそうでなければ腫瘍細胞の悪性表現型を逆転させるもしくは低下させることになり得る。

【0193】

B. 製剤および投与

本発明は、抗MUC1-C抗体を含む薬学的組成物を提供する。具体的な態様において、「薬学的に許容される」という用語は、動物における、より特にヒトにおける使用に関して、連邦政府もしくは州政府の規制機関によって認可された、または米国薬局方もしくは他の一般的に認められている薬局方に列挙されたことを意味する。「キャリア」という用語は、それとともに治療法が施される希釈剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的キャリアは、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油など、石油、動物性、植物性、または合成の起源のものを含めた、水および油などの滅菌した液体であり得る。他の適切な薬学的賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、生理食塩水、ブドウ糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが含まれる。

【0194】

組成物は、中性または塩の形態として製剤化され得る。薬学的に許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するものなど、陰イオンで形成されたもの、および水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するものなど、陽イオンで形成されるものが含まれる。

【0195】

本発明の抗体は、古典的な薬学的調製物を含み得る。本発明に従ったこれらの組成物の投与は、標的組織がその経路を介して利用可能である限り、任意の一般的経路を介するものである。これには、経口、経鼻、口腔、直腸、腔内、または局所が含まれる。あるいは、投与は、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内注入によるものであり得る。そのような組成物は、通常、上記で記載される薬学的に許容される組成物として投与される。特に関心対象なのは、直接腫瘍内投与、腫瘍の灌流、あるいは例えば局所的もしくは領域的な血管系もしくはリンパ系における、または切除された腫瘍床における腫瘍への局所的もしくは領域的な投与である。

10

【0196】

活性化化合物は、非経口的にまたは腹腔内にも投与され得る。遊離塩基または薬理学的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散体は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびに油中でも調製され得る。保管および使用についての普通の条件下で、これらの調製物は、微生物の成長を阻止する保存剤を含有する。

20

【0197】

C. 組み合わせ療法

本発明の背景において、本明細書において記載される抗MUC1-C抗体は、化学療法もしくは放射線療法による介入または他の治療と合わせて、同様に用いられ得ることも企図される。特に、抗MUC1-C/ECD抗体と、MUC1細胞質ドメインを標的とするペプチドおよび小分子など、MUC1機能の異なる局面を標的とする他の療法とを組み合わせることも有効であると判明し得る。

30

【0198】

本発明の方法および組成物を用いて、細胞を殺傷する、細胞成長を阻害する、転移を阻害する、血管新生を阻害する、またはそうでなければ腫瘍細胞の悪性表現型を逆転させるもしくは低下させるために、一般的に、「標的」細胞と、本発明に従った抗MUC1-C抗体および少なくとも1種の他の作用物質とを接触させる。これらの組成物は、細胞を殺傷するまたは細胞の増殖を阻害するのに有効な合わせた量で提供される。この過程は、細胞と、本発明に従った抗MUC1-C抗体および他の作用物質または因子とを同時に接触させる工程を伴い得る。これは、細胞と、両方の作用物質を含む単一の組成物もしくは薬理学的製剤とを接触させることによって、または細胞と、一方の組成物は本発明に従った抗MUC1-C抗体を含みかつ他方は他の作用物質を含む、2つの個別の組成物もしくは製剤とを同時に接触させることによって達成され得る。

40

【0199】

あるいは、抗MUC1-C抗体療法は、数分間から数週間に及ぶ間隔で、他の作用物質による治療に先行し得るまたはその後に続き得る。他の作用物質および抗MUC1-C抗体を細胞に個別に適用する態様において、一般的に、作用物質および発現構築物が、依然として細胞に対して有利に組み合わせた効果を発揮し得るであろうように、それぞれの送達の時間の間で大幅な期間が期限切れとならなかったことが保証される。そのような場合には、細胞と両方の様態とを互いの約12~24時間以内に、より好ましくは互いの約6~12時間以内に接触させ、約12時間のみ遅延時間が最も好ましいことが企図される。しかしながら、ある状況では、治療のための期間を大幅に延ばすことが望ましくあり得、それぞれの投与の間

50

に数日間（2、3、4、5、6、または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8）が経過する。

【0200】

抗MUC1抗体または他の作用物質のいずれかの1回を上回る回数の投与が望まれるであろうことも考えられる。下記で例示されるように、本発明に従った抗MUC1-C抗体が「A」でありかつ他の療法が「B」である、様々な組み合わせが採用され得る。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

10

【0201】

他の組み合わせが企図される。再度、細胞殺傷を達成するために、両方の作用物質は、細胞を殺傷するのに有効な合わせた量で細胞に送達される。

【0202】

癌療法に適した作用物質または因子には、細胞に適用した場合にDNA損傷を誘導する任意の化学的化合物または治療方法が含まれる。そのような作用物質および因子には、照射、マイクロ波、電子放散など、DNA損傷を誘導する放射線および波動が含まれる。「化学療法剤」または「遺伝毒性作用物質」としても記載されている多様な化学的化合物が用いられ得る。これは、局在した腫瘍部位を照射することによって達成され得る；あるいは、対象に治療上有効量の薬学的組成物を投与することによって、腫瘍細胞を作用物質と接触させ得る。

20

【0203】

様々なクラスの化学療法剤が、本発明との使用のために企図される。例えば、タモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン（アフイモキシフェン（Afimoxfene））、フェソロデックス（Falsodex）、ラロキシフェン、バゼドキシフェン、クロミフェン、フェマレル（Femarelle）、ラソフォキシフェン、オルメロキシフェン、およびトレミフェンなどの選択的エストロゲン受容体アンタゴニスト（「SERM」）。

【0204】

有用であると企図される化学療法剤には、例えばカンプトテシン、アクチノマイシン-D、マイトマイシン-Cが含まれる。本発明は、シスプラチンとのX線の使用またはエトポシドとのシスプラチンの使用など、放射線に基づくものまたは実際の化合物にかかわらず、1種または複数種のDNA損傷作用物質の組み合わせの使用も包含する。作用物質は、それと上記で記載されるMUC1ペプチドとを組み合わせることによって、組み合わせた治療用組成物としてまたはキットとして調製され得かつ用いられ得る。

30

【0205】

ヒートショックタンパク質90は、多くの真核細胞に見出される調節タンパク質である。HSP90阻害剤は、癌の治療において有用であることが示されている。そのような阻害剤には、ゲルダナマイシン、17-(アリルアミノ)-17-デメトキシゲルダナマイシン、PU-H71、およびリファブチンが含まれる。

【0206】

DNAを直接架橋するまたは付加物を形成する作用物質も想定される。シスプラチンなどの作用物質、および他のDNAアルキル化剤が用いられ得る。シスプラチンは、合計3コースの間、3週間ごとに5日間20mg/m²という、臨床応用において用いられる有効用量で、癌を治療するために広く用いられている。シスプラチンは経口吸収されず、したがって静脈内への、皮下への、腫瘍内への、または腹腔内への注入を介して送達されなければならない。

40

【0207】

DNAに損傷を与える作用物質には、DNA複製、有糸分裂、および染色体分離を妨害する化合物も含まれる。そのような化学療法化合物には、ドキシソルピシンとしても知られるアドリアマイシン、エトポシド、ベラパミル、ポドフィロトキシンなどが含まれる。新生物の

50

治療のための臨床設定において広く用いられる場合、これらの化合物は、ドキソルビシンに関して21日間隔で25~75mg/m²から、エトポシドに関する静脈内への35~50mg/m²に及ぶ用量で静脈内へのボラス注入により、または静脈内用量の2倍で経口的に投与される。タキサンなどの微小管障害剤も企図される。これらの分子は、イチイ (Taxus) 属の植物によって産生されるジテルペンであり、かつそれらには、パクリタキセルおよびドセタキセルが含まれる。

【0208】

イレッサなどの上皮成長因子受容体障害剤、FK506結合タンパク質12-ラパマイシン関連タンパク質1 (FRAP1) としても知られる、ラパマイシンの哺乳類標的であるmTORは、細胞成長、細胞増殖、細胞運動性、細胞生存、タンパク質合成、および転写を調節するセリン/スレオニンタンパク質キナーゼである。したがって、ラパマイシンおよびその類似体 (「ラパログ (rapalog)」) が、本発明に従った癌療法における使用のために企図される。

10

【0209】

別の考え得る療法は、全身性炎症に関与するサイトカインであり、かつ急性期反応を刺激するサイトカインのグループのメンバーであるTNF- α (腫瘍壊死因子- α) である。TNFの主要な役割は、免疫細胞の調節にある。TNFは、また、アポトーシス細胞死を誘導し得、炎症を誘導し得、かつ腫瘍形成およびウイルス複製を阻害し得る。

【0210】

核酸の前駆体およびサブユニットの合成および忠実度を混乱させる作用物質も、DNA損傷につながる。そのようなものとして、いくつかの核酸前駆体が開発されている。特に有用なのは、広範囲にわたる試験を受けておりかつ容易に入手可能である作用物質である。そのようなものとして、5-フルオロウラシル (5-FU) などの作用物質は、新生組織によって優先的に用いられ、新生細胞への標的化にとってこの作用物質を特に有用にしている。かなり有害であるものの、5-FUは、局所性のものを含めた広範なキャリアに適用可能であるが、しかしながら3~15mg/kg/日に及ぶ用量での静脈内投与がよく用いられている。

20

【0211】

DNA損傷を引き起こしかつ広範囲にわたって用いられている他の因子には、 γ 線、x線として一般に知られているもの、および/または腫瘍細胞へのラジオアイソトープの指向性送達が含まれる。マイクロ波およびUV照射など、他の形態のDNA損傷因子も企図される。これらの因子のすべては、DNAの前駆体、DNAの複製および修復、ならびに染色体の会合および維持に対して広範な損傷DNAをもたらす可能性が最も高い。x線に関する投与量範囲は、長期的期間 (3~4週間) にわたる50~200レントゲンの1日線量から、2000~6000レントゲンの単回線量に及ぶ。ラジオアイソトープに関する投与量範囲は幅広く変動し、かつ同位体の半減期、放散される放射線の強度およびタイプ、ならびに新生細胞による取り込みに依存する。

30

【0212】

加えて、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、および外科手術が用いられ得ることも企図される。特に、アバスチン、アービタックス、グリベック、ハーセプチン、およびリツキサンなどの標的療法を採用し得る。

40

【0213】

組み合わせ療法への特に有利な一手法は、MUC1を標的とする第二の作用物質を選択することである。本発明者らによって申請された同時係属中の出願において、少なくとも4個の連続したMUC1残基かつ多くて20個の連続したMUC1残基でありかつCQC配列を含むMUC1ペプチドであって、CQCのアミノ末端システインはそのNH₂末端上で、天然MUC-1膜貫通配列に対応する必要はない少なくとも1個のアミノ酸残基によって覆われているMUC1ペプチドを対象に投与する工程を含む、対象におけるMUC1陽性腫瘍細胞を阻害する方法が開示されている。該ペプチドは、少なくとも5個の連続したMUC1残基、少なくとも6個の連続したMUC1残基、少なくとも7個の連続したMUC1残基、少なくとも8個の連続したMUC1残基を含み得、かつ該配列は、より具体的には、

50

CQCR (配列番号: XX), CQCRR (配列番号: XX),

CQCRRR (配列番号: XX), CQCRRRR (配列番号: XX), CQCRRK (配列番号: XX),

CQCRRKN (配列番号: XX), または RRRRRRRRCQCRRKN (配列番号: XX)

を含み得る。該ペプチドは、MUC1の多くて10個の連続した残基、11個の連続した残基、12個の連続した残基、13個の連続した残基、14個の連続した残基、15個の連続した残基、16個の連続した残基、17個の連続した残基、18個の連続した残基、または19個の連続した残基を含有し得る。該ペプチドは、ポリ-D-R、ポリ-D-P、またはポリ-D-Kなどの細胞送達ドメインに融合され得る。該ペプチドは、すべてのLアミノ酸、すべてのDアミノ酸、またはLおよびDアミノ酸の混合を含み得る。米国特許第8,524,669号を参照されたい。

10

【0214】

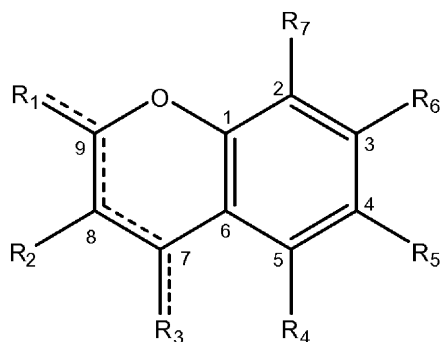
この技術に関するバリエーションが、米国特許出願第13/026,858号に記載されている。その出願では、少なくとも4個の連続したMUC1残基かつ多くて20個の連続したMUC1残基でありかつCQC配列を含むMUC1ペプチドであって、(i) CQCのアミノ末端システインはそのH₂末端上で、天然MUC1膜貫通配列に対応する必要はない少なくとも1個のアミノ酸残基によって覆われており；かつ(ii) 該ペプチドは、天然MUC1残基に対応するそれらの正に帯電したアミノ酸残基に加えて、3〜5個の連続した正に帯電したアミノ酸残基を含む、MUC1ペプチドと細胞とを接触させる工程を含む、MUC1陽性癌細胞を阻害する方法が開示されている。MUC1陽性細胞は、肺癌細胞、脳腫瘍細胞、頭頸部癌細胞、乳癌細胞、皮膚癌細胞、肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、胃癌細胞、結腸癌細胞、直腸癌細胞、子宮癌細胞、子宮頸癌細胞、卵巣癌細胞、精巣癌細胞、皮膚癌細胞、または食道癌細胞などの固形腫瘍細胞であり得る。MUC1陽性細胞は、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、または多発性骨髄腫などの白血病または骨髄腫の細胞であり得る。該ペプチドは、ステープルドペプチド、環化ペプチド、ペプチド模倣体、またはペプトイドであり得る。該方法は、第二の抗癌剤を該ペプチドの前に、該ペプチドの後に、または該ペプチドと同時に接触させるなど、細胞と第二の抗癌剤とを接触させる工程をさらに含み得る。阻害することには、癌細胞成長、癌細胞増殖を阻害すること、またはアポトーシスなどによって癌細胞死を誘導することが含まれ得る。

20

【0215】

本発明者らによって進歩した別の技術（米国特許出願第13/045,033号を参照されたい）は、細胞と

30



40

の構造を有するフラボンまたはその塩とを接触させる工程を含む、細胞における炎症性シグナル伝達を阻害する方法を伴い、式中、

R₁およびR₃は両方とも=Oではあり得ないという条件付きで、

R₁は、H、-OH、=O、置換されているまたは置換されていないアルキル (C₁~₈)、アルコキシ (C₁~₈)、ハロアルキル (C₁~₈)、置換されているフェニルまたは置換されていないフェニルであり、R₁が=Oである場合、C₇-C₈は二重結合であり；

R₂は、H、-OH、アルキル (C₁~₈)、置換されているフェニル、置換されていないフェニル、フェニル、フェニルチアゾール、イミダゾール、ピラゾール、またはフランであり；

R₃は、H、-OH、=O、ハロゲン、ハロアルキル (C₁~₈)、置換されているまたは置換されていないアルキル (C₁~₈)、置換されているフェニルまたは置換されていないフェニ

50

ルであり、 R_3 が=Oである場合、 C_8-C_9 は二重結合であり；

R_4 は、Hまたは-OHであり；

R_5 は、H、-OH、置換されているもしくは置換されていないアルキル ($C_1 \sim 8$) もしくはアルコキシ ($C_1 \sim 8$)、または R_8 がアルキル ($C_1 \sim 8$)、エステル、もしくはアミドである OR_8 であり；

R_6 は、H、-OH、置換されているもしくは置換されていないアルキル ($C_1 \sim 8$) もしくはアルコキシ ($C_1 \sim 8$)、または R_8 がアルキル ($C_1 \sim 8$)、エステル、もしくはアミドである OR_8 であり；かつ

R_7 は、H、-OH、または置換されているもしくは置換されていないアルキル ($C_1 \sim 8$) である。

10

【0216】

R_1 は、=Oであり得る。 R_3 は、=Oであり得る。フラボン、モリン、アピゲニン、ケンフェロール、フィセチン、PD98059、7-(ベンジルオキシ)-4-(トリフルオロメチル)-2H-クロメン-2-オン、もしくは7-[(3-オキソブタン-2-イル)オキシ]-4-フェニル-2H-クロメン-2-オン、または前述のもののいずれかの塩である。

【0217】

当業者であれば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第15編、第33章、特に624~652ページに方向づけられる。投与量のいくらかの変動は、治療を受けている対象の条件に応じて必然的に生じるであろう。いかなる場合でも、投与に対して責任がある人が、個々の対象に対する適当な用量を決定する。さらに、ヒト投与に関しては、調製物は、FDA生物製剤部 (Office of Biologics) の規準によって要求される、無菌性、発熱原性、全般的安全性、および純度の規準を満たすべきである。

20

【0218】

IV. 抗体抱合体

抗体を少なくとも1種の作用物質に連結して、抗体抱合体を形成し得る。診断用または治療用作用物質としての抗体分子の有効性を増加させるために、少なくとも1種の所望の分子または成分を連結させるまたは共有結合させるまたは複合させることが従来のである。そのような分子または成分は、少なくとも1種のエフェクターまたはレポーター分子であり得るが、それらに限定されるわけではない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば免疫抑制/抗炎症を有する分子を含む。そのような分子の非限定的な例は、上記で示されている。そのような分子は、任意で、該分子が標的部位においてまたはその付近で放出されるのを可能にするように設計された切断可能なリンカーを介して付着される。

30

【0219】

対照的に、レポーター分子は、アッセイを用いて検出され得る任意の成分として定義される。抗体に抱合されているレポーター分子の非限定的な例には、ビオチンなど、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光性分子、化学発光分子、発色団、光親和性分子、着色粒子、またはリガンドが含まれる。

【0220】

抗体抱合体は、一般的に診断用作用物質としての使用に好ましい。抗体診断法は、一般的に、多様な免疫アッセイにおいてなど、インビトロ診断における使用のためのもの、および「抗体指向性イメージング」として一般的に知られる、インビボ診断プロトコールにおける使用のためのもの、という2つのクラスに分けられる。抗体へのそれらの付着のための方法がそうであるように、多くの適当なイメージング用作用物質が当技術分野において公知である (例えば、米国特許第5,021,236号、第4,938,948号、および第4,472,509号を参照されたい)。用いられるイメージング用成分は、常磁性イオン、放射性同位体、蛍光色素、NMRにより検出可能な物質、およびX線イメージング用作用物質であり得る。

40

【0221】

常磁性イオンの場合、例として、クロミウム (III)、マンガン (II)、鉄 (III)、鉄 (II)、コバルト (II)、ニッケル (II)、銅 (II)、ネオジム (III)、サマリウム (II)、イットルビウム (III)、ガドリニウム (III)、バナジウム (II)、テルビウム (

50

III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)、および/またはエルビウム(III)などのイオンを挙げ得、ガドリニウムが特に好ましい。X線イメージングなど、他の背景において有用であるイオンには、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、およびとりわけビスマス(III)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0222】

治療的および/または診断的適用のための放射性同位体の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロミウム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレン、³⁵硫黄、テクネチウム(technetium)^{99m}、および/またはイットリウム⁹⁰を挙げ得る。¹²⁵Iは、ある特定の態様における使用にしばしば好ましく、かつテクネチウム^{99m}および/またはインジウム¹¹¹も、それらの低いエネルギーおよび長期にわたる検出に対する適切性が理由でしばしば好ましい。放射活性により標識されたモノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法に従って産生され得る。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/もしくはヨウ化カリウム、ならびに次亜塩素酸ナトリウムなどの化学的酸化剤またはラクトペルオキシダーゼなどの酵素的酸化剤との接触によってヨウ素化され得る。モノクローナル抗体は、配位子交換過程によって、例えばパーテクネート(pertechnate)をスズ溶液で還元し、還元されたテクネチウムをSephadexカラムにキレートし、かつこのカラムに抗体を適用することによって、テクネチウム^{99m}で標識され得る。あるいは、例えばパーテクネート、 SnCl_2 などの還元剤、フタル酸ナトリウム-カリウム溶液などのバッファー溶液、および抗体をインキュベートすることによる、直接標識技法が用いられ得る。中間官能基は、抗体にラジオアイソトープを結合させるためにしばしば用いられ、かつ金属イオンとして存在し、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)またはエチレンジアミン四酢酸(diaminetetracetic acid)(EDTA)である。

【0223】

抱合体としての使用のために企図される蛍光標識の中には、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、レノグラフィン(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはTexas Redが含まれる。

【0224】

企図される別のタイプの抗体抱合体は、抗体が二次的結合リガンドに、および/または発色性基質との接触があると着色産物を生成すると考えられる酵素(酵素タグ)に連結されている、主としてインビトロでの使用を意図されるものである。適切な酵素の例には、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(ホースラディッシュ)ペルオキシダーゼ(hydrogen peroxidase)、またはグルコースオキシダーゼが含まれる。好ましい二次的結合リガンドは、ビオチンおよびアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。そのような標識の使用は当業者に周知であり、かつ例えば米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、および第4,366,241号に記載されている。

【0225】

抗体への分子の部位特異的付着についてのさらに別の公知の方法は、抗体と、ハプテンに基づくアフィニティー標識との反応を含む。本質的に、ハプテンに基づくアフィニティー標識は、抗原結合部位におけるアミノ酸と反応し、それによってこの部位を破壊し、かつ特異的抗原反応を遮断する。しかしながら、それは、抗体抱合体による抗原結合の喪失をもたらすため、これは有利であり得るわけではない。

【0226】

アジド基を含有する分子を用いても、低強度の紫外線光によって生成される反応性ナイトレン中間体を介した、タンパク質への共有結合を形成し得る(Potter and Haley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジド類似体は、粗細胞抽出物中のヌクレオ

10

20

30

40

50

チド結合タンパク質を同定するための部位指向性光プローブとして用いられている (Owens & Haley, 1987; Atherton et al., 1985)。2-および8-アジドヌクレオチドは、精製されたタンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも用いられており (Khatoon et al., 1989; King et al., 1989; Dholakia et al., 1989)、かつ抗体結合作用物質として用いられ得る。

【0227】

抗体のその抱合成分への付着または抱合のためのいくつかの方法が、当技術分野において公知である。一部の付着法は、抗体に付着した、例えばジエチレントリアミン五酢酸無水物 (DTPA) ; エチレントリアミン四酢酸 ; N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド ; および/またはテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコウリル (diphenylglycouril) -3のよう

10

のような有機キレート剤を採用した金属キレート複合体の使用を伴う (米国特許第4,472,509号および第4,938,948号)。モノクローナル抗体は、グルタルアルデヒドまたはペリオデートなどの共役剤の存在下で、酵素とも反応し得る。フルオレセインマーカ-との抱合体は、これらの共役剤の存在下でまたはイソチオシアネートとの反応によって調製される。米国特許第4,938,948号において、乳房腫瘍のイメージングはモノクローナル抗体を用いて達成されており、かつ検出可能なイメージング用成分は、メチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオネートなどのリンカーを用いて抗体に結合されている。

【0228】

他の態様において、抗体結合 (combining) 部位を変更しない反応条件を用いて、免疫グロブリンのFc領域においてスルフヒドリル基を選択的に導入することによる、免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法論に従って産生された抗体抱合体は、向上した寿命、特異性、および感度を呈することが開示されている (参照により本明細書において組み入れられる米国特許第5,196,066号)。レポーターまたはエフェクター分子が、Fc領域における炭水化物残基に抱合されている、エフェクターまたはレポーター分子の部位特異的付着も文献において開示されている (O'Shannessy et al., 1987)。この手法は、診断上および治療上有望な抗体を産生することが報告されており、それは、現在臨床評価中である。

20

【0229】

V. 免疫検出法

なおさらなる態様において、MUC1およびその関連抗原に結合する、それらを精製する、取り出す、定量化する、およびそうでなければ一般的に検出するための免疫検出法が存在する。一部の免疫検出法には、少し挙げるだけでも、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 、放射免疫アッセイ (RIA) 、免疫放射定量アッセイ、蛍光免疫アッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウェスタンブロットが含まれる。特に、MUC1-C抗体の検出および定量的ための競合アッセイも提供される。様々な有用な免疫検出法の工程は、例えばDoolittle and Ben-Zeev (1999)、Gulbis and Galand (1993)、De Jager et al. (1993)、およびNakamura et al. (1987)などの科学的文献に記載されている。一般的に、免疫結合法は、サンプルを獲得する工程、およびサンプルと本明細書において記述される態様に従った第一の抗体とを、場合によっては免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で、接触させる工程を含む。

30

40

【0230】

免疫複合体 (一次免疫複合体) の形成を可能にするのに有効な条件下でかつ十分な期間、選出された生物学的サンプルと抗体とを接触させるとは、一般的に、抗体組成物をサンプルに単に添加し、かつ抗体が、存在しているMUC1と免疫複合体を形成するのに、すなわち存在しているMUC1に結合するのに十分長い期間、混合物をインキュベートするということである。この時間の後、一般的に、組織切片、ELISAプレート、ドットブロット、またはウェスタンブロットなどのサンプル-抗体組成物を洗浄して、任意の非特異的に結合した抗体種を取り除き、一次免疫複体内に特異的に結合しているそうした抗体のみが検出されるのを可能にする。

50

【0231】

一般的に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、かつ数々の手法の適用を通じて達成され得る。これらの方法は、一般的に、それらの放射性タグ、蛍光性タグ、生物学的タグ、および酵素的タグのうちのいずれかなど、標識またはマーカの検出に基づく。そのような標識の使用に関する特許には、米国特許第3,817,837号、第3,850,752号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、および第4,366,241号が含まれる。当然、当技術分野において公知であるように、第二の抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合編成など、二次的結合リガンドの使用を通じてさらなる利点を見出し得る。

【0232】

検出において採用される抗体それ自体を、検出可能な標識に連結し得、次いでこの標識を単に検出し、それによって組成物中の一次免疫複合体の量が判定されるのを可能にする。あるいは、一次免疫複体内に結合されることになる第一の抗体は、該抗体に対する結合アフィニティーを有する第二の結合リガンドによって検出され得る。これらの場合、第二の結合リガンドは、検出可能な標識に連結され得る。第二の結合リガンドそれ自体がしばしば抗体であり、ゆえにそれは「二次」抗体と称され得る。二次免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下でかつ十分な期間、一次免疫複合体と、標識された二次的結合リガンドとを接触させる。一般的に、次いで二次免疫複合体を洗浄して、任意の非特異的に結合した標識された二次抗体またはリガンドを取り除き、次いで、二次免疫複合体における残りの標識を検出する。

【0233】

さらなる方法には、2工程手法による一次免疫複合体の検出が含まれる。抗体に対する結合アフィニティーを有する抗体など、第二の結合リガンドを用いて、上記で記載されるように二次免疫複合体を形成する。洗浄後、再度免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件下でかつ十分な期間、二次免疫複合体と、第二の抗体に対する結合アフィニティーを有する第三の結合リガンドまたは抗体とを接触させる。第三のリガンドまたは抗体は検出可能な標識に連結されており、ゆえに、形成された三次免疫複合体の検出が可能となる。このシステムは、これが所望される場合にはシグナル増幅を提供し得る。

【0234】

免疫検出の一方法は、2種の異なる抗体を用いる。第一のビオチン化抗体を用いて、標的抗原を検出し、次いで第二の抗体を用いて、複合したビオチンに付着したビオチンを検出する。その方法では、まず、試験される対象となるサンプルを、第一工程の抗体を含有する溶液中でインキュベートする。標的抗原が存在している場合、抗体の一部は抗原に結合して、ビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次いで、各工程が抗体/抗原複合体にさらなるビオチン部位を付加する、ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチン化DNA、および/または相補的ビオチン化DNAの一連の溶液中におけるインキュベーションによって、抗体/抗原複合体を増幅する。適切なレベルの増幅が達成されるまで増幅工程を繰り返し、その時点で、ビオチンに対する第二工程の抗体を含有する溶液中でサンプルをインキュベートする。例えば、発色性基質を用いた組織酵素学によって抗体/抗原複合体の存在を検出するために用いられ得る酵素と同様に、この第二工程の抗体を標識する。適切な増幅とともに、肉眼で見える抱合体が産生され得る。

【0235】

免疫検出の別の公知の方法は、免疫PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）方法論の利点を生かす。PCR法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションに至るまでCantor法と同様であり、しかしながら、多数回のストレプトアビジンおよびビオチン化DNAのインキュベーションを用いる代わりに、DNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体を、該抗体を放出する低pHまたは高塩のバッファーで洗い流す。次いで、結果として生じる洗浄液を用いて、適当な対照とともに、適切なプライマーを用いたPCR反応を行う。少なくとも理論上は、PCRの膨大な増幅能および特異性を利用して、単一抗原分子を検出することができる。

【0236】

A. ELISA

免疫アッセイとは、それらの最も単純な意味において、結合アッセイである。ある特定の好ましい免疫アッセイは、当技術分野において公知の、様々なタイプの酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）および放射免疫アッセイ（RIA）である。組織切片を用いた免疫組織化学的検出も特に有用である。しかしながら、検出はそのような技法に限定されるわけではなく、ウェスタンブロットティング、ドットブロットティング、FACS解析なども用いられ得ることが容易に解されるであろう。

【0237】

1つの例示的なELISAでは、本発明の抗体を、ポリスチレン製マイクロタイタープレート中のウェルなど、タンパク質アフィニティーを呈する選択された表面上に固定化する。次いで、MUC1を含有することが疑われる試験組成物をウェルに添加する。結合させかつ洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を取り除いた後、結合している抗原が検出され得る。検出は、検出可能な標識に連結されている別の抗MUC1-C抗体の添加によって達成され得る。このタイプのELISAは、単純な「サンドイッチELISA」である。検出は、第二の抗MUC1-C抗体の添加、それに続く、該第二の抗体に対する結合アフィニティーを有する第三の抗体の添加によっても達成され得、該第三の抗体は検出可能な標識に連結されている。

10

【0238】

別の例示的なELISAでは、MUC1抗原を含有することが疑われるサンプルをウェル表面に固定化し、次いで抗MUC1-C抗体と接触させる。結合させかつ洗浄して、非特異的に結合した免疫複合体を取り除いた後、結合している抗MUC1-C抗体が検出される。当初の抗MUC1-C抗体が検出可能な標識に連結されている場合、免疫複合体は直接検出され得る。再度、免疫複合体は、第一の抗MUC1-C抗体に対する結合アフィニティーを有する第二の抗体を用いて検出され得、該第二の抗体は検出可能な標識に連結されている。

20

【0239】

採用される形式に関係なく、ELISAは、コーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的に結合した種を取り除く洗浄、ならびに結合している免疫複合体の検出など、ある特定の特質を共通して有する。これらは下記で記載される。

【0240】

プレートに抗原または抗体のいずれかをコーティングすることにおいて、一般的に、プレートのウェルを、抗原または抗体の溶液とともに一晩または指定の時間インキュベートする。次いで、プレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着した材料を取り除く。次いで、任意の残りの利用可能なウェルの表面を、試験抗血清に関して抗原的に中性である非特異的なタンパク質で「コーティング」する。これらには、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼイン、または粉ミルクの溶液が含まれる。コーティングは、固定化表面上の非特異的吸着部位のブロッキングを可能にし、ゆえに該表面への抗血清の非特異的結合によって引き起こされるバックグラウンドを低下させる。

30

【0241】

ELISAでは、直接的な手順よりもむしろ、二次的または三次的な検出手段を用いることがおそらくより慣習的である。ゆえに、ウェルへのタンパク質または抗体の結合後、非反応性材料でコーティングしてバックグラウンドを低下させ、かつ洗浄して結合していない材料を取り除き、免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするのに有効な条件下で、固定化表面と試験される対象となる生物学的サンプルとを接触させる。次いで、免疫複合体の検出は、標識された二次的結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または第三の結合リガンドと併用した二次的結合リガンドまたは抗体を要する。

40

【0242】

「免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能にするのに有効な条件下」とは、該条件が、好ましくは、抗原および/または抗体を、BSA、ウシγグロブリン（BGG）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）/Tweenなどの溶液で希釈する工程を含むことを意味する。これらの添加された作用物質も、非特異的バックグラウンドの低下を助ける傾向がある。

50

【0243】

「適切な」条件は、インキュベーションが、有効な結合を可能にするのに十分な温度におけるまたは十分な期間のものであることも意味する。インキュベーション工程は、典型的に、好ましくは25℃～27℃のオーダーにある温度で約1～2時間から4時間ほどである、または約4℃ほどで一晩であり得る。

【0244】

ELISAにおけるすべてのインキュベーション工程の後、接触させた表面を洗浄して、複合していない材料を取り除く。好ましい洗浄手順には、PBS/Tweenまたはホウ酸塩バッファなどの溶液を用いた洗浄が含まれる。試験サンプルと、もともと結合している材料との間の特異的免疫複合体の形成、およびそれに続く洗浄の後、たとえ微量の免疫複合体の発生率でさえ判定され得る。

10

【0245】

検出手段を提供するために、第二または第三の抗体は、検出を可能にする関連付けされた標識を有する。好ましくは、これは、適当な発色性基質とインキュベートすると色の発生をもたらすと考えられる酵素である。ゆえに、例えば、さらなる免疫複合体形成の発生を支援する期間かつ条件下で（例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中にて室温で2時間のインキュベーション）、第一および第二の免疫複合体と、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはペルオキシダーゼ抱合型抗体とを接触させるまたはインキュベートすることが望まれるであろう。

【0246】

20

標識された抗体とのインキュベーションの後、かつ結合していない材料を取り除く洗浄の後で、標識の量は、例えば尿素、またはブロモクレゾールパープル、または2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンゾチアゾリン (benzthiazoline) -6-スルホン酸 (ABTS)、または酵素標識としてペルオキシダーゼの場合にはH₂O₂など、発色性基質とのインキュベーションによって定量化される。次いで、定量化は、例えば可視スペクトル分光光度計を用いて、生成された色の程度を測定することによって達成される。

【0247】

B. ウェスタンブロット

ウェスタンブロット（あるいは、タンパク質免疫ブロット）とは、組織のホモジネートまたは抽出物の所与のサンプルにおける特異的タンパク質を検出するために用いられる分析技法である。それは、ゲル電気泳動を用いて、ポリペプチドの長さによって（変性条件）、またはタンパク質の3-D構造によって（天然/非変性条件）、天然のまたは変性したタンパク質を分離する。次いで、タンパク質を膜（典型的には、ニトロセルロースまたはPVDF）に転写し、そこでそれらを、標的タンパク質に特異的な抗体を用いてプローブする（検出する）。

30

【0248】

サンプルは、組織全体からまたは細胞培養物から採取され得る。ほとんどの場合、固形組織は、まず、ミキサーを用いて（より大きなサンプル容積に対して）、ホモジナイザーを用いて（より小さな容積）、または超音波処理によって機械的に碎かれる。細胞も、上記の機械的方法のうちの1つによって破碎され得る。しかしながら、細菌、ウイルス、または環境サンプルはタンパク質の供給源であり得、ゆえにウェスタンブロッティングは、細胞研究のみに限られるわけではないことに留意すべきである。いろいろな界面活性剤、塩、およびバッファを採用して、細胞の溶解を助長し得かつタンパク質を可溶化し得る。プロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤をしばしば添加して、それ自身の酵素によるサンプルの消化を阻止する。組織の調製をしばしば低温で行って、タンパク質が変性するのを回避する。

40

【0249】

サンプルのタンパク質は、ゲル電気泳動を用いて分離される。タンパク質の分離は、等電点 (pI)、分子量、電荷、またはこれらの因子の組み合わせによるものであり得る。分離の性質は、サンプルの処理およびゲルの性質に依存する。これは、タンパク質を判定す

50

る非常に有用な方式である。単一サンプル由来のタンパク質を二次元に広げる二次元（2-D）ゲルを用いることも可能である。タンパク質は、第一の次元で等電点（それらが中性の正味電荷を有するpH）に従って、かつ第二の次元でそれらの分子量に従って分離される。

【0250】

タンパク質を抗体検出に利用しやすくするために、それらを、ゲル内から、ニトロセルロースまたはポリビニリデンジフルオリド（PVDF）から作製された膜へ移す。この膜をゲルの上面に置き、かつ積み重ねたろ紙をその上面に置く。積み重ねたものの全体をバッファー溶液中に置き、それは毛細管作用によって紙を上り、タンパク質をそれと一緒にする。タンパク質を転写するための別の方法はエレクトロブロットティングと称され、電流を用いて、ゲルからPVDFまたはニトロセルロース膜へタンパク質を引き抜く。タンパク質は、それらがゲル内で有した組織を維持しつつ、ゲル内から膜上へ動く。このブロットティング過程の結果として、タンパク質は、検出のための薄い表層上でむき出しになる（下記を参照されたい）。それらの非特異的タンパク質結合特性のために（すなわち、すべてのタンパク質に同様に等しく結合する）、両方の品種の膜が選出される。タンパク質結合は、疎水性相互作用、ならびに膜とタンパク質との間の電荷相互作用に基づく。ニトロセルロース膜はPVDFよりも安い、はるかによりもろく、繰り返しのプローブに十分に耐えるわけではない。ゲルから膜へのタンパク質の転写の均一性および全体的有効性は、膜をクマシーブリリアントブルーまたはボンソーS色素で染色することによってチェックされ得る。いったん転写されると、標識一次抗体、または一次抗体のFc領域に結合する標識プロテインAもしくは標識二次抗体を用いた間接的検出が後に続く非標識一次抗体を用いて、タンパク質を検出する。

【0251】

C. 免疫組織化学

抗体は、また、免疫組織化学（IHC）による調査のために調製される、新鮮凍結した組織ブロックおよび/またはホルマリン固定しパラフィン包埋した組織ブロックの両方と合わせて用いられ得る。これらの微粒子標本から組織ブロックを調製する方法は、様々な診断因子についての以前のIHC調査において上手く用いられており、かつ当業者に周知である（Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990）。

【0252】

簡潔には、50ngの凍結した「粉碎」組織を、小さなプラスチックカプセル中でリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中にて室温で再水和し；粒子を遠心分離によってペレット形成し；粘性のある包埋溶剤（OCT）中にそれらを再懸濁し；カプセルを反転させかつ/もしくは遠心分離によって再度ペレット形成し；-70℃のイソペンタン中で瞬間凍結し；プラスチックカプセルをカットしかつ/もしくは凍結した組織の円柱を取り出し；クリオスタットミクロトームチャック上に組織円柱を取り付け；そして/またはカプセルから25～50枚の連続切片をカットすることによって、凍結切片を調製し得る。あるいは、凍結組織サンプル全体が、連続切片カットに用いられ得る。

【0253】

プラスチック製微量遠心チューブ中での50mgのサンプルの再水和；ペレット形成；10%ホルマリン中に4時間再懸濁して固定；洗浄/ペレット形成；温かい2.5%寒天中に再懸濁；ペレット形成；氷水中で冷却して寒天を硬化する；組織/寒天ブロックをチューブから取り出す；パラフィン中にブロックを浸潤させかつ/もしくは包埋する；そして/または最高50枚の連続永久切片をカットすることを伴う同様の方法によって、永久切片を調製し得る。再度、組織サンプル全体が代用され得る。

【0254】

D. 免疫検出キット

なおさらなる態様において、上記で記載される免疫検出法との使用のための免疫検出キットが存在する。ゆえに、免疫検出キットは、適切な容器手段中に、MUC1抗原に結合する第一の抗体、および任意で、免疫検出試薬を含む。

【0255】

ある特定の態様において、MUC1-C抗体は、カラムマトリックスおよび/またはマイクロタイタープレートのウェルなど、固体支持体にあらかじめ結合され得る。キットの免疫検出試薬は、所定の抗体と関連付けられたまたは連結したそうした検出可能な標識を含めた、多様な形態のうちのいずれか1つを取り得る。二次的結合リガンドと関連付けられたまたはそれに付着した検出可能な標識も企図される。例示的な二次的リガンドは、第一の抗体に対する結合アフィニティーを有するそうした二次抗体である。

【0256】

本キットにおける使用のためのさらなる適切な免疫検出試薬には、第一の抗体に対する結合アフィニティーを有する二次抗体、それとともに、第二の抗体に対する結合アフィニティーを有する第三の抗体を含む2構成要素試薬が含まれ、該第三の抗体は検出可能な標識に連結されている。上記で述べられるように、多数の例示的な標識が当技術分野において公知であり、かつそのようなすべての標識は、本明細書において記述される態様に関連して採用され得る。

10

【0257】

キットは、検出アッセイのための標準曲線を準備するために用いられ得る、標識されているまたは標識されていないにかかわらず、MUC1抗原の適切に等分された組成物をさらに含み得る。キットは、完全に抱合した形態の、中間体の形態の、またはキットのユーザーによって抱合される対象となる別個の成分としてのいずれかの抗体-標識抱合体を含有し得る。キットの構成要素は、水性媒体状または凍結乾燥形態のいずれかでパッケージされ得る。

20

【0258】

キットの容器手段には、一般的に、その中に抗体が置かれ得る、または好ましくは適切に等分され得る、少なくとも1種のバイアル、試験管、フラスコ、瓶、シリンジ、または他の容器手段が含まれる。キットは、商業的販売のために密に閉じ込めた状態で抗体、抗原、および他の任意の試薬容器を含有するための手段も含む。そのような容器には、その中に所望のバイアルが保持される、射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器が含まれ得る。

【実施例】

【0259】

30

VI. 実施例

以下の実施例は、好ましい態様を実証するために含まれる。後に続く実施例において開示される技法は、態様の実践において上手く機能することが本発明者らによって発見された技法に相当し、ゆえにその実践のための好ましい様態をなすと見なされ得ることが、当業者によって解されるべきである。しかしながら、当業者であれば、本開示に照らして、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、多くの変化が、開示されている具体的な態様においてもたらされ得、かつ依然として類似したまたは同様の結果を獲得し得ることを解するべきである。

【0260】

実施例1ー抗体産生およびスクリーニング法

40

免疫付与および免疫血清の試験

C57B1/6マウスに、マウス免疫グロブリンのFc部分に融合したMUC1-CのECDを含有するタンパク質（MUC1-C/ECD-mFc）を免疫付与した。2匹のマウスに、フロイント完全アジュバント（FCA）と混合した100 μ gのMUC1-C/ECD-mFcを、かつ3日後に、100 μ gのPBS中MUC1-C/ECD-mFcを免疫付与した。表6に示されるように、50 μ gのFCA中MUC1-C/ECD-mFcを50 μ gのPBS中MUC1-C/ECD-mFcと交互に、3日間ごとに8回、マウスに繰り返してブーストした。最後のブーストは、免疫血清をチェックした後、静脈内に50 μ gの抗原を用いて実施された。陰性対照として用いられる対象となる免疫前血清を収集した。スケジュールどおりに7回目の注入後に免疫血清を収集し、かつ下記で記載される方法どおりに、血清をウェスタンブロッティングおよびELISAの両方によって試験した。

50

【0261】

ELISA

1 µg/mlのMUC1-C/ECD-hFcまたはMUC1-C/ECD-mFcまたはhFc（陰性対照として）100 µlをプレートにコーティングすることによって、ELISAを実施した。ハイブリドーマ上清または免疫血清を、プレートとともに1時間インキュベートすることによって、コーティングされたタンパク質に対してスクリーニングした。HRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）に抱合した特異的二次抗体（抗マウスIg、F(ab)₂特異的）とともにインキュベートすることによって、結合している抗体を検出した。さらに、HRP特異的基質を用いて反応を30分間生じさせ、かつプレートを405nmで読み取った。

【0262】

ウェスタンブロッティング

細胞溶解物全体を用いたウェスタンブロッティングにおける抗体の性能を下記のとおり実施した。ZR-75-1乳癌腫、MCF-7乳癌腫、H441非小細胞肺癌腫、および293T細胞由来の細胞溶解物全体をSDS-PAGEに供し、かつニトロセルロース膜に転写した。精製されたモノクローナル抗体を膜とともにインキュベートし、かつHRP抱合型ヤギ抗マウスIg、F(ab)₂特異的（1:5000希釈；GE Healthcare）、それに続く増強された化学発光（GE Healthcare）を用いて、抗原に結合している抗体を検出した。

【0263】

（表6）免疫付与のスケジュールおよび詳細

マウス系統: スイス-ウェブスター、C57B1/6 齢: 6週齢 性別: 雌 N=2			
日付	用量/動物	アジュバント	注釈
0日目	100 µg	完全	4/26/10に免疫付与前採血 #1-N、#2-N(黒色)
3日目	100 µg	PBS	
5日目	50 µg	不完全	
7日目	50 µg	PBS	4回目の注入
10日目	50 µg	不完全	5回目の注入
12日目	50 µg	PBS	6回目の注入
14日目	50 µg	不完全	7回目の注入
17日目	50 µg	PBS	採血
17日目			8回目の注入
31日目	100 µg	不完全	1回目の追加注入i. p.

【0264】

ハイブリドーマのための融合および一次スクリーニング

ELISAから得られた結果に基づき、両方のマウス由来の脾臓を骨髓腫細胞との融合に用いて、ハイブリドーマを作出した。ポリエチレングリコール（PEG）の存在下で、マウス骨髓腫細胞sp2/0-Ag14と脾細胞とを1:3比で混合することによって、脾臓-骨髓腫融合を実施した。融合後の細胞培養を、選択HAT培地中で行った。ハイブリドーマを、組換えMUC-C/ECD-mFcまたはMUC1-C/ECD-hFcを抗原として用いた間接的ELISAまたはウェスタンブロットによって選択し、かつクローンが安定するまで、限界希釈プロトコールによるサブクロ

ーニングに供した。マウス1の脾臓から得られた融合クローンを315.1クローンと称し、かつ同様にマウス2由来のものを315.2クローンと称する。他の免疫付与バッチ由来のマウス1の脾臓から得られた融合クローンを384クローンと称する。315.2クローンから、7個の親陽性クローン（3G1、3H7、4A11、4H3、5A4、8E1、および8F1）が同定された。マウス315.1から、6個の親陽性クローン（1A4、1G4、2A6、6D12、6A6、5G6）が選択された。マウス384から、2個の親陽性クローン（2G11、2H11）が選択された。これらのクローンをELISAによって再確認し、かつスクリーニングの間、本発明者らは、hFcタンパク質のみに反応性を示す任意のクローンを排除した、というのも、マウスにMUC1-C/ECD-hFcを抗原として免疫付与したためである。

【0265】

10

二次スクリーニング

選択された親クローンを、96ウェルプレートでの限界希釈によるサブクローニングに供し、かつこれらのウェルからの上清をELISAによるさらなるスクリーニングに供した。より高い吸光度値を有するサブクローンをより大きなウェルで拡張させ、かつ上清をELISAによる確認のために選択した。この段階で、各親クローンから最大3個のサブクローンを選出した。これらの選択されたサブクローンを、MUC1-C/ECDタンパク質にのみ反応性を示すが、hFcタンパク質にはそうでないことを確認した。315.1および315.2マウスからの選択されたサブクローン：

315.1クローン	315.2クローン
315.1.2A6.E7	315.2.8E1.F7
315.1.2A6.H5	315.2.8F1.B5
315.1.2A6.H6	315.2.8F1.D2
315.1.6A6.A3	315.2.8F1.F12
315.1.6A6.C8	
315.1.6A6.C11	
315.1.6D12.H3	
315.1.6D12.G6	
315.1.6D12.H10	

20

30

【0266】

哺乳類mFc-MUC1-C/ECDを免疫付与されたマウス384は、2個のさらなるクローン2G11および2H11をもたらした（図29）。これらのクローンは、ウェスタンブロット解析において、細菌により産生されたMUC1-C/ECDタンパク質と陽性反応を示した（図30）。それゆえ、これらのクローンの特徴は、6A6、8E1、2A6、および8F1とは異なる（図30）。

【0267】

最終クローンの選択

40

サブクローンは、上記で言及される基準どおりに選出され、かつmAbの産生および精製、またはクローンの純度（単一細胞クローン）および安定性に応じたさらなるサブクローニングのいずれかに進んだ。したがって、安定性に対するサブクローニングの後に、以下のサブクローンが、産生および精製のために最終的に選択された。

315.1.6D12.G6

315.1.2A6.H6.F7

315.1.6A6.C11.G5

315.2.8F1.D2.D1

315.2.8E1.F7.C3.H7.H8.F5

384.1.2G11.H5.E4

384.1.2H11.F2.G6

【0268】

10

抗MUC1-C/ECDモノクローナル抗体の精製

ウシ低IgGを含有する10% FBSを補充したDMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中でハイブリドーマを成長させた。Akta Xpress FPLCシステム (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) を用いて、培養上清を、50mMリン酸ナトリウム/300mM NaClで平衡化したプロテインA sepharoseに通した。洗浄後、0.1Mクエン酸塩バッファー (pH3.0) を用いて、抗体を溶出した。溶出された画分を中和し、プールし、PBSに対して透析し、かつAmicon Ultracel 10Kフィルター (Millipore, Billerica, MA) を用いて濃縮した。これらすべての精製された抗体を、Muc1-ECDに対するそれらの反応性について、種々の希釈でELISAにおいて試験した。

【0269】

20

抗MUC1-C/ECDの命名

本発明者らは、MUC1-Cタンパク質のECDに向けられた7種の異なるモノクローナル抗体を開発しかつ精製し、それは、それらが精製される由来のサブクロンの名前の後で識別される。しかしながら、単純さの理由で、彼らは、下記で示されるように、それらの親クローンにちなんでそれらを名付けた。

【0270】

(表7) クローン命名

クローンの名前	単純名
315.1.6D12.G6 (IgM)	6D12 (IgM)
315.1.2A6.H6.F7	2A6 (IgG)
315.1.6A6.C11.G5	6A6 (IgG)
315.2.8F1.D2.D1	8F1 (IgG)
315.2.8E1.F7.C3.H7.H8.F5	8E1 (IgG)
384.2G11.H5.E4	2G11 (IgG)
384.2H11.F2.G6	2H11 (IgG)
400.6.2B11.D5.F6	2B11 (IgG1)
400.6.4G5.E11.G2	4G5 (IgG1)
400.6.7B8.G3.G1	7B8 (IgG2a)

30

40

【0271】

ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロッティングにおける抗体の性能を解析した。MUC1-ECD-mFcおよび/またはMUC1-ECD-hFc (0.5および1μg/レーン) をSDSPAGEに供し、かつ20Vで60分間ニトロセルロース膜に転写した。モノクローナル抗体を膜とともにインキュベートし、かつHRP抱合型ヤギ抗マウスIg、F(ab)2特異的 (1:5000希釈; GE Healthcare)、それに続く増強された化学発光 (GE Healthcare) を用いて、抗原に結合している抗体を検出した。

50

【0272】

フローサイトメトリー解析

抗体が細胞表面MUC1-Cタンパク質に結合し得る能力を、フローサイトメトリーによって解析した。細胞を抗MUC1-C/ECD抗体またはマウスIgGとともに30分間インキュベートし、洗浄し、ヤギ抗マウス免疫グロブリンフルオレセイン抱合型抗体（Santa Cruz Biotechnology）とともにインキュベートし、かつ1%ホルムアルデヒド/PBS中で固定した。反応性を免疫蛍光FACScanによって検出した。反応性を免疫蛍光FACScanによって検出した（表8）。

【0273】

（表8）フローサイトメトリーデータ

10

細胞株	-ve 対照	8E1	8F1	+ve (DF3)
KU812/Con siRNA <i>MUC1-陽性</i>	1.08	17.9	17.18	95.18
KU812/MUC1siRNA <i>MUC1-陰性</i>	1.18	6.64	7.6	35.36
U266/Con siRNA <i>MUC1-陽性</i>	0.94	24.62	16.86	94.68
U266/MUC1siRNA <i>MUC1-陰性</i>	0.92	4.36	3.04	13.5
K562/Con siRNA <i>MUC1-陽性</i>	0.86	22.82	34.44	40.61
K562/MUC1siRNA <i>MUC1-陰性</i>	0.94	6.91	6.37	17.07

20

【0274】

細胞成長阻害アッセイ/トリパンプルー排除

30

トリパンプルー排除アッセイ

それらの成長速度に基づく推定数の細胞を、24ウェルプレートに播いた。細胞をウェル内で一晚成長させた後、37℃、5% CO₂にて、様々な間隔で（例えば、3日間に1回）、2～4 μg/mlの抗体を培養物に添加しかつ混合した。抗体とのインキュベーションの6日後に、細胞をトリプシン処理によって収穫し、かつ生存細胞をトリパンプルー排除法によって計数した。

【0275】

細胞成長阻害アッセイ/アラマープルー

あるいは、細胞を96ウェルプレートに播いた。一晚の成長後、2倍連続希釈で10 μg/mlから始まる様々な濃度の抗体で細胞を処理した。抗体による処理の4～6日後、アラマープルー試薬をウェルに添加しかつ3～5時間インキュベートし、そしてThermomaxプレートリーダー（Molecular Devices）を用いて、プレートを570nm（励起波長）および600nm（発光波長）で読み取ることによって、吸光度を測定した。アッセイにおいて、アラマープルーの還元パーセンテージは生細胞のパーセンテージに比例し、そしてそれをSoftMax Proソフトウェアを用いて計算しかつ4パラメーター曲線としてプロットした。

40

【0276】

ZR-75-1乳癌細胞およびH-1975肺癌細胞における抗MUC1-C/ECD MAbの8E1および6A6の細胞内在化

MAb 6A6および8E1をFITCまたはAlexa Fluor 488のいずれかで直接標識し、かつ標識後に、抗体をメーカーの指示に従って精製した。ガラス底培養プレート上で成長させたZR-7

50

5-1またはH-1975細胞に対して、免疫蛍光を査定した。FITCに抱合したまたはAlexa Fluor 488に抱合したMAb 6A6または8E1を、4および2 μ g/mlの濃度で用いた。MUC1陰性HEK-293T細胞を陰性対照として用いた。初めに、表面標識を4℃で60分間行った。表面に結合している抗体の内在化を、培地中での37℃でさらなる3時間のインキュベーションによって開始させた。その後、適当な波長を用いた落射蛍光顕微鏡で生細胞を解析した。

【0277】

ZR-75-1乳癌腫細胞およびH-1975 NSCLC細胞における、エンドソームマーカーとのMAb 6A6および8E1の共局在

ヒトZR-75-1およびH-1975細胞を、10%熱不活性化ウシ胎仔血清、ストレプトマイシン (100mg/ml)、ペニシリン (100U/ml)、および2Mm L-グルタミンを含有するRPMI 1640培地中で成長させた。標識の48時間前に、細胞を、ガラス底培養プレート内に、RPMI-1640とともにプレートあたり15,000個の細胞で播種した。Alexa Fluor 488に抱合したMAb 6A6または8E1を、4および2 μ g/mlの濃度で用いた。Alexa Fluor 488標識された非特異的IgG (アイソタイプ対照抗体)を陰性対照として用いた。MUC1陰性HEK-293T細胞をさらなる陰性対照として用いた。MAbとのインキュベーション前に、ZR-75-1またはH-1975細胞にRFP-エンドサイトマーカー (Invitrogen)を16~18時間トランスフェクトした。適当な時点で、細胞をPBSで洗浄し、かつPBS中0.5% BSAでブロッキングした。Alexa Fluor 488標識されたMAb 8E1または6A6 (2 μ g/ml)を用いて、細胞を4℃で60分間標識した。インキュベーションの後、続いて細胞をPBSで3回洗浄し、かつ膜結合をモニターする4℃または内在化のための37℃のいずれかで、培養培地中にてさらに3時間インキュベートさせた。処理期間の終了時に、細胞をPBSで3回洗浄し、かつ60 $\times$ 油浸対物レンズを用いたNikonデコンボリューション広視野落射蛍光システムを用いて調べ、かつ画像をNIS-elementソフトウェア (Nikon)を用いて取り込んだ。すべての画像を、Image Jソフトウェアを用いて解析した。

【0278】

実施例2ー抗体産生およびスクリーニング結果

ウェスタンブロッティングの結果は、抗MUC1-C/ECD抗体のMUC1-C/ECDタンパク質との特異的反応性、およびMUC1-CDタンパク質 (陰性対照)と反応しなかったことを実証した。トリパンブルー排除法によって得られた細胞生存率アッセイが、表9~27に提示されている。結果は、抗MUC1-C/ECD抗体が、細胞成長阻害に対して個別のかつ選択的な効果を有することをはっきりと実証した。細胞の生存率は、抗体の増加する濃度とともに減少した。しかしながら、抗体濃度が2mg/mlを上回るまで増加した場合、それは生存率に影響を及ぼさなかった。このデータは、トリパンブルー排除法を用いて同時に実施されたアッセイを裏付ける。ある特定のタイプの細胞を阻害することにおける該抗体の選択性は、6D12抗体で処理された場合にはいかなる大きな細胞成長阻害をも示さなかったMCF-7細胞を用いて実証された。

【0279】

(表9)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	90	76	84	90	82	84.4	2	1688000	0.09	151920	156240	100.0
	94	96	108	106	104	101.6	2	2032000	0.09	182880		
	98	58	74	77	65	74.4	2	1488000	0.09	133920		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p53 2A6	30	17	30	41	23	28.2	2	564000	0.09	50760	100320	64.2
	69	66	68	67	69	67.8	2	1356000	0.09	122040		
	69	67	70	77	73	71.2	2	1424000	0.09	128160		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p53 6A6	37	51	59	54	46	49.4	2	988000	0.2	197600	200266.7	128.2
	63	54	44	43	43	49.4	2	988000	0.2	197600		
	49	54	55	40	59	51.4	2	1028000	0.2	205600		

細胞対照 100

2A6 (4ug/ml) 64.2

6A6 (4ug/ml) 128.2

【0 2 8 0】

4 μg/mlの抗p59抗体2A6および6A6によるH1975細胞の処理

抗MUC1 CD (4 μg/ml) を対照として用いた。8000個の細胞/ウェル/ml RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0 2 8 1】

(表 1 0)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	90	76	84	90	82	84.4	2	1688000	0.09	151920	156240	100.0
	94	96	108	106	104	101.6	2	2032000	0.09	182880		
	98	58	74	77	65	74.4	2	1488000	0.09	133920		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-2A6	30	17	30	41	23	28.2	2	564000	0.09	50760	100320	64.2
	69	66	68	67	69	67.8	2	1356000	0.09	122040		
	69	67	70	77	73	71.2	2	1424000	0.09	128160		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-6A6	37	51	59	54	46	49.4	2	988000	0.2	197600	200267	128.2
	63	54	44	43	43	49.4	2	988000	0.2	197600		
	49	54	55	40	59	51.4	2	1028000	0.2	205600		

細胞対照 100

2A6 (4ug/ml) 64.2

6A6 (4ug/ml) 128.2

【0 2 8 2】

4 μg/mlの抗p59抗体2A6および6A6によるH-1975細胞の処理

8000個の細胞/ウェル/ml RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0 2 8 3】

(表 1 1)

10

20

30

40

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	67	68	66	59	63	64.6	2	1292000	0.7	904400	1029467	100.0
	74	76	76	77	81	76.8	2	1536000	0.7	1075200		
	64	75	97	81	79	79.2	2	1584000	0.7	1108800		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-2A6	63	89	81	88	83	80.8	2	1616000	0.7	1131200	1134933	110.2
	87	84	90	84	72	83.4	2	1688000	0.7	1167600		
	74	85	89	68	79	79	2	1580000	0.7	1106000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-6A6	75	90	89	74	72	80	2	1600000	0.7	1120000	1249733	121.4
	82	73	72	102	79	81.6	2	1632000	0.7	1142400		
	99	110	115	95	112	106.2	2	2124000	0.7	1486800		

10

細胞対照 100

2A6 (4ug/ml) 110.2

6A6 (4ug/ml) 121.4

【0 2 8 4】

4 μg/mlの抗p59抗体2A6および6A6による293T細胞の処理

抗MUC1-CD (4 μg/ml) を対照として用いた。DMEM中、4500個の細胞/ウェル/mlを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

20

【0 2 8 5】

(表 1 2)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	90	82	107	92	91	92.4	2	1848000	0.1	184800	208133	100.0
	94	135	135	93	109	113.2	2	2264000	0.1	226400		
	98	110	142	89	94	106.6	2	2132000	0.1	213200		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-2A6	113	121	118	141	132	125	2	2500000	0.1	250000	268000	128.8
	98	126	141	151	128	128.8	2	2576000	0.1	257600		
	159	131	161	171	119	148.2	2	2964000	0.1	296400		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-6A6	54	72	81	60	45	62.4	2	1248000	0.1	124800	141600	68.0
	83	64	67	64	56	66.8	2	1336000	0.1	133600		
	92	86	63	79	96	83.2	2	1664000	0.1	166400		

30

細胞対照 100

2A6 (4ug/ml) 128.8

6A6 (4ug/ml) 68

【0 2 8 6】

4 μg/mlの抗p59抗体2A6および6A6によるZR75-1細胞の処理

40

抗MUC1-CD (4 μg/ml) を対照として用いた。10,000個の細胞/ウェル/ml RPMIを24ウェルプレートに播いた。処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0 2 8 7】

(表 1 3)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	150	169	19	147	168	128.6	2	2572000	0.2	514400	456267	100.0
	117	105	102	100	109	106.6	2	2132000	0.2	426400		
	110	71	107	104	143	107	2	2140000	0.2	428000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p53-8F1	108	126	113	91	104	108.4	2	2168000	0.2	433600	407733	89.4
	103	76	109	131	111	106	2	2120000	0.2	424000		
	80	66	86	112	113	91.4	2	1828000	0.2	365600		
細胞 + 4 ug/ml 抗 P53-2A6	103	80	103	101	95	96.4	2	1928000	0.2	385600	340800	74.7
	88	104	93	73	68	85.2	2	1704000	0.2	340800		
	87	87	69	68	69	74	2	1480000	0.2	296000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 P53-6A6	75	67	131	109	91	94.6	2	1892000	0.3	567600	506000	110.9
	83	99	85	87	109	92.6	2	1852000	0.3	555600		
	68	61	62	59	79	65.8	2	1316000	0.3	394800		

細胞対照 100

8F1 (4ug/ml) 89.4

2A6 (4ug/ml) 74.7

6A6 (4ug/ml) 110.9

【0288】

4 μg/mlの抗p53抗体8F1、2A6、および6A6によるZR75-1細胞の処理

抗MUC1-CD 4 μg/mlを対照として用いた。10,000個の細胞/ウェル/ml RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体の処理を同じ日（細胞を播種する日）に行った。細胞を7日目に収穫した。

【0289】

(表14)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	76	86	89	54	63	73.6	2	1472000	0.2	294400	452800	100.0
	192	115	147	145	128	145.4	2	2908000	0.2	581600		
	120	131	159	87	106	120.6	2	2412000	0.2	482400		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p53- 8F1	35	31	58	68	41	46.6	2	932000	0.25	233000	299333.3	66.1
	81	68	56	63	54	64.4	2	1288000	0.25	322000		
	66	72	60	74	71	68.6	2	1372000	0.25	343000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p53- 2A6	51	47	51	43	41	46.6	2	932000	0.25	233000	363000	80.2
	64	77	67	107	71	77.2	2	1544000	0.25	386000		
	102	107	93	78	90	94	2	1880000	0.25	470000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 P53- 6A6	59	96	106	65	59	77	2	1540000	0.25	385000	417333.3	92.2
	96	141	151	96	91	115	2	2300000	0.25	575000		
	66	56	56	51	63	58.4	2	1168000	0.25	292000		

細胞対照 100

8F1 (4ug/ml) 66.1

2A6 (4ug/ml) 80.2

6A6 (4ug/ml) 92.2

【0290】

4 μg/mlの抗p53抗体8F1、2A6、および6A6によるZR75-1細胞の処理

抗MUC1-CD (4 µg/ml) を対照として用いた。5000個の細胞/ウェル/ml RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体の処理を（細胞を播種する日にのみ）行った。9日目に収穫した。同じ日。

【0291】

(表15)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均細胞数	生細胞%
細胞のみ (対照)	21	37	36	36	31	32.2	2	644000	0.3	193200	198160	100.0
	33	31	43	38	35	36	2	720000	0.24	172800		
	45	47	42	53	51	47.6	2	952000	0.24	228480		
細胞 + 2 ug/ml 抗 p59	37	25	50	38	34	36.8	2	736000	0.24	176640	179520	90.6
	44	34	43	39	36	39.2	2	784000	0.24	188160		
	32	28	34	44	43	36.2	2	724000	0.24	173760		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59	39	28	36	28	31	32.4	2	648000	0.24	155520	160000	80.7
	39	48	36	44	30	39.4	2	788000	0.24	189120		
	26	29	31	28	27	28.2	2	564000	0.24	135360		

細胞対照 100

8F1 (2ug/ml) 80.7

8F1 (4ug/ml) 90.6

【0292】

2および4 µg/mlの抗p59抗体 (315.2.8F1.D2.D1) によるH1650細胞の処理

抗MUC1-CDを、アイソタイプ合致対照 (IgG1κ) として、2および4 µg/mlで用いた。8,000個の細胞/ウェル/800 µl RPMIを24ウェルプレートに播いた。処理を6日間実施した。

【0293】

(表16)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均細胞数	生細胞%
細胞のみ (対照)	40	40	44	44	43	42.2	2	844000	0.3	253200	282000	100.0
	35	42	54	51	47	45.8	2	916000	0.3	274800		
	43	61	61	52	48	53	2	1060000	0.3	318000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59	38	44	40	41	37	40	2	800000	0.3	240000	274400	97.3
	50	55	39	42	54	48	2	960000	0.3	288000		
	39	52	42	61	52	49.2	2	984000	0.3	295200		

細胞対照 100

8F1 (4ug/ml) 97.3

【0294】

4 µg/mlの抗p59抗体 (315.2.8F1.D2.D1) によるH1975細胞の処理

抗MUC1-CD (4 µg/ml) を対照として用いた。8,000個の細胞/ウェル/800 µl RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0295】

(表17)

10

20

30

40

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	40	40	44	44	43	42.2	2	844000	0.3	253200	282000	100.0
	35	42	54	51	47	45.8	2	916000	0.3	274800		
	43	61	61	52	48	53	2	1060000	0.3	318000		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59	38	44	40	41	37	40	2	800000	0.3	240000	274400	97.3
	50	55	39	42	54	48	2	960000	0.3	288000		
	39	52	42	61	52	49.2	2	984000	0.3	295200		

【0296】

10

4 µg/mlの抗p59抗体 (315.2.8F1.D2.D1) によるH1975細胞の処理。抗MUC1-CD (4 µg/ml) を対照として用いた。8,000個の細胞/ウェル/800 µl RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0297】

(表18)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	83	66	81	78	76	76.8	2	1536000	0.8	1228800	1155200	100.0
	56	59	80	64	49	61.6	2	1232000	0.8	985600		
	79	76	85	82	69	78.2	2	1564000	0.8	1251200		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59	45	58	55	65	72	59	2	1180000	0.8	944000	1091200	94.5
	75	72	77	64	71	71.8	2	1436000	0.8	1148800		
	69	79	70	85	66	73.8	2	1476000	0.8	1180800		

20

細胞対照 100

8F1 (4ug/ml) 94.5

【0298】

4 µg/mlの抗p59抗体 (315.2.8F1.D2.D1) によるHEK293T細胞の処理

抗MUC1-CD (4 µg/ml) を対照として用いた。4,500個の細胞/ウェル/800 µl RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞は6日間毎日処理される予定であった。しかしながら、細胞は早く成長し、したがって処理の5日後に収穫された。

30

【0299】

(表19)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	85	92	96	85	79	87.4	2	1748000	0.24	419520	390080	100.0
	82	80	70	65	86	76.6	2	1532000	0.24	367680		
	70	82	86	80	81	79.8	2	1596000	0.24	383040		
細胞 + 2 ug/ml 抗 p59	41	31	45	44	33	38.8	2	776000	0.24	186240	216000	55.4
	48	48	44	41	63	48.8	2	976000	0.24	234240		
	40	64	39	54	40	47.4	2	948000	0.24	227520		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59	37	32	49	41	27	37.2	2	744000	0.24	178560	210240	53.9
	55	48	43	53	61	52	2	1040000	0.24	249600		
	29	50	40	43	49	42.2	2	844000	0.24	202560		

40

細胞対照 100

2ug/ml 8F1 55.4

4ug/ml 8F1 53.9

50

【0300】

2および4 μ g/mlの抗p59抗体（315.2.8F1.D2.D1）によるZR-75.1細胞の処理

10,000個の細胞/ウェル/800 μ l RPMIを24ウェルプレートに播いた。処理を6日間実施した。

【0301】

（表20）

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 [ml]	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	110	164	113	129	108	124.8	2	2496000	0.1	249600	251200	100.0
	70	98	100	107	88	92.5	2	1852000	0.125	231500		
	118	78	106	121	122	109	2	2180000	0.125	272500		
細胞 + 4 μ g/ml 抗 p59	85	81	79	90	99	86.8	2	1736000	0.125	217000	159333	63.4
	59	72	63	62	49	61	2	1220000	0.125	152500		
	51	48	39	33	46	43.4	2	868000	0.125	108500		

10

細胞対照 100

8F1 (4 μ g/ml) 63.4

【0302】

4 μ g/mlの抗p59抗体（315.2.8F1.D2.D1）によるZR75-1細胞の処理

抗MUC1-CD（4 μ g/ml）を対照として用いた。10,000個の細胞/ウェル/800 μ l RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

20

【0303】

（表21）表面染色：MM、AML、およびCML細胞株に対する抗体試験（フローサイトメトリー）クローン6A6を用いたフロー

	NC	PE	p58-6A6	DF-3
MOLM-14	1.09	5.24	71.49	99.55
MV4-11	1.01	2.6	96.93	74.19
ME559203	1.09	2.1	69.01	57.03

30

K562	1.13	1.63	11.56	78.75
KU812	1.09	1.57	11.39	98.06

RPMI8266	1.16	6.35	89.64	94.97
U266	1.11	4.17	98.55	99.19

KMS28PE	1.12	2.23	2.72	58.18
---------	------	------	------	-------

40

*2 μ g 抗体/サンプル；PE抱合型ヤギ抗マウス2nd抗体

【0304】

（表22）表面染色：乳癌細胞株および原発性乳癌患者細胞に対する抗体試験（フローサイトメトリー）

	NC	PE クローン2A6	クローン6A6	クローン8E1	クローン8F1	DF-3
ZR-75-1	0.98	0.82	0.98	0.92	0.94	98.52
ZR-75-1	1.06				1.34	6.84
ZR-75-1	1.13	1.43	1.78	2.16	1.61	89.48
JB564765	1.17	2.59	14.25	16.85	8.26	21.06
RG563999	1.19	15.42	42.14	68.24	42.16	60.54
RG563999	0.45	1.14		14.63		11.87

*2 μ g 抗体/サンプル；PE抱合型ヤギ抗マウス2nd抗体

【0305】

(表23) 表面染色：慢性骨髄性 (Myelogeneous) 白血病 (CML) 細胞株に対する抗体試験 (フローサイトメトリー)

10

	NC	PE クローン2A6	クローン6A6	クローン8E1	クローン8F1	DF-3
K562	0.9	1.4	10.5	9.31	8.65	9.58
KU812	1.09	24.93	41.19	31.62	39.59	39.86

*2 μ g 抗体/サンプル；PE抱合型ヤギ抗マウス2nd抗体

【0306】

(表24) 表面染色：抗体試験 (フローサイトメトリー)

K562/siRNA

	NC	PE	p58-2A6	p58-6A6	P58-8E1	P58-8F1	DF-3
CTL-siRNA	1.13	14.01	29.74	22.65	22.36	34.44	40.61
MUC1-siRNA	0.94	5.81	6.98	6.26	6.91	6.37	17.07

20

*2 μ g 抗体/サンプル；PE抱合型ヤギ抗マウス2nd抗体

サンプルを固定し、かつ4°Cで4日間保った。

【0307】

(表25) 表面染色：抗体試験 (フローサイトメトリー)

	NC	PE	p58-2A6	p58-6A6	P58-8E1	P58-8F1	DF-3
KU812/siRNA							
CTL-siRNA	1.09	1.31	14.79	20.08			96.57
MUC1-siRNA	0.97	1.14	4.75	4.08			69.25

30

U266/siRNA

CTL-siRNA	1.01	2.2	31.36	84.2			94.67
MUC1-siRNA	1.21	4.78	36.71	93.47			16.23

KU812/siRNA

CTL-siRNA	1	0.68			17.9	15	95.18
MUC1-siRNA	1.18	1.54			6.64	7.6	85.36

40

U266/siRNA

CTL-siRNA	1.18	0.8			24.62	16.86	96.5
MUC1-siRNA	0.92	5.74			4.36	3.04	13.5

*2 μ g 抗体/サンプル；PE抱合型ヤギ抗マウス2nd抗体

【0308】

(表26)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	90	76	84	90	82	84.4	2	1688000	0.09	151920	156240	100.0
	94	96	108	106	104	101.6	2	2032000	0.09	182880		
	98	58	74	77	65	74.4	2	1488000	0.09	133920		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-2A6	30	17	30	41	23	28.2	2	564000	0.09	50760	100320	64.2
	68	66	68	67	69	67.8	2	1356000	0.09	122040		
	69	67	70	77	73	71.2	2	1424000	0.09	128160		
細胞 + 4 ug/ml 抗 p59-6A6	37	51	59	54	46	49.4	2	988000	0.2	197600	200267	128.2
	63	54	44	43	43	49.4	2	988000	0.2	197600		
	49	54	55	40	59	51.4	2	1028000	0.2	205600		
細胞 + 4 ug/ml 抗 MUC1-CD	1	0	0	0	0	0.2	2	4000	0.015	60	480	0.3
	3	3	3	1	2	2.4	2	48000	0.015	720		
	3	1	4	1	2	2.2	2	44000	0.015	660		

【0309】

4 µg/mlの抗p59抗体2A6および6A6によるH1975細胞の処理

抗MUC1-CD (4 µg/ml) を対照として用いた。8000個の細胞/ウェル/ml RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0310】

(表27)

処理	ウェル1	ウェル2	ウェル3	ウェル4	ウェル5	平均	DF	細胞/ml	容量 (ml)	総細胞	平均 細胞 数	生細胞%
細胞のみ (対照)	32	32	37	45	39	37	2	740000	0.05	37000	38666.67	100.0
	48	43	46	43	45	45	2	900000	0.05	45000		
	35	30	40	31	34	34	2	680000	0.05	34000		
細胞 + 5 ug/ml IgM 対照	29	33	39	44	42	37.4	2	748000	0.05	37400	41066.67	106.2
	40	42	36	45	42	41	2	820000	0.05	41000		
	45	49	43	49	38	44.8	2	896000	0.05	44800		
細胞 + 5 ug/ml 抗p59	26	32	39	39	34	34	2	680000	0.05	34000	37333.33	96.6
	38	46	32	41	43	40	2	800000	0.05	40000		
	40	38	36	34	42	38	2	760000	0.05	38000		

【0311】

5 µg/mlの抗p59抗体またはIgM対照抗体によるSKOV3細胞の処理

10,000個の細胞/ウェル/800 µl RPMIを24ウェルプレートに播いた。抗体による処理を翌日に開始した。細胞を6日間毎日処理した。

【0312】

FITCまたはAlexa Fluor 488のいずれかに抱合したMAb 6A6および8E1の内在化を、ZR-75-1乳癌腫細胞株またはH-1975 NSCLC細胞株を用いて査定した。対照として、MUC1陰性HEK293T細胞を用いて、結合および内在化についての選択性を規定した。結果は、H-1975 NSCLC細胞を、タグ化抗体と37℃で3時間インキュベートした場合の、FITC標識された6A6および8E1抗体の有意な内在化を実証している (図12および13)。Alexa Fluor 488標識された6A6抗体をZR-75-1乳癌腫細胞において37℃で3時間用いた場合に、同様の結果が得られた (図14)。4℃または37℃のいずれかで3時間インキュベートした場合、いずれの抗体もMUC1陰性HEK-293T細胞には結合しなかった (図15およびデータ示さず)。

【0313】

10

20

30

40

50

本発明者らは、初めに、4℃におけるZR-75-1乳癌腫細胞へのAlexa Fluor 488-6A6 Mabの結合を査定した。免疫蛍光解析により、4℃における原形質膜でのZR-75-1へのMab 6A6抗体の結合が確認された（図18）。ZR-75-1細胞を4℃でRFPエンドソームマーカーとともにインキュベートしかつ解析した場合に、同様の免疫蛍光表面染色が観察された。さらに、Alexa Fluor 488標識された6A6（緑色）は細胞膜で検出可能であり、そこでそれは、4℃にて初期エンドソームと共局在している（オレンジ色/黄色のエリア）。37℃で3時間のより長いインキュベーションは、Mab 6A6の細胞質への移動をもたらし、そこでそれは、RFPエンドソームマーカーと共局在した。3時間後の37℃における後期エンドソーム内へのAlexa Fluor 488タグ化6A6抗体のこの内在化および局在は、重ね合わせにおけるオレンジ色によって明白であった（白色の矢印、図19）。これらの知見は、蛍光標識された6A6抗体の大部分が、（4℃において）初期エンドサイトーシス区画から抜け出し得、かつ37℃において後期エンドソーム/リソソームと共局在し得たことを示唆している。

10

【0314】

H-1975非小細胞癌腫細胞における、抗MUC1-C/ECD Mabの内在化およびエンドソームマーカーとの共局在

本発明者らは、次に、H-1975 NSCLC細胞におけるAlexa Fluor 488-6A6および8E1 Mabの内在化を査定した。共局在の調査に関しては、抗MUC1-C/ECD Mab 6A6または8E1とのインキュベーション前に、H-1975細胞に、RFP-エンドサイトマーカーを16～18時間トランスフェクトした。さらに、対照として、RFP-エンドサイトマーカーをトランスフェクトされたH-1975細胞を、Alexa Fluor 488標識されたアイソタイプ対照抗体（IgG）とともに別個にインキュベートした。免疫蛍光解析により、RFP-エンドサイトマーカーによる細胞のトランスフェクション後にエンドソームの染色が確認された（図26）。重要なことに、結果は、IgGアイソタイプ対照抗体とともにインキュベートした場合、細胞のたとえあったとしてもわずかな染色を実証している（図26）。さらに、免疫蛍光解析により、37℃で3時間インキュベートした場合の、H-1975細胞におけるAlexa Fluor 488標識されたMab 6A6の内在化が実証された（図20）。37℃でH-1975細胞にRFP-エンドサイトマーカーをトランスフェクトしかつ解析した場合に、同様の染色が観察された。より重要なことに、結果は、37℃において、Alexa Fluor 488標識された6A6がエンドソームとはっきりと共局在したことを実証している。3時間後の37℃における後期エンドソーム内へのAlexa Fluor 488タグ化6A6抗体のこの内在化および局在は、重ね合わせにおけるオレンジ色/黄色によって明白であった（図20）。RFP-エンドサイトマーカーをトランスフェクトされたH-1975細胞を、Alexa Fluor 488標識された抗MUC1-C/ECD 8E1 Mabとともにインキュベートした場合に、同様の結果が得られた（図21）。

20

30

【0315】

MUC1陰性HEK-293T細胞において、蛍光標識された6A6の結合を評価することによって、抱合体の特異性をさらに調べた。結果は、HEK-293T細胞をタグ化抗体とともに4℃または37℃で3時間インキュベートした場合、Alexa Fluor 488標識された6A6抗体のたとえあったとしてもわずかな染色を実証している（図26）。さらに、ZR-75-1細胞において、Alexa Fluor 488標識されたアイソタイプ対照（IgG）抗体を4℃または37℃で3時間用いた場合、免疫蛍光は観察されなかった（データ示さず）。

40

【0316】

H-1975非小細胞癌腫細胞における、抗MUC1-C/ECD Mabの内在化およびリソソームマーカーとの共局在

本発明者らは、次に、H-1975 NSCLC細胞における、Alexa Fluor 488-6A6および8E1 Mabの内在化、ならびにそれらとリソソームとの共局在を査定した。共局在の調査に関しては、抗MUC1-C/ECD Mab 6A6または8E1とのインキュベーション前に、H-1975細胞に、RFP-リソソームマーカーを16～18時間トランスフェクトした。さらに、対照として、RFP-リソソームマーカーをトランスフェクトされたH-1975細胞を、Alexa Fluor 488標識されたアイソタイプ対照抗体（IgG）とともに別個にインキュベートした。

【0317】

50

免疫蛍光解析により、RFP-リソソームマーカーによる細胞のトランスフェクション後にリソソームの染色が確認された（図27）。興味深いことに、結果は、IgGアイソタイプ対照抗体とともにインキュベートした場合、細胞のたとえあったとしてもわずかな染色を実証している（図27）。さらに、免疫蛍光解析により、37℃で3時間インキュベートした場合の、H-1975細胞におけるAlexa Fluor 488標識されたMab 8E1の内在化が実証された（図28）。37℃でH-1975細胞にRFP-リソソームマーカーをトランスフェクトしかつ解析した場合に、同様の染色が観察された。より興味深いことに、結果は、37℃において、Alexa Fluor 488標識された8E1がリソソームとはっきりと共局在したことを実証している。3時間後の37℃におけるリソソーム内へのAlexa Fluor 488タグ化8E1抗体のこの内在化および局在は、重ね合わせにおけるオレンジ色/黄色によって明白であった（図28）。RFP-リソソームマーカーをトランスフェクトされたH-1975細胞を、Alexa Fluor 488標識された抗MUC1-C/ECD 6A6 Mabとともにインキュベートした場合に、同様の結果が得られた（図23）。

【0318】

図3は、MUC1-C/ECD（58aa）由来の3種の重複ペプチドの配列を示している。記載される抗体のすべては、これら3種のペプチドのいずれとも反応し得ない。

【0319】

最後に、反応性およびアイソタイプに関するELISAデータ、フローデータ（特異性および選択性）、ウェスタンブロット解析（精製タンパク質および細胞溶解物）、免疫蛍光（内在化；エンドソームおよびリソソームとの共局在）、線状および立体構造的エピトープマッピング（重複ECDペプチドおよび多数の単一点変異体を用いた）、ならびに生物学的活性調査（インビトロにおける多数の細胞株）を実行した。多数のIgGクローンが同定されており（6A6、8E1/8F1、2A6、2G11、2H11）、かつ下記でさらに記載される。

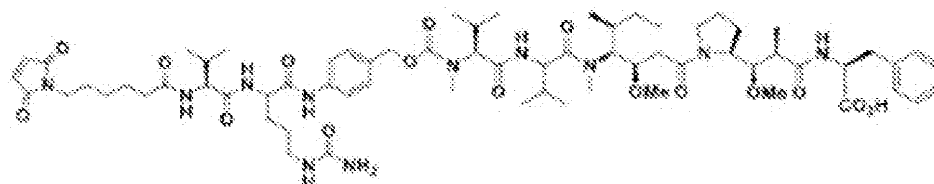
【0320】

7B8および3D1抗体の特徴付け

7B8および3D1クローンの線状エピトープマッピングを、MUC1-C/ECD領域（58個のアミノ酸）全体にわたる3種の重複ペプチドを用いて実施し、合成した。P1、P2、またはP3ペプチドの存在下または非存在下において、7B8または3D1精製抗体を用いてELISAアッセイを実施した。図47に示される結果は、抗原への7B8および3D1の結合は、これら3種の重複ペプチドのいずれによっても阻害されなかったことを実証している。7B8および3D1の立体構造的エピトープマッピングを、MUC1-C/ECD領域における8種の決定的な個々の点変異体を用いて、ELISAによって実施した。結果は、抗体3D1が、MUC1-C/ECDに存在しているD19アミノ酸に対して少なくとも部分的に感度を有することを実証している（図48A～B）。これらの知見は、D19が、3D1結合のための立体構造的コア/ポケットの一部であることを表す。ZR-75-1乳癌腫細胞を用いて、MUC1-C/ECDとの競合形式での7B8または3D1抗体結合を判定し、かつフローによって解析した。結果は、7B8とは対照的に、細胞とMUC1-C/ECDタンパク質とのインキュベーションが、3D1の結合を完全に無効にすることを実証している（図49）。これらの知見は、7B8および3D1の立体構造的結合エピトープが異なることを表す。ハイブリドーマ3D1に関するシーケンシング結果が図50に示されており、かつ下記でより詳細に記述される。

【0321】

切断可能なリンカーのバリリン-シトルリン-p-アミノベンジル（Val-Cit-PAB）を介して、2mgのそれぞれのモノクローナル抗体をモノメチルアウリスタチンF（MMAF）に抱合することによって、7B8および3D1の抗体-薬物抱合体（ADC）を作出した。MMAFは、その細胞傷害活性を減衰させる帯電したC末端フェニルアラニンを含む新たなアウリスタチン誘導体である。作出されたADCの構造は、下記で示されるとおりである。



10

20

30

40

50

【0322】

本発明者らは、切断可能なリンカーを用いた7B8-MMAFおよび3D1-MMAF抱合体のインビトロにおける有効性を判定した。7B8および3D1抱合体の抗増殖効果を、複数の培養したMUC1陽性細胞株に対して評価した。重要なことに、切断可能なリンカーを介してMMAFに連結した7B8および3D1は、MMAFに連結したCD1（MUC1-Cの内側細胞質ドメインを標的とする抗体）と比較して、有意な抗増殖活性を呈示した。7B8および3D1抗体抱合体は、それぞれ約860pMおよび1.32nMのIC₅₀値を有して、ZR-75-1乳癌腫細胞において増殖の用量依存的阻害を誘導した（図51A）。MDA-MB-468三重陰性乳癌腫細胞を7B8または3D1 MMAF抱合体で処理した場合に、同様の結果が得られた（図51B）。

【0323】

実施例3ー抗体シーケンシング法および結果
8E1/8F1

Qiagenキットを用いて、ハイブリドーマから全RNAを抽出した。QIAGEN（登録商標）One Step RT-PCR Kit（カタログ番号210210）を用いた。重鎖および軽鎖に特異的なプライマーセットを用いて、RT-PCRを実施した。各RNAサンプルに対して、可変領域のリーダー配列を網羅する順方向縮重プライマー混合物を用いて、12種の個々の重鎖および11種の軽鎖RT-PCR反応を設定した。逆方向プライマーは、重鎖および軽鎖の定常領域に位置する。プライマー内に制限部位は操作されなかった。

【0324】

反応設定は以下のとおりであった。
5×QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCRバッファー 5.0 μl
dNTPミックス（10mMの各dNTPを含有） 0.8 μl
プライマーセット 0.5 μl
QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCR酵素ミックス 0.8 μl
鋳型RNA 2.0 μl
RNase不含水 20.0 μlまで
総容量 20.0 μl

【0325】

PCR条件は以下のとおりであった。
逆転写：50℃、30分間
初回PCR活性化：95℃、15分間
サイクル：20回サイクルの
94℃、25秒間
54℃、30秒間
72℃、30秒間
最終伸長：72℃、10分間

【0326】

第1ラウンドの反応からのRT-PCR産物を、第2ラウンドのPCRにおいてさらに増幅した。抗体可変領域に特異的なセミネストプライマーセットを用いて、12種の個々の重鎖および11種の軽鎖RT-PCR反応を設定した。

【0327】

反応設定は以下のとおりであった。
2×PCRミックス 10 μl
プライマーセット 2 μl
第1ラウンドのPCR産物 8 μl
総容量 20 μl

【0328】

PCR条件は以下のとおりであった。
95℃で5分間の初回変性
25回サイクルの

10

20

30

40

50

95℃、25秒間

57℃、30秒間

68℃、30秒間

最終伸長は68℃、10分間である。

【0329】

PCRが完了した後、PCR反応サンプルをアガロースゲル上でランして、増幅されたDNAフラグメントを可視化した。正しい抗体可変領域DNAフラグメントは、400～500塩基対のサイズを有するはずである。

【0330】

PCR陽性バンドをTOPOによってクローニングし、次いでPCR増幅し、その後にゲル電気泳動およびアガロースゲルからの回収が続く。およそ24個のクローンをシーケンシングし、かつシーケンシングデータを用いてCDR解析を実施し、そして2種の重鎖および1種の軽鎖が同定されかつ下記で示されている。

【0331】

重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

**EVQLVESGGGLVQPGESLKLSCESNEYEFPSHDMSWVRKTPEKRLELVAAINSDDGGSTYY
PDTMERRFIISRDNTHKKTLYLQMSLSRSEDALYYCVRLYYGNVMDYWGQGTSTVTVSS**

(配列番号：15)

**GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGAGTCCCTGAAACTC
TCCTGTGAATCCAATGAATACGAATCCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTCCGCAAGACT
CCGGAGAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGATGGTGGTAGCACCTACTAT
CCAGACACCATGGAGAGACGATTCATCATCTCCAGAGACAATACCAAGAAGACCCTGTAC
CTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACAGCCTTGTATTACTGTGTAAGACTCTAC
TATGGTAATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA**

(配列番号：16)

【0332】

軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

**DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLYWYLQKPGQSPKLLIYKVSINRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPLTFGAGTKLELK**

(配列番号：19)

**TCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTATATTGGTACCTACAGAAGCCAGG
CCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAG
GTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGA
GGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCTCTCACGTTCCGGTGCTGG
GACCAAGCTGGAGCTGAAAC**

(配列番号：20)

【0333】

6A6。QIAGEN（登録商標）RNeasy Mini Kit（カタログ番号74104）を用いて、ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出した。第1ラウンドのRT-PCR。QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCR Kit（カタログ番号210210）を用いた。重鎖および軽鎖に特異的なプライマーセットを用いて、RT-PCRを実施した。各RNAサンプルに対して、可変領域のリーダー配列を網羅する順方向縮重プライマー混合物を用いて、12種の個々の重鎖および11種の軽鎖RT-PCR反

10

20

30

40

50

応を設定した。逆方向プライマーは、重鎖および軽鎖の定常領域に位置する。プライマー内に制限部位は操作されなかった。

【0334】

反応設定は以下のとおりであった。

5×QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCRバッファ 5.0 μl

dNTPミックス（10mMの各dNTPを含有） 0.8 μl

プライマーセット 0.5 μl

QIAGEN（登録商標）OneStep RT-PCR酵素ミックス 0.8 μl

鋳型RNA 2.0 μl

RNase不含有水 10.9 μl

総容量 20.0 μl

10

【0335】

PCR条件は以下のとおりであった。

逆転写：50℃、30分間

初回PCR活性化：95℃、15分間

20回サイクルの

94℃、25秒間

54℃、30秒間

72℃、30秒間

最終伸長：72℃、10分間

20

【0336】

第2ラウンドのセミネストPCR

第1ラウンドの反応からのRT-PCR産物を、第2ラウンドのPCRにおいてさらに増幅した。

抗体可変領域に特異的なセミネストプライマーセットを用いて、12種の個々の重鎖および11種の軽鎖RT-PCR反応を設定した。

【0337】

反応設定は以下のとおりであった。

2×PCRミックス 10.0 μl

プライマーセット 2.0 μl

第1ラウンドのPCR産物 8.0 μl

総容量 20.0 μl

30

【0338】

PCR条件は以下のとおりであった。

初回変性：95℃、5分間

25回サイクルの

95℃、25秒間

57℃、30秒間

68℃、30秒間

最終伸長：68℃、10分間

40

【0339】

PCRが完了した後、PCR反応サンプルをアガロースゲルで解析して、増幅されたDNAフラグメントを可視化した。正しい抗体可変領域DNAフラグメントは、400～500塩基対のサイズを有するはずである。PCR陽性バンドをTOPOによってクローニングし、次いでPCR増幅し、その後にゲル電気泳動およびアガロースゲルからの回収が続いた。およそ24個のクローンをシーケンシングし、かつシーケンシングデータを用いてCDR解析を実施した（CDR領域は、ワールドワイドウェブvbase2.orgにおけるVBASE2を用いて規定された）。1種の重鎖および1種の軽鎖が同定された。

【0340】

重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

QVQLKESGPGLVAPSQSLSMCTCTVSGFSLTTYGVHWVRQPPGKGLEWLVVIWSDGSTT
YNSPLKSRLSISRDNKSQVFLKMNSLQADDTAIYYCAKNYLGS LDYWGQGSVTVSS

(配列番号 : 17)

CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCGCAGAGCCTGTCCA
TGACATGCACCGTCTCAGGGTTTTTCATTAACCTACCTATGGTGTTCCTGGGTTCGCCA
GCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGTAGTGATATGGAGTGATGGAAGCACAACC
TATAATTCACCTCTCAAGTCCAGACTGAGCATCAGCAGGGACAACCTCCAAGAGCCAAG
TATTCTTAAAAATGAACAGTCTCCAAGCTGATGACACAGCCATCTACTACTGTGCCAA
AAATTACCTCGGTAGTCTGGACTACTGGGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

(配列番号 : 18)

【 0 3 4 1 】

軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

DVVLQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSLVHNNGD TYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVS N
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTFKISRVEAEDLG VYFCSQTTHVPLTFGAGTKLELK

(配列番号 : 21)

GATGTTGTGTTGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCT
CCATCTCTTG CAGATCTAGTCAGAGCCTTG TACACAATAATGGAGACACCTATTTACA
TTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAC
CGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACAT
TCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAC TAC
ACATGTTCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAC

(配列番号 : 22)

【 0 3 4 2 】

2H11

重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

QIQLVQSGPELKKPGETVKTSCKASGYTF TGYSMHVVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTY

ADDFKGRFALSLETSASTTYLQINN LKNEDTATYFCVRGTGGDDWGQTTTLTVSSAKTTP

(配列番号 : 23)

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGACC
TCCTGCAAGGCCTCTGGTTATACCTTCACAGGCTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCT
CCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACTGAGACTGGTGAGCCAACATAT
GCAGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTGCTCTGGAAACCTCTGCCAGCACTACCTAT
TTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGTTAGGGGGACG
GGGGGTGACGACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC

(配列番号 : 24)

【 0 3 4 3 】

軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

10

20

30

40

50

DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDLGVYFCSQGTHVPPTFGGGTKLEIKRADAAPTV

(配列番号 : 25)

GATGTTGTGATGACCCAACTCCGCTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC
ATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGG
TACCTTCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGGTTT
TCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATC
AACAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAGGTACACATGTTCTCT
CCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA

(配列番号 : 26)

【0344】

2B11

重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

QVQLQQSGAELMKFGASVKISCKAIGFTTFNYFWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGTGSTNY
NEKFKGKAIFTADTSSNTAYMQLRSLTSEDSAVYYCVRYDYTSSMDYWGQGTSTVTVSS

(配列番号 : 60)

CAGGTTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAAATT
TCCTGCAAGGCTATTGGCTTACATTCAATTACTTCTGGATAGAGTGGGTAAAACAGAGG
CCTGGGCATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAGTACTAAGTAC
AATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTTCACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTAC
ATGCAACTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGCTTATTACTGTGTAAGATACGAC
TATACCTCTTCTATGGAAGTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCTCAG

(配列番号 : 61)

【0345】

軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

NIVMTQSPKSMMSVGERVTLTKASENVGTYSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPFN
RFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYYCGQSYSPWTFGGGTKLEIK

(配列番号 : 62)

AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCAAC
TTGACCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGGTACTTATGTATCCTGGTATCAACAGAAACCA
GAGCAGTCTCCTAACTACTGATATACGGGGCATCCAACCGGTACACTGGGGTCCCCAAT
CGCTTCACGGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCT
GAAGACCTTGCAAGATTATTACTGTGGACAGAGTTACAGCTATCCGTGGACGTTTCGGTGGA
GGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

(配列番号 : 63)

【0346】

4G5

重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

10

20

30

40

50

QITLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLSTSQMGVSWIRQPSGKGLEWLSHIYWDDDKR
YNPSLKSRLSISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCAPGVSSWFFPYWGPGLVTVSA

(配列番号 : 64)

CAGATTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATAFTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTG
ACTTGTTCTTCTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCTG
CAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAATGGCTGTCAACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGC
TATAACCCATCCCTGAAGAGCCGACTCTCAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTA
TTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCCCGGC
GTATCCTCATGGFTTCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAG

(配列番号 : 65)

【 0 3 4 7 】

軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

SIVMTQTPKFLPVSAGDRVTVTCKASQSVGNVAVNYQQKPGQSPKLLIYFASNRYSGVPD
RFTGSGSGTDFTFTISSVQVEDLAVYFCQOHYIFPYTFGSGTKLEIK

(配列番号 : 66)

AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCCTGTATCAGCAGGAGACAGGGTTACC
GTGACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGGGTAATTATGTAGCCTGGTACCAACAGAAGCCA
GGACAGTCTCCTAACTACTGATATACTTTGCATCCAATCGCTATAGTGGAGTCCCTGAT
CGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTTTCAACATCAGCAGTGTGCAGGTT
GAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTGCAGCAGCATATATCTTTCCGTATACGTTTCGGATCG
GGGACCAAGCTGGAAATAAAAC

(配列番号 : 67)

【 0 3 4 8 】

7B8

重鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

QVQLQQPGAELVKFGASEKLSCKASGHTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPSNGRITYY
NENFKTKATLTVDKYSSSASMQLRSLTSEDSAVYYCASDGDYVSGFAYWGQGTTTLTVSS

(配列番号 : 68)

CAGGTCCAAGTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGAGAAGCTG
TCCTGCAAGGCTTCTGGGCACACCTTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGG
CCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAACGGTCGTACTTACTAC
AATGAGAACTTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATATTCCAGCTCAGCCTCC
ATGCAACTCCGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGTGATGGT
GACTACGTCTCGGGCTTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAG

(配列番号 : 69)

【 0 3 4 9 】

軽鎖のアミノ酸およびヌクレオチド配列が下記で示されている。

DIVLTQSPGSLAVSLGQSVTISCRASESVQYSGTSLMHWYQQKPGQPPKLLIYGASNVET
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDIAMYFCQQNWKVPWTFGGGTKLEIK

(配列番号 : 70)

GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGGTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGTGTACCC
ATCTCCTGCAGAGCCAGTGAAAGTGTTCAATATTCTGGCACTAGTTTAATGCACTGGTAT
CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGGTGCATCCAACGTAGAGACT
GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
CCTGTGGAGGAGGATGATATTGCAATGTATTTCTGTGCAGCAAAATTGGAAGGTTTCCTTGG
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

10

(配列番号 : 71)

【0350】

3D1

TRIzol（登録商標）試薬の技術マニュアルに従って、クライアントによって提供された凍結ハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出した。全RNAをアガロースゲル電気泳動によって解析した。PrimeScript（商標）1st Strand cDNA Synthesis Kitの技術マニュアルに従って、アイソタイプ特異的アンチセンスプライマーまたはユニバーサルプライマーを用いて、全RNAをcDNAに逆転写した。GenScriptのRACEについての標準作業手順に従って、V_HおよびV_Lの抗体フラグメントを増幅した。

20

【0351】

増幅された抗体フラグメントを、標準的な分子クローニング手順を用いて、標準的なクローニングベクター内に別個にクローニングした。コロニーPCRスクリーニングを実施して、正しいサイズのインサートを有するクローンを同定した。正しいサイズのインサートを有する少なくとも5個の単一コロニーを、各抗体フラグメントについてシーケンシングした。

【0352】

サンプルの単離されたRNAを、1.5%アガロース/GelRed（商標）ゲルで、DNA Marker II I（Tiangen、カタログ番号MD103）と並べてランした（図52）。各サンプルの4 μlのPCR産物を、1.5%アガロース/GelRed（商標）ゲルで、DNAマーカーのMarker IIIと並べてランした（図53）。PCR産物を精製し、かつさらなる使用まで-20℃で保管した。

30

【0353】

正しいV_HおよびV_Lインサートサイズを有する5個の単一コロニーをシーケンシングに送った。5個の異なるクローンのV_HおよびV_L遺伝子（配列に関しては添付のファイル、および詳細に関しては配列アラインメントを参照されたい）は、ほぼ同一であることが見出された。下記で列挙されるコンセンサス配列は、ハイブリドーマ441.3.3D1.D6.D11.B1.F10によって産生された抗体の配列であると思われる（抗Muc-1）。

【0354】

重鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列が下記で示されている。

40

CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATT
TCCTGCAAGACTTCTGGCTATGCATTCAGTAACTTCTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGG
CCTGGACAGGGTCTAGAGTGGATTGGACAGATTTATCCTGGAGATGGTGACACTAACTAC
AATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTAC
ATGCAGCTCAGCAGTCTAACATCTGAGGCCTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGGTCCTAC
TATAGGTCGGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCTCTGTCTCTGCA

(配列番号 : 72)

10

QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKTSGYAFSNFWMNWVKQRPQGLEWIGQIYPGDGDTNY
NGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEASAVYFCARSYYRSAWFAYWGQGLVSVSA

(配列番号 : 73)

【 0 3 5 5 】

重鎖のヌクレオチドおよびアミノ酸配列が下記で示されている。

GACATCTTGCTAACTCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCAGT
TTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGCATTTGGCACAAGCATACACTGGTATCAGCAAAGAACA
AATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAAGTATGCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCTTCC
AGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGAGTCT
GAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATAACTGGCCACTCACGTTTCGGTGCT
GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

20

(配列番号 : 74)

DILLTQSPAILSVPGERVSFSCRASQSIGTSIHWYQORTNGSPRLLIKYASESISGIPS
RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNNWPLTFGAGTKLELK

(配列番号 : 75)

30

【 0 3 5 6 】

本明細書において開示されかつ主張される組成物および方法のすべては、本開示に照らして、過度の実験なしになされ得かつ遂行され得る。本発明の組成物および方法は、好ましい態様の観点から記載されているものの、本発明の概念、精神、および範囲から逸脱することなく、本明細書において記載される組成物および方法に、ならびに方法の工程または工程の配列において、変動が適用され得ることは当業者に明らかであろう。より具体的には、両方とも化学的かつ生理学的に関連しているある特定の作用物質を、本明細書において記載される作用物質の代わりに置換し得ると同時に、同じまたは同様の結果が達成されるであろうことは明らかであろう。当業者に明らかであるそのようなすべての同様の代用物および改変は、添付の特許請求の範囲によって規定される、本発明の精神、範囲、および概念の内にあると見なされる。

40

【 0 3 5 7 】

VII. 参考文献

以下の参考文献は、それらが、本明細書において示されるものに対して補足的である例示的な手順の詳細または他の詳細を提供する程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

U.S. Patent 3,817,837
U.S. Patent 3,850,752
U.S. Patent 3,939,350
U.S. Patent 3,996,345
U.S. Patent 4,196,265
U.S. Patent 4,275,149
U.S. Patent 4,277,437
U.S. Patent 4,366,241
U.S. Patent 4,472,509
U.S. Patent 4,554,101
U.S. Patent 4,680,338
U.S. Patent 4,683,202
U.S. Patent 4,684,611
U.S. Patent 4,816,567
U.S. Patent 4,867,973
U.S. Patent 4,879,236
U.S. Patent 4,938,948
U.S. Patent 4,952,500
U.S. Patent 5,021,236
U.S. Patent 5,141,648
U.S. Patent 5,196,066
U.S. Patent 5,217,879
U.S. Patent 5,302,523
U.S. Patent 5,322,783
U.S. Patent 5,384,253
U.S. Patent 5,464,765
U.S. Patent 5,506,138
U.S. Patent 5,538,877
U.S. Patent 5,538,880

10

20

30

U.S. Patent 5,550,318	
U.S. Patent 5,563,055	
U.S. Patent 5,563,250	
U.S. Patent 5,565,332	
U.S. Patent 5,580,859	
U.S. Patent 5,589,466	
U.S. Patent 5,610,042	
U.S. Patent 5,656,610	10
U.S. Patent 5,670,488	
U.S. Patent 5,702,932	
U.S. Patent 5,736,524	
U.S. Patent 5,739,018	
U.S. Patent 5,780,448	
U.S. Patent 5,789,215	
U.S. Patent 5,824,544	20
U.S. Patent 5,830,725	
U.S. Patent 5,849,304	
U.S. Patent 5,851,826	
U.S. Patent 5,856,456	
U.S. Patent 5,858,744	
U.S. Patent 5,871,982	
U.S. Patent 5,871,983	
U.S. Patent 5,871,986	30
U.S. Patent 5,879,934	
U.S. Patent 5,880,270	
U.S. Patent 5,888,502	
U.S. Patent 5,925,565	
U.S. Patent 5,928,906	
U.S. Patent 5,932,210	
U.S. Patent 5,935,819	40
U.S. Patent 5,945,100	
U.S. Patent 5,955,331	
U.S. Patent 5,981,274	
U.S. Patent 5,994,136	

- U.S. Patent 5,994,624
- U.S. Patent 6,013,516
- U.S. Patent Serial No. 12/789,127
- U.S. Patent Serial No. 13/026,858
- U.S. Patent Serial No. 13/045,033
- “Antibodies: A Laboratory Manual,” Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.
- Abbondanzo *et al.*, *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 12(4), 480-489, 1990. 10
- Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1), 107-113, 1990.
- Almendro *et al.*, *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.
- Amado and Chen, *Science*, 285(5428):674-676, 1999.
- Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987a.
- Angel *et al.*, *Cell*, 49:729, 1987b.
- Armentano *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87(16):6141-6145, 1990.
- Atchison and Perry, *Cell*, 46:253, 1986. 20
- Atchison and Perry, *Cell*, 48:121, 1987.
- Atherton *et al.*, *Biol. of Reproduction*, 32, 155-171, 1985.
- Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- Baldus *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 10(8):2790-2796, 2004.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 27:299, 1981.
- Banerji *et al.*, *Cell*, 33(3):729-740, 1983.
- Bates, *Mol. Biotechnol.*, 2(2):135-145, 1994. 30
- Batra *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 21(2):238-245, 1999.
- Battraw and Hall, *Theor. App. Genet.*, 82(2):161-168, 1991.
- Beidler *et al.*, *J. Immunol.*, 141(11):4053-4060, 1988.
- Berkhout *et al.*, *Cell*, 59:273-282, 1989.
- Bett *et al.*, *J. Virology*, 67(10):5911-5921, 1993.
- Bhattacharjee *et al.*, *J. Plant Bioch. Biotech.*, 6(2):69-73. 1997.
- Bilbao *et al.*, *FASEB J.*, 11(8):624-634, 1997. 40
- Blackwell *et al.*, *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 125(8):856-863, 1999.
- Blonar *et al.*, *EMBO J.*, 8:1139, 1989.
- Blomer *et al.*, *J. Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997.
- Bodine and Ley, *EMBO J.*, 6:2997, 1987.

- Boshart *et al.*, *Cell*, 41:521, 1985.
- Bosze *et al.*, *EMBO J.*, 5(7):1615-1623, 1986.
- Braddock *et al.*, *Cell*, 58:269, 1989.
- Brown *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 12:130(1), :111-121, 1990.
- Bulla and Siddiqui, *J. Virol.*, 62:1437, 1986.
- Campbell and Villarreal, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1993, 1988.
- Campbell, In: *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 13, Burden and Von Knippenberg, Eds. pp. 75-83, 10
Amsterdam, Elsevier, 1984.
- Campere and Tilghman, *Genes and Dev.*, 3:537, 1989.
- Campo *et al.*, *Nature*, 303:77, 1983.
- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
- Caplen *et al.*, *Gene Ther.*, 6(3):454-459, 1999.
- Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
- Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(6):2988-2993, 1999. 20
- Celander and Haseltine, *J. Virology*, 61:269, 1987.
- Celander *et al.*, *J. Virology*, 62:1314, 1988.
- Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
- Chang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2153, 1989.
- Chatterjee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9114, 1989.
- Chen and Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Chillon *et al.*, *J. Virol.*, 73(3):2537-2540, 1999.
- Choi *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262(2):151-167, 1996. 30
- Christou *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(12):3962-3966, 1987.
- Clay *et al.*, *J. Immunol.*, 162:1749, 1999.
- Cocca, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Coffey *et al.*, *Science*, 282(5392):1332-1334, 1998.
- Cohen *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 5:75, 1987.
- Costa *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:81-90, 1988.
- Cripe *et al.*, *EMBO J.*, 6:3745, 1987. 40
- Culotta and Hamer, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1376-1380, 1989.
- D'Halluin *et al.*, *Plant Cell*, 4(12):1495-1505, 1992.
- Dandolo *et al.*, *J. Virology*, 47:55-64, 1983.
- De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.* 23(2), 165-179, 1993.

- DeLuca *et al.*, *J. Virol.*, 56(2):558-570, 1985.
- Derby *et al.*, *Hear Res*, 134(1-2):1-8, 1999.
- Deschamps *et al.*, *Science*, 230:1174-1177, 1985.
- Dholakia *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264, 20638-20642, 1989.
- Doolittle and Ben-Zeev, *Methods Mol. Biol.*, 109, :215-237, 1999.
- Dorai *et al.*, *Int. J. Cancer*, 82(6):846-52, 1999.
- Duraisamy *et al.*, *Gene*, 373:28-34, 2006.
- Edbrooke *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:1908-1916, 1989. 10
- Edlund *et al.*, *Science*, 230:912-916, 1985.
- Engel and Kohn, *Front Biosci*, 4:e26-33, 1999.
- EP Application 125,023
- EP Application 171,496
- EP Application 173,494
- EP Application 184,187
- EPO 0273085 20
- Fechheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Feldman *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 32(2):194-207, 1996.
- Feldman *et al.*, *Semin. Interv. Cardiol.*, 1(3):203-208, 1996.
- Feng and Holland, *Nature*, 334:6178, 1988.
- Feng *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):866-870, 1997.
- Firak and Subramanian, *Mol. Cell. Biol.*, 6:3667, 1986.
- Fisher *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7(17):2079-2087, 1996.
- Foecking and Hofstetter, *Gene*, 45(1):101-105, 1986. 30
- Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- Fujita *et al.*, *Cell*, 49:357, 1987.
- Fujiwara and Tanaka, *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 99(7):463-468, 1998.
- Garoff and Li, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 9(5):464-469, 1998.
- Garrido *et al.*, *J. Neurovirol.*, 5(3):280-288, 1999.
- Gefter *et al.*, *Somatic Cell Genet.*, 3:231-236, 1977.
- Gendler *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:12820-12823, 1988. 40
- Ghosh and Bachhawat, In: *Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands*, Wu *et al.* (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87-104, 1991.
- Gillies *et al.*, *Cell*, 33:717, 1983.
- Gloss *et al.*, *EMBO J.*, 6:3735, 1987.

- Gnant *et al.*, *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.
- Gnant *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(20):1744-1750, 1999.
- Godbout *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:1169, 1988.
- Goding, *In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, 60-61, 65-66, 71-74, 1986.
- Goodbourn and Maniatis, *Cell*, 41(2):509-520, 1985.
- Goodbourn *et al.*, *Cell*, 45:601, 1986.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985. 10
- Graham and Prevec, *Mol Biotechnol*, 3(3):207-220, 1995.
- Graham and Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Greene *et al.*, *Immunology Today*, 10:272, 1989.
- Grosschedl and Baltimore, *Cell*, 41:885, 1985.
- Gulbis and Galand, *Hum. Pathol.* 24(12), 1271-1285, 1993.
- Haecker *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 7(15):1907-1914, 1996.
- Han *et al.*, *J. Infect. Dis.*, 179:230-233, 1999. 20
- Harland and Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- Haslinger and Karin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:8572, 1985.
- Hauber and Cullen, *J. Virology*, 62:673, 1988.
- Hayashi *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 267(1):37-40, 1999.
- He *et al.*, *Plant Cell Reports*, 14 (2-3):192-196, 1994.
- Hen *et al.*, *Nature*, 321:249, 1986.
- Hensel *et al.*, *Lymphokine Res.*, 8:347, 1989.
- Hermens and Verhaagen, *Prog. Neurobiol.*, 55(4):399-432, 1998. 30
- Herr and Clarke, *Cell*, 45:461, 1986.
- Hirochika *et al.*, *J. Virol.*, 61:2599, 1987.
- Hirsch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1959, 1990.
- Holbrook *et al.*, *Virology*, 157:211, 1987.
- Holzer *et al.*, *Virology*, 253(1):107-114, 1999.
- Horlick and Benfield, *Mol. Cell. Biol.*, 9:2396, 1989.
- Hou and Lin, *Plant Physiology*, 111:166, 1996. 40
- Howard *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 880:352-365, 1999.
- Huang *et al.*, *Cell*, 27:245, 1981.
- Huard *et al.*, *Neuromuscul Disord*, 7(5):299-313, 1997.
- Hug *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:3065-3079, 1988.

- Hwang *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:585, 1990.
- Imagawa *et al.*, *Cell*, 51:251, 1987.
- Imai *et al.*, *Nephrologie*, 19(7):397-402, 1998.
- Imbra and Karin, *Nature*, 323:555, 1986.
- Imler *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:2558, 1987.
- Imperiale and Nevins, *Mol. Cell. Biol.*, 4:875, 1984.
- Irie *et al.*, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 9(4):341-349, 1999.
- Jakobovits *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2555, 1988. 10
- Jameel and Siddiqui, *Mol. Cell. Biol.*, 6:710, 1986.
- Jaynes *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:62, 1988.
- Johnson *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9(8):3393-3399, 1989.
- Johnston *et al.*, *J. Virol.*, 73(6):4991-5000, 1999.
- Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525, 1986.
- Kadesch and Berg, *Mol. Cell. Biol.*, 6:2593, 1986.
- Kaepler *et al.*, *Plant Cell Rep.*, 8:415-418, 1990. 20
- Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Karin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:606, 1987.
- Katinka *et al.*, *Cell*, 20:393, 1980.
- Katinka *et al.*, *Nature*, 290:720, 1981.
- Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kaufman *et al.*, *Arch. Ophthalmol.*, 117(7):925-928, 1999.
- Kawamoto *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:267, 1988. 30
- Kay, *Haemophilia*, 4(4):389-392, 1998.
- Khatoon *et al.*, *Ann. of Neurology*, 26, 210-219, 1989.
- Kiledjian *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:145, 1988.
- King *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269, 10210-10218, 1989.
- Kinlough *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279(51):53071-53077, 2004.
- Kinoshita *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394:205-210, 2010.
- Klamut *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:193, 1990. 40
- Klimatcheva *et al.*, *Front Biosci*, 4:D481-496, 1999.
- Koch *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:303, 1989.
- Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 6, 511-519, 1976.
- Kohler and Milstein, *Nature*, 256, 495-497, 1975.

- Kohut *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 275(6Pt1):L1089-1094, 1998.
- Kooby *et al.*, *FASEB J*, 13(11):1325-34, 1999.
- Kraus *et al.* *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kriegler and Botchan, *Mol. Cell. Biol.*, 3:325, 1983.
- Kriegler *et al.*, *Cell*, 38:483, 1984a.
- Kriegler *et al.*, In: *Cancer Cells 2/Oncogenes and Viral Genes*, Van de Woude *et al.* eds, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1984b.
- Krisky *et al.*, *Gene Ther*, 5(11):1517-1530, 1998a. 10
- Krisky *et al.*, *Gene Ther*, 5(12):1593-1603, 1998b.
- Kuhl *et al.*, *Cell*, 50:1057, 1987.
- Kunz *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1121, 1989.
- Kyte and Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.
- Lachmann and Efsthathiou, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 1(5):622-632, 1999..
- Lareyre *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.
- Larsen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:8283, 1986. 20
- Laspia *et al.*, *Cell*, 59:283, 1989.
- Latimer *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:760, 1990.
- Lazzeri, *Methods Mol. Biol.*, 49:95-106, 1995.
- Lee *et al.*, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13(1):54-59, 1989.
- Lee *et al.*, *Nature*, 294:228, 1981.
- Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 12:4191-206, 1984.
- Lee *et al.*, *DNA Cell Biol.*, 16(11):1267-1275, 1997.
- Leibowitz *et al.*, *Diabetes*, 48(4):745-753, 1999. 30
- Lesch, *Biol Psychiatry*, 45(3):247-253, 1999.
- Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.
- Li *et al.*, *Cancer Biol. Ther.*, 2:187-193, 2003b.
- Lin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 10:850, 1990.
- Lundstrom, *J. Recept Signal Transduct. Res.*, 19(1-4):673-686, 1999.
- Luria *et al.*, *EMBO J.*, 6:3307, 1987.
- Lusky and Botchan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:3609, 1986. 40
- Lusky *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1108, 1983.
- Macejak and Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Majors and Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:5866, 1983.
- Marienfeld *et al.*, *Gene Ther.*, 6(6):1101-1113, 1999.

- Mastrangelo *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 65(3):298-305, 1999.
- McNeall *et al.*, *Gene*, 76:81, 1989.
- Miksicek *et al.*, *Cell*, 46:203, 1986.
- Miller *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264:11-16, 1993.
- Miyatake *et al.*, *Gene Ther.*, 6:564-572, 1999.
- Moldawer *et al.*, *Shock*, 12(2):83-101, 1999.
- Mordacq and Linzer, *Genes and Dev.*, 3:760, 1989.
- Moreau *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9:6047, 1981. 10
- Moriuchi *et al.*, *Cancer Res*, 58(24):5731-5737, 1998.
- Morrison *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 78(Pt 4):873-878, 1997.
- Morrison, *Science*, 229(4719):1202-1207, 1985.
- Muesing *et al.*, *Cell*, 48:691, 1987.
- Nakamura *et al.*, In: *Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems*, Chapter 27, 1987.
- Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996. 20
- Neuberger *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 16(14B):6713-6724, 1988.
- Neumann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(16):9345-9350, 1999.
- Ng *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 17:601, 1989.
- Nicolau and Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
- Nicolau *et al.*, *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.
- Nomoto *et al.*, *Gene*, 236(2):259-271, 1999.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Omitz *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3466, 1987. 30
- Ondek *et al.*, *EMBO J.*, 6:1017, 1987.
- O'Shannessy *et al.*, *J. Immun. Meth.*, 99, 153-161, 1987.
- Owens and Haley, *J. Biol. Chem.*, 259, 14843-14848, 1987.
- Palmiter *et al.*, *Cell*, 29:701, 1982.
- Parks *et al.*, *J. Virol.*, 71(4):3293-8, 1997.
- PCT Application PCT/US86/02269
- PCT Application WO 86/01533 40
- PCT Appln. WO 92/17598
- PCT Appln. WO 94/09699
- PCT Appln. WO 95/06128
- Pech *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:396, 1989.

- Pelletier and Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- Perales *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:4086-4090, 1994.
- Perez-Stable and Constantini, *Mol. Cell. Biol.*, 10:1116, 1990.
- Petrof, *Eur Respir J*, 11(2):492-497, 1998.
- Picard and Schaffner, *Nature*, 307:83, 1984.
- Pinkert *et al.*, *Genes and Dev.*, 1:268, 1987.
- Ponta *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:1020, 1985.
- Posner *et al.*, *Hybridoma* 6, 611-625, 1987. 10
- Potrykus *et al.*, *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-177, 1985.
- Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- Potter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165, 1984.
- Queen and Baltimore, *Cell*, 35:741, 1983.
- Quinn *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4713, 1989.
- Rabinovitch *et al.*, *Diabetes*, 48(6):1223-1229, 1999.
- Reddy *et al.*, *Virology*, 251(2):414-26, 1998. 20
- Redondo *et al.*, *Science*, 247:1225, 1990.
- Reisman and Rotter, *Mol. Cell. Biol.*, 9:3571, 1989.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., 33:624-652, 1990.
- Resendez Jr. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:4579, 1988.
- Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 55:121-131, 1995.
- Rippe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9(5):2224-2227, 1989.
- Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rittling *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:1619, 1989. 30
- Robbins and Ghivizzani, *Pharmacol Ther*, 80(1):35-47, 1998.
- Robbins *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 16(1):35-40, 1998.
- Sambrook *et al.*, In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sawai *et al.*, *Mol. Genet. Metab.*, 67(1):36-42, 1999.
- Schaffner *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 201:81, 1988.
- Searle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1480, 1985. 40
- Sharp and Marciniak, *Cell*, 59:229, 1989.
- Shaul and Ben-Levy, *EMBO J.*, 6:1913, 1987.
- Shaw *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80(19):1553-1559, 1988.
- Sherman *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:50, 1989.

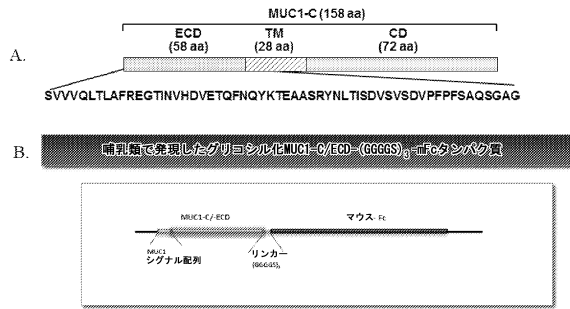
- Sleigh and Lockett, *J. EMBO*, 4:3831, 1985.
- Smith *et al.*, *Neuron.*, 20:1093-1102, 1998.
- Spalholz *et al.*, *Cell*, 42:183, 1985.
- Spandau and Lee, *J. Virology*, 62:427, 1988.
- Spandidos and Wilkie, *EMBO J.*, 2:1193, 1983.
- Stephens and Hentschel, *Biochem. J.*, 248:1, 1987.
- Stewart *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 365:71-74; 1999.
- Stuart *et al.*, *Nature*, 317:828, 1985. 10
- Sullivan and Peterlin, *Mol. Cell. Biol.*, 7:3315, 1987.
- Sun *et al.*, *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
- Suzuki *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 252(3):686-90, 1998.
- Swartzendruber and Lehman, *J. Cell. Physiology*, 85:179, 1975.
- Takebe *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:466, 1988.
- Tavernier *et al.*, *Nature*, 301:634, 1983.
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:165, 1990a. 20
- Taylor and Kingston, *Mol. Cell. Biol.*, 10:176, 1990b.
- Taylor *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:15160, 1989.
- Thiesen *et al.*, *J. Virology*, 62:614, 1988.
- Timiryasova *et al.*, *Int. J. Oncol.*, 14(5):845-854, 1999.
- Treisman, *Cell*, 42:889, 1985.
- Tronche *et al.*, *Mol. Biol. Med.*, 7:173, 1990.
- Tronche *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 9:4759, 1989.
- Trudel and Constantini, *Genes and Dev.*, 6:954, 1987. 30
- Tsukada *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 30(4):599-604, 1989.
- Tsumaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-22864, 1998.
- Tur-Kaspa *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 6:716-718, 1986.
- Tyndall *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 9:6231, 1981.
- Vanderkwaak *et al.*, *Gynecol Oncol*, 74(2):227-234, 1999.
- Vasseur *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1068, 1980.
- Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239(4847):1534-1536, 1988. 40
- Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(9):3410-3414, 1990.
- Wang and Calame, *Cell*, 47:241, 1986.
- Wang *et al.*, *Infect. Immun.*, 66:4193-202, 1998.
- Wawrzynczak & Thorpe, *Cancer Treat Res.*, 37:239-51, 1988.

- Weber *et al.*, *Cell*, 36:983, 1984.
- Wei *et al.*, *Cancer Cell*, 7:167-178, 2005.
- Weihl *et al.*, *Neurosurgery*, 44(2):239-252, 1999.
- Wen *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278:38029-38039, 2003.
- White *et al.* *J. Virol.*, 73(4):2832-2840, 1999.
- Wilson, *J. Clin. Invest.*, 98(11):2435, 1996.
- Winoto and Baltimore, *Cell*, 59:649, 1989.
- Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wood *et al.*, *J. Clin. Lab. Immunol.*, 17(4):167-171, 1985.
- Wu and Wu, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 12:159-167, 1993.
- Wu and Wu, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432, 1987.
- Wu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233(1):221-226, 1997.
- Wu *et al.*, *Cancer Res.*, 58(8): 1605-8, 1998.
- Yamada *et al.*, *Brain Res.*, 833(2):302-307, 1999.
- Yeung *et al.*, *Gene Ther.*, 6(9):1536-1544, 1999.
- Yoon *et al.*, *J. Gastrointest. Surg.*, 3(1):34-48, 1999.
- Yutzey *et al.* *Mol. Cell. Biol.*, 9:1397, 1989.
- Zhao-Emonet *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.
- Zheng *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 80(Pt 7):1735-1742, 1999.
- Zhou *et al.*, *Nature*, 361(6412):543-547, 1993.
- Zufferey *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 15(9):871-875, 1997.

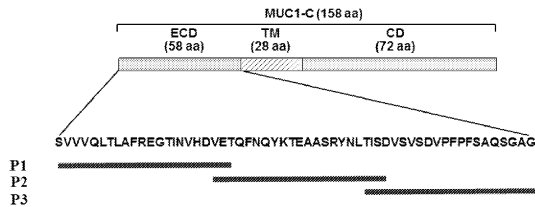
10

20

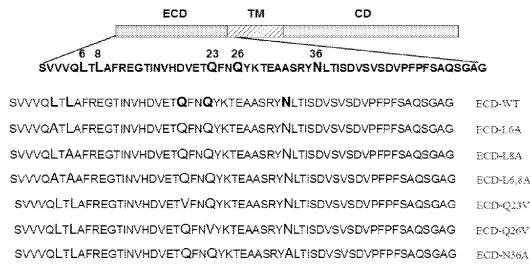
【図 1】



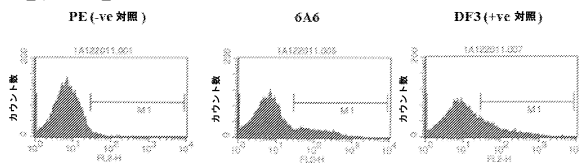
【図 3】



【図 4】



【図 9】



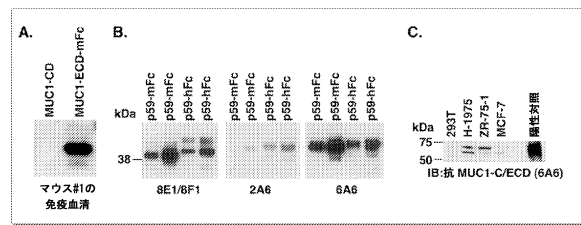
【図 10】

	8E1	6A6	DF3
U266	96.4	98.2	96.7
MOLM-14	71.4	72.5	99.5
Mv4-11	N/D	96.0	88.2
RPMI-8226	N/D	89.4	N/D
AML 原発性細胞			
ME-559203		69.5	
RG-563999		68.3	

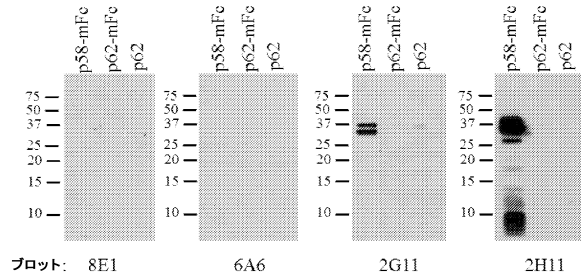
【図 11】

	8E1	6A6
K562/C-siRNA	34.4	40.6
K562/MUC1-siRNA	6.3	17.0

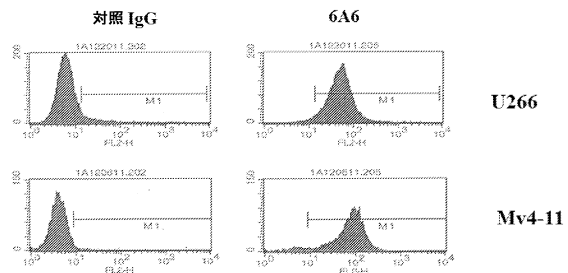
【図 6】



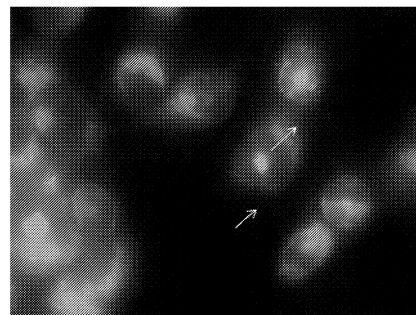
【図 7】



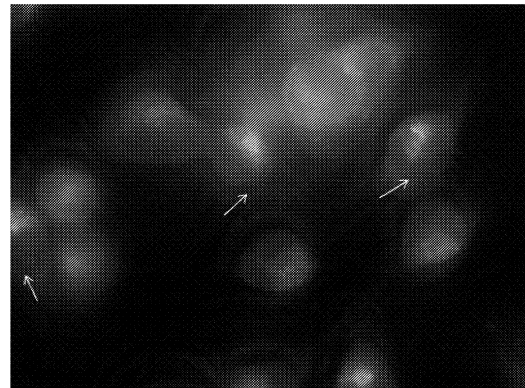
【図 8】



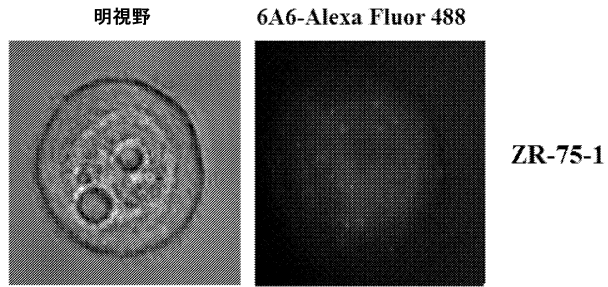
【図 12】



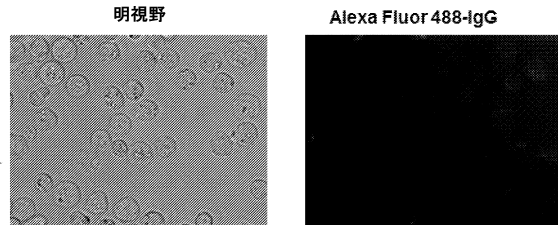
【図 13】



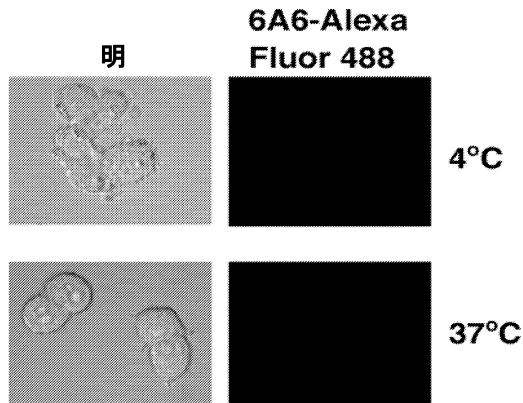
【図 14】



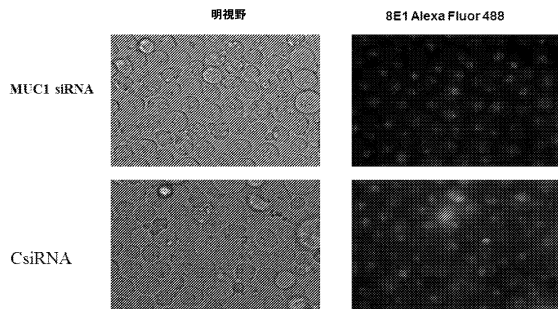
【図 16】



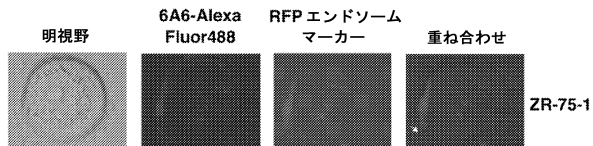
【図 15】



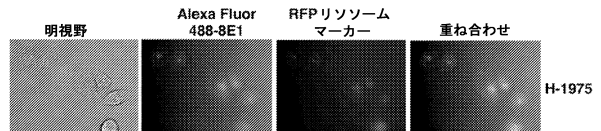
【図 17】



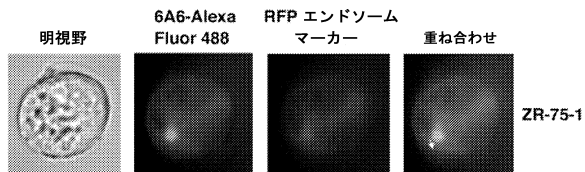
【図 18】



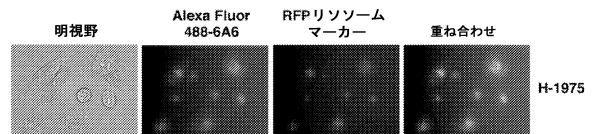
【図 22】



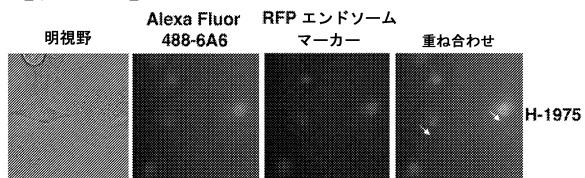
【図 19】



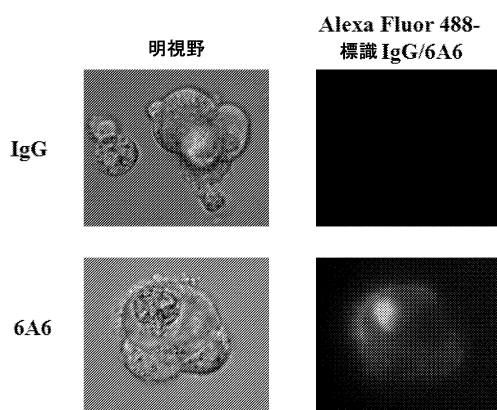
【図 23】



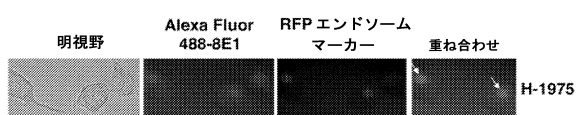
【図 20】



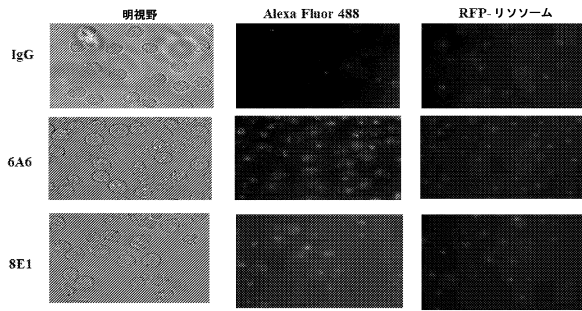
【図 24】



【図 21】



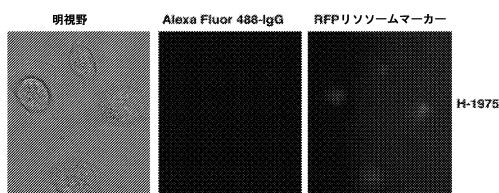
【図 25】



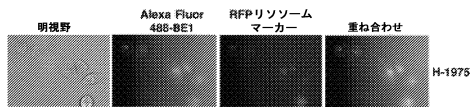
【図 26】



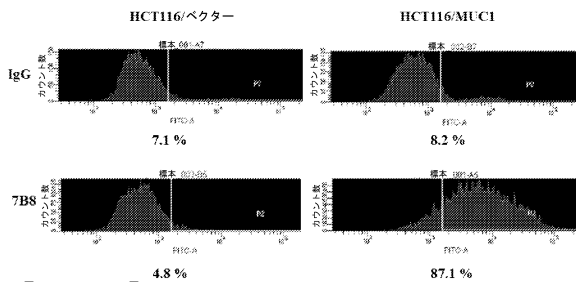
【図 27】



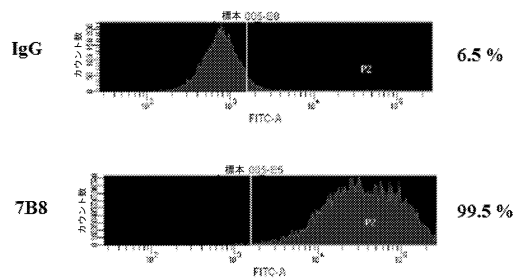
【図 28】



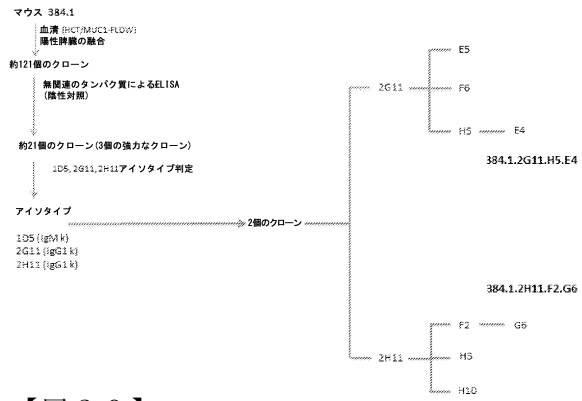
【図 31】

HCT116 結腸癌腫細胞

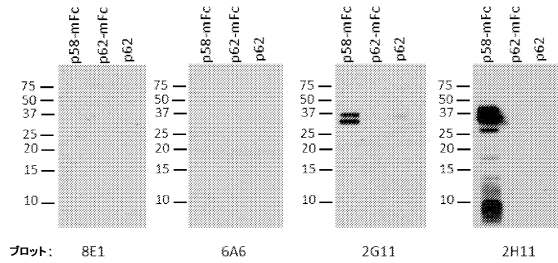
【図 32】

ZR-75-1 乳癌腫細胞

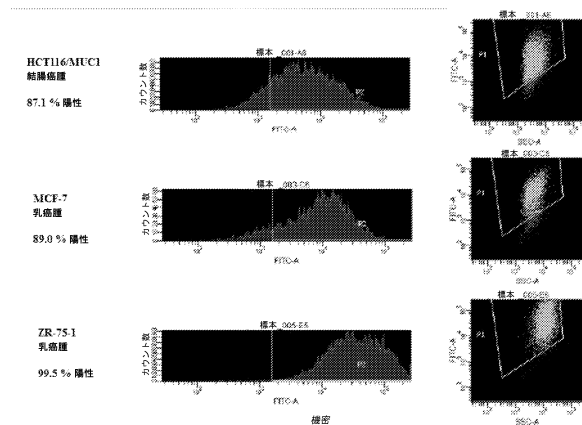
【図 29】



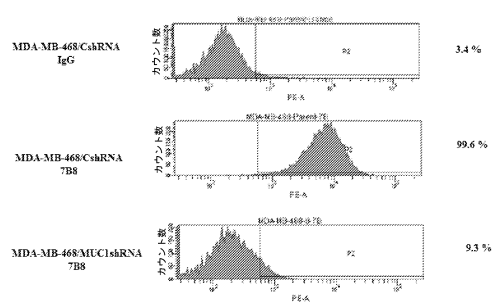
【図 30】



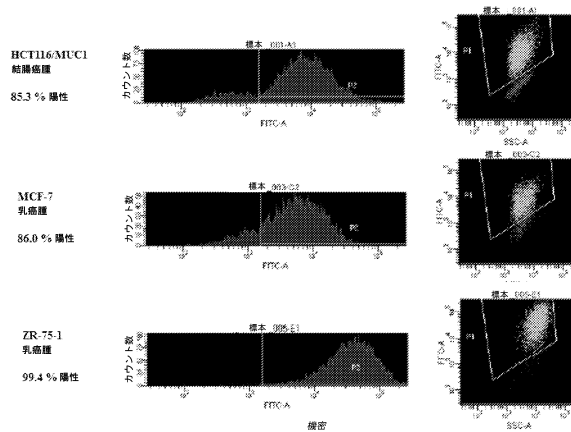
【図 33】



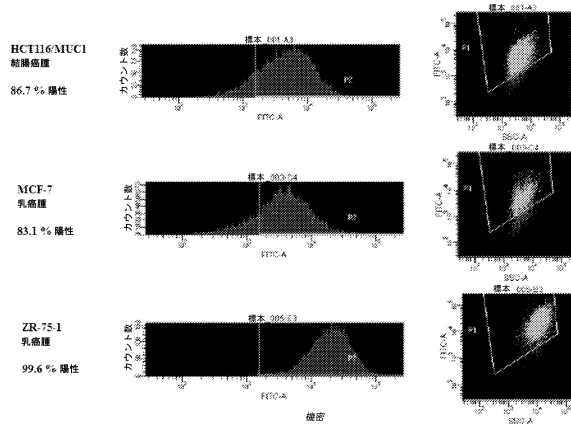
【図 34】

MDA-MB-468 三重陰性乳癌腫細胞
ノックダウンモデル

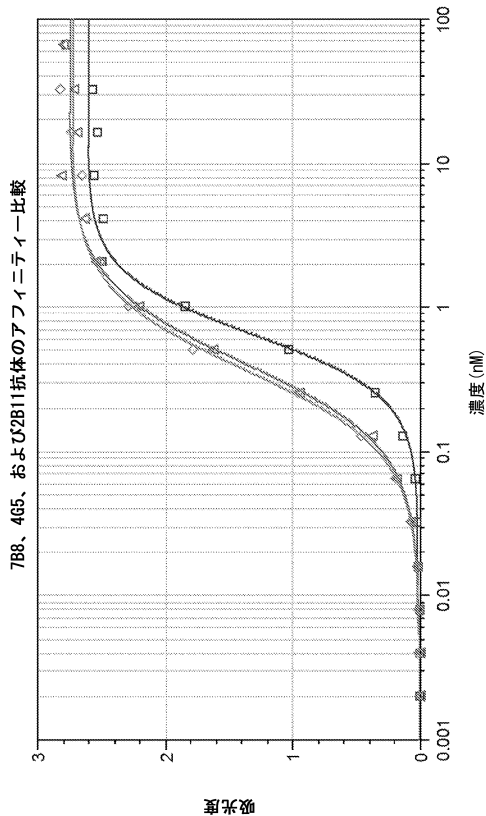
【図 35】



【図 36】



【図 38】



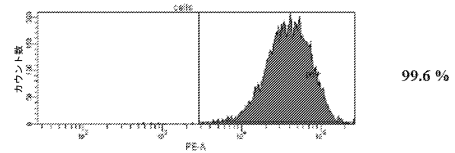
	R ²	D	C	B	A
7B8抗体(7B8抗体:濃度対 Me...)	0.997	2.61	0.651	2.03	0.0119
4G5抗体(4G5抗体:濃度対 Me...)	0.999	2.75	0.412	1.51	0.00427
2B11抗体(2B11抗体:濃度対 ...)	0.999	2.73	0.37	1.54	0.00798

4-PL fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

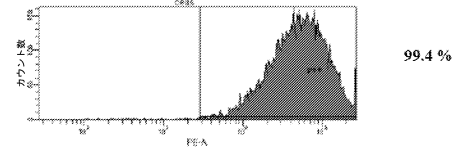
【図 37】

HCT-116 結腸癌腫細胞

野生型



CQC→AQA



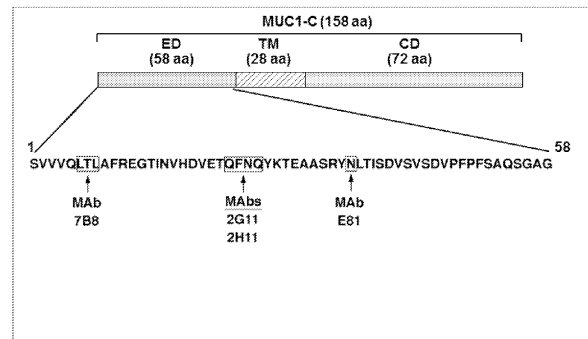
【図 39】

抗MUC1-C/ECDMAb

	クローン	ELISA	ウェスタン	フロー	IHC	内在化
7B8	+	+	+	+	+	ND
4G5	+	+	+	+	ND	ND
2B11	+	+	+	+	ND	ND

ND: 未判定

【図 40】



【図 41】

2B11

CDR-H1	G F T F N Y F W I E
CDR-H2	E I L P G T G S T N Y N E K F K G
CDR-H3	Y D Y T S S M D Y
CDR-L1	C K A S E N V G T Y V S
CDR-L2	G A S N R Y T
CDR-L3	G Q S Y S Y P W T

【図 4 2】

4G5

CDR-H1 G F S L S T S G M G V S
 CDR-H2 H I Y W D D D K R Y N P S L K S
 CDR-H3 G V S S W F P Y

CDR-L1 C K A S Q S V G N Y V A
 CDR-L2 F A S N R Y S
 CDR-L3 Q Q H Y I F P Y T

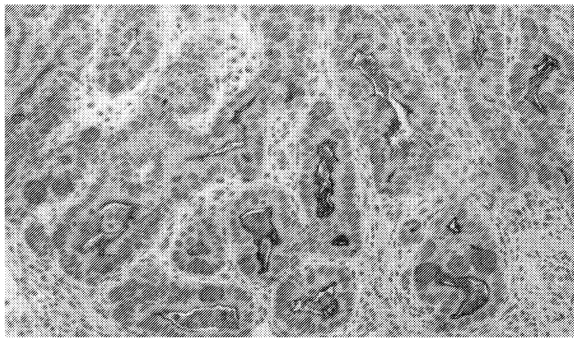
【図 4 3】

7B8

CDR-H1 G H T F T S Y W M H
 CDR-H2 E I N P S N G R T Y Y N E N F K T
 CDR-H3 D G D Y V S G F A Y

CDR-L1 C R A S E S V Q Y S G T S L M H
 CDR-L2 G A S N V E T
 CDR-L3 Q Q N W K V P W T

【図 4 4】



【図 4 6】

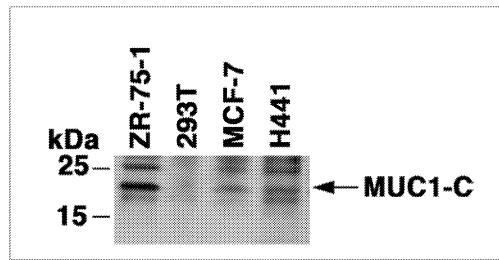
・線状エピトープマッピング



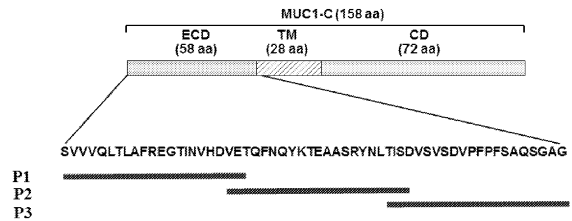
・ペプチド反応性なし

Mab : 2B11, 4G5 および 7B8

【図 4 5】

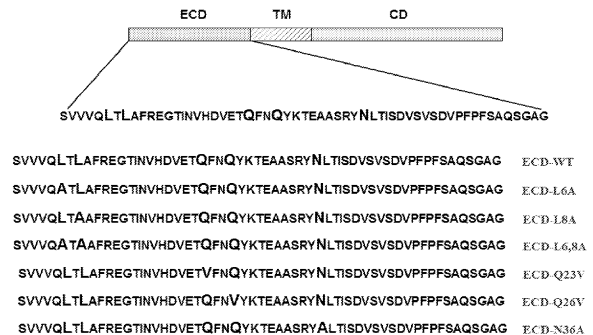


【図 4 7】



ELISAアッセイにおいて、3種のペプチドのいずれも、
 MUC1-C/ECDタンパク質との7B8群および3D1 Mabの反応性を遮断しない

【図 4 8 A】

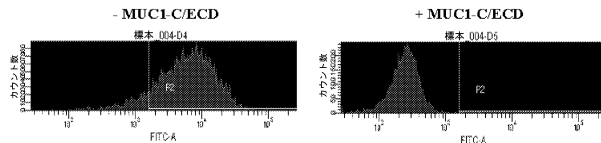


【図 48 B】



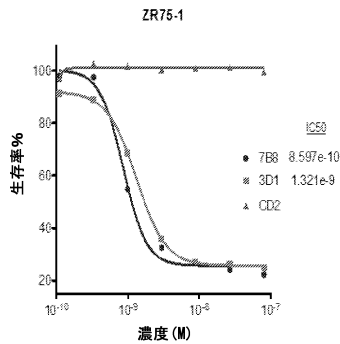
Mab/コーティングされたタンパク質	MUC1-C/ECD	MUC1-C/ECD (D19E)
7B8	3.064	3.054
3D1	3.087	3.075
CD(-)ve 制御	0.064	0.065

【図 49】

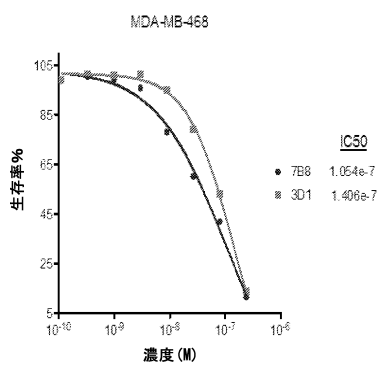


タンパク質	抗体	P1 割合	MFI
-	CD1	1.2	5082
-	DF3 (+ve)	88.1	16317
-	7B8	95.1	13290
-	3D1	89.8	7087
MUC1-C/ECD タンパク質	3D1	0.1	2430

【図 51 A】



【図 51 B】



【図 50】

重鎖: アミノ酸配列 (138AA)

リーダー配列 - FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

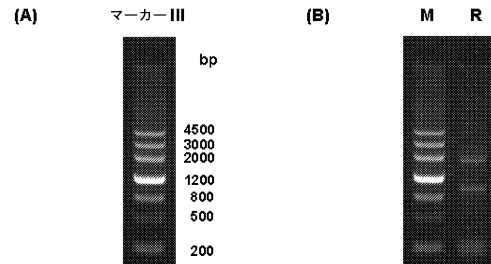
MEWPCIFLLSVTEGVHSQVQLQSGAELVRFPGSSVKISCKTSGYAFSNFWMNWNWKQRPQGGLWIGQIYP
GDGDTNYNGKEFGKATLTADKSSTAYNQLSSLTSEASAVYFCARSYRSAAWYWGQGTLYVSA

軽鎖: アミノ酸配列 (127AA)

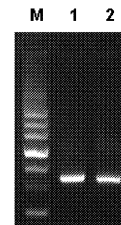
リーダー配列 - FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

MYSTPQFLVLLFWIPASRGDILLTQSPAILSVSPGERVYSCRSQSIGTSHWYQQRTNGSPRLLIKVASISIGI
PSRFGSGSGTDFTLINSVSEDIADYVYCOQSNWPLTFGAGTKLEK

【図 52】



【図 53】



【配列表】

0006908381000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 E

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 45/00

(74)代理人 100102118

弁理士 春名 雅夫

(74)代理人 100160923

弁理士 山口 裕孝

(74)代理人 100119507

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 クーフェ ドナルド ダブリュ.

アメリカ合衆国 0 2 4 8 2 マサチューセッツ州 ウェルズリー グローブ ストリート 1 7 9

(72)発明者 カルバンダ スレンダー

アメリカ合衆国 0 1 7 6 0 マサチューセッツ州 ナティック ジャクリン サークル 8

審査官 佐藤 巖

(56)参考文献 特表2012-504961 (JP, A)

特表2006-502110 (JP, A)

特表2004-515472 (JP, A)

MAHANTA, S. et al., PLOS One, 2008年, Vol.3, No.4, e2054(pp.1-12)

KUFU, D.W., Oncogene, 2013年, Vol.32, No.9, pp.1073-1081

WEINER, L.M. et al., Cell, 2012年, Vol.148, pp.1081-1084

CHAMES, P. and BATY, D., mAbs, 2009年, Vol.1, No.6, pp.539-547

STONE, J.D. et al., OncoImmunology, 2012年, Vol.1, No.6, pp.863-873

MAHER, J. and WILKIE, S., Cancer Res., 2009年, Vol.69, No.11, pp.4559-4562

WILKIE, S. et al., J. Immunol., 2008年, Vol.180, pp.4901-4909

WIENS, G.D. et al., J. Immunol., 1997年, Vol.159, pp.1293-1302

HILKENS, J. and BOER, M., Tumor Biol., 1998年, Vol.19, Suppl.1, pp.67-70

RUBINSTEIN, D.B. et al., Cancer Res., 2006年, Vol.66, No.23, pp.11247-11253

NATH, S. and MUKHERJEE, P., Trends Mol. Med. , 2014年, pp.332-342

PANCHAMOORTHY, G. et al., JCI Insight, 2018年, Vol.3, No.12, e99880(pp.1-11)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

UniProt/GeneSeq

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)