

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6577872号
(P6577872)

(45) 発行日 令和1年9月18日 (2019.9.18)

(24) 登録日 令和1年8月30日 (2019.8.30)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 Z N A D

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

C 0 7 K 16/18 (2006.01)

A 6 1 K 48/00

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 0 7 K 16/18

請求項の数 4 (全 90 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-558975 (P2015-558975)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月20日 (2014.2.20)
 (65) 公表番号 特表2016-514099 (P2016-514099A)
 (43) 公表日 平成28年5月19日 (2016.5.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/017515
 (87) 国際公開番号 W02014/130741
 (87) 国際公開日 平成26年8月28日 (2014.8.28)
 審査請求日 平成29年2月6日 (2017.2.6)
 (31) 優先権主張番号 61/767,206
 (32) 優先日 平成25年2月20日 (2013.2.20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/768,992
 (32) 優先日 平成25年2月25日 (2013.2.25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 507081094
 ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ
 レーション
 米国, エムエー 02451, ウォルサム
 , 40 ベアー ヒル ロード
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (72) 発明者 バンドッド, シンシア
 米国, エムエー 02451, ウォルサム
 , 40 ベアー ヒル ロード
 (72) 発明者 スマッジ, ブノワ
 米国, エムエー 02451, ウォルサム
 , 40 ベアー ヒル ロード
 審査官 長谷川 茜
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NME阻害剤、及びNME阻害剤を使用する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

薬剤が、NME7を阻害するが、NME1を阻害しない、SEQ ID NOS:88-121から選択されるい
 ずれか1つのアミノ酸配列からなるペプチドを認識する抗体である、
 NMEファミリータンパク質の機能を阻害する薬剤。

【請求項 2】

薬剤が、抗体である又はFab、一価、二価、又はIgM、二重特異的ヒト若しくはヒト化さ
 れた抗体である、請求項1に記載の薬剤。

【請求項 3】

阻害されるNMEファミリータンパク質の機能は次のことをする能力であって：

幹細胞の増殖を促進する及び/又は分化を阻害する；

癌細胞の増殖を促進する及び/又は分化を阻害する；

MUC1*に結合する；

DNAに結合する；

転写調節因子として作用する；

細胞によって分泌される； あるいは、

二量体を形成する、請求項1に記載の薬剤。

【請求項 4】

癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者に、NMEファミリータンパク質の腫瘍形成活性
 を阻害する有効量の薬剤を投与することを含む、癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者

10

20

用の請求項 1 ~ 3 のいずれかーに記載の薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は、タンパク質のNMEファミリーの阻害剤に関する。本願発明は、さらに阻害剤を使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、細胞障害性物質である抗癌剤は、直接あるいは間接的に癌細胞成長を促進する特別な分子を標的とする「高性能」薬として、置き換わり若しくは増大してきた。理想的には、標的化される分子は正常細胞より癌細胞においてより発現されることである。より好適には、癌細胞又はガン組織において殆ど 排他的に発現され、健康なヒト成人の組織で発現されない分子を標的とする薬である。その場合、標的分子が、患者の健康な組織を著しくは傷つけずに、効果的に無能力化される。

【0003】

本発明者は、以前にNMEタンパク質が、MUC1*成長因子受容体のリガンドで、これらのリガンド受容体ペアが、幹細胞及び癌細胞の両方の成長を仲介するという発見を報告した(Mahanta et al, 2008, Hikita et al, 2008, Smagghe et al, 2013)。それ以前は、NM23-H1及びNM23-H2(NME1とNME2)は、分化における役割を持っているとして扱われてきたが、矛盾している報告書で一杯になっていた(Lombardi et al, 1995)。第1に、NM23は、白血病細胞を、病気の証明である、最終分化に達するのを予防する阻害因子であると同定されてきた(Okabe-Kado, J., et al. 1985, Okabe-Kado, J., et al. 1992, Okabe-Kado, J., et al. 1995)。

しかしながら、NM23-H1及びH-2が、MUC1*細胞外ドメインのリガンド誘導による二量化を経る幹及び癌細胞成長を促進するMUC1*成長因子受容体のリガンドであるという本願発明者の開示前には、NM23がどうして、分化に、又は活性であるために、それが二量体であらねばならない又はそれはその標的受容体を二量化するということにより重大に関与しているかは知られていなかった。本発明者は、二量体のNM23が、癌細胞と幹細胞において、MUC1*に結合し二量化させ、そして癌の成長と生存あるいは成長と多能性を促進することを見出した。NM23四量体若しくは六量体は、MUC1*受容体のPSMGFRドメインに結合せず、そして二量体としてのものと逆の機能をもっている。六量体のNM23は、幹細胞の分化を誘導する。

【0004】

同様に、多くの研究者が、MUC1を標的とした薬を開発することを試みた。しかしながら、本発明者が、それが、成長因子受容体として機能し、リガンド誘導による二量化によって活性化され、主としてPSMGFR配列から成る細胞外ドメインをもつ、MUC1*と呼ばれる、開裂型である、ことを本発明者が発見するまで、どのようにMUC1が癌と関係があるかは未知であった。実際、本質的に、MUC1に狙いを定めた抗癌治療薬を開発する他のすべての試みは、本発明者が見出した、細胞表面から脱落そして遊離した細胞外ドメインの縦列繰返しを標的とした。

その時まで、一般通念は、MUC1は開裂されるが、縦列繰返しを含む該開裂部位は、細胞表面へ付着のままの膜貫通断片にやってきて結合し、ヘテロ二量体を形成するというものだった(Ligtenberg et al, 1990, Baruch A et al. (1999)。本発明者は、ガン組織の二重染色法実験として、真実ではないが、開裂型(MUC1*)のみを認識する抗体又は脱落ドメイン(縦列繰返し若しくはコア)にのみ結合する抗体を使うことで、開裂型を染色する抗体は、縦列繰返しに結合する抗体とは共存(共局在化)しないということを明らかにした。実際、ガン組織の殆どの膜染色は、完全な縦列繰返しドメインをもつMUC1には陰性だったか、あるいは最小陽性であった。しかし、切り取った(クッリプ化)MUC1*型には高度に陽性だった。これらの実験は、MUC1が開裂される場合、大容量の細胞外ドメインが細胞表面から遊離されることを示した(Mahanta, et al, 2008)。

【 0 0 0 5 】

抗癌剤に加えて、癌治療ワクチンの開発の試みの多くの失敗があった。問題は、体の免疫系が任意の将来のガン組織と同様に健康な組織において該標的を破壊する「自己」に対する抗体を作成するということである。MUC1を標的とする癌治療ワクチンを開発するいくつかの試みがなされた。しかしながら、各々の失敗の試みにおいて、標的とされたMUC1分子の部分は、本発明者が以前示した、癌細胞の表面から脱落する縦列繰り返しドメインとして知られている「コア」であった(Kroemer G et al, 2013)。

【 発明の概要 】

【 0 0 0 6 】

1つの態様において、本発明は、MUC1が成長因子受容体形態にクリップ化される正常細胞ではなく、癌細胞を優先的に認識する抗体を志向する。

10

【 0 0 0 7 】

別の態様において、本発明は、NMEタンパク質を標的とする抗体を志向する。

【 0 0 0 8 】

本発明の別の態様で、本発明の抗体は、初期の生命で優先的に・成年期でより劣った程度に、発現されるNMEタンパク質を標的とする。好適には、これらのNMEタンパク質は、成人の細胞ではなく、幹細胞中に高レベルで存在する。

【 0 0 0 9 】

本発明の別の態様において、本発明の抗体は、成人の組織中では発現されないか低レベルの発現であるが、胚形成のまさにその初期段階、あるいはナイーブ状態の幹細胞において、優先的に発現されるNMEタンパク質を標的にする。

20

【 0 0 1 0 】

本発明の別の態様では、NME1を標的とする抗体が生成される。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様では、NME6を標的とする抗体が生成される。

【 0 0 1 2 】

本発明の別の態様では、それらは二量化を阻害する、NME1あるいはNME6を標的とする抗体が生成される。

【 0 0 1 3 】

本発明の別の態様では、NME7を標的とする抗体が生成される。

30

【 0 0 1 4 】

本発明の1つの態様において、生成される抗体は、NMEタンパク質を認識し、又その二量化を阻害する。本発明の別の態様において、生成される抗体は、NMEタンパク質を認識し、MUC1とのその相互作用を阻害する。また本発明の別の態様において、生成される抗体は、NMEタンパク質を認識し、MUC1*とのその相互作用あるいはPSMGFRペプチドとのその相互作用を阻害する。

【 0 0 1 5 】

さらに本発明の別の態様では、MUC1*に結合し、NMEタンパク質とのその相互作用を阻害する抗体が生成される。1つの態様では、それらは、MUC1*とNME1間ではなく、MUC1*とNME7間の相互作用を阻害する。

40

【 0 0 1 6 】

本発明の1つの態様では、抗体は、患者の外部で、例えば、細胞において、動物において生成され、あるいはファージディスプレイ及び結合分析を使用することを含めて、人工的に生成される。本発明の別の態様では、抗体は患者において生成され、ここで標的とされたタンパク質の部分は、単独であるいはコンビネーション、ここでアジュバントがワクチンとして使用のために加えうる、において投与される。

【 0 0 1 7 】

1つの態様では、本発明は、NMEファミリータンパク質の機能を阻害する薬剤を志向する。薬剤は、Fab、一価、二価、あるいはIgM、バイスペシフィック、ヒト、あるいはヒト化のような、抗体でありうる。あるいは、薬剤は小分子でありうる。

50

1つの態様では、該阻害のために求められうるNMEファミリータンパク質の機能は次のようなNMEファミリータンパク質の能力でありうる： 幹細胞増殖を促進し及び/又は分化を阻害する； 癌細胞増殖を促進し及び/又は分化を阻害する； MUC1*に結合する； DNAに結合する； 転写調節因子として作用する； 細胞によって分泌される； あるいは、二量体を形成する。特異的に、NMEファミリーメンバーは、好適にはNME7あるいはNME7-ABでありうる。

【0018】

薬剤は、NME7又はNME7ABの腫瘍形成活性を阻害する抗体でありうる。好適には、NMEファミリーメンバーは、25～33 kDa分子量をもつNME7の変異体でありうる。あるいは、NMEファミリーメンバーはNME6又はNME1でありうる。

10

【0019】

別の態様において、本発明は、癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者に、NMEファミリータンパク質の腫瘍形成活性を阻害する有効量の薬剤を投与することを含む治療方法を志向する。NMEファミリータンパク質は、好適には、NME7、NME6あるいはNME1でありうる。1つの実施態様では、薬剤は、NME1活性ではなく、NME7活性を阻害しうる。別の実施態様では、薬剤は、NME7及びMUC1*の間の結合を阻害しうる。あるいは、薬剤は、NME7とその同系統の核酸結合部位の間の結合を阻害しうる。さらに別の実施態様では、薬剤は抗体でありうる。

【0020】

別の態様において、本発明は、癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者に、ヘクサマーとしてNME1の有効量を投与することを含む治療方法を志向する。NME1ポリペプチドは、ヘクサマー状態を志向する突然変異体か変異体でありうる。

20

【0021】

さらに別の態様において、本発明は、癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者に、モノマーとしてNME6の有効量を投与することを含む治療方法を志向する。1つの実施態様では、NME6は、モノマー状態を志向する突然変異体あるいは変異体でありうる。

【0022】

なおさらに別の態様において、本発明は、癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者に、モノマーとしてNME1の有効量を投与することを含む治療方法を志向する。NME1は、モノマー状態を志向する突然変異体か変異体でありうる。

30

【0023】

別の態様において、本発明は、癌患者あるいは癌になる危険をもつ患者に、その同系統の受容体とNMEファミリーメンバーの相互作用を阻害する、有効量のペプチドかペプチド模倣物を投与することを含む治療方法を志向する。1つの実施態様では、同系統の受容体はMUC1でありうる。別の実施態様では、ペプチドは、MUC1、PSMGFR、N-10 PSMGFR、N-15 PSMGFRあるいはN-20 PSMGFRのMUC1*部分に由来しうる。

【0024】

別の態様において、本発明は、次の工程含む、癌を分類するか、癌を担持する若しくは疑われる患者を階層化する方法を志向する：

(i) 幹若しくは先祖細胞遺伝子又は遺伝子産物の存在のために患者サンプルを分析すること；

40

(ii) そして、幹若しくは先祖細胞遺伝子又は遺伝子産物の、同様の発現あるいは発現レベルを共有する患者のグループ化をすること。

【0025】

(iii) 本発明の方法は、それらの幹若しくは先祖細胞遺伝子あるいは遺伝子産物を阻害する薬剤で患者を処置するステップ(iii)をさらに含む。あるいは、該方法は、癌の重症度を評価するために幹若しくは先祖遺伝子あるいは遺伝子産物を分析するステップ(iii)を含む。そこで、初期の幹若しくは先祖状態の特性をもつ遺伝子あるいは遺伝子産物の、発現若しくはより高い発現は、より活発な癌を示し、遅い先祖状態の特性である遺伝子あるいは遺伝子産物の、発現若しくはより高い発現は、より少なく活発な癌を示す；

50

(iv) ステップ(iii)で決定されるより活発若しくはより少なく活発な癌をもつ患者の処置に釣り合った治療デザインをすること; そして

(v) ステップ(iv)でのデザインに従う治療法で患者を治療する。このような方法では、患者サンプルは、血液、体液あるいは生検でありうる。また、遺伝子又は遺伝子産物は、NMEファミリータンパク質でありうる。1つの実施態様では、初期の幹細胞状態を示す遺伝子か遺伝子産物は、NME7又はNME6でありうる。

【0026】

別の態様において、本発明は、その細胞外ドメインが、縦列繰り返しドメインを欠いているNMEファミリータンパク質及びMUC1膜貫通型タンパク質の相互作用を阻害する薬剤を志向し、ここでその細胞外ドメインが、成人の正常細胞で存在する縦列繰り返しドメインが欠けているMUC1膜貫通型タンパク質へのその結合より高い親和性で癌細胞上のMUC1*に薬剤は結合する。1つの実施態様では、薬剤は、制限無しに、抗体、天然物、合成化学薬品あるいは核酸を含む。1つの実施態様では、NMEファミリータンパク質は、NME7、NME6あるいはバクテリアNMEでありうる。

10

【0027】

別の態様において、本発明は、その細胞外ドメインが、成人の正常細胞上の縦列繰り返しドメインが欠けているMUC1膜貫通型タンパク質へのその結合のより高い親和性で癌細胞上のMUC1*に結合する薬剤と細胞を接触させることを含み、その細胞外ドメインが、NMEファミリータンパク質と細胞で縦列繰り返しドメインが欠けているMUC1膜貫通型タンパク質の相互作用を阻害する方法を志向する。1つの実施態様では、薬剤は、制限なく、抗体、天然産物、合成化学薬品あるいは核酸を含みうる。1つの実施態様では、NMEファミリータンパク質は、NME7、NME6あるいはバクテリアNMEでありうる。

20

【0028】

別の態様において、本発明は、NMEファミリータンパク質とその細胞外ドメインは縦列繰り返しドメインが欠けているMUC1膜貫通型タンパク質の相互作用を阻害する薬剤を同定する方法を志向し、そのステップは、癌細胞上に存在するMUC1*への薬剤の親和性を決定すること、幹若しくは先祖細胞に存在するMUC1*への薬剤の親和性を決定すること、そして、幹若しくは先祖細胞に存在するMUC1*へ結合する能力より、癌細胞上に存在するMUC1*により結合する薬剤を選択すること、そしてかくして該薬剤を同定すること、を含みうる。1つの実施態様では、本薬剤は、制限なしに、抗体、天然産物、合成化学薬品あるいは核酸を含みうる。別の実施態様では、幹若しくは先祖細胞は、胚性幹細胞、iPS細胞、臍帯血細胞、骨髓細胞あるいは造血性の先祖細胞でありうる。1つの実施態様では、NMEファミリータンパク質は、NME7、NME6あるいはバクテリアNMEでありうる。

30

【0029】

別の態様において、本発明は、生殖細胞と体細胞中でヒトNMEタンパク質を発現する遺伝子組み換え哺乳動物を志向し、ここで生殖細胞と体細胞は、該哺乳動物へ導入されたヒトNMEをコードする核酸を含む。したがって、ヒトNMEは、遺伝子組み換え哺乳動物において組換えによって発現されうる。無論、遺伝子組み換え哺乳動物はヒトではない。遺伝子組み換え哺乳動物では、NMEタンパク質は、好適には誘導可能に発現されうる。NMEタンパク質は、好適にはNME7あるいはNME7-ABでありうる。

40

【0030】

さらに別の態様において、本発明は、哺乳動物が、ヒトNMEタンパク質が発現される哺乳動物である、ヒトの応答に非常によく似ている方法で、癌に応答する哺乳動物を生成する方法を志向する。該癌は、培養細胞あるいはヒトから、自然に生成されるかもしれない若しくは植え込まれうる。1つの実施態様では、NMEタンパク質は、NME1二量体かNME7モノマーでありうる。別の態様では、哺乳動物は、遺伝子組み換え哺乳動物であり、該哺乳動物は、生殖細胞と体細胞が該哺乳動物へ導入された組み換えヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質遺伝子配列を含んでいる生殖細胞と体細胞において、ヒトMUC1かMUC1*あるいはNMEタンパク質を発現しうる。好適には、NMEタンパク質は、誘導可能に発現される。さらに、好適には、NMEタンパク質は、NME7あるいはNME7-ABでありうる。

50

【0031】

別の態様において、本発明は、哺乳動物でヒト腫瘍の生着を増加させる方法を志向し、それは、テスト哺乳動物にヒト腫瘍細胞を導入する前に、該細胞をNME1二量体若しくはNME7モノマーと混合することを含む。

【0032】

さらに別の態様において、本発明は、抗体を生成する方法を志向し、それは、哺乳動物に、NMEファミリータンパク質若しくはペプチド断片若しくはそれらの断片を注入すること、及び抗体が抗体産生細胞を回収することを含む。好適には、NMEファミリータンパク質は、NME7若しくはNME7-AB若しくはNME1でありうる。好適には、ペプチド断片は、SEQ ID NOS:88-140から、好ましくは88-133から、より好ましくは88-121から選られうる。

10

【0033】

別の態様において、本発明は、次の工程を含む、NMEファミリータンパク質あるいはそれらのペプチド断片に、特異的に結合する抗体か抗体様分子を生成するか選択する方法を志向する：

- (i) NMEファミリータンパク質あるいはペプチド断片で、抗体ライブラリーか抗体断片ライブラリーかエピトープをスクリーニングすること；
- (ii) NMEファミリータンパク質あるいはそれらのペプチド断片への結合性を分析すること；そして
- (iii) 特異的に結合された抗体あるいは抗体様分子を同定すること。

この方法は、当該技術分野において知られた方法を使い、癌の治療か予防のために、患者への投与のために該同定された抗体か抗体様分子を製造することを含む。NMEファミリータンパク質は、NME7若しくはNME7-AB若しくはNME1でありうる。好適には、ペプチド断片は、SEQ ID NOS:88-140、好ましくは88-133、より好ましくは88-121から選られうる。

20

【0034】

さらに別の態様では、本発明は、NMEファミリータンパク質あるいはペプチド断片若しくはその断片でヒトにワクチン化をすることによって、癌を予防する方法を志向する。1つの実施態様では、ペプチド断片若しくは複数断片が、その配列がNMEファミリータンパク質に存在する1つ以上のペプチドを含み、それは所望により、担体若しくはアジュバントと混合、又は免疫原性薬剤に結合されうる。NMEファミリータンパク質は、NME1、NME6、NME7あるいはNME7-ABでありうる。好適には、ペプチド断片は、SEQ ID NOS:88-140、好ましくは88-133、より好ましくは88-121から選られうる。好ましい実施態様では、ペプチド配列は、ヒトNME-H1タンパク質の断片ではない。本発明は、以下の詳細な記述、及び図面から完全に理解され、それらは本発明を限定するものではない。

30

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】図1は、二価若しくは一価の抗体濃度の機能として分析された癌細胞成長のグラフであり、それは成長を促進するのがMUC1*受容体の二量化であることを示している。MUC1陽性の乳癌細胞、ZR-75-30の成長は、二価の(Ab)抗MUC1*の添加によって刺激され、1価Fabの添加によって阻害された。二価抗体の添加は、成長因子受容体二量化を示す特異的なベルシェーブ成長曲線をもたらした。MUC1-陰性HEK 293細胞の成長は、二価若しくは一価のFab抗MUC1*によって影響されなかった。二価抗体が過剰に添加された時、すべての2つの受容体を二量化している一つの二価抗体よりむしろ各受容体に結合する一つの二価抗体が存在し、そしてその結果、成長を阻害する。縦軸は正規化%細胞成長、横軸は抗体濃度。

40

【図2】図2は、MN-E6抗MUC1*抗体のビヒクルあるいはFabでの処置後における、nu/nu雌マウスへ生着されたT47D乳癌細胞の、腫瘍ボリューム分析のグラフである。抗MUC1* E6抗体のその効能は、0.0001のp値をもって、腫瘍ボリュームの縮小において統計的に有意性を見出した。抗MUC1*FabとMUC1*NMEの相互作用のブロックは、癌成長を阻害する。縦軸は%正規化細胞成長、横軸は処置開始後の日。。

【図3】図3A-3D。次のものの細胞溶解物でのNME1あるいはNME7の発現を示すウェスタン

50

プロット・ゲルの写真である：1) MUC1*抗体表面(MN-C3 mab)でコートされた表面上でNM23-H1二量体で培養されたBG01Vのヒト胚性幹細胞；2) マウス・フィーダー細胞(MEF)の層上でbFGFで標準プロトコルによって培養されたBG01Vのヒト胚性幹細胞；3) RPMI培地で標準法によって培養されたT47D乳癌細胞；そして4)組み換えヒトNM23-H1野生体、「wt」(A、B)。下段(C、D)は、プルダウン若しくは免疫沈澱分析の結果を示し、そこでは細胞溶解物が、MUC1の細胞質尾部への抗体、「Ab-5」を加えられたベッドで別々にインキュベートされた。MUC1*ペプチドに結合することにより捕捉された種は、SDS-PAGEによって分離され、個々のそれぞれのNM23タンパク質に対する抗体でプロットされた。同じ実験はNME6で行なわれたが、データは示されていない。全てのNMEsはNDPKドメインを持つが、酵素機能は多分化能においてその役割を必要としない。NME7は2 NDPKドメインを持ち、「自然」のダイマである。NME7は、よりナイーブ幹細胞で高レベルに発現する。プルダウン分析はMUC1*への結合を示す。

10

【図4】図4A-4Eは、T47D乳癌細胞、BG01V及びHES-3のヒトES(ES)細胞及びヒトSC101-A1 iPS細胞からの細胞溶解物が、NME1、NME6あるいはNME7の存在について検査された、ウェスタンプロットの写真を示す。すべての細胞株において、NME1は、明白な～17kDa(A)の分子量になった。すべての細胞株について、HES-3細胞株(FGFで培養)以外、NME7～33kDa種及び42kDa種(C、E)を全てで検知することができた。高感度シグナルを使用して、ビジュアル化が増強された時、NME6特異抗体で反応した種は、HES-3細胞株以外のすべての細胞株に検知された。

【図5】図5A-5Cは、NME7の存在を検査した、ヒト胚幹(ES)細胞(A)及び誘導分化多能幹(iPS)細胞(B、C)のウェスタンプロットの写真を示す。ウェスタンは、細胞溶解物において、NME7の3つの型の存在を示す。～42kDa(全長)、～33kDa(N-末端DHドメインが欠けているNME7-ABドメイン)及び小さな～25kDa種の明白な分子量を持つもの。しかしながら、より低い分子量種だけが、調整済み培地(B)に存在する。

20

【図6】図6A-6C。(A)は、NME7-ABの分子ふるいクロマトグラフィー精製の溶出プロフィールであり；(B)は、NME7-ABピーク画分からの非還元SDS-PAGEゲルであり；(C)は、精製されたNME7-ABの分子ふるいクロマトグラフィーの溶出プロフィールである。NDPKドメインAとBを含む組み換えNME7新規バリエーション"NME7-AB"は、大腸菌でその可溶性タンパク質として高生産率でよく発現する。

【図7】図7A-7Cは、ナノ粒子結合分析の写真を示し、そこでMUC1*細胞外ドメインペプチドがSAM被覆ナノ粒子上に固定化され、そして、NMEタンパク質は溶液にフリーに添加された。ピンクから青までの色変化は、溶液でのフリーのタンパク質が、2つの異なるナノ粒子上で2つのペプチドに同時に結合することができることを示す。

30

【図8】図8は、ELISAサンドイッチ分析からのHRPシグナルのグラフを示し、それはNME7-ABがMUC1*細胞外ドメインペプチドを二量化させることを示す。プレートに固定化されたMUC1*細胞外ドメインペプチドが、飽和状態に、NME7によって結合された。C末端His-タグ若しくはビオチンタグを持つ第二のMUC1*ペプチドが添加され、His-タグ若しくはHRP標識ストレプトアビジンへのHRPラベル化抗体によって視覚化された。

【図9】図9A-9Dは、植え付け1日後での、組み換えNME7-ABあるいは組み換えNM23(NME1)精製二量体のいずれかにおいて培養されたヒトiPS幹細胞の拡大された写真を示す。

40

【図10】図10A-10Dは、植え付け3日後での、組み換えNME7-ABあるいは組み換えNM23(NME1)精製二量体のいずれかにおいて培養されたヒトiPS幹細胞の拡大された写真を示す。

【図11】図11A-11Dは、免疫細胞化学実験の写真を示し、NME7-ABで10代以上の継代で培養されたヒトHES-3幹細胞は、多分化能マーカーNANOG(A)、OCT3/4 (B)、Tra 1-81 (C)及びSSEA4 (D)について陽性であることを示す。

【図12】図12A-12Cは、ヒストン3上のトリメチル化リジン27を認識する抗体で染色されたHES-3胚性幹細胞の写真であり、それは細胞がナイーブ状態から原始的な状態〔X染色体が、両Xの活性(XaXa)に対立して不活性化される(XaXi)]に進展している場合に、凝縮した(condensed)ドットを形成する。A)細胞は、MEFフィーダー細胞(XaXi)上でFGF培地において最初培養され、B)その後、10継代(XaXa)の間NME7において成長された、C)その後

50

、4継代(XaXi)の間FGF-MEFへ戻された。

【図13】図13A-13Gは、無(列A)、タキソル(列B)あるいは抗NME7抗体(列C-E)で処置されたMUC1*陽性の癌細胞の写真示す；(F)48時間での処置に反応する細胞数を示すグラフ、及び(G)癌細胞阻害実験で使用された抗体濃度を想定するために使われたドット-プロットである。

【図14】図14A-14Kは、癌細胞成長を阻害するために、抗NME7抗体を使用して、実験48時間での結果を示す。培地において、培地単独(A)、タキソル(B)あるいは(C-J)に示された濃度での抗NME7で培養された細胞の写真；カルセシン(calcein)を使用して得られた細胞数のグラフが示される(K)。

【図15】図15A-15Kは、癌細胞成長を阻害するために、抗NME7抗体を使用して、実験96時間での結果を示す。培地において、培地単独(A)、タキソル(B)あるいは(C-J)に示された濃度での抗NME7で培養された細胞の写真；カルセシン(calcein)を使用して得られた細胞数のグラフが示される(K)。グラフと写真は、ナノモル範囲の低さの濃度で、抗NME7抗体が、癌細胞成長を阻害することを示す。

【図16】図16は、組み換えNM23-S120Gの3つの異なる調製物に対するNM23-WTのマルチマー化状態を示す天然の非変性ゲルを示す。

【図17】図17A-17G。(A)は、NM23-WT、NM23-S120G-混合、NM23-S120G二量体の非還元ゲルの写真を示し、それは、野生型タンパク質とS120G突然変異体の3つの異なる調製物のマルチマー化状態を示す。図17Bは、SPRチップ表面へ付着したMUC1*細胞外ドメインペプチド(PSMGFR)に結合する異なるNM23マルチマーの表面プラズモン共鳴(SPR)測定結果を示す。図17Cは、NM23二量体だけが同系統の受容体MUC1*に結合することを示すナノ粒子実験の写真を示す。MUC1*細胞外ドメインペプチドが、金のナノ粒子に固定化された。図17D-Gは、多能性幹細胞成長をサポートするそれらの能力に関してテストされた異なるNM23-H1マルチマーを示す。

【図18】図18は、NME7、NME1二量体及びNME1ヘクサマーの発現のタイミング、及び本願実験例の分析にもとづく、それらの関連する癌/幹因子の発現レベルの漫画である。

【図19】図19A-19Iは、ELISA分析の結果についてのグラフを示し、ヒトNME6が、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合することを示す。組み換えNME6-wtは、モノマー又はマルチマーへFPLCによって分離され、PSMGFRペプチドの表面に結合する能力についてELISAによって分析された(A)。NME6マルチマーは、CMC(臨界ミセル濃度)の画分によるSDSでの希釈によって解離され、次に、PSMGFRペプチドの表面に結合する能力についてELISAによって分析された(B)。二量化を志向するように設計されたNME6突然変異体は、二量体形成を志向するNME1 S120G変異体を模倣することで生成され、アラインメントによってNM E6においてS139Gである。第二の突然変異体は、二量体として存在することが報告された海綿NME6に似るように、ヒトNME6が、その重要なエリアで、変換されるべく残基を変位することでなされる。これらの組み換え突然変異体は、発現され、精製され、PSMGFRペプチドの表面への結合能力について分析された(C)。D-Iは、様々な組み換えヒトNME6タンパク質の発現を証拠づけるポリアクリルアミドゲルの写真である。D) NME6 wtは、発現される。E) NME1におけるS120G変位に相当する、S139G変位を担持するNME6、が発現された。F) 二量体であることが報告された海綿NME6を模倣する変位S139A、V142D及びV143Aを担持するヒトNME6。G、H) (GSSS)₃リンカーによって結合された2つのドメインをもつ単鎖ヒトNME6。I) プルダウン分析が、MUC1のC末端に対する抗体を使用して行なわれた。MUC1に結合したタンパク質はゲル上で解離され、次に、NME6に対する抗体で検査された。ゲルは、T47D乳癌細胞、BGo1v及びHES-3のヒト胚性幹細胞、ヒトiPS細胞において、すべて、MUC1に結合したNME6を発現した。

【図20】図20A-20Dは、ウェスタンブロットの写真を示し、そこで、T47D乳癌細胞、BGo1V、及びHES-3のヒトES細胞及びヒトSC101-A1 iPS細胞からの細胞溶解物(A、C)あるいは核画分(B、D)が、NME7(A、B)あるいはNME1(C、D)の存在について検査された。

【図21】図21は、MUC1陽性のT47D乳癌細胞、MUC1陽性のDU145前立腺癌細胞及びMUC1陰性PC3前立腺癌細胞について、NME1、NME6、NME7及びMUC1のリアルタイムPCR分析のグラフ

10

20

30

40

50

である。分析は、18SリボソームRNAに対し関連づけられ、T47D細胞の分析に対し標準化される。両方のMUC1陽性の癌細胞株は、NME7が高い。MUC1陰性細胞株は、何ら検知できるNME1、NME7あるいはMUC1がないが、NME6の非常に高い発現を有した。

【図22】図22は、ウェスタンブロットの写真を示し、そこでは幹細胞溶解物(奇数番号が付けられたレーン)あるいは細胞調整済み培地(偶数番号が付けられたレーン)が、NME7の存在について検査された。iPS(誘導分化多能幹)細胞は、MEF上にFGF(レーン1及び2)で、抗MUC1*抗体(C3)表面上にNM23-H1二量体(レーン3及び4)で、あるいは抗MUC1*抗体(C3)表面上にNME7(レーン5-8)で培養された。HES-3(ヒト胚の幹)細胞は、MEF上にFGF(レーン9及び10)で、抗MUC1*抗体(C3)表面上にNM23-H1二量体(レーン11及び12)で、あるいは抗MUC1*抗体(C3)表面上にNME7(レーン13-14)で培養された。マウスの胚の繊維芽細胞(MEF)細胞も検査された(レーン15及び16)。ウェスタンブロットは、細胞溶解物が~42kDa、それは全長タンパク質に相当する、の分子量をもつNME7種を含むことを示す。しかしながら、分泌された種は、明白な~33kDaの分子量で展開し、それは、N-末端リーダー配列が欠けているNME7種に相当する。

10

【図23】図23A-23Bは、図22に示される同じウェスタンブロットの写真であり、組み換えNM23-H1、~17kDa及びNME7-AB 33kDa(レーン3-8及び11-14において幹細胞が培養された)を同定する、ヒスチジン・タグ化種の存在に関し、ストリップされ検査された。最小染色の結果は、図22に検知された主なNME7種が、幹細胞によって生産されプロセッシングされた天然型NME7だったことを示した。

【図24】図24A-24Bは、マウス単クローン抗体(A)又はN-末端DM10配列のみを認識する別の単クローン抗体(B)を使い、NME7の存在を検査した、様々な細胞溶解物及び対応する調整済み培地のウェスタンブロットの写真をしめす。細胞の調整済み培地からのサンプルでの~33kDa NME7種へのDM10特異的抗体の結合の欠如は、NME7の分泌された形態が、N-末端DM10リーダー配列のすべてではないが大部分が欠けていることを示す。

20

【図25】図25A-25B。(A)は、バクテリアHalomonas Sp593からのNMEのポリアクリルアミドゲルを示し、それは大腸菌において発現され、可溶性タンパク質及び天然二量体として発現された。(B)は、ELISA分析において、Halomonas Sp593からのNMEは、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合することを示す。

【図26】図26は、バクテリアPorphyromonas gingivalis W83からのNMEのポリアクリルアミドゲルを示す。

30

【図27】図27A-27C。(A)は、ヒトNME-H1へのHalomonas Sp 593バクテリアNMEの配列アラインメントを示す。(B)は、ヒトNME7-AドメインへのHalomonas Sp 593バクテリアNMEの配列アラインメントを示す。(C)は、ヒトNME7-BドメインへのHalomonas Sp 953バクテリアNMEの配列アラインメントを示す。

【図28】図28A-28Dは、10X拡大(A、C)か20X拡大(B、D)での、Halomonas Sp 593からのバクテリアNMEにおいて培養されたヒト胚性幹細胞の写真である。

【図29】図29は、ヒト繊維芽細胞がヒトNME7-AB、ヒトNME1二量体あるいはHalomonas Sp 593からのバクテリアNMEのいずれかを含んでいる無血清培地において培養された後の、OCT4幹/癌細胞マーカーの発現を分析するRT-PCRデータのグラフである。

【図30】図30は、ヒトNME7-AB、ヒトNME1あるいはHalomonas Sp 593由来バクテリアNME「HSP 593」の存在下で培養された、繊維芽細胞での幹/癌遺伝子OCT4及びNANOGの発現レベルのRT-PCR分析のグラフである。ある場合には、ローキナーゼ阻害剤「ROCi」が、非付着細胞(幹/癌状になるもの)の表面に付着させるために添加された。

40

【図31】図31は、4X拡大での、二量体形態のヒトNME1を含んでいる無血清培地での培養において、8日後のヒト繊維芽細胞を示す写真である。

【図32】図32は、20X拡大での、二量体形態のヒトNME1を含んでいる無血清培地での培養において、18日後のヒト繊維芽細胞を示す写真である。

【図33】図33は、4X拡大での、Halomonas Sp 593からのバクテリアNMEを含んでいる無血清培地での培養において、18日後のヒト繊維芽細胞を示す写真である。

【図34】図34は、20X拡大での、Halomonas Sp 593からのバクテリアNMEを含んでいる

50

無血清培地での培養において、18日後のヒト線維芽細胞を示す写真である。

【図35】図35は、4X拡大での、ヒトNME7-ABを含んでいる無血清培地での培養において18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【図36】図36は、20X拡大での、ヒトNME7-ABを含んでいる無血清培地での培養において18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【図37】図37は、4X拡大でのNMEタンパク質のない標準培地において18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【図38】図38は、20X拡大でのNMEタンパク質のない標準培地において18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【図39】図39は、後期段階ブライム化幹細胞と比較された最も初期の段階のナイーブヒト幹細胞での転写因子BRD4及びコファクターJMJD6の発現レベルのRT-PCR分析のグラフである。

10

【図40】図40は、他因子が、ナイーブ幹細胞及びいくつかの癌細胞において抑制されている間に、繊維芽細胞が誘導分化多能の状態に戻る場合に抑制されるクロマチン再配列因子の発現レベルのRT-PCR分析のグラフである。クロマチン再整理遺伝子Brd4、JMJD6、Mbd3及びCHD4の発現レベルが、ヒトNME7-AB、ヒトNME1あるいはHalomonas Sp 593、「HSP 593」からのバクテリアNMEの存在下で培養された繊維芽細胞において測定された。ある場合には、ローキナーゼ阻害剤「ROCi」が、非付着細胞(幹/癌状になるもの)のその表面に付着させるために添加された。

【図41】図41は、ヒトNME7-AB、ヒトNME1あるいはHalomonas Sp 593、「HSP 593」からのバクテリアNMEの存在下で培養された繊維芽細胞での幹/癌遺伝子の発現レベルのRT-PCR分析の混成グラフである。ある場合には、ローキナーゼ阻害剤「ROCi」が、非付着細胞(幹/癌状になるもの)のその表面に付着させるために添加された。

20

【図42】図42は、より小さな変位がある遺伝子の差異をよりよく示すために圧縮したY軸を使い、ヒトNME7-AB、ヒトNME1あるいはHalomonas Sp 593「HSP 593」からのバクテリアNMEの存在下で培養された繊維芽細胞での幹/癌遺伝子の発現レベルのRT-PCR分析の混成グラフである。ある場合には、ローキナーゼ阻害剤「ROCi」が、非付着細胞(幹/癌状になるもの)のその表面に付着させるために添加された。

【図43】図43は、一般的な培地あるいはNME7を含んでいる培地において培養の後に、T47D癌細胞について、幹細胞マーカー及び癌幹細胞マーカーの遺伝子発現のRT-PCR分析のグラフであり、ここで非付着(浮遊物)になった細胞は、付着したままのものから別に分析された。

30

【図44】図44は、幹細胞マーカーSOX2及びT47D癌細胞の癌幹細胞マーカーCXCR4の遺伝子発現についてのRT-PCR分析のグラフである。細胞は、一般的な培地あるいはNME1二量体又はNME7(NME7-AB)を含んでいる培地のいずれかにおいて培養された。別々に分析された細胞タイプは浮遊細胞、すべての細胞を付着させたローキナーゼ阻害剤(+Ri)と細胞、あるいはローキナーゼ阻害剤(-Ri)がない状態で浮遊物が除去された後付着して残った細胞である。

【図45】図45は、T47D乳癌細胞の様々な幹及び推定上の癌幹細胞マーカーの遺伝子発現のRT-PCR分析のグラフである。細胞は、一般的な培地あるいはNME1二量体(「NM23」)若しくはNME7(NME7-AB)を含んでいる培地のいずれか、において培養された。別々に分析された細胞タイプは、浮遊細胞、すべての細胞を付着させたローキナーゼ阻害剤(+Ri)と細胞、あるいはローキナーゼ阻害剤(-Ri)がない状態で浮遊物が除去された後付着して残った細胞である。

40

【図46】図46は、DU145前立腺癌細胞について、様々な幹及び推定上の癌幹細胞マーカーの遺伝子発現のRT-PCR分析のグラフである。細胞は、一般的な培地あるいはNME1二量体(「NM23」)若しくはNME7(NME7-AB)を含んでいる培地のいずれか、において培養された。継代2によって、細胞は付着したままだったので、ローキナーゼ阻害剤は使用されなかった。

【図47】図47は、DU145前立腺癌細胞について、様々な幹及び推定上の癌幹細胞マーカー

50

一の遺伝子発現のRT-PCR分析のグラフである。細胞は、一般的な培地あるいはNME1二量体(「NM23」)を含んでいる培地のいずれか、において培養された。継代2によって、細胞は付着したままだったので、ロー・キナーゼ阻害剤は使用されなかった。

【図48】図48は、添加されたただ一つの因子が「2i」阻害剤(GSK3ベータ及びMEK阻害剤)あるいはヒト組み換えNME7-ABのいずれかであった最小無血清基礎培地中での培養による、T47D乳癌細胞におけるMUC1に加えて、報告のある「癌幹細胞」あるいは「腫瘍惹起細胞」マーカーCDH1(E-カドヘリン)、CXCR4、NANOG、OCT4及びSOX2の発現レベルのRT-PCR分析グラフである。分析された細胞は、アンカレッジ-独立的に、浮遊物として成長し始めたものであった。

【図49】図49は、添加されたただ一つの因子が「2i」阻害剤(GSK3ベータ及びMEK阻害剤)あるいはヒト組み換えNME7-ABのいずれかであった最小無血清基礎培地中での培養による、T47D乳癌細胞における、各々NME7を抑えかつNME1を誘導することが報告された転写因子BRD4及びコファクターJMJD6、幹細胞多分化能の誘導を阻止することが報告されたクロマチン再配置因子MBD3とCHD4の発現レベルのRT-PCR分析のグラフである。

【図50】図50は、本願実験例の分析による関連因子とNME7の相互作用マップの図である。

【図51】図51は、経過時間にそって分析された腫瘍体積のグラフである。T47D乳癌細胞は、標準分析法(点線)を使い移植されるか又はそこにおいて細胞がNME7-ABと50/50体積/体積で混合され、10日後に、それらのマウスがNME7-ABを日毎注入された。

【図52】図52は、培養された癌細胞(T47D)又はFGF、NM23-H1二量体あるいはNME7において培養されたヒト胚性幹細胞(HES)において、MUC1*にMUC1全長を分解できる、MMP14、MMP16及びADAM17のRNA発現を分析した定量PCR分析のグラフを示す。

【図53】図53は、FGFで成長したHES-3のヒト胚性幹細胞において、ヒトNME7-ABで成長したHES-3細胞において、生体外でのT47D乳癌細胞において、動物に移植されたT47D乳癌細胞において、生体外でのDU145前立腺癌細胞において、動物に移植されたDU145細胞において、及び動物へ移植された1500乳癌細胞においての、開裂酵素MMP14、MMP16及びADAM17の発現レベルのRT-PCR分析のグラフである。細胞は全て、MEFでのFGFにおいて育てられたHES-3細胞に標準化した。

【図54】図54は、生体外でT47D乳癌細胞、FGFにおいて育てられたHES-3のヒト胚性幹細胞、ヒトNME7-ABにおいて育てられたHES-3細胞、及びNME1二量体において育てられたHES-3細胞における開裂酵素MMP14、MMP16及びADAM17の発現レベルのRT-PCR分析のグラフであり、細胞はすべて生体外でT47D乳癌細胞に対して標準化された。

【図55】図55は、DU145ホルモン難治性前立腺癌細胞の腫瘍ボリューム分析のグラフであり、NOD/SCIDのオスマウスへ移植され、MN-E6抗MUC1*抗体のピークルあるいはFabでの治療60日後の結果である。60日から70日まで、治療グループはスイッチされた。抗MUC1*E6抗体の効能は、0.0001のp値をもって、腫瘍ボリュームの縮小において統計的に有意であった。

【図56】図56は、DU145ホルモン難治性前立腺癌細胞から切除された腫瘍での開裂酵素MMP14及びMMP16の発現レベルのRT-PCR分析のグラフであり、NOD/SCIDのオスマウスへ移植され、MN-E6抗MUC1*抗体のピークルあるいはFabでの処置60日の結果である。MUC1*成長因子受容体を阻止する治療は、両方の開裂酵素の発現を減少させたが、MMP14だけが統計的に有意であった。

【図57】図57A-57B。(A)は、DU145ホルモン難治性前立腺癌細胞から切除された腫瘍におけるMUC1*のウェスタンブロット検査の写真であり、NOD/SCIDのオスマウスへ移植され、MN-E6抗MUC1*抗体のピークルあるいはFabでの処置60日の結果である。写真は、抗MUC1*のFab治療されたマウスでは、より少ないMUC1*、つまり処置グループでより少ないMUC1開裂があることを示す。(B)は、DU145ホルモン難治性前立腺癌細胞から切除された腫瘍でのmicroRNA-145の発現レベルのRT-PCR分析のグラフであり、NOD/SCIDのオスマウスへ移植され、MN-E6抗MUC1*抗体のピークルあるいはFabでの処置60日の結果である。グラフは、平均では、miR-145(それは幹細胞に分化するようにシグナルする)が、対照群と比較

10

20

30

40

50

して、処置グループにおいて増加されることを示す。

【図58】図58A-58Dは、生の癌細胞が、幹細胞特異的抗MUC1*単クローン抗体あるいは癌細胞特異的単クローン抗体で検査されたFACS実験の結果を示す。(A) N-10ペプチドへの結合優先性に基づいて選択された、MN-C2単クローン抗体は、生のT47D乳癌細胞への強い結合性を示し、癌細胞特異的である。(B) C-10ペプチドへの結合優先性に基づいて選択された、MN-C3単クローン抗体は、生のT47D乳癌細胞への非結合性を示し、幹細胞特異的である。(C) 癌細胞特異的MN-C2は、DU145前立腺癌細胞へ結合する。(D) 幹細胞特異的MN-C3は、DU145前立腺癌細胞へ結合しない。(E) 別のFACS実験のグラフは、癌細胞特異的単クローン抗体MN-C2及びMN-E6が、DU145前立腺癌細胞に結合するが、一方幹細胞特異的MN-C3は結合しないことを示す。

10

【図59】図59A-59Dは、幹細胞か癌細胞が、幹細胞特異的抗MUC1*単クローン抗体あるいは癌細胞特異的単クローン抗体で検査されたFACS実験の結果を示す。幹細胞特異的MN-C3の単クローンは、BG01vのヒト胚性幹細胞(A)に強い結合を示した、しかしT47D乳癌細胞(B)、あるいはDU145前立腺癌細胞(C)に結合を示さなかった。別のFACS実験のグラフは、幹細胞特異的MN-C3単クローンは、幹細胞への強い結合を示すが、T47D乳癌細胞、1500乳癌細胞株、DU145前立腺癌細胞あるいはMUC1陰性PC3前立腺癌細胞(D)へは結合しない。

【図60】図60A-60Eは、次のものが添加され通常の培地において培養されたDU145前立腺癌細胞の写真を示す；無(A)、幹細胞特異的MN-C3のFab(B)、幹細胞特異的MN-C8のFab(C)、癌細胞特異的MN-C2のFab(D)あるいは癌細胞特異的MN-E6のFab(E)。もし癌細胞に現われるように、該抗体がMUC1*を認識すれば、抗体のFabは、MUC1*の二量化を阻止し、細胞死を誘導したであろう。写真で見ることができるよう、幹細胞特異的抗体のFabsは、癌細胞成長に対する影響はない、一方、癌細胞特異的抗体のFabsは、癌細胞を効果的に殺した。

20

【図61】図61は、ヒトNME1及びヒトNME7-A若しくは-Bドメインの間の配列アラインメントである。

【図62】図62は、NME1への低い配列同一性を持つヒトNME7からの免疫原性のペプチドをリストする。リストされたペプチド配列は、ヒトNME1ではなくヒトNME7を標的とする抗体を生じさせる免疫原性のペプチドであるものとして同定される。該配列は、ヒトNME1への配列相同性の欠如のために選ばれ、癌の治療か予防用のNME7を阻害する抗体を生成するためのNME7特異的ペプチドとして有用である。

30

【図63】図63は、構造の完全性にとって、あるいはMUC1*への結合性にとって重要かもしれないヒトNME7からの免疫原性のペプチドをリストする。それぞれの可変ドメインが、NME7の異なるペプチド部分に結合する、二価及び2重特異性抗体が好適である。このようなペプチドは、両方に特異的な抗体を生成するために、1つ以上のペプチドを使用することにより生成される。このペプチドは、癌の治療か予防用のNME7を阻害する抗体を生成するためのNME7特異的ペプチドとして有用である。

【図64】図64は、構造の完全性にとって、あるいはMUC1*への結合性にとって重要かもしれないヒトNME1からの免疫原性のペプチドをリストする。リストされたペプチド配列は、ヒトNME1からであって、その機能を模倣することができる他のバクテリアNMEタンパク質へのそれらの相同性と同様にヒトNME7へのそれらの高い相同性によって選ばれた。ペプチド50~53は、特に、ヒトNME7-A若しくは-B、及びさらにHSP 593に対して高い相同性を持つ。

40

【発明を実施するための形態】

【0036】

定義

【0037】

ここに使用される、MUC1*細胞外ドメインは、主としてPSMGFR配列：

(GTINVDHVDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQID NO: 6))によって定義される。MUC1開裂の正確なサイトは、それを切り取る酵素に依存し、開裂酵素が細胞タイプ、組織タイプあるいは細胞の進化・発生での時間に依存して変異するので、MUC1*細胞外ドメ

50

インの正確な配列は、N-末端で変異するかもしれない。

【0038】

ここに使用される、用語「PSMGFR」は、GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(SEQ ID NO: 6)として述べられるようなMUC1成長因子受容体の一次配列の頭文字である。この点では、「N-10 PSMGFR」、「N-15 PSMGFR」あるいは「N-20 PSMGFR」のような「N-数」は、PSMGFRのN-末端で削除されたアミノ酸残基の数を指す。同様に「C-10 PSMGFR」、「C-15 PSMGFR」あるいは「C-20 PSMGFR」のような「C-数」は、PSMGFRのC-末端で削除されたアミノ酸残基の数を指す。

【0039】

ここに使用される、MUC1*の細胞外ドメインは、縦列繰り返しドメインが欠けているMUC1タンパク質の細胞外の部分を指す。多くの場合、MUC1*は、MUC1*部分が、縦列繰り返し、膜貫通ドメイン及び細胞質尾部が欠けている短い細胞外ドメインから成る分解産物である。恐らく1つ以上の酵素によって開裂されるように見えるので、MUC1の開裂の正確な位置は知られていない。MUC1*細胞外ドメインは、PSMGFR配列の殆どを含むが、さらに付加的な10-20のN末端アミノ酸があってもよい。

【0040】

ここに使用される、「NMEファミリータンパク質」あるいは「NMEファミリータンパク質」の番号付けされた1-10は、それらすべては、少なくとも1つのNDPK(ヌクレオチドジホスフェートキナーゼ)ドメインもつことにより、グルーブ化されたタンパク質である。ある場合には、NDPKドメインは、ADPへのATPの転換を触媒することができることの意味では機能的ではない。NMEタンパク質は、H1、H2などと番号付けられたNM23タンパク質として公式に知られていた。ここに、NM23とNMEという用語は互換可能である。ここに、用語NME1、NME2、NME6及びNME7は、NME変異体にも天然たんぱくをも参照するために使用される。

ある場合には、これらの変異体が、より可溶か、あるいは大腸菌において一層よく発現するか、天然の配列・タンパク質より可溶である。例えば、本明細書において使用されるNME7は、変異が大腸菌での可溶、適切に折り重ねられたタンパク質の高い産出發現を可能にするので、優れた商用適用可能性を持っているNME7-ABのような、天然たんぱく若しくは変異体を意味する場合がある。ここに引用されるように「NME1」は、「NM23-H1」と互換可能である。本発明は、NMEタンパク質の正確な配列によっては制限されていないことはさらに意図される。NM23-S120Gと呼ばれる突然変異体NME1-S120Gは、本願明細書を通して互換的に使用される。S120G突然変異体及びP96S突然変異体は、二量体形成に対するこれらの好適性のために好ましいが、NM23二量体あるいはNME1二量体とここでリファーされる。

【0041】

ここに引用されるNME7は、分子量が42kDaの天然のNME7、分子量が25～33kDaの間の開裂型、DM10リーダー配列を欠く変異体、NME7-AB、あるいは組み換えNME7タンパク質、又はその配列が、効率的な発現、産生高率の上昇、溶解性又はNME7をより有効かより商業ベースにのったようにする他の特性への変更可能なこれらの変異体を意味するように意図される。

【0042】

本発明は、MUC1*に関するパスウェイを調整する抗体及び抗体変異体を開示し、そこで、抗体の一セットは優先的に、幹細胞に存在するが十分には癌細胞上ではMUC1*を認識しないような、MUC1*に結合する。別の抗体の一セットは優先的に、癌細胞に存在するが十分には幹細胞上ではMUC1*を認識しないような、MUC1*に結合する。本発明は、これらのカテゴリーに分類される他の抗体を同定する方法をさらに示す。本発明は、以下「幹細胞抗体」と呼ばれ、生体外及び生体内において、幹細胞成長の刺激のために、抗体の第一のセットを使用する方法をさらに示す。本発明は、さらに、以下「癌細胞抗体」と呼ばれ、生体外及び生体内において、癌細胞成長を阻害するために、抗体の第二のセットを使用する方法を示す。

【0043】

本願明細書の記述において、癌特異的抗体MIN-C2(加えて、本願が「C2」としてプライオリティを主張する出願と同様にここに引用された)又はMIN-E6(加えて本願が「E6」としてプライオリティを主張する出願と同様にここに引用された)が、本出願人によって他の出願におけるように本出願において引用される構造上及び配列的に同じ抗体である。これらの抗体及びそれらのCDR配列の記述は、2009年10月6日に本出願されたWO2010/042562(PCT/US2009/059754)に見られる。特に、そこで図11~16を参照する。

【0044】

同様に、幹細胞特異的抗体2D6C3(加えて本願が「C3」としてプライオリティを主張する出願と同様にここに引用された)又はMN-C3又は2D6C8(加えて本願が「C8」としてプライオリティを主張する出願と同様にここに引用された)又はMN-C8が、本出願人によって他の出願におけるように本出願において引用される構造上及び配列的に同じ抗体である。これらの抗体及びそれらのCDR配列の記述は、2012年3月19日出願のWO2012/126013(PCT/US2012/059754)に見られる。特に、そこで図13~18を参照する。

10

【0045】

本願明細書の記述において、「NMEファミリータンパク質を阻害する薬剤の有効量」は、MUC1かMUC1*のような、NMEファミリータンパク質とその同系統の受容体の間の活性化相互作用を妨害する際における薬剤の有効量を指す。

【0046】

本願明細書の記述において、「高い相同」とは、任意の2つのポリペプチド間の指定のオーバーラップするドメインの少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%あるいは97%の同一性をもつものであると考えられる。

20

【0047】

本願明細書の記述において、「低い相同」とは、任意の2つのポリペプチド間の指定のオーバーラップするドメインの25%、20%、15%、10%あるいは5%未満の同一性をもつものであると考えられる。

【0048】

本願明細書の記述において、「小分子」と呼ばれている薬剤に関して、それは、50Daと2000Daの間の分子量、より好適には150Daと1000Daの間、さらに好適には200Daと750Daの間の分子量をもつ合成化学分子あるいは化学に基づいた分子でありうる。

【0049】

本願明細書の記述において、分子が自然界において存在する限り、「天然産物」と呼ばれている薬剤に関して、それは化学的分子あるいは生物学的分子でありうる。

30

【0050】

本願明細書の記述において、「2i阻害剤」はGSK3ベータの小分子阻害剤及びMAPキナーゼ・シグナルパスウェイのMEKを指す。名称2iは、研究文献(Silva J et al., 2008)において作りだされた。しかしながら、ここにおいて「2i」は、それらが当該標的を阻害する場合、多分化能又は腫瘍形成に同じ効果をもつ多くの小分子若しくは生物学的因子が存在するように、GSK3ベータ若しくはMEKのいずれかの任意の阻害剤を指す。

【0051】

本願明細書の記述において、FGF、FGF-2あるいはbFGFは、繊維芽細胞増殖因子を指す。

40

【0052】

本願明細書の記述において、「ロー(Rho)関連キナーゼ阻害剤」は、小分子、ペプチドあるいはタンパク質でありうる(Rath N, et al., 2012)。ロー・キナーゼ阻害剤は、ここ及びいずれかでROCKiかROCKiあるいはRiと短縮される。特異的ロー・キナーゼ阻害剤の使用というのは、例示的であるという意図であり、他のロー・キナーゼ阻害剤の代替として用いることができる。

【0053】

本願明細書の記述において、用語「癌幹細胞」あるいは「腫瘍イニシエーティング細胞」は、より転移の状態あるいはより活発な癌にリンクされた遺伝子のレベルを発現する癌細胞を指す。用語「癌幹細胞」あるいは「腫瘍イニシエーティング細胞」は、動物へ移植

50

【 0 0 5 4 】

10

20

【 0 0 5 7 】

【 0 0 5 8 】

30

40

50

MTPGTQSPFFLLLLLTVLT (SEQ ID NO:2)

【 0 0 6 0 】

MTPGTQSPFFLLLLLTVLT VVTA (SEQ ID NO:3)

【 0 0 6 1 】

MTPGTQSPFFLLLLLTVLT VVTG (SEQ ID NO:4)

【 0 0 6 2 】

SEQ ID NOS:2、3及び4は、細胞膜表面に、MUC1受容体及び短縮化されたアイソフォームを志向するN-末端MUC-1シグナリング配列を特定する。3つまでのアミノ酸残基が、SEQ ID NOS:2、3及び4の変異体によって示されるようにC-末端で欠如する。

【 0 0 6 3 】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLI ALAVCQCRRK NYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAAAASANL (SEQ ID NO: 5)

これは、そのN-末端に、nat-PSMGFRを持っており、短縮化されたMUC1受容体を特定し、そして全長MUC1受容体の膜貫通及び細胞質配列を含む。

【 0 0 6 4 】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA (SEQ ID NO: 6)

これは、MUC1成長因子受容体 (nat-PSMGFR : 「PSMGFR」の例) の天然の一次配列を特定する。

【 0 0 6 5 】

TINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA (SEQ ID NO: 7)

これは、SEQ ID NO:6のN-末端で単一のアミノ酸欠失を持つ、MUC1成長因子受容体 (nat-PSMGFR : 「PSMGFR」の例) の天然の一次配列を特定する。

【 0 0 6 6 】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA (SEQ ID NO: 8)

これは、増強された安定性 (var-PSMGFR: 「PSMGFR」の例) を持っているMUC1成長因子受容体の天然の一次配列の「SPY」の機能的な変異体を特定する。

【 0 0 6 7 】

TINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA (SEQ ID NO: 9)

これは、SEQ ID NO:8のC末端で単一のアミノ酸欠失を持って、増強された安定性 (var-PSMGFR- 「PSMGFR」の例) を持っているMUC1成長因子受容体の天然の一次配列の「SPY」の機能的な変異体を特定する。

【 0 0 6 8 】

tgtcagtgccgcccgaagaactacgggcagctggacatctttccagcccgggatacctaccatcctatgagcgagtaccc cacctaccacacccatggcgctatgtgccccctagcagtagccatcgtagccccctatgagaaggtttctgcaggtaacg gtggcagcagcctctcttacacaaaccagcagtgaggcagccgcttctgccaacttg (SEQ ID NO: 10)

これは、MUC1細胞質ドメインのヌクレオチド配列を特定する。

【 0 0 6 9 】

CQCRRKNYQQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAAAASANL (SEQ ID NO: 11)

これは、MUC1細胞質ドメインのアミノ酸配列を特定する。

【 0 0 7 0 】

gagatcctgagacaatgaatcatagtgaaagattcggttttcatgtgcagagtggatgatccaaatgcttcacttcttgcg cgttatgagcttttattttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgccactttttaaagcg gaccaaataatgataacctgcacttgaagatttatttataggcaacaaagtgaatgtcttttctcgacaactggatttaa ttgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgctagccctaattaaac、cagatg caatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaacaagctggatttactataacaaactcaaaatgatgatgctt tcaaggaaagaagcattggaattttcatgtagatcaccagtcagacccttttcaatgagctgatccagtttattacaac tggctcttatattgccatggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctg gagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaaatgcagcgcatggccct gatctcttttgcctctgctggccagagaaatggagttgttttttcccttcaagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaa

10

20

30

40

50

atttactaatgtacctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagtgaggatgttgaatacactatattcagtacatt
ttgttaataggagagcaatgtttatcttcttgatgtactttatgtatagaaaataa(SEQID NO: 12)

これは、NME7ヌクレオチド配列(NME7: GENBANK ACCESSION AB209049)を特定する。

【0071】

DPETMNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSQRQLVLI
DYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEII EII NKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTG
PIIAMEILRDDAICEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKF
TNCTCCIVKPHAVSEGMLNTLYSVHFVNRRAMFIFLMYFMYRK(SEQID NO: 13)

これは、NME7アミノ酸配列(NME7: GENBANK ACCESSION AB209049)を特定する。

【0072】

atggtgctactgtctacttttagggatcgctcttcaaggcgaggggcctcctatctcaagctgtgatacaggaacatggc
caactgtgagcgtaccttcattgcatcaaaccagatggggtccagcggggtctgtgggagagattatcaagcgttttg
agcagaaaggattccgcctgttggctctgaaattcatgcaagcttccgaagatcttctcaaggaacactacgttgacctg
aaggaccgtccattcttctgcccggcctgggtgaaatatacgtcactcagggccggtagttgccatggctctgggaggggctgaa
tgtggtgaagacgggcccagtcgtctgcccggagaccaacctgcagactccaagcctgggacctccgtggagacttct
gcatacaagttggcaggaacattatacatggcagtgattctgtggagagtgcagagaaggagatcggtctgtggtttcac
cctgaggaactggtagattacacgagctgtgctcagaactggatctatgaatga(SEQID NO: 14)

これは、NM23-H1ヌクレオチド配列(NM23-H1: GENBANK ACCESSION AF487339)を特定する。

【0073】

MVLLSTLGI VFQEGGPP ISSCDTGTMANCERTFII IKPDGVQRGLVGEI IKRFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDL
KDRPFFAGLVKYMHS GPV VAMVWEGLNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNI IHGSDSVESAEKE IGLWFH
PEELVDYTSCAQNWIYE(SEQID NO: 15)

これは、NM23-H1アミノ酸配列(NM23-H1: GENBANK ACCESSION AF487339)を特定する。

【0074】

atggtgctactgtctacttttagggatcgctcttcaaggcgaggggcctcctatctcaagctgtgatacaggaacatggc
caactgtgagcgtaccttcattgcatcaaaccagatggggtccagcggggtctgtgggagagattatcaagcgttttg
agcagaaaggattccgcctgttggctctgaaattcatgcaagcttccgaagatcttctcaaggaacactacgttgacctg
aaggaccgtccattcttctgcccggcctgggtgaaatatacgtcactcagggccggtagttgccatggctctgggaggggctgaa
tgtggtgaagacgggcccagtcgtctgcccggagaccaacctgcagactccaagcctgggacctccgtggagacttct
gcatacaagttggcaggaacattatacatggcgggtgattctgtggagagtgcagagaaggagatcggtctgtggtttcac
cctgaggaactggtagattacacgagctgtgctcagaactggatctatgaatga(SEQID NO: 16)

これは、NM23-H1 S120G突然変異体ヌクレオチド配列(NM23-H1: GENBANK ACCESSION AF487339)を特定する。

【0075】

MVLLSTLGI VFQEGGPP ISSCDTGTMANCERTFII IKPDGVQRGLVGEI IKRFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDL
KDRPFFAGLVKYMHS GPV VAMVWEGLNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNI IHGSDSVESAEKE IGLWFH
PEELVDYTSCAQNWIYE(SEQID NO: 17)

これは、NM23-H1 S120G突然変異体アミノ酸配列(NM23-H1: GENBANK ACCESSION AF487339)を特定する。

【0076】

atggccaacctggagcgcaccttcattcgccatcaagccggacggcgtgcagcgcggcctgggtgggagagatcatcaagcg
cttcgagcagaagggtatccgcctcggtggccatgaagtcttccggggcctctgaagaacctgaagcagcactacattg
acctgaaagaccgaccttcttccctgggctgggtgaagtacatgaactcagggccggtgtgtggccatggctctgggagggg
ctgaacgtgggtgaagacaggccgagtgatgcttggggagaccaatccagcagattcaaagccaggcaccattcggtgggga
cttctgcattcaggttggcaggaacatttcattggcagtgattcagtaaaaagtgtgaaaaagaaatcagcctatggt
ttaagcctgaagaactggttgactacaagtcttgtgctcatgactgggtctatgaataa(SEQID NO: 18)

これは、NM23-H2ヌクレオチド配列(NM23-H2: GENBANK ACCESSION AK313448)を特定する。

【0077】

MANLERTFII IKPDGVQRGLVGEI IKRFEQKGFRLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLKDRPFFPGLVKYMNSGPV VAMVWEGL
LNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNI IHGSDSVKSAEKE ISLWFKPEELVDYKSCAHDWVYE(SEQID N

10

20

30

40

50

O: 19)

これは、NM23-H2アミノ酸配列(NM23-H2: GENBANK ACCESSION AK313448)を特定する。

【 0 0 7 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNM23-H7-2配列:

【 0 0 7 9 】

(DNA)

【 0 0 8 0 】

atgcatgacgttaaaaatcacctgtacctttctgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttattgg
caacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgaccagtacaccgcgcgtcaactgggtagtc
gcaaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcg
gggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgttaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcg
cccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgatgatgacgctatct
gCGaattgaaacgcctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgttt
ggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcatctcgatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttccc
gagctctggcgggtgCGgtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtg
cagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatg
gaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggtacggaaatgta
ctccgggtccgtgCGtCGcatggaaattcagcaaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatc
cgaaatcgacgtcatctgCGtccgggtaccctgCGcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgt
accgatctgccgaagacgggtctgctggaagtccaatactttttcaaaattctggataattga(SEQ ID NO: 20)

10

20

【 0 0 8 1 】

(アミノ酸)

【 0 0 8 2 】

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVVNFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKA
GFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLLGPNASGVARTDASESIRALF
GTDGIRNAAHGPD SFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNM
DRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKT、KIQNAV
HCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-(SEQ ID NO:21)

【 0 0 8 3 】

ヒトNME7-A:

【 0 0 8 4 】

(DNA)

【 0 0 8 5 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagtttatataactggctctattatgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaacctctggagtggcagcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatctctttgcttctgCGGCCAGAGAAATGGAGTGTttttttga(
SEQ ID NO: 22)

【 0 0 8 6 】

(アミノ酸)

【 0 0 8 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAREMELFF-(SEQ ID NO:23)

【 0 0 8 8 】

ヒトNME7-A1:

【 0 0 8 9 】

(DNA)

【 0 0 9 0 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaacaagctgg

30

40

50

atttactataaccaaactcaaaatgatgatgcttttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctctattatggcatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctcttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatcttttgccttctgcgccagagaaaatggagttgtttttcctt
caagtggaggtgtgggcccggcaaactgctaaatttacttga (SEQ ID NO: 24)

【 0 0 9 1 】

(アミノ酸)

【 0 0 9 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNASGVARTDASEIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (SEQ ID NO: 25)

10

【 0 0 9 3 】

ヒトNME7-A2:

【 0 0 9 4 】

(DNA)

【 0 0 9 5 】

atgaatcatagtgaagattcgttttcattgcagagtggatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatgagctttt
attttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgacacctttttaagcggaccaaataatgata
acctgcacttggagatttatttataggcaacaaagtgaatgtctttctcgacaactggattaattgactatggggat
caataacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctgg
agaaaataatgaaataataacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcat
tggattttcatgtagatcaccagtcaagacctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctctattatgcc
atggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacaga
tgcttctgaaagcattagagccctcttggacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcttctg
cgccagagaaaatggagttgttttttga (SEQ ID NO: 26)

20

【 0 0 9 6 】

(アミノ酸)

【 0 0 9 7 】

MNHSERFVFAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVVNFSRQLVLDYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICWKRLGPNASGVARTDASEIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFF- (SEQ ID NO: 27)

30

【 0 0 9 8 】

ヒトNME7-A3:

【 0 0 9 9 】

(DNA)

【 0 1 0 0 】

atgaatcatagtgaagattcgttttcattgcagagtggatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatgagctttt
attttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgacacctttttaagcggaccaaataatgata
acctgcacttggagatttatttataggcaacaaagtgaatgtctttctcgacaactggattaattgactatggggat
caataacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctgg
agaaaataatgaaataataacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcat
tggattttcatgtagatcaccagtcaagacctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctctattatgcc
atggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacaga
tgcttctgaaagcattagagccctcttggacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcttctg
cgccagagaaaatggagttgtttttccttcaagtggaggtgtgggcccggcaaactgctaaatttacttga (SEQ ID
NO: 28)

40

【 0 1 0 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 0 2 】

MNHSERFVFAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVVNFSRQLVLDYGD

50

QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIIEINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPPANSVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT-(S
EQ ID NO:29)

【 0 1 0 3 】

ヒトNME7-B:

【 0 1 0 4 】

(DNA)

【 0 1 0 5 】

atgaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgaga
tgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagttataaag
gagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataat
gctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatcttttggtaaaactaagatccagaatgctgttactgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatact
tcttctga(SEQID NO: 30)

10

【 0 1 0 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 0 7 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF-(SEQ ID NO:31)

【 0 1 0 8 】

20

ヒトNME7-B1:

【 0 1 0 9 】

(DNA)

【 0 1 1 0 】

atgaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgaga
tgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagttataaag
gagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataat
gctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatcttttggtaaaactaagatccagaatgctgttactgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatact
tcttcaagatcttggataattagtgga(SEQID NO: 32)

30

【 0 1 1 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 1 2 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-(SEQ ID NO:33)

【 0 1 1 3 】

ヒトNME7-B2:

【 0 1 1 4 】

(DNA)

【 0 1 1 5 】

40

atgccttcaagtggaggttgtggccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaaaccccatgc
tgtcagtgaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttca
atatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaa
atgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgc
tgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttc
actgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttctga(SEQID NO: 34)

【 0 1 1 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 1 7 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE

50

MYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF - (SEQ ID NO:35)

【 0 1 1 8 】

ヒトNME7-B3:

【 0 1 1 9 】

(DNA)

【 0 1 2 0 】

atgccttcaagtggagggtgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagtggaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggtttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaattgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggtcaatacttcttcaagatcttggataattagtga (SEQ ID NO: 36)

10

【 0 1 2 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 2 2 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN - - (SEQ ID NO:37)

20

【 0 1 2 3 】

ヒトNME7-AB:

【 0 1 2 4 】

(DNA)

【 0 1 2 5 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaaciaaacgctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctcctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgtgaaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtgccacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctcttggaaacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcctctgcggccagagaaaatggagttgtttttccttcaagtggagggtgttgggcccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagtggaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggtttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggaatcggttaattgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttctactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggtcaatacttcttcaagatcttggataattagtga (SEQ ID NO: 38)

30

【 0 1 2 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 2 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC EWRLLGPANSGVARTDASEIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN - - (SEQ ID NO:39)

40

【 0 1 2 8 】

ヒトNME7-AB1:

【 0 1 2 9 】

(DNA)

【 0 1 3 0 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaaciaaacgctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac

50

cctttttcaatgagctgatccagttttattacaactggctctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtgccacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcagtgccctgatcttttgccttctgcccagagaaatggagttgttttttccctt
caagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtgttaaaccctatgctgtcagt
gaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatgga
tcgggttaatgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatg、gtgacagaaatgta
ttctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatc
ctgaaattgcccggcatttacgcccgtgaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgt
actgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttctga (SEQ ID NO: 40)

【 0 1 3 1 】

10

(アミノ酸)

【 0 1 3 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIHRLRPGLTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (SEQ ID NO: 41)

【 0 1 3 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A配列:

【 0 1 3 4 】

(DNA)

20

【 0 1 3 5 】

atggaaaaaacgctggccctgatataaacggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttcacccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagctctcgcc
cgtttttcaatgaactgatataatcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatggtccggactcatctcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga(
SEQ ID NO: 42)

【 0 1 3 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 3 7 】

30

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (SEQ ID NO: 43)

【 0 1 3 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A1配列:

【 0 1 3 9 】

(DNA)

【 0 1 4 0 】

atggaaaaaacgctggccctgatataaacggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttcacccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagctctcgcc
cgtttttcaatgaactgatataatcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatggtccggactcatctcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttccga
gctctggcggttgcgggtccggcaaacaccgccaattttacctga (SEQ ID NO: 44)

40

【 0 1 4 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 4 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (SEQ ID NO: 45)

【 0 1 4 3 】

50

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A2配列:

【 0 1 4 4 】

(DNA)

【 0 1 4 5 】

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggtagtaccggaatgcttccctgctgcccgcgtacgaactgct
gttttatccgggcatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgata
atctgcatctggaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgac
cagtacaccgcgcgtcaactgggtagtcgcaaagaaaaaacgctggccctgatataaccggatgcaatctccaaagctgg
cgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaaatgatgatgctgagccgtaagaagccc
tggattttcatgtcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgca
atggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgtgctgctaccga
tgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggccggactcatctcgcatcgg
cagctcgtgaaatggaactgtttttctga (SEQ ID NO: 46)

10

【 0 1 4 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 4 7 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVVNFSRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (SEQ ID NO: 47)

20

【 0 1 4 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A3配列:

【 0 1 4 9 】

(DNA)

【 0 1 5 0 】

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggtagtaccggaatgcttccctgctgcccgcgtacgaactgct
gttttatccgggcatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgata
atctgcatctggaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgac
cagtacaccgcgcgtcaactgggtagtcgcaaagaaaaaacgctggccctgatataaccggatgcaatctccaaagctgg
cgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaaatgatgatgctgagccgtaagaagccc
tggattttcatgtcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgca
atggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgtgctgctaccga
tgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggccggactcatctcgcatcgg
cagctcgtgaaatggaactgtttttcccagctctggcggttgcgggtccggcaaacaccgccaattttacctga (SEQ ID
NO: 48)

30

【 0 1 5 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 5 2 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVVNFSRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (S
EQ ID NO: 49)

40

【 0 1 5 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B配列:

【 0 1 5 4 】

(DNA)

【 0 1 5 5 】

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtga
tgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gctggtttaccgaatatcacgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgctgctgcatggaaattcagcaaaacaat
gccacaaaacgctttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgctgctccgggtaccctgctgctg

50

aatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacggctctgctggaagttcaatact
ttttctga(SEQID NO: 50)

【 0 1 5 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 5 7 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF-(SEQ ID NO:51)

【 0 1 5 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B1配列:

【 0 1 5 9 】

(DNA)

【 0 1 6 0 】

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtga
tgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttaciaag
gctgggttaccgaatatcacgatatgggtacggaaatgtactccgggtccgtgctgctcgcatggaaattcagcaaaacaat
gccacaaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccggaaatcgacagtcattctgctccgggtaccctgcgcgc
aatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacggctctgctggaagttcaatact
ttttcaaaattctggataattga(SEQID NO: 52)

【 0 1 6 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 6 2 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-(SEQ ID NO:53)

【 0 1 6 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B2配列:

【 0 1 6 4 】

(DNA)

【 0 1 6 5 】

atgccgagctctggcgggtgctgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgc
agtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttca
acatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttaciaaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggtacggaa
atgtactccgggtccgtgctgctcgcatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggc
agatccggaaatcgacagtcattctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgc
actgtaccgatctgccggaagacggctctgctggaagttcaatactttttctga(SEQID NO: 54)

【 0 1 6 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 6 7 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF-(SEQ ID N
O:55)

【 0 1 6 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B3配列:

【 0 1 6 9 】

(DNA)

【 0 1 7 0 】

atgccgagctctggcgggtgctgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgc
agtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttca
acatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttaciaaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggtacggaa
atgtactccgggtccgtgctgctcgcatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggc
agatccggaaatcgacagtcattctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgc

10

20

30

40

50

actgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (SEQ ID NO: 56)

【 0 1 7 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 7 2 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ
ID NO: 57)

【 0 1 7 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB配列:

【 0 1 7 4 】

(DNA)

【 0 1 7 5 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcgcc
cgttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgatgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatgggtccggactcatctcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttccga
gctctggcgggttgcgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgtca
gaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggcctttgaaatctcggccatgcagatgttcaacatgga
ccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttaciaaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtact
ccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacaaaacgctttcgatgaattctgtgggtccggcagatccg
gaaatcgcacgtcatctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaaccagaacgctgtgcactgtac
cgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (SEQ ID NO: 58)

【 0 1 7 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 7 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASEIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
E IARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID NO: 59)

【 0 1 7 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB1配列:

【 0 1 7 9 】

(DNA)

【 0 1 8 0 】

Atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcgcc
cgttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgatgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatgggtccggactcatctcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttccga
gctctggcgggttgcgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgtca
gaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggcctttgaaatctcggccatgcagatgttcaacatgga
ccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttaciaaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtact
ccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacaaaacgctttcgatgaattctgtgggtccggcagatccg
gaaatcgcacgtcatctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaaccagaacgctgtgcactgtac
cgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga (SEQ ID NO: 60)

【 0 1 8 1 】

(アミノ酸)

【 0 1 8 2 】

10

20

30

40

50

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPGANSVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIAHRLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF-(SEQ ID NO:61)

【0183】

マウスNME6

【0184】

(DNA)

【0185】

Atgacctccatcttgcaagtcaccaagctcttcagctcacactagccctgatcaagcctgatgcagttgccaccact
gatcctggaggctgttcatcagcagattctgagcaacaagttcctcatgtacgaacgaggaactgcagtggaagctgg
aggactgccggagggtttaccgagagcatgaagggcgtttttctatcagcggctggagggttcatgacaagtgggcca
atccgagcctatatccttgcccacaaagatgccatccaactttggaggacactgatgggaccaccagagtatttcgagc
acgctatatagccccagattcaattcgtggaagtttgggcctcactgacacccgaaatactacccatggctcagactccg
tggtttccgccagcagagagattgcagcctcttccctgacttcagtgaacagcgttggtatgaggaggaggaacccag
ctgcggtgtggtcctgtgcactacagtcagaggaaggtatccactgtgcagctgaaacaggaggccacaaacaacctaa
caaaccttag(SEQ ID NO:62)

10

【0186】

(アミノ酸)

【0187】

MTSILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRTRELQWKLEDCCRFFYREHEGRFFYQRLVEFMTSGP
IRAYILAHKDAIQLWRTLMGPTRVFRARYIAPDSIRGSLGLTDRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQ
LRCGPVHYSPEEGIHCAETGGHKQPNKT-(SEQ ID NO:63)

20

【0188】

ヒトNME6:

【0189】

(DNA)

【0190】

Atgaccagaatctggggagttagatggcctcaatcttgcaagccctcaggctctccagctcactctagccctgatcaa
gcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaa
tgagagaactactgttgagaaaaggaagattgccagagggtttaccgagagcatgaagggcgtttttctatcagaggctg
gtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat
gggaccaccagagtggttccgagcacgccaatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgca
acaccacccatgggtcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagcctcttccctgacttcagtgaacagcgc
tggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagaggagggtgtccactatgtagctgg
aacaggaggcctaggaccagcctga(SEQ ID NO:64)

30

【0191】

(アミノ酸)

【0192】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA-(SEQ ID NO:65)

40

【0193】

ヒトNME6 1:

【0194】

(DNA)

【0195】

Atgaccagaatctggggagttagatggcctcaatcttgcaagccctcaggctctccagctcactctagccctgatcaa
gcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaa
tgagagaactactgttgagaaaaggaagattgccagagggtttaccgagagcatgaagggcgtttttctatcagaggctg

50

gtggagt tcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat
gggacccaccagagtgttccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgca
acaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaacagcgc
tggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (SEQ ID NO:66)

【 0 1 9 6 】

(アミノ酸)

【 0 1 9 7 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPV- (SEQ ID NO:67)

【 0 1 9 8 】

ヒトNME6 2:

【 0 1 9 9 】

(DNA)

【 0 2 0 0 】

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttaccgagagcatgaag
ggcgtttttctatcagaggctggtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgcc
atccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggag
tttcggcctcactgacacccgcaacaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttct
tccctgacttcagtgaacagcgcgtggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (SEQ ID NO:68)

【 0 2 0 1 】

(アミノ酸)

【 0 2 0 2 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (SEQ
ID NO:69)

【 0 2 0 3 】

ヒトNME6 3:

【 0 2 0 4 】

(DNA)

【 0 2 0 5 】

atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttaccgagagcatgaag
ggcgtttttctatcagaggctggtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgcc
atccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggag
tttcggcctcactgacacccgcaacaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttct
tccctgacttcagtgaacagcgcgtggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagag
ggaggtgtccactatgtagctggaacaggaggcctaggaccagcctga (SEQ ID NO:70)

【 0 2 0 6 】

(アミノ酸)

【 0 2 0 7 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPE
GGVHYVAGTGGLGPA- (SEQ ID NO:71)

【 0 2 0 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6配列:

【 0 2 0 9 】

(DNA)

10

20

30

40

50

【 0 2 1 0 】

atgacgcaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccctggctctgatcaa
accggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgagcaacaaatctctgatcgtgcgta
tgcggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatcgcgcaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctg
gttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatacctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgtagacctgat
gggtccgacgcgcgtctttcggtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcgggtctgaccgatagcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcgctcccgtagaatcgcgccctttttcccgacttctccgaacagcgt
tggtagcaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccgggtctgttatctccggaagggtgggtgcatatgtggcggg
cacgggtgggtctgggtccggcatga (SEQ ID NO:72)

【 0 2 1 1 】

(アミノ酸)

【 0 2 1 2 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (SEQ ID NO:73)

【 0 2 1 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 1配列:

【 0 2 1 4 】

(DNA)

【 0 2 1 5 】

atgacgcaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccctggctctgatcaa
accggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgagcaacaaatctctgatcgtgcgta
tgcggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatcgcgcaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctg
gttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatacctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgtagacctgat
gggtccgacgcgcgtctttcggtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcgggtctgaccgatagcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcgctcccgtagaatcgcgccctttttcccgacttctccgaacagcgt
tggtagcaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccgggtctga (SEQ ID NO:74)

【 0 2 1 6 】

(アミノ酸)

【 0 2 1 7 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEPQLRCGPV- (SEQ ID NO:75)

【 0 2 1 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 2配列:

【 0 2 1 9 】

(DNA)

【 0 2 2 0 】

atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgag
caacaaatctctgatcgtgcgtagtcggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatcgcgcaacatgaag
gccgtttcttttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatacctggctcacaagatgcg
attcagctgtggcgtagacctgatgggtccgacgcgcgtctttcggtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctc
gttcgggtctgaccgatagcgcaataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcgctcccgtagaatcgcgccctttt
tcccgacttctccgaacagcgttggtagcaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccgggtctga (SEQ ID NO:76
)

【 0 2 2 1 】

(アミノ酸)

【 0 2 2 2 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEPQLRCGPV- (SEQ

10

20

30

40

50

ID NO:77)

【 0 2 2 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 3配列:

【 0 2 2 4 】

(DNA)

【 0 2 2 5 】

atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgcctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaatcttgag
caacaaattctgatcgctgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggttttatcgcgacaatgaag
gccgtttcttttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatcctgggtcaciaaagatgcg
attcagctgtggcgtaacctgatgggtccgacgcgcgtcttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctc
gttcggcttgaccgatacgcgcaataccacgcacggttagcgactctgttgttagtgcgtcccgtgaaatcgcgccctttt
tcccgacttctccgaacagcgttggtagaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccggtctgttatctccggaa
ggtggtgtccattatgtggcgggcacgggtgggtctgggtccggcatga (SEQ ID NO:78)

10

【 0 2 2 6 】

(アミノ酸)

【 0 2 2 7 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRITLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEPQLRCGPVCYSPE
GGVHYVAGTGGLGPA- (SEQ ID NO:79)

20

【 0 2 2 8 】

全長OriGene-NME7-1

【 0 2 2 9 】

(DNA)

【 0 2 3 0 】

gacgttgatatacgactcctatagggcgccgggaattcgtcgactggatccggtaccgaggagatctgccgccgcgatcg
ccatgaatcatagtgaagattcgttttcatatgcagagtggatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatgagctt
ttattttacccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgcaccttttaaagcggaccaaataatga
taacctgcacttggaagatttatttataggcaacaaagtgaatgtcttctctcgacaactggatttaattgactatgggg
atcaatatacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgtagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggct
ggagaaataattgaataataaacaagcgtggatttactataaccaaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagc
attggattttcatgtagatcaccagtcagacccttttcaatgagctgatccagtttatataactggctctattatg
ccatggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcaca
gatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgattcttttgcttc
tgccggccagagaaatggagtgtttttccctcaagtggaggtgtgggcccggcaaactgctaaatttactaattgta
cctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagtgaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggtttt
gaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaagtgtgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgac
cgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggccctgtgttagcaatggagattcaacagaataatgctacaaaga
catttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaattcttgggt
aaaactaagatccagaatgctgttctactgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttcaagat
cttgataatacgcgtacgcggccgctcgagcagaaactcatctcagaagaggatctggcagcaaatgatatcctggatt
acaaggatgacgacgataaggtttaa (SEQ IDNO: 80)

30

40

【 0 2 3 1 】

(アミノ酸)

【 0 2 3 2 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVVNFSRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLLPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCT
CCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDNTRTRRLEQKLI SEEDLAANDILDY
KDDDDKV (SEQ ID NO:81)

50

【 0 2 3 3 】

Abnova NME7-1全長

【 0 2 3 4 】

(アミノ酸)

【 0 2 3 5 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVVNFSRQLVLI DYGD
 QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
 MEILRDDAICEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCT
 CCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKT
 FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN (SEQ ID NO:82)

10

【 0 2 3 6 】

Abnova部分NME7-B

【 0 2 3 7 】

(アミノ酸)

【 0 2 3 8 】

DRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHC
 TDLPEDGLLEVQYFFKIL (SEQ ID NO:83)

【 0 2 3 9 】

ヒスチジン・タグ

【 0 2 4 0 】

(ctcgag)caccaccaccaccactga (SEQ ID NO:84)

20

【 0 2 4 1 】

Strept IIタグ

【 0 2 4 2 】

(accggt)tgagccatcctcagttcgaaaagtaatga (SEQ ID NO:85)

【 0 2 4 3 】

N-10 ペプチド:

【 0 2 4 4 】

QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVFPFSAQSGA (SEQ ID NO:86)

【 0 2 4 5 】

C-10 ペプチド

【 0 2 4 6 】

GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDV (SEQ ID NO:87)

【 0 2 4 7 】

ヒトNME7に由来免疫ペプチド:

【 0 2 4 8 】

LALIKPDA (SEQ ID NO:88)

【 0 2 4 9 】

MMMLSRKEALDFHVDHQS (SEQ ID NO:89)

【 0 2 5 0 】

ALDFHVDHQS (SEQ ID NO:90)

【 0 2 5 1 】

EILRDDAICEWKRL (SEQ ID NO:91)

【 0 2 5 2 】

FNELIQFITTGPI (SEQ ID NO:92)

【 0 2 5 3 】

RDDAICEW (SEQ ID NO:93)

【 0 2 5 4 】

SGVARTDASESIRALFGTDGIRNAA (SEQ ID NO:94)

【 0 2 5 5 】

50

ELFFPSSGG(SEQ ID NO:95)
【 0 2 5 6 】
KFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMA(SEQ ID NO:96)
【 0 2 5 7 】
LMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVT(SEQ IDNO:97)
【 0 2 5 8 】
EFYEVYKGVVTEYHD(SEQ ID NO:98)
【 0 2 5 9 】
EIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA(SEQID NO:99)
【 0 2 6 0 】 10
YSGPCVAM(SEQ ID NO:100)
【 0 2 6 1 】
FREFCGP(SEQ ID NO:101)
【 0 2 6 2 】
VHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN(SEQ ID NO:102)
【 0 2 6 3 】
IQNAVHCTD(SEQ ID NO:103)
【 0 2 6 4 】
TDLPEDGLLEVQYFFKILDN(SEQ ID NO:104)
【 0 2 6 5 】 20
PEDGLLEVQYFFK(SEQ ID NO:105)
【 0 2 6 6 】
EIINKAGFTITK(SEQ ID NO:106)
【 0 2 6 7 】
MLSRKEALDFHVDHQS(SEQ ID NO:107)
【 0 2 6 8 】
NELIQFITT(SEQ ID NO:108)
EILRDDAICEWKRL(SEQ ID NO:109)
【 0 2 6 9 】
SGVARTDASESIRALFGTDGI(SEQ ID NO:110) 30
【 0 2 7 0 】
SGVARTDASES(SEQ ID NO:111)
【 0 2 7 1 】
ALFGTDGI(SEQ ID NO:112)
【 0 2 7 2 】
NCTCCIVKPHAVSE(SEQ ID NO:113)
【 0 2 7 3 】
LGKILMAIRDA(SEQ ID NO:114)
【 0 2 7 4 】
EISAMQMFNMDRVNVE(SEQ ID NO:115) 40
【 0 2 7 5 】
EVYKGVVT(SEQ ID NO:116)
【 0 2 7 6 】
EYHDMVTE(SEQ ID NO:117)
【 0 2 7 7 】
EFCGPADPEIARHLR(SEQ ID NO:118)
【 0 2 7 8 】
AIFGKTKIQNAV(SEQ ID NO:119)
【 0 2 7 9 】
LPEDGLLEVQYFFKILDN(SEQ ID NO:120) 50

【 0 2 8 0 】	
GPDSFASAAAREMELFFP(SEQ ID NO:121)	
【 0 2 8 1 】	
ヒトNME7に由来した免疫ペプチド	
【 0 2 8 2 】	
ICEWKRL(SEQ ID NO:122)	
【 0 2 8 3 】	
LGKILMAIRDA(SEQ ID NO:123)	
【 0 2 8 4 】	
HAVSEGLLGK(SEQ ID NO:124)	10
【 0 2 8 5 】	
VTEMYSGP(SEQ ID NO:125)	
【 0 2 8 6 】	
NATKTFREF(SEQ ID NO:126)	
【 0 2 8 7 】	
AIRDAGFEI(SEQ ID NO:127)	
【 0 2 8 8 】	
AICEWKRLGPPAN(SEQ ID NO:128)	
【 0 2 8 9 】	
DHQSRRPF(SEQ ID NO:129)	20
【 0 2 9 0 】	
AICEWKRLGPPAN(SEQ ID NO:130)	
【 0 2 9 1 】	
VDHQSRRPF(SEQ ID NO:131)	
【 0 2 9 2 】	
PDSFAS(SEQ ID NO:132)	
【 0 2 9 3 】	
KAGEIIEIINKAGFTITK(SEQ ID NO:133)	
【 0 2 9 4 】	
ヒトNME1に由来した免疫ペプチド	30
【 0 2 9 5 】	
MANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFE(SEQ ID NO:134)	
【 0 2 9 6 】	
VDLKDRPF(SEQ ID NO:135)	
【 0 2 9 7 】	
HGSDSVESAEKEIGLWF(SEQ ID NO:136)	
【 0 2 9 8 】	
ERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFE(SEQ ID NO:137)	
【 0 2 9 9 】	
VDLKDRPFFAGLVKYMHSPPVAMVWGLN(SEQ ID NO:138)	40
【 0 3 0 0 】	
NIIHGSDSVESAEKEIGLWFHPEELV(SEQ ID NO:139)	
【 0 3 0 1 】	
KPDGVQRGLVGEII(SEQ ID NO:140)	
【 0 3 0 2 】	
NME阻害	
【 0 3 0 3 】	

本出願人は、重要な成長因子受容体MUC1*及びその活性化リガンド、2量体型のNM23-H1(NME1とも呼称する)が、殆どの固形腫瘍癌の成長を仲介することを以前に発見した。本発明者は、この同じ成長因子/成長因子受容体ペアが、多能性幹細胞の成長をさらに仲介す

ることを続いて発見した。MUC1*、互換的スプライスバリエントあるいは膜貫通型タンパク質(MUC1)の酵素による開裂型は、すべての分化多能のヒト幹細胞で(Hikita、2008年ら)及び大多数の固形腫瘍癌で(Mahanta、2008年ら)発現される。幹細胞が分化するとき、MUC1の開裂はおさまり、また、MUC1はその全長の不活性型に戻る。幹細胞及び癌細胞で、MUC1*は、成長因子受容体として機能する。MUC1*のリガンド誘導二量化は、癌細胞成長、生存を促進し、癌細胞を化学療法剤抵抗性にする(Fessler、2009年ら)。MUC1*細胞外ドメインのリガンド誘導二量化の阻害は、癌細胞成長を生体外で(図1)及び生体内で(図2)非常に阻害する。幹細胞では、分化を阻害している間、MUC1*のリガンド誘導二量化は成長と生存を刺激する。幹細胞と癌細胞の両方はNM23-H1を分泌する。二量体型では、NM23-H1は、幹細胞を増殖させ、かつそれらの分化を阻害するために、MUC1*の細胞外ドメインを二

10

量化させる。
二量体型のNME1は、幹細胞の成長及び多分化能を促進するだけでなく、ヒト幹細胞を最も初期状態、「ナイーブ」状態と呼ばれる最も分化多能な状態に戻すことを誘導する((Nichols J, Smith A (2009); Hanna et al, 2010; Amit M, et al, 2000; Ludwig TE, et al 2006; Xu C, et al, 2005; Xu RH, et al, 2005; Smaghe et al 2013)。現在まで、それらがまさにその初期胚の内部の集合体に存在するので、これは、ナイーブ状態にヒト幹細胞を維持すると示された唯一の天然因子である。

【0304】

ここで、本発明者は、以前に幹細胞に特異的であると思われた他の分子も、癌細胞中で発現されるということを見出した。胚形成中に発現され、しかし不規則に癌細胞で再び発現する成長因子及び成長因子受容体は、それらを無能にすることが、患者に重大な負の効果もたないので、優れた治療標的となる。したがって、胚形成において、胚の幹(ES)細胞あるいは誘導分化多能の幹(iPS)細胞において活性であるが、不規則に癌細胞中で再活性化される幹細胞成長因子及び受容体を同定し、それらを不能にし若しくはそれらの発現を抑制させる治療手段を開発することは、当該技術分野の大きな進展である。

20

【0305】

本出願人は、ヒト幹細胞中で発現する多くの遺伝子及び遺伝子産物も又、ヒト癌で発現することをさらに最近発見した。例えば、MUC1*、代替スプライスバリエントあるいは膜貫通型タンパク質の酵素的開裂型、MUC1*、は、すべての分化多能のヒト幹細胞、及び大多数の固形腫瘍癌で発現される。幹細胞が分化する場合、MUC1の開裂は止まり、また、MUC1はその全長の不活性型に戻る。幹細胞及び癌細胞上で、MUC1*は、成長因子受容体として機能する。MUC1*の二量化は、幹及び癌細胞成長を促進する；それは、幹細胞の分化を阻害し、癌細胞をより分化されなかった状態に戻らせる。幹細胞と癌細胞は両方とも二量体型でNM23-H1を分泌する、また幹細胞を増殖させ、かつそれらの分化を阻害するためにMUC1*の細胞外ドメインを二量化させる。

30

【0306】

本発明者は、幹細胞中で活性的に発現されるNMEファミリーメンバーが、癌細胞中で不規則にアップレギュレートされることを発見した。NM23-H1に加えて、他のNMEファミリータンパク質は、幹及び癌細胞成長を促進し、それらの分化を阻害する成長因子及び転写調節因子として作用する。二量体である場合、NME1は、幹細胞成長及び多分化能を促進する。NME1二量体は、さらに、MUC1陽性癌細胞の成長及び脱分化を仲介する。幹細胞濃度が増加し及びますます多くのNME1が幹細胞から分泌されるとき、NME1は、実際に分化を誘導し多能性幹細胞成長を止める、ヘクサマーを形成する。癌細胞は、正常な成人細胞より、より分化されていないように見える場合があることが知られている。実際、癌細胞が、形態学的に、脱分化したように見える程度は、癌活動性の程度に関連する。したがって、癌細胞の分化を引き起こし、自己複製するそれらの能力を制限するであろうヘクサマー型のNME1で、癌患者若しくは癌になるリスクのある患者を、処置することは、価値ある治療アプローチである。。

40

【0307】

NME1に加えて、NME6とNME7は、初期段階の幹細胞及び癌細胞で発現される。ウェスタン

50

プロット分析が、種々多様のヒト幹細胞及び癌細胞株について行なわれ、それは、幹細胞と癌細胞の両方が、NME1、NME6及びNME7を発現し分泌することを示した。1つのそのような実験で、ヒト胚性幹細胞(BG01v)及びヒトMUC1*陽性乳癌細胞(T47D)について、その細胞溶解物は、NME1(NM23-H1)、NME6(データは示されない)あるいはNME7の存在が検査された。図3Aと3Bは、NME1とNME7が、幹細胞と癌細胞の該溶解物に容易に検知されたことを示す。NME6(～22kDa)は、図4Dにおいて示されるより敏感な分析によって検知された。プルダウン分析は、MUC1の細胞質ドメインに結合する抗体を使い幹細胞と癌細胞で行なわれた。図3C及び3Dのウェスタン、NME1とNME7の両方は、(それが幹と癌細胞に存在するので)MUC1に結合することを示す。NME7は、幹細胞と癌細胞の両方で生産されるが、本発明者は、細胞内に、全長タンパク質～42kDaとして存在することを見出した。しかしながら、分泌される前に、NME7は、開裂される。分泌された型は、そのリーダー配列DM10が欠けているように見え、～33kDaの明白な分子量が確認された。図5は、NME7の存在について検査された、ヒト胚の幹(ES)細胞(A)及び誘導分化多能の幹(iPS)細胞(B、C)のウェスタンプロットの写真のパネルである。ウェスタンプロットは、細胞溶解物中にNME7の3つの型の存在を示す。それらは、～42kDa(全長)、～33kDa(N-末端DHドメインが欠けているNME7-ABドメイン)及び小さな～25kDa種の明白な分子量を持つ。しかしながら、より低い分子量種だけが調整済み培地(C)中で分泌される。

【0308】

本発明者は、ヒトNME7の発現のためにいくつかの構成物を作った。大腸菌中でよく発現するこれらのうちの1つは、モノマーとして可溶の型で分泌され、NME1二量体が、幹細胞成長、多分化能及び分化の阻害の促進を履行するようにほぼ機能した。この構成物では、リーダー配列「DM10」は配列から除去された。これは、タンパク質の分泌型として、ほぼ同じ分子量(33kDa)の種を生成した。該タンパク質は、ヒスチジン・タグ化タンパク質として作られ、最初にNTA-Niカラムで精製され、次に、98%純度以上にFPLCによって精製された。本発明者は、NME7、NME7-ABとこの型を呼ぶ。本発明は、NME7タンパク質の正確な性質によって制限されることは意図していない。本発明者が生成したNME7-ABタンパク質は、単に、その幹/癌促進機能に必要な自然なタンパク質の最小の部分でありうる。

本発明者は、ここに含まれている実験例と実施例において実証されるように、NME7-ABは、自然状態でプロセスされたNME7と本質的に同じである方法で機能するというを示した。しかしながら、NME7の自然に発生する開裂サイトは、本発明者がNME7-AB N-末端の開始場所とは異なるかもしれない。NME7の阻害剤は、N-末端でDM10を含んでいる天然タンパク質に作用しうるか、又はNME7の分泌型への開裂を阻害するために作用しうる。図6A-Cは、ニッケル・カラムによってつづいて精製されるNME7-ABのFPLCトレース(A)、未精製タンパク質のSDS-PAGEゲル(B)及び最終生産物のFPLCトレース(C)を示す。ナノ粒子分析が行なわれ、モノマーとしてのNME7が、MUC1*細胞外ドメインの2つのPSMGFRペプチド(SEQ ID NO: 6)に同時に結合できることを示した。

ヒスチジン・タグ化PSMGFRペプチドは、NTA-SAM-被覆ナノ粒子上に固定化された。分析は、FPLC及び天然のゲルによってモノマーであることが確認された、DM10のN-末端リーダー配列が欠けて発現される、組み換えNME7-ABが、ナノ粒子に加えられた。NME7の添加は、金のナノ粒子溶液をピンクから青に変わらせ、それはNME7が、同時に、2つの別個のナノ粒子上の2つのペプチドに結合していることを示す。それは、粒子を共に密接に近づかせ、特徴的な色の変異をもたらす(図7)。別のELISA実験は、NME7モノマーが、2つのMUC1*細胞外ドメインペプチドを二量化させることを実証した。最初のPSMGFRペプチドは、BSAにカップル化され、多重ウェルプレート上で固定化された。組み換えNME7-ABが添加された。適切な洗浄ステップの後に、ビオチンで修飾された、第2のPSMGFRペプチドが加えられた。その後、ラベル化ストレプトアビジン(streptavidin)が加えられ、それはNME7モノマーが同時に2つのMUC1*細胞外ドメインペプチドを結合することができることを明らかに示した(図8)。これらの結果は、その2つのNDPKドメイン経由のNME7が、幹細胞と癌細胞で、結合しそしてMUC1*を二量化させることを示す。

【0309】

NME7は、ほぼNME1二量体と同様に機能する。NME1二量体のように、NME7は、完全にヒト幹細胞の成長をサポートする。ヒト幹細胞(胚「ES」及び誘導分化多能「iPS」)の試験パネルが、ただ一つの成長因子サイトカインとして添加されたNME7-ABあるいはNME1二量体のいずれかを持つ最小の無血清基礎培地において培養された。幹細胞は、一般的なFGF含有培地での成長より速く成長し、自然には分化せず、そして2つの活性X染色体を持っていることにより証拠づけられるように、ナイーブ状態に戻された。図9及び図10は、NME1二量体あるいはNME7-ABで培養された1日目と3日目のそれぞれのヒトHES-3胚性幹細胞の写真を示す。

はっきり見ることができるように、幹細胞は、分化の何らのサインなしで等しく成長するように見える。ナイーブ幹細胞が、コロニーで成長しないが、密度が達成するに従いシートになる単層で寧ろ成長することに留意する。図11は、10継代以上NME7-ABで培養された幹細胞が、標準の多分化能マーカーに陽性に染色するということを確認する免疫細胞化学(ICC)実験の写真を示す。図12は、NME7-ABで培養された幹細胞がナイーブ状態であることを確認するICCの実験の写真を示す。パネル(A)の細胞は、標準的手法であるように、マウス・フィーダー細胞上でFGFにおいて培養された。

染色抗体は、それがヒストン3(H3K27me)上の濃縮トリメチル化リジン27に結合し、赤いドットをもたらした；それは1つのX染色体が不活性(XaXi)で、幹細胞が「プライム化(初回刺激を受けた)」状態に進んだことを示している。パネル(B)の細胞は、それらがNME7-ABで10継代培養されたという点を除いて、(A)において撮影されたのと同じ細胞である。その挿入物で見ることができるように、H3K27me抗体は、クラウド染色パターンを生み、それは両方のX染色体が活性(XaXa)であることを示し、細胞はナイーブ状態に戻ったことを証拠づけた。したがって、本発明者は、NME7が、完全に、幹細胞成長及び多分化能をサポートしさらに、後の、プライム化状態より少ない成熟した状態である、ナイーブか基底状態にそれらを戻すことを実証した。

【0310】

本発明者は、次に、NME7が、さらに癌細胞の成長を駆動する活性成長因子かどうかを判断しようとした。もしそうならば、MUC1*細胞外ドメインへのNME7の相互作用を阻止する治療薬は、患者において癌成長を阻害するか予防することができる。NME7 A及びBドメインに対して調製されたウサギポリクローン抗体が、T47D、MUC1*陽性乳癌細胞に加えられ、細胞成長が分析された。非常に低い、ナノモル濃度でさえ、抗NME7は、癌細胞の成長を阻害した(図13-15)。好ましい実施態様では、癌の治療用の治療薬は、NME7のNDPK Aドメインへ結合する抗体である。

もっと好ましい実施態様では、治療薬は、NME7のNDPK Bドメインへ結合する抗体である。さらにもっと好ましい実施態様では、治療薬は、NME1には存在しないNME7のAかBドメインの配列に結合する抗体である。さらにもっと好ましい実施態様では、治療薬は、NME7及びMUC1*間の相互作用を阻害する抗体である。最も好ましい実施態様では、治療薬は、当該機能が癌腫瘍の成長あるいは癌様状態への復帰の促進をもたらすNME7の機能を阻害する抗体である。

【0311】

NMEリガンドが成長因子として機能する1つの方法が、MUC1*の細胞外ドメインへ結合し及び二量化させることによることを参照する。NMEファミリータンパク質には、1つ以上のNDPKドメインがある。これらのNDPKドメインには、成長因子と転写調節因子としてのそれらの機能から独立し、及び、それらのために必要されない、触媒機能をもつ。NMEファミリータンパク質は、それらのNDPKドメイン経由でMUC1*の細胞外ドメインへ結合する。

【0312】

異なるNMEファミリータンパク質は、正常な胚発生の際の異なる時に発現される。NME7は、幹細胞成長を調整し、そして生体内で大変初期の胚形成においてのみ発現する、NMEファミリータンパク質の最も原始的なものである。NME7は、DM10ドメインと呼ばれるN-末端リーダー配列と、2つのNDPKドメイン、A及びBをもつ単一の~42kDaタンパク質である。ELISA分析は、NME7が、MUC1*膜貫通受容体に結合し、二量化させることを示す。NME7は、

2つのNDPKドメインをもつので、MUC1*受容体を常に二量化させることができる偽二量体である。

【0313】

対照的に、NME1は、NME7(～17kDa)のおよそ半分の分子量で、たった1つのNDPKドメインをもつ。NME1は、二量体である場合に限り、成長を促進し、分化を阻害する成長因子として作用する。より高い濃度では、NME1は、ヘクサマーを形成することができる。二量体とは対照的に、NME1ヘクサマーは分化を誘導する。したがって、NME1(それは後で胚形成中で発現される)は、自身遮断する能力を持ち、それにより、自己複製を制限する。一方、NME7はできない。野生型(wt)NME1は、分析可能な濃度で、主としてヘクサマーとして存在する。安定な二量体集合体を形成するS120Gのような、突然変異体NME1タンパク質は、癌から単離され、したがって連続的にMUC1*受容体を活性化している。本発明者は組み換えNME1-wt及びS120G突然変異体を作った。

10

リフォールディングプロトコルを変えることによって、本発明者は、本質的に100%ヘクサマーあるいは100%二量体である集合体を安定化させることができた。さらに、本発明者は、二量体、四量体及びヘクサマーの混合物である、NME1-S120Gの集合体を単離した。図16は、天然のゲル上でこれらの様々なマルチマーを示す。図17(A)は、SPR実験において使用されたNME1タンパク質のゲルを開示し(B)、そこで、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドがチップに固定化され、そして、異なるNME1タンパク質が表面を通過した。結果は、NME1の二量体型が、MUC1*細胞外ドメインに結合する型であることを示す。パネル(C)は、PSMGFRペプチドが、NTA-Ni-SAM被覆ナノ粒子に付着され、そして組み換えNME1二量体若しくはヘクサマーが、ナノ粒子に加えられた実験を示す。

20

相互作用が起こる場合、金のナノ粒子は青くなり、そうでない場合、ピンクのままである。確認できるように、二量体だけが、ナノ粒子上のMUC1*ペプチドに結合し、そして、2つの異なるナノ粒子の2つのペプチドを二量化させ、本質的に、該粒子を架橋する。溶液に添加された時、MN-C2抗MUC1*抗体のFabは、NME1二量体とMUC1*PSMGFRペプチド間の相互作用を阻止する。パネル(D)は、競争的に相互作用を阻害するために、フリーのPSMGFRペプチドと二量体、ヘクサマー、又はNME1二量体(NM23)で培養されたヒト幹細胞の写真を示す。

写真で見ることができるよう、NME1二量体だけが、多能性幹細胞成長を促進する。自然界において、幹細胞の濃度が、臨界量に達し、そして、NME1のそれらの分泌が、それらがヘクサマーを形成する濃度に達する時、分化は誘導される。図18は、本願実験例に支持されるメカニズムを描く漫画である。それによってNME7とNME1は、NME1がそれ自体を制御し、多分化能を促進するために機能する。

30

【0314】

NME6もまた、まさに初期発生中で発現される。報告によると、NME6は、海綿のようなある種の二量体である。NME6は、成長を活性化し、分化を阻害することができるには、二量体を形成できる十分に高いレベルで発現されねばならない。したがって、それは、NME7より遅い段階で発現される。NME6は、さらに、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合する。プルダウン分析では、NME6は、癌細胞及び幹細胞で、MUC1*に結合することが示された。本発明者は、野生体タンパク質として、あるいは、NME1を二量体形成志向にさせるS120G変異を模倣する、単一の点突変異S139Gで、組み換えNME6を作った。さらに、ヒトNME6が、報告によるとそれは二量体として存在する、海綿NME6に見えるように、この敏感なエリアで別のNME6変異体が作られた。

40

これらの変異は、S139Aに加えて、V142DとV143Aである。図19 A、B及びCにおいて示されるELISA分析は、NME6が、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合することを示す。部分Aでは、NME6-wtは、モノマー、あるいは高分子量マルチマーとして精製される。その表面がPSMGFRMUC1*ペプチドで被覆される、ELISA分析は、MUC1*ペプチドへのNME6モノマーの優先的な結合を示す。部分Bでは、NME6マルチマーは、SDSにおいて、希釈によって解離される。このELISAは、マルチマーが解離されるに従い、MUC1*ペプチドへの結合が増加することを示す。

50

この図は、NME6-wtと二量体形成を志向する2つの突然変異体が、MUC1*ペプチドに結合することを示す。図19D-Hのゲルは、以下の発現を示す；NME6-wt(D)、ヒトNME1において二量体形成を増加する変異S120Gに相当するS139G変異を持つNME6(E)、二量体であることが報告される海綿型にヒト型を模倣させる3つの変異を担持するNME6(F)、及び2つのNME6タンパク質をリンクする単鎖タンパク質(GH)。パネルIは、MUC1の細胞質尾部に対する抗体を使用するプルダウン分析で、NME6が、癌細胞及び幹細胞で、MUC1に結合することを示す。

したがって、有効な抗癌剤は、MUC1*細胞外ドメインペプチドへのNME6二量体の結合を阻止する抗体、小分子あるいは他の薬剤である。好ましい実施態様では、癌の治療用薬は、NME6のNDPK Aドメインへ結合する抗体である。もっと好ましい実施態様では、治療用抗体は、NME1には存在しないNME6の配列に結合する。

【0315】

それらはまさに最も早い段階の幹細胞であるところの、胚盤胞の内部塊の胚性幹細胞を模倣するヒト幹細胞は、「ナイーブ」状態の幹細胞と呼ばれる。最近まで、研究者は遺伝学的に未修飾のナイーブ状態ヒト幹細胞を生体外で維持し若しくは生成することができなかった。本発明者は、NME1二量体若しくはNME7で、及び他の成長因子あるいはサイトカインがない状態、特にbFGFがない状態で、細胞を培養することで、ナイーブ状態が持つ未修飾のヒト幹細胞を遺伝子工学的に生成することに最近成功した。さらに、本発明者は、これらのナイーブ状態幹細胞が、それらがbFGFにさらされるとすぐに、より多く成熟した「プライム化」状態に進むことを示した。

非常に早い段階の幹細胞で、まさにハイ・レベルでNME7が発現されることを実証するために、本発明者は、NME1若しくはNME7(ナイーブ)のいずれかにおいて培養されたか、又はbFGF(プライム化)において培養されたヒト幹細胞についてのウェスタンブロット分析を行ない、その後、NME7の存在を検査した。プライム化状態の胚性幹細胞、それらはナイーブ状態の幹細胞よりもっと分化している、は、NME7のトレース量でのみ発現する。ありのままの比較において、初期の「ナイーブ」状態(「グランド」状態とも呼ぶ)の幹細胞は、NME7の高レベルを発現する(図3B、レーン1“ナイーブ”をレーン2“プライム化”に比較せよ)。NME7は、初期段階の幹細胞でのその発現に匹敵するレベルに癌細胞中で発現される(図3B、レーン3“癌細胞”をレーン1“ナイーブ幹細胞”に比較せよ)。この理由で、それらの主要な役割が、成年期ではなく初期発生にあるので、NME7とNME6は、治療上著しい副作用なしで無力化することができる。

【0316】

NME7は、2つのNDPKドメインをもつ単一の分子であり、また、したがって、1つの態様で、NME1二量体として機能する。NME7の結合力のあるパートナーのうちの1は、MUC1*である。本発明者の研究は、成長を促進し、かつヒト幹細胞及び癌細胞の両方の分化を阻害するために、NME7が、MUC1*陽性細胞の細胞外ドメインを結合し二量化させることを示す。NME7もまた、癌細胞、調整済み培地、細胞質及び核に検知され、それは、分泌された成長因子として、及びさらに直接あるいは間接的にDNAを結合する転写調節因子として機能することを示している。図20のウェスタンブロットは、NME1とNME7の両方が、両方の細胞質、及びヒト癌細胞(T47D)、胚性幹細胞(BG01v及びHES-3)及び誘導分化多能の幹(iPS)細胞の核の中に存在することを示す。

これらのデータは、遺伝子の転写に影響するために、NME1とNME7が、直接あるいは間接的に機能できることを示す。したがって、本発明の1つの態様では、NME1又はNME7の機能は、DNAへのNME1若しくはNME7の結合を阻害する、小分子でありうる薬剤を添加することにより阻害され、そして、NME1又はNME7の転写機能を阻害する薬剤は、癌患者、あるいは癌になるリスクをもつ患者に投与できる抗癌剤である。

【0317】

NMEタンパク質は、おそらく、異なる癌細胞で異なるレベルで発現される。殆どの癌は、MUC1*陽性で、NME1、NME6及びNME7の高い発現を示す。DU145前立腺癌細胞は、NME1若しくはNME6より、NME7が高い発現をする。PC3前立腺癌細胞(それらはMUC1*陰性である)は、

検知できるNME1やNME7を持たなかったが、NME6の高い発現を有した(図21)。

【0318】

NME7は、異なる型で存在する。

【0319】

NME7は、異なる種として発現される。これらの種のうちのいくつかは、癌細胞に特異的である。全長NME7は、42kDaで、そのN-末端で2つの異なったNDPKドメイン及び1つのDM10リーダー配列で構成される。全長NME7は細胞質で見つけることができる。~33kDaのNME7の種、それはNDPK A及びBドメインで構成された種と一致しているが、DM10リーダー配列が欠けている、は、もっぱら幹細胞及び癌細胞の両方の調整済み培地でもっぱら見出される(図5及び図22)。これらの発見は、幹細胞を培養するために添加された、二量体型の組み換えNME1には依存しないことに注目する。図23は、図22のゲルが、組換え型タンパク質上のヒスチジン・タグの存在に関し、さらされ及び再検査された時、何も検知されなかったことを示す。

10

これらの結果は、より小分子量のNME7が、分泌された成長因子型であるということができる。本発明者は、~33kDaの分子量を持ち、NME7-ABと呼ばれる、NDPK A及びBドメインを含み、だがDM10ドメインもたない、NME7変異体を作った。この組み換えNME7-ABは、他の成長因子あるいはサイトカインを欠く無血清培地で分化多能のヒト幹細胞の成長を完全にサポートすることができる。NME7-ABは、さらに完全に、MUC1*陽性の癌細胞の成長をサポートした。これらの実験は、NME7の分泌型が、成長因子型であること、及びそれがNDPK A及びBドメインを含み、大部分あるいは全てのDM10が欠け、及び~33kDaの分子量を持つことを示した。

20

図24は、マウス単クローン抗体(A)あるいは単にN-末端DM10配列を認識する別の単クローン抗体(B)を使い、NME7の存在について検査された、様々の細胞溶解物及び相当する調整済み培地のウェスタンブロットの写真を示す。該細胞の調整済み培地からのサンプルでの、~33kDa NME7種へのDM10特異的抗体の結合の欠如は、NME7の分泌された型が、N-末端DM10リーダー配列のすべてではないが、大部分が欠けていることを示す。

【0320】

別のより小さな~25kDa NME7種は、さらに時々存在する。ウェスタンブロットは、最初から、より低い分子量種~25kDaの存在を示す。この~25kDa NME7は、NDPK Aドメインを含み、MUC1*のための単一の結合部位をもつ。~25kDaバンドは、切り取られ、質量分析によって分析された。マスマススペックは、~25kDa種がNDPK Aドメインで本質的に構成されることを示した。

30

【0321】

NME7が、低レベルでも、他のヒト組織で発現されることが報告された。しかしながら、本発明者は、成長因子として機能するのがNME7の分泌された型であることを発見した。また、いくつかの成人組織はNME7を発現しうるが、重要な態様は、それが分泌されるかどうかである。NME7を発現し分泌する幹細胞は、それは、NME7を発現若しくは分泌しない幹細胞より初期-より分化多能の状態である、NME7を分泌しない幹細胞より初期-したがってより分化多能の状態である幹細胞である。

NME7を発現し分泌する癌細胞は、より分化されておらず及びNME7を分泌しない癌細胞より攻撃的な癌細胞である。したがって、NME7及び分泌されたNME7のレベルの分析は、腫瘍の活動性、計画治療、治療のモニター効果を予測するため、及び臨床試験のための患者集団を階層化するために使用されうる。

40

それゆえ、NME1、NME6あるいはNME7を検知する抗体は、癌の出現を検知するため若しくは癌の活動性を評価する診断のツールとして使用することができ、ここでハイ・レベルのNME1、NME6あるいはNME7は、腫瘍の活動性及び不十分な結果と関連する。ハイ・レベルのNME7及びNME6は、腫瘍の活動性及びしたがって予後不良に特に関連づけられる。NME1、NME6あるいはNME7に対する抗体で検査することができる、患者サンプルは、血液、組織生検、針生検などを含む体液のサンプルでありえる。

【0322】

50

NMEファミリータンパク質は、癌を促進するために機能しうる。

【0323】

本発明者は、NMEタンパク質が、細胞を幹様状態に戻すことを導くのと同様に、胚とiPS細胞の成長及び多分化能を促進することを以前に報告した。幹様状態及び癌の状態の遺伝的特徴の多くが、共有されるので、本発明者はさらに、NMEファミリータンパク質が、癌の状態を誘導しえるとの結論を下している。好ましい実施態様では、NMEファミリータンパク質は、NME1あるいはNME1に対して30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%あるいは97%より以上の配列同一性を持っているNMEタンパク質である。ここで該タンパク質は二量体である。もっと好ましい実施態様では、NMEファミリータンパク質は、NME7又はNME7ドメインA若しくはBの少なくとも1つに対して30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%あるいは97%以上の配列同一性を持っているNMEタンパク質であり、そしてMUC1*成長因子受容体を二量化させうる。

【0324】

ここで、本発明者は、二量体型のNME1、二量体型のバクテリアNME1、NME7あるいはNME7-ABが次のものに有効だったことを報告する：

- a) 分化を阻害している間、完全にヒトES若しくはiPSの成長及び多分化能をサポートする；
- b) より幹様若しくはより癌様状態へ、体細胞を戻す；そして、
- c) 腫瘍惹起細胞とも呼ばれる、癌細胞を高度に転移性の癌幹細胞状態へ転換する。

【0325】

本発明者は、ヒトNME1に対して高い配列相同性を持っており、二量体状態で存在することが報告された*Porphyromonas gingivalis* W83及び*Halomonas* Sp593(「HSP 593」)で見つけられた組み換えバクテリアNMEタンパク質を調製した(図25及び図26)。HSP 593は、大腸菌でよく発現され、及び重要な部分は二量体として存在し、その後、その集合体はFPLCによって精製され、二量体集合体を確認した(図25A)。“*Halomonas* Sp. 593からのバクテリアNMEは、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドに結合する”ことを示した直接結合実験が行なわれた(図25B)。HSP 593とヒトNME1あるいはヒトNME7ドメインA若しくはBの間の配列アラインメントは、MUC1*細胞外ドメインに結合されたバクテリアNMEが、ヒトNME1及びヒトNME7-Aに40-41%の同一性、及びNME7-Bに34%の同一性だったことを示した(図27A-C)。

【0326】

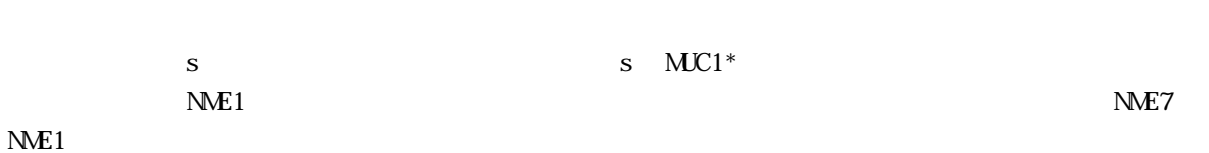
ヒトNME1あるいはNME7への同一性が30%より好ましくは40%以上を持つバクテリアNMEが、癌及び幹細胞成長及び生存を促進する、ヒトNME類似の機能を発揮することを示した追加の実験が行なわれた。ヒトNMEに対してこの高い配列同一性を持っていたバクテリアNMEの多くが、ヒト癌に関係があることが報告された。したがって、本発明者は、多くのバクテリアが、ヒトにおいて癌を誘導するか既存の癌をより悪くするかの考えをテストした。バクテリアNMEについて、ヒトNME1及びNME7に対しての、機能的な分析をした。ヒトHES-3胚性幹細胞が、ただ一つの成長因子かサイトカインとしてHSP 593、ヒトNME1二量体あるいはヒトNME7-ABを持つ無血清最小基礎培地において培養された。ヒトNME1及びNME7が、完全に、ヒト幹細胞成長をサポートしたので、HSP 593由来のバクテリアNMEもサポートした(図9及び図10と比較された図28 A-F)。

【0327】

ヒトNME1二量体あるいはヒトNME7は、体細胞を、幹と癌細胞のマーカーを発現している、より少ない成熟した状態に戻らせることができる。体細胞を癌様状態への振り向けることができることにより、それがそれらの機能を模倣できるかどうか判断するために、HSP 593由来バクテリアNMEが、ヒト同族体と共にテストされた。ヒト線維芽細胞が、ただ一つの成長因子かサイトカインとしてHSP 593、ヒトNME1二量体あるいはヒトNME7-ABを持つ無血清最小基礎培地において培養された。RT-PCR分析は、ヒトNMEのように、バクテリアNME 1 HSP 593が、体細胞を、19日までに、OCT4陽性状態に振り向けたことを示した。

幹細胞及び転移がん細胞が、アンカレッジ - 独立的に成長する場合があることを思い出

して、本発明者は実験を繰り返した。しかし、今回は、細胞を表面に付着させるために、ロー・キナーゼ阻害剤が細胞の1セットに加えられた。フローティング細胞が、表面に付着することを強いられた時、RT-PCRは、幹/癌マーカーOCT4の7倍の増加が、実際にあったことを示し、及び幹/癌マーカーNanogの12倍の増加と同じくらい高かった(図30)。

ヒト若しくはバクテリアNMEにおいて培養された時、繊維芽細胞が先祖返りする様に、実験の写真は、形態的な劇的な変異を示した(図31-38)。より少ない成熟した状態への体細胞を戻す効率の相対的な順序は、NME7>NME1二量体>バクテリアNME1であった。報告によると、転写調節因子BRD4及びコファクターJMJD6は、NME7を抑制し、NME1をアップレギュレートとする(Lui With et al, 2013)。本発明者は、これらの因子は、それらが後期段階プライム化幹細胞にあったよりナイーブ幹細胞中で低いレベルで発現されることを見出した(図39)。

10

この結果は、二量体としては幹細胞成長を活性化するが、該細胞がもっと分泌し、それがヘクサマーを形成するとき、該ヘクサマーはMUC1*を結合せず、また、分化が誘導されるような、NME1がする方法で、自己複製を自身中断若しくは制御できないので、NME7はNME1より早く発現された幹細胞成長因子であるという仮説を立証する。

【0328】

クロマチン再配置因子MBD3及びCHD4は、多分化能の誘導を阻止することが最近報告された(Rais Yet al, 2013)。ヒトNME1あるいはNME7あるいはバクテリアNME1において育てられたヒト繊維芽細胞のRT-PCR分析は、NMEタンパク質は、多分化能の4つの(BRD4、JMJD6、MBD3及びCHD4)ブロッカーをすべて抑制することを示す(図40)。RT-PCR実験の合成グラフは、多分化能遺伝子を増加させて、多分化能ブロッカーを減少させる相対的な能力は、NME7>NME1>HSP 593 NMEであることを示す。しかしながら、明らかに、HSP593からのバクテリアNMEは、ヒトNME7及びNME1の発現をアップレギュレートする(図41及び図42)。したがって、NME1二量体、NME7及びバクテリアNME1二量体は、より少ない成熟の癌/幹状態に体細胞を戻らせる。

20

【0329】

NME1とNME7が持つ別の機能は、腫瘍惹起細胞とも呼ばれる、より転移がん幹細胞状態に、癌細胞を変異する能力である。癌細胞の試験パネルが、ただ一つの成長因子若しくはサイトカインとしてヒトNME7-AB NME1二量体あるいはヒトNME1二量体(図の中の「NM23」)を持つ無血清最小基礎培地において培養がされた。この培地での数日後に、細胞は表面から浮かび始め、溶液中で成長し続けた。「浮遊物」は、集められPCRによって別々に分析された。他のウェル中の細胞は、ロー・キナーゼ阻害剤(「図のRi」)で処理された。

30

量的PCR分析は、癌幹細胞マーカーの増加を示す。そのいくつかは、幹細胞マーカーのみとみなされ使われた(Miki J et al 2007, Jeter CR et al 2011, Hong X et al 2012 Faber A et al 2013, Mukherjee Det al 2013, Herreros-Villanueva M et al , 2013, Sefah K et al, 2013; Su H-T et al 2013)。図44-47は、NMEタンパク質での培養が、癌細胞を、高度転移性腫瘍惹起細胞に戻らせ、転移受容体CXCR4で200倍より以上までアップレギュレートされ、SOX2で200倍以上までアップレギュレートされ、E-カドヘリン(CDH1)、NANOG及びMUC1で10倍までのアップを示す。

結論として、癌細胞は、MUC1を活性化し、癌と癌幹細胞遺伝子のホストをアップレギュレートするNME7及びNME1を分泌する。本発明者は、より適度であるが傾向性をもって、癌幹細胞のマーカーにおける増加及びMUC1陰性だった細胞でさえ転移を観察した(図47)。したがって、本発明者は、NME7は、おそらくMUC1*以外のルートによってこれらの細胞に入ることができ、そこで、それが転写調節因子としてなお作用でき、これらの遺伝子の発現レベルに影響することができると結論した。ヘクサマーとしては、それは幹あるいは癌成長を活性化しないので、NME1はこの方法で機能するために二量体であらねばならない。しかしながら、多くの癌がNME1を変異させ、それが自己複製制限ヘクサマーの形成に抵抗する。NME1と異なり、NME7は常に活性である。

40

【0330】

2i阻害剤(それらはMAPキナーゼ・シグナル経路のMEK及びGSK3ベータの小分子阻害剤で

50

ある)は、マウスプライム化幹細胞を、ナイーブ状態へ戻らせることが報告された(Silva J et al, 2008)。本発明者は、これらの阻害剤が、又、ヒト癌細胞を癌幹細胞状態へ戻せるかどうか疑いをもった。T47D乳癌細胞は、添加された2i阻害剤を持つ無血清最小基礎培地で、あるいは添加されたヒト組み換えNME7-ABを持つ同じ基礎培地で、或いは両方のNME7-AB及び2iをもつ同じ基礎培地で、10日間培養された。

図48に示される結果は、次のことを示す；癌幹細胞マーカーE-カドヘリン(CDH1)、転移受容体CXCR4が、幹/癌マーカーOCT4、SOX2及びNANOGと同様に、2i、2i+NME7-AB、NME7-AB単独で、非常にアップレギュレートされるということを示す。癌幹細胞マーカーを誘導する相対的な性能は、NME7>NME7+2i>2iであった(図48)。

癌細胞が、2iあるいはNME7-ABのいずれかで処置された時、多分化能阻止クロマチンレギュレーター及び転写調節因子BRD4、JMJD6、MBD3及びCHD4の発現は、同様にダウンレギュレートされた(図49)。

【0331】

したがって、NME1二量体、ヒト若しくはバクテリア、又はNME7の以下の機能のうちのいずれかを不能にする薬剤は、有力な抗癌剤で、癌の治療か予防のための患者に投与することができる；幹細胞成長を促進する能力、MUC1*ペプチドPSMGFRに結合する能力、体細胞をより少ない成熟した状態に戻す能力、癌細胞を癌幹細胞状態へ変異する能力。

【0332】

NME阻害剤が、有力な抗癌剤であるという考えを支持して、本発明者はある実験を行ない、他のNMEタンパク質と同様に、NME7、NME7-ABに結合する他の多くの抗体にそれを拡張することができることを確信した。本発明者は、ヒトNME7に対して生じさせたウサギポリクローン抗体が存在する状態若しくは存在しない状態で、MUC1*陽性の癌細胞を育てた。腫瘍細胞増殖は、濃度依存的に大幅に減少し、図13-15に示された。ポリクローン抗NME7は、ウサギによって生産された抗体であるという点で理想的な抗癌剤ではない。治療薬については、モノクローン抗体が生成され、特異的に癌細胞成長を阻害する能力によって選択され、かつ理想的にはMUC1*細胞外ドメインへのNME7の結合を阻止するモノクローン抗体を選択する。最後に、ヒトあるいはヒト化された抗体が選ばれうる。

【0333】

NME機能1: NMEタンパク質が、癌を促進する機能を発揮する1つの方法は、主としてPSMGFR配列から成る、本発明でMUC1*と呼ぶ、MUC1膜貫通型タンパク質のクリップ型へ結合による。MUC1*細胞外ドメインの二量化は、幹と癌細胞の成長及び脱分化を刺激する。

【0334】

NME機能2: NMEタンパク質が、癌、脱分化、多分化能、成長あるいは生存を促進する機能を発揮する別の方法は、他の遺伝子を刺激するか抑制するために、直接あるいは間接的に、機能する核に、それらを移送することである。OCT4とSOX2が、MUC1及びその開裂酵素MMP16のプロモーターサイトに結合することは以前に報告された(Boyer et al, 2005)。同じ研究は、SOX2とNANOGが、NME7のプロモーターサイトへ結合すると報告した。本発明者は、本発明者の実験に基づき、これらの「山中」多分化能因子(Takahashi and Yamanaka, 2006)が、MUC1、その開裂酵素MMP16及びその活性化リガンドNME7を、アップレギュレートすると結論付けた。

BRD4がNME7を抑制して、その一方でそのコファクターJMJD6が、胚形成中のNME7より遅く発現される自己調整の幹細胞成長因子である(本発明者が決定した)NME1を、アップレギュレートしていることは以前に他で報告された(Thompson et al)。さらに最近の報告は、Mbd3若しくはChd4のsiRNA抑制は、iPS生成への抵抗を大きく減少させた(Rais Y et al 2013 et al.)。本発明者の実験による証拠は、多分化能 Mbd3及びCHD4の阻害剤を抑制している間、NME7がBRD4とJMJD6を抑制する相互のフィードバックループがあることを示した。本発明者は、ナイーブヒト幹細胞において、これらの4つの因子BRD4、JMJD6、Mbd3及びCHD4は、後のステージのプライム化幹細胞でのそれらの発現に比較して、抑制されているということに着目した。さらに、本発明者は、マウスプライム化幹細胞をナイーブ状態へ戻す2i阻害剤(Gsk3 とMEKの阻害剤)が、同じ4つの因子BRD4、JMJD6、Mbd3及びCHD4を

10

20

30

40

50

ダウンレギュレートすることにも着目した。

【0335】

さらに、本発明者は、NME7が、SOX2(>150X)、NANOG(～10X)、OCT4(～50X)、KLF4(4X)及びMUC1(10X)を、アップレギュレートすることを見出した。重要なことには、本発明者は、NME7が、CXCR4(～200X)及びE-カドヘリン(CDH1)を含む癌幹細胞マーカーをアップレギュレートすることを示した。NME7は、最も原始的な幹細胞成長及び多分化能メディエータであり、また、それは、癌細胞をより転移性の癌幹細胞へ変異させるのと同様に体細胞を癌の状態へ変異させる強力な因子であるという結論に多くの証拠は導いた。図50は、本願の実験によって証拠づけられた幹/癌状態の関連するレギュレータとNME7の相互作用マップ図である。

10

二量体型のNME1は、体細胞を幹/癌様状態に変換することができること、わずかに劣った程度にだが癌細胞を転移性癌幹細胞への変異できることにおいて、ほぼNME7と同様に機能した。同様に、Halomonas Sp 593のような、ヒトNME1あるいはNME7への高い相同性を持つバクテリアNME二量体は、NME1二量体及びNME7モノマーのように、完全に、ヒト幹細胞成長、多分化能及び生存、癌細胞成長及び生存をサポートすることができ、体細胞を癌/幹細胞状態に戻し及び癌細胞をより転移性の癌幹細胞へ変異させた。

【0336】

本発明者は、したがって、ヒト幹細胞成長、多分化能及び生存、癌細胞成長及び生存をサポートし、体細胞を癌/幹細胞状態に戻すことができ、癌細胞をより転移性の癌幹細胞に変異できる、NMEタンパク質の機能を無効にする薬剤は、抗癌治療の理想的な目標物であるとの結論に達した。ここで治療薬は、NMEタンパク質を不能にするか、あるいはMUC1*へのその結合を阻むか、直接若しくは間接の転写因子としてその機能を阻止するか、上に記述のような機能を阻止するものである。

20

好ましい実施態様では、NMEタンパク質の機能を阻止する薬剤は抗体である。別の好ましい実施態様では、薬剤は、NME1二量体の機能又は二量化を阻止する。さらにもっと好ましい実施態様では、薬剤は、NME7の機能を阻止する。これらのNMEタンパク質のうちの1つの機能を阻止する抗癌剤は、二者択一で核酸でありうる。例えば、sh-若しくはsiRNA、アンチセンス核酸などのようなNMEの発現を阻害する核酸が例示される。あるいは、薬剤は、間接的に、NMEの発現を抑制してもよい。例えば、BRD4の増加した発現は、NME7を抑制し、かくして、抗癌剤として働く。

30

別の実施態様では、標的化NMEタンパク質の機能を阻害する薬剤は、NMEタンパク質に直接作用する若しくはその発現を阻害する、小分子である合成化学薬品でありうる。別々に若しくはコンビネーションで、これらの薬剤は、癌の治療か予防用の有力な抗癌剤である。

【0337】

1つのケースでは、標的化NMEタンパク質を阻害する薬剤は、抗体であり、癌の治療か予防のために患者に直接投与される抗癌剤である。好ましい実施態様では、原発性癌又はその子孫は、MUC1*陽性癌である。抗体は、それ本来の抗体でも、あるいは修飾された抗体様分子でもありうる。抗体若しくは抗体様分子は、免疫反応を活性化する細胞毒素物質あるいは免疫反応を活性化する物質にリンクすることができる。

40

例えば、抗NME抗体の部分は、CAR(キメラ抗原受容体)T細胞技術(Porter D et al, 2011)に記述されるような治療用分子の一部であるように修飾できる。該抗体は、二価、一価、二重特異性のヒト化又は部分的にヒト化でありうる。抗体あるいは抗体様分子は、Tiller Tら(2013年)によって使用されたものを含む、生体外での結合分析、ファージディスプレイ技術及びその他を使い、例えばYlanthia(登録商標)システムのような無作為化されたヒト化抗体エピトープライブラリーを使い、生成されうる。

【0338】

本発明の別の態様では、標的化NMEタンパク質を阻害する薬剤は、患者によって生成される抗体である。ここで患者は、患者が抗NME抗体を含む免疫反応を開始するように、標的化NMEタンパク質の部分で免疫される。このような免疫化は、例えばワクチンとして、

50

癌の治療か予防のために行なわれる。

【0339】

別の態様では、本発明は、抗癌剤である抗体を生じさせるMUC1*、NME1ヒト、バクテリアNME1及びNME7に由来したペプチド配列の同定を含む。これらのペプチド配列は、ワクチン、アンチセンスタイプ治療のための核酸配列、癌誘導バクテリアの同定のための方法、診断の方法及び薬剤スクリーニング法と同様に、治療抗体を生成するために使用することができる。本発明の1つの態様では、ここに記述された配列のペプチドは、アジュバントで補足されうる、或いは、宿主動物若しくは人において、患者に標的化NMEタンパク質に対して抗体産生を誘導することによって癌に対して免疫化するためのワクチンとして、免疫系を刺激し、抗癌抗体を生み出すために使われる他のペプチドに融合されうる。

10

好ましい実施態様では、標的化NMEタンパク質は、ヒトNME1あるいはNME7ドメインA若しくはBへの30%以上の配列同一性をもつバクテリアNMEである。もっと好ましい実施態様では、標的化NMEタンパク質は、ヒトNME1であり、ここで当該抗体は、それにS120G変異、P69S変異あるいはC-末端切断のような、二量体形成を志向させる変異を持つNME1を特異的に標的としうる。さらにもっと好ましい実施態様では、標的化NMEタンパク質は、NME7-AB(SEQ ID NO: 39)として述べられるような開裂型を実質的に含むNME7(SEQ ID NO: 13)である。

【0340】

ヒトNME7、ヒトNME1あるいは二量化を志向する突然変異体あるいはバクテリアNMEを発現するトランスジェニックマウスは、創薬において、癌細胞を生体内に育てるために、及び抗癌ワクチンの要素としてNME由来ペプチドの免疫化効果をテストするために、大きく役に立つだろう。例えば、ネズミ科のNMEタンパク質は、ヒトNMEタンパク質と異なる。マウス幹細胞は、単一の成長因子LIFを使用して成長する。一方、LIFは、ヒト幹細胞の成長をサポートすることができない。本発明者は、癌細胞と幹細胞が、同様のメカニズムによって成長することを今や知っている。したがって、マウスへヒト癌細胞を移植することは、まさに、ヒト癌細胞に対するマウスでの免疫反応に加えて問題をもたらす；つまりマウスは、単独で癌成長及び癌幹細胞へ変異を促進する成長因子である二量体NME1又はヒトNME7を生産しない。

20

【0341】

本発明者は、ヒトNME7を注入された動物が、注入されないマウスより、容易に癌になることを知った。例えば、いくつかの癌細胞は動物において生着するのが非常に難しい。本発明者は、ヒトNME7あるいはNME7-ABを動物に注入することにより、数倍癌細胞の生着割合を増加させた。免疫損傷マウスに、MatrigelあるいはNME7-ABのいずれかと50/50V/V混合したT47D乳癌細胞が注入された。10日後に、NME7混合細胞を注入されたマウスは、NME7-ABを日毎さらに注入された(図51)。

30

NME7-ABをさらに注入されたグループ(点線)には、加速された割合で成長した、より大きな腫瘍があった。NME7-ABが、注入された時に癌細胞と混合した場合、及びマウスが注入の後24時間あるいは48時間ごとに注入された場合、生着速さ、必要された細胞数の減少及びより速い腫瘍成長率が、もたらされた。NME7に対する癌細胞の比率の範囲あるいはNME7の注入スケジュールは、あるマウス種から別の種及びある腫瘍タイプから別のタイプによって変わると予想される。この方法に関する改良で、ヒトNME7あるいはNME7-ABのための遺伝子組み換え動物は、癌細胞の生着レート非常に増加させ、その結果、動物で腫瘍に成長するのに必要な細胞の数を減少させる。これは、ヒトNME7あるいはNME7-ABを発現する動物での原発性患者癌細胞の成長を可能にする。

40

【0342】

1例において、癌細胞は、動物へ注入され、また、動物は、NME7あるいはNME7-ABを投与される。好ましい実施態様では、動物は、ヒトNME7-ABを発現する遺伝子組み換え動物である。好ましい実施態様では、癌細胞は患者からの原発性細胞である。この方法で、動物(それはマウスでありえる)は、より少ない成熟、より転移性の状態に患者癌細胞を戻らせるNME成長因子を提供する。1つの実施態様では、宿主動物は、候補薬あるいは合成物を

50

注入され、そして、効能が、候補薬か合成物を用いた治療に対する患者の応答を预言するために評価される。

別の実例では、患者に投与されているか、患者の治療のために考慮されている、第一選択処置若しくは薬が、より少ない成熟状態に振戻された患者の癌細胞を担持する動物に投与される。第一選択治療は、おそらく、癌細胞が第一選択治療を回避するために適合する変異に影響する。処置後の癌細胞は、その後ホスト動物から取り除かれ、ある治療に応じて生じる変異を同定するために分析し特徴付けをなされうる。あるいは、癌細胞はホスト動物に残すこともでき、どの薬剤が耐性細胞若しくは癌幹細胞を阻害若しくは殺すかを決定するために、該ホスト動物は、他の治療薬で処置される。

【0343】

本発明者の実験は、ネズミ科のNMEタンパク質とヒトNMEタンパク質間の差異は、マウスへのヒト癌細胞の生着が、非常に非能率であることが主要な理由であることを示した。癌細胞注入の時に組み換えヒトNME7をマウスに注入することは、腫瘍生着の割合及び腫瘍成長の割合を大幅に増加させた。したがって、ヒトNME7あるいはより好ましくはヒトNME7-ABを発現するトランスジェニックマウスは、創薬、投薬試験のためマウス・モデルに患者細胞を生着すること又は患者の癌細胞がどのように薬物療法に応じて進展し若しくは変異するかを決定することを可能にし、腫瘍生着の割合を大幅に増加させるだろう。

例えば、動物の成育の間にNME7発現の潜在的な問題を回避するためには、誘導可能なプロモータの上にヒトNME7を持っていることは有利だろう。あるいは、患者細胞を含む癌細胞は、動物で腫瘍を惹起するのにわずか50-200の細胞を必要とする癌幹細胞に細胞が変異されるようなヒトNMEを模倣するバクテリアNME、NME7、或いはNME1二量体において培養されうる。その後、これらの細胞は、NME7、NME1二量体、バクテリアNMEあるいは単一のチェーンのNME1偽二量体を担持する遺伝子組み換え動物を含む生体内で又は生体外でテストされうる。

【0344】

ヒトNME(特異的にNME7-AB)を発現する遺伝子組み換え動物は、NME1、バクテリアNME及びNME7を含むNMEタンパク質に対する抗体を生成するのにどの免疫ペプチドが安全に使用することができるかを評価するのに役立つだろう。例えば、ヒトNME1、NME7あるいはNME7-ABのために遺伝子組み換えマウスは、図62-64、ペプチドNo.1-53でとして記述された、免疫ペプチドの1つ以上で免疫化することができた。対照群マウスは、抗NME抗体が生産されたことを確認するために分析された。その後、ヒト腫瘍細胞は、トランスジェニックマウスへ注入され、ここで誘導可能なプロモータを使用する場合、ホスト動物でヒトNMEタンパク質の発現が誘導される。その後、免疫ペプチドの効能及び潜在的な毒性が、誘導可能なNMEプロモータが活性化されなかったマウス若しくはコントロールマウスにくらべて、トランスジェニックマウスへ移植された細胞の腫瘍生着、腫瘍成長割合及び腫瘍惹起能の比較により評価される。

毒性は、骨髓細胞へ細胞毒素性の薬剤による処置に応じての骨髓細胞の再生応答時間、循環する血球の数とタイプ及び全体として骨髓数を決定することに加えて、心臓、肝臓及びその他同のような器官の検査により評価される。耐えられる副作用での腫瘍惹起能力、腫瘍生着、又は腫瘍成長割合を優位に減ずる、図62-64、ペプチドNo.1-53にリストされたものに由来した免疫ペプチドは、抗癌治療、予防、若しくはワクチンとして、患者の外において若しくは人において、抗体の生成のための免疫ペプチドとして選択される。

【0345】

したがって、自然に腫瘍を形成するであろう又はテストされている薬へのよりヒトのような応答するであろう、あるいはよりよくヒト腫瘍生着を可能にするであろう、マウス若しくは他の哺乳動物は、動物へヒト遺伝子を導入する多くの方法のうちの何らかの1つの使用により生成される。そのような方法は、ノックイン、ノックアウト、CRISPR、TALEN及びその他がしばしば引用される。本発明は、哺乳動物に、ヒトNME7あるいはNME7-ABを発現させるいかなる方法も使用することが想定できる。

NME7あるいはNME7-ABは、既知のトランスジーンの発現をコントロールする多くの方法

10

20

30

40

50

のうちの1つで誘導可能になりえる。あるいは、NME7の発現あるいは発現のタイミングを、哺乳動物によって自然に発現する別の遺伝子の発現によってコントロールされうる。例えば、それは、心臓のような組織で発現されるNME7変異体又はNME7には好適でありうる。その後、NME7の遺伝子は、MHCのような心臓で発現されたタンパク質の発現に操作可能にリンクされる。この事例で、NME7の発現は、MHC遺伝子産物が発現される時及び場所で、可能になる。同様に、例えば前立腺特異的タンパク質の発現によって、その発現の場所及びタイミングがコントロールされるヒトNME6若しくはNME7の発現を前立腺でおこしたいと思いうる。同様に、ヒト類以外の哺乳動物で、ヒトNME6若しくはNME7の発現が、乳房組織で発現した遺伝子によってコントロールされることができる。例えば、トランスジェニックマウスでは、ヒトNME6若しくはヒトNME7は、プロラクチン・プロモーター、あるいは同様の遺伝子から発現される。

10

【0346】

抗癌剤としてのNMEタンパク質の阻害剤

【0347】

抗癌剤として働く阻害剤が、どのNMEタンパク質を標的とするかは、癌のタイプに左右されうる。例えば、ヒトNME1あるいはNME7-A若しくは-BドメインあるいはヒトNME1二量体あるいはNME7-ABの機能を模倣するバクテリアNMEへの高い配列相同性のバクテリアNMEを担持することが示される腫瘍は、バクテリアNMEタンパク質を標的とし及び二量化する能力、MUC1*に結合するその能力、又は癌成長を促進する若しくは癌細胞を癌幹細胞に変異するその能力を阻害する薬剤又は抗体で処理されるだろう。あるいは、いくつかの癌細胞では、二量化を志向するNMEタンパク質が不規則に再活性化されるか、あるいはそのヘクサマー型の形成に抵抗するような変異をさせうる。さらに、他の癌は、不規則にNME7あるいは開裂型NME7-ABの発現を再活性化しうる。したがって、NME1、NME1二量体及び/又はNME7-ABを模倣するバクテリアNMEを認識する治療抗体は、癌の予防か治療に役立ちうる。あるいは、診断の分析は、どのNME阻害剤が、癌あるいは癌サブセットに有効かを決めるために行なわれる。

20

【0348】

NME7に結合し、その腫瘍形成能を阻害する抗体は、有力な抗癌剤であり、癌の治療か予防のために患者に投与することができる。NME7あるいはNME7-ABの腫瘍形成能を阻害する抗体は、NME7のその同系統の結合力のあるパートナー（それは1つのケースでMUC1*受容体のPSMGFR部分である）に結合する能力を阻害する抗体である。別の場合では、NME7は、細胞に入り、核に移動し、直接間接的な転写調節因子として働くことにより機能することができ、XCR4、SOX2、MUC1、E-カドヘリン、OCT4、NME7あるいはNME7-ABのような腫瘍形成を促進する遺伝子における賦活が、そのすべてが細胞の増加した腫瘍形成能に帰着するBRD4、JMJD6、MBD3及びCHD4をダウンレギュレートする。したがって、癌の治療か予防用抗体は、生体外かあるいは生体内でテストされた時、MUC1*へのNME7結合を阻害するか、NME7又はCXCR4、SOX2、MUC1、E-カドヘリン、OCT4、BRD4、JMJD6、MBD3若しくはCHD4の核酸プロモーターサイトへのそのコファクターが結合することを阻害するというようなものである。これらの抗体は、癌患者若しくは癌になるリスクをもつ患者に投与することができる。

30

40

当該技術分野において周知のように、抗体及び抗体様分子は、全NME1、NME6あるいはNME7タンパク質を使用して生成することができる。あるいは、該タンパク質のペプチドあるいは部分を使用することもできる。さらに、他の方法では、ペプチドは、キャリアー分子若しくは免疫応答を誘発するためのアジュバントと共に宿主動物に注入されう。抗体は、その後、ヒト化することができる動物から得られた、抗体産生細胞によって生産される単クローン抗体を含む標準的方法で動物から得ることができる。

本発明は、さらにNME1、NME6若しくはNME7タンパク質、又はその配列がそれらに由来するペプチドをスクリーニング分析で使うことも可能である。1つのそのような例において、抗体ライブラリーは、NME1、NME6あるいはNME7に結合するそれらの能力についてスクリーニングすることができ、ここで標的化NMEタンパク質に結合する抗体は、癌を治療する

50

か予防するために使用される。さらに、ライブラリーは、抗体それ自身で構成される必要はない。抗体エピトープ若しくは断片のライブラリーは、癌患者若しくは癌になるリスクを持つ人の処置のための治療用抗体を同定するために、NMEタンパク質の部分への結合についてスクリーニングされる。

図62-64にリストされた免疫原性のペプチドの1つ以上は、ホスト動物での抗体の生成にとって、あるいは患者への投与のための抗体様分子へ後で修飾できる抗体エピトープの同定及び選択にとって理想的である。別の実施態様では、その配列が、NME1、NME6あるいは好適にはNME7に由来するペプチドは、ヒトに直接投与される。それは、投与されたヒトが、癌ワクチンとして抗体産生を含む免疫応答を生み出す。図62-64(SEQ ID NO.88-140)にリストされたペプチドの1つ以上は、抗体生成あるいは選択のために好適であり、それはホスト動物での抗体生成用に、ワクチンとしての使用に、Ylanthia登録商標システムのような合成ペプチドか抗体エピトープのライブラリーをスクリーニングするための餌としても使用される。ここで、該抗体は、NME7の機能を阻害することによって又はそれを退化のためにマーキングすることによって癌を阻害するだろう。別の態様において、本発明は、NMEファミリータンパク質のペプチド断片を志向し、これらペプチドは、SEQ ID NOS:88-140、好ましくは88-133、より好ましくは、88-121から選ばれる、NME7に結合し及び阻害する、抗癌抗体若しくは抗体エピトープを生成する若しくは選択するために使用される。

【0349】

NME7は、その主要な役割が、大変初期の胚形成にあるようであり、成人組織で有意水準では発現されないもので、癌の治療か予防の理想的な治療の標的でありうる。したがって、NME7を不能にする薬剤は、健康な成人の組織で何らかの副作用がマイナーである状態で、癌を阻止し阻害することが期待される。本発明者の研究は、癌細胞及びナイーブ幹細胞が、NME7(それはそれらのただ一つの必要な成長因子として機能しうる)を分泌することを示す。

さらに、転移がん細胞である細胞集合体(それは癌幹細胞若しくは腫瘍惹起細胞)は、それらを、NME1二量体、バクテリアNME二量体、あるいはNME7(ここでNME7は多くの癌幹細胞を生産した)と接触させることにより、優先的に増大することを本発明者は示した。したがって、NMEタンパク質を不能にする薬剤は、優れた抗癌治療薬であり、特に癌幹細胞あるいは腫瘍惹起細胞の阻害若しくは予防に役立つ。好ましい実施態様では、治療薬によって標的とされるNMEタンパク質は、ヒト若しくはバクテリアNME1であり、ここで該治療薬は、二量化を阻害するか、MUC1*への結合を阻害するか、CXCR4のような多分化能遺伝子若しくは癌幹細胞遺伝子をアップレギュレートする能力を阻害する。もっと好ましい実施態様では、治療薬によって標的とされるNMEタンパク質はNME7であり、ここで治療薬は、NME7の発現を阻害するか、MUC1*へのNME7の結合を阻害するか、DM10ドメインの開裂を阻害するか、CXCR4のような多分化能遺伝子が癌幹細胞遺伝子をアップレギュレートするその能力を阻害する。

【0350】

したがって、癌細胞の成長及び脱分化を阻害する標的化治療薬は、NME7機能を無効にする薬剤である。治療薬が癌の治療のために無効にするNME7機能は、次のものに制限されないが、以下を含む：

- 1)MUC1*細胞外ドメインに結合する能力；
- 2)DNAに結合する能力；
- 3)幹細胞増殖を促進する能力；
- 4)分化を阻害する能力；
- 5)転写調節因子として働く能力；そして
- 6)細胞によって分泌される能力。

【0351】

上にリストされるようなNME7機能を無効にする薬剤は、次のものに制限されないが、以下を含む：抗体、化学物質、小分子、microRNAs、アンチセンス核酸、阻害性RNA、RNAi、siRNA。1つの実例では、治療薬は抗体であり、それは一価、二価、二重特異性、多クロー

ン、単クローン、あるいはそれらの抗体の可変ドメインを模倣する領域を含んでいる抗体様物でありうる。別の事例では、治療薬は小分子のような化学物質である。RNAi又はsiRNAのようなNME7の抑制をおこす薬剤も、抗癌治療として適用できる。好ましい実施態様では、これらの薬剤は、MUC1*の細胞外ドメインとNME7の相互作用を阻止する。

【0352】

代替物アプローチでは、BRD4がNME7を抑えるので、BRD4をアップレギュレートする薬剤が、癌の治療か予防のために患者に投与される。

【0353】

治療用抗体を生成するための免疫NMEペプチド

【0354】

今まで、NMEタンパク質及びそれらの機能、特にNME7のような新しく同定されたNMEタンパク質は、殆ど知られていない。最近まで、NME1は、ヘクサマーであると考えられた。ヘクサマーとしてのNME1とNME2の結晶構造は、公表されていた(Webb PA et al, 1995; Min Ket al, 2002)が、NME二量体あるいはNME7が、どの様に折畳まれるのかに関する情報は殆ど提供していない。しかし、本発明者は、NME1の公表されたヘクサマー構造、ヒトNME1、ヒトNME7及びバクテリアNME(それはヒトNME1及びNME7、特にHalomonas Sp.593を模倣することができる)中での配列アラインメントに基づき、既知の癌の治療か予防のための治療用抗体を生じさせることが予測させるHalomonas Sp.593、ヒトNME7及びヒトNME1から特定ペプチド配列を同定した。

【0355】

図61は、ヒトNME1及びヒトNME7-A若しくは-Bドメインの間の配列アラインメントである。図27は、ヒトNME1及びHalomonas Sp 593からのバクテリアNME間、及びヒトNME7-A若しくは-Bドメイン及びHalomonas Sp. 593(「HSP 593」)からのバクテリアNME間での配列アラインメントである。

【0356】

SEQ ID NOS:88-121をもつ図62にリストされたペプチド1~34は、ヒトNME1へのそれらの低い相同性のために選ばれた、ヒトNME7からのペプチドである。

NME7ペプチド35~46(SEQ ID NOS: 122-133)(図63)は、タンパク質の完全性若しくはMUC1*ペプチドへの結合能のために構造上重要に見えるNME7の領域について、適度にユニーク配列であるので選択された。NME7配列の両方のセットが、NME7に結合する抗体を生じさせると予測される。ところが、NME7ペプチドの第2のセットが、NME7あるいはMUC1*ペプチドへの結合能を、不能にするために機能するかもしれない。これらのペプチドは、NME7を認識するか、又はヒトNME1がバクテリアNMEを認識することができ、その結果、癌の治療か予防に使用することができる抗体を生じると予想される。

【0357】

図64にリストされたペプチド47~53(SEQ ID NOS: 134-140)は、ヒトNME7及びバクテリアのHSP 593 NMEの両方へのそれらの高い配列相同性のために選ばれたヒトNME1配列であって、構造若しくはMUC1*への結合にとって重要と推論される。これらのペプチドは、NME1、NME7あるいはバクテリアNMEを認識することができる抗体を生じさせると予想され、癌の治療か予防に使用することができる。

【0358】

図62で、ペプチド1~34(SEQ ID NOS: 88-121)としてリストされ、ヒトNME1に対して低い相同性を持っているが、ヒトNME7-AあるいはNME7-Bに対して高い相同性を持っているペプチドは、ヒトNME7への結合を志向する抗体を生じさせるにちがひなく、それは、その活性を阻害することが望まれる癌組織のような場合を除き、成人の組織での何らかの役割に制限するべきである。

【0359】

図63にリストされたペプチド35~46(SEQ ID NOS: 122-133)は、NME7からのペプチド配列であり、それらは、配列相同性、NME1 ヘクサマーの公表された結晶構造、及びC-末端切除が二量化を志向し、MUC1*への結合若しくは幹及び癌成長におけるタンパク質の機能

10

20

30

40

50

を阻害しないという知識に基づき、構造的完全性若しくはMUC1*結合にとって重要であると想定されるものである。

図64にリストされたペプチド47～53(SEQ ID NOS: 134-140)は、NME1からのペプチド配列であり、それらは、配列相同性、NME1 ヘクサマーの公表された結晶構造、及びC-末端切除が二量化を志向し、MUC1*への結合若しくは幹及び癌成長におけるタンパク質の機能を阻害しないという知識に基づき、構造的完全性若しくはMUC1*結合にとって重要であると想定されるものである。

これらの配列を含むペプチド若しくはペプチド模倣体から生成された抗体は、癌の治療か予防のために患者に投与することができる抗体を生み出すだろう。これらの配列を含むペプチド又はペプチド模倣体は、ホストで抗体を生じさせて、したがって、癌の治療か予防のための患者に投与することができる、癌治療ワクチンを構成する。

【0360】

診断分析

【0361】

さらに本発明の別の態様は、診断分析であって、それは、患者の癌若しくは癌になるリスクにある患者の優勢なNMEが、NME1、バクテリアNME、又は全長NME7若しくはNME7-AB型に裂かれたものかどうか決定する。診断の分析は、IHC、ICC、FISH、RNA-Seq及び他の検知あるいは配列技術のような標準分析を含んでいる。しかし、標準癌診断テストと異なり、分析はNME1、NME7あるいはバクテリアNMEが対照群において分析されたものより大きな量に存在するかどうかを決定するために行なわれる。

患者の癌によって若しくは多くの患者を苦しめる癌サブセットによって発現されるNMEタンパク質のタイプのこのような決定に基づいて、患者において若しくは患者グループにおいて、NMEタンパク質の存在を特異的に阻害若しくは不能にする抗NEM抗体若しくは他のNME不能化剤が、選ばれ及び患者に投与される。同様に、診断分析は、患者のNMEタンパク質がタンパク質を二量化志向にする変異を持つかどうか、そうならば、その格別な変異体NMEを不能にする薬剤が、癌の治療か予防のために患者に投与されるかどうかを、決定するために使用される。

【0362】

標的化NMEタンパク質の機能を不能にする抗体、あるいはその同系統の受容体MUC1*は、優先的に、癌細胞を標的にするが、幹若しくは先祖細胞を標的とせず若しくはより少ない程度にしかそうしないような、抗体を同定するためにさらにスクリーニングされる。MUC1は様々な開裂酵素によってMUC1*型に開裂され、そこでどの酵素がMUC1を開裂するかは、組織タイプあるいは細胞又は生物体の発生のタイミングによる。

例えば、MMP14は、それが乳癌細胞にあるより幹細胞でより高いレベルで発現される(図52)。逆に、MMP14及びADAM17、さらに、MUC1開裂酵素は、ヒト幹細胞にそれらがあるより3倍及び5倍高くDU145前立腺癌細胞で発現される；T47D乳癌細胞では、MMP16とADAM17は、それらが幹細胞にあるより2倍高い(図53及び54)。

実際、DU145前立腺癌細胞が注入されたマウスが、抗MUC1*抗体MN-E6のFabで処置される場合、腫瘍成長は非常に阻害され(図55)、MMP14とADAM17の発現は減少し(図56)、MUC1開裂は減少され、及び、分化をシグナルするmicroRNA-145の発現は増加した(図57 A、B)。かくして、MUC1*は、その遠位、10以上のアミノ酸によるN-末端で変わりうる。

MUC1のC末端は細胞内であり、及び、そのN-末端は細胞外である。本発明者の実験は、PSMGFRペプチドのN-10バージョンにNME1二量体が結合することを示す。すなわち、PSMGFRペプチドの最初の10のアミノ酸を除去すること、それは大多数のMUC1*細胞外ドメインに相当する、は、NME1二量体のMUC1*ペプチドに結合する能力に影響しないことを意味する。N-10ペプチド(SEQ ID NO: 86)に優先的に結合する抗体は、それが癌細胞に存在するので、MUC1*に優先的に結合する。逆に、C-10ペプチド(SEQ ID NO: 87)に優先的に結合する抗体は、癌細胞ではなく幹細胞及び骨髄細胞に優先的に結合する(図58-60)。

したがって、癌の治療か予防のためにMUC1*を標的とする抗体は、PSMGFRペプチド、N-10ペプチドあるいはC-10ペプチド、での免疫化によって生成されうる。あるいは、癌の治

10

20

30

40

50

療か予防用の治療用抗体若しくは抗体様分子は、それが幹と先祖細胞に現われる様とは対照的に、癌細胞に現われるので、MUC1*に結合するものを選択することによって同定することができる。

好ましい実施態様では、抗体は、N-10ペプチドに結合することを志向する。さらにもっと好ましい実施態様では、治療抗体は、幹若しくは先祖細胞ではなく、癌細胞に結合するその能力によって選ばれる。1例で、抗体は、ELISA 若しくは同様の直接結合分析によって、PSMGFRペプチド、N-10ペプチドあるいはC-10ペプチドに結合する能力によってまず選ばれ、その後、様々なタイプのMUC1*陽性の癌細胞に結合することができることが確認された。ここで1つの抗体は、乳癌細胞よりよりよく前立腺癌細胞に結合でき、あるいは、異なる組織タイプの異なる開裂サイトの仮説を支持して、その逆も又ありうる。

10

その後、ハイブリドーマ上澄みは、多ウェルプレート上に被覆され。そして、幹細胞はその上に蒔かれた。ト幹細胞は、非付着性であるので、幹細胞(あるいは先祖細胞)に結合された抗体で覆われたウェルは、幹細胞を付着させた。一方、幹細胞を付着しなかった抗体は、癌の治療か予防に好ましい抗MUC1*抗体として選ばれた。

【0363】

したがって、別の態様において、本発明は、以下の工程を含む癌を分類するか又は癌患者若しくは癌が疑われる患者を階層化する方法を志向する：

(i) 幹若しくは先祖細胞遺伝子あるいは遺伝子産物の存在のための患者サンプルを分析すること；そして、

(ii) 幹若しくは先祖細胞遺伝子あるいは遺伝子産物の同様の発現あるいは発現レベルを共有する患者のグループ化。

20

この方法で、その後、患者は、それらの幹若しくは先祖細胞遺伝子あるいは遺伝子産物を阻害する薬剤で治療することができる。

【0364】

別の場合、幹若しくは先祖細胞遺伝子あるいは遺伝子産物の発現レベルは、癌の重症度を評価するために分析され、そこで、初期の幹若しくは先祖状態の特性である遺伝子あるいは遺伝子産物の発現若しくはより高い発現は、より攻撃的な癌であることを示し、後の先祖状態の特性である遺伝子あるいは遺伝子産物の発現若しくはより高い発現は、それほど攻撃的でない癌を示す。その後、このような決定は、内科医が、より攻撃的かそうでないかの癌患者を治療するにあたって戦略デザインを可能にするだろう。

30

【0365】

癌を分類するか、癌を階層化するこれらの方法は、血液サンプル、体液あるいは生検で遂行することができる。その高い発現レベルが、非常に攻撃的な癌を示す遺伝子あるいは遺伝子産物は、NME1を含み、より好ましくはNME6、そしてさらに好適には、NME7を含む。

【0366】

本発明はここに記述された具体的実施態様によって、その権利範囲が制限されるものではない。確かに、ここに記述されたものに加えて発明の様々な修飾は、上記記述及び付属する図面から当業者には明白である。そのような修飾は、本願請求項の範囲内に含むことを意図する。以下の実施例は、制限的開示ではなく本発明の例示として提示される。

【実施例】

40

【0367】

実施例1 - 最小無血清基礎培地(「MM」)(500mls)の組成

【0368】

400ml DME/F12/GlutaMAXI(Invitrogen#10565-018)

100ml ノックアウト血清代替物(Knockout Serum Replacement)(KO-SR(Invitrogen# 10828-028))

5ml 100x MEM非本質的アミノ酸溶液(MEM Non-essential Amino Acid Solution)(Invitrogen# 11140-050)

0.9ml (0.1mM)の -メルカプトエタノール(55mMストック、Invitrogen# 21985-023)

【0369】

50

実施例2 - NME1、NME6及びNME7の存在についての癌及び幹細胞での検査

【0370】

実験のこのシリーズでは、本発明者は、幹細胞と癌細胞でのNME6及びNME7の発現を検査した。さらに、本発明者は、NME7の標的としてMUC1*を同定した。NME1、NME6及びNME7の存在か不存在かを決定するために、本発明者は、細胞溶解物について、最初に、ウェスタンブロット分析を行なった。図3Aにおいて、抗MUC1*抗体で被覆された表面でNME1二量体中において培養された(Lane 1)若しくはMEFs表面でbFGF中で培養された(Lane 2)BG01vヒト胚性幹細胞からの溶解物、T47Dのヒト乳癌細胞溶解物(Lane 3)、又はポジティブコントロールとしてNME1-wtが、SDS-PAGEによって分離され、ついで抗NME1特異的抗体で検査した。結果は、NME1は、NME1二量体若しくはbFGF、及びT47D癌細胞において培養されたにせよ、ヒトES細胞において強く発現されることを示す。同じ細胞溶解物は、SDS-PAGEによって分離され、次に、抗NME6特異的抗体(Abnovaからの抗NME6)で検査した。NME6は、検知されなかった(データ示さず)が、しかし、それはその後より濃縮されたサンプルで検知された(図4を参照)。

【0371】

図3Bでは、同じ細胞溶解物が、SDS-PAGEによって分離され、次に、抗NME7特異的抗体(Santa Cruz Biotechnology社からのnm23-H7 B9)で検査した。結果は、抗MUC1*抗体表面上でNME1二量体において培養されたヒトES細胞においてNME7が強く発現されること(Lane 1)、MEF上でbFGFにおいて培養された同じES細胞で弱く発現されること(Lane 2)、そして乳癌細胞で強く発現されること(Lane 3)を、示している。

NME1が添加されたレーン4は、ブランクであり、NME7抗体がNME1と交差反応しないということを示す。

本発明者が、それらがbFGFにおいて培養された細胞よりよりナイーブ状態であることを示す表現マーカーであることを示した、NME7がNME1二量体において培養された幹細胞でよりかなり多く発現されるという事実は、NME7が、プライム化細胞でその発現に比べ、ナイーブ細胞でより高いレベルに発現することを意味する。

【0372】

NME7も、その標的受容体としてMUC1*と成長因子として機能するかどうか判断するために、本発明者はプルダウン分析を行なった。これらの実験において、合成MUC1*細胞外ドメインペプチド(Hisタグ化PSMGFR配列)が、NTA-Ni磁気ベッドに固定化された。これらのベッドは、抗MUC1*抗体で被覆された表面でNME1二量体中で培養された(Lane 1)若しくはMEFs表面でbFGF中で培養された(Lane 2)BG01vヒト胚性幹細胞からの溶解物、T47Dのヒト乳癌細胞溶解物(Lane 3)でインキュベートされた。ベッドは、すすがれそして捕捉されたタンパク質がイミダゾールの添加によってリリースされた。

タンパク質は、SDS-PAGEによって分離され、次に、抗NME1抗体(図3C)、抗NME6抗体(データ示さず)あるいはNME7抗体(図3D)で検査した。結果は、NME7がMUC1*細胞外ドメインペプチドに結合することを示す。これは、幹細胞と癌細胞で、NME7は、その2つのNDPKドメインのその部分を経て、MUC1*細胞外ドメインを二量化させることにより多分化能パスウェイを活性化するというを示す

【0373】

実施例3 - タンパク質構成物の生成

【0374】

組み換えNME7の生成:

第1の構成物は、効率的に可溶の型で発現することができる組み換えNME7を作るために調製された。最初のアプローチは、天然のNME7(-1)又はN-末端欠失がある代替的スプライスバリエントNME7(-2)をコードする構成物作ることであった。ある場合には、構成物が、その精製を助けるためにstrepタグ又はヒスチジン・タグを担持した。NME7-1は、大腸菌で貧弱に発現し、そして、NME7-2は大腸菌で発現しなかった。しかしながら、標的配列が削除され、NME7が、31kDaの計算された分子量をもつNDPK A及びBドメインを本質的に含んだ、新しい構成物が作られた。

この新しいNME7-ABは、大腸菌において非常によく発現され、また可溶のタンパク質として存在した。シングルNDPKドメインが発現された構成物、NME-Aは、大腸菌で発現しなかった。NME7-ABは、NTA-Niカラムで最初に精製され、次に、セファデックス200カラムで分子ふるいクロマトグラフィー(FPLC)によってさらに精製された。その後、精製されたNME7-ABタンパク質は、多分化能を促進し、かつ幹細胞の分化を阻害する能力に関してテストされた。

【 0 3 7 5 】

実施例4 - ヒト組み換えNME7-ABの機能的な試験

【 0 3 7 6 】

多分化能を維持し、かつ分化を阻害する能力に関しての組み換えNME7のテスト

10

NME7の可溶性変異体、NME7-ABは、生成され精製された。ヒト幹細胞(iPS cat# SC101a-1及びシステム・バイオサイエンス)は、4継代のためにマウス繊維芽細胞フィーダー細胞の層上で4ナノグラム/mlのbFGF中でメーカー指示書によって成長した。その後、これらのソース幹細胞は、単クローン抗MUC1*抗体(MN-C3)の12.5 µg/ウェルで被覆された6ウェル細胞培養プレート(Vita™, ThermoFisher)へ植え付けられた。細胞は、ウェル当たり300,000個の細胞の密度で植え付けされた。

基礎培地は、次のものから成る最小の幹細胞培地であった:

400ml DME/F12/GlutaMAX 1(Invitrogen#10565-018)、100ml ノックアウト血清代替物(KO-SR, Invitrogen# 10828-028)、5ml 100xMEMの非本質アミノ酸溶液(Invitrogen#11140-050)及び0.9ml(0.1mM) - メルカプトエタノール(55mMストック Invitrogen# 21985-023)。該基礎培地は任意の培地になりえる。

20

好ましい実施態様では、基礎培地は、他の成長因子及びサイトカインがフリーである。基礎培地に、NME7-ABの8nMあるいは8nM NM23-H1のいずれかが加えられ、安定した二量体として折りたたまれ精製された。培地は48時間ごとに変更され、加速的成長により回収されなければならない、植え付け3日目まで継代した。

図9及び10は、NME7モノマーでの成長に対するNM23-H1二量体での成長の日々比較を示す。NME7及びNM23-H1(NME1)二量体の、両方は分化多能に成長し、100%の集密状態でさえ、分化がなかった。写真で見ることができるように、NME7細胞は、NM23-H1二量体中で成長する細胞より速く成長した。最初の回収での細胞数は、NME7での培養がNM23-H1二量体での培養より1.4倍多い細胞の生産を確認した。典型的な分化多能のマーカのためのICC染色は、NME7-ABがヒト幹細胞成長、多分化能及び抵抗された分化を完全にサポートすることを確認した(図11)。

30

【 0 3 7 7 】

実施例5 - NME6とNME7の変異体の生成

【 0 3 7 8 】

次の新規なNME6及びNME7変異体が設計され生成された:

大腸菌発現のために最適化されたヒトNM23-H7-2配列:

【 0 3 7 9 】

(DNA)

【 0 3 8 0 】

40

atgcatgacgttaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttatttgg
caacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgaccagtagaccgcgcgtcaactgggtagtc
gcaaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcg
ggtttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgttaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagttctcg
cccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgctgatgacgctatct
gcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgttt
ggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttccc
gagctctggcgggtgctgggtccggcaaacaccgccaatttaccaatgtacgtgctgtatgtcaaaccgcacgcagtg
cagaaggcctgctgggttaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatg
gaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatattggttacggaaatgta

50

ctccggtccgtgcgatcggaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatc
cggaatcgacgctcatctgctccgggtaccctgcgcgcaattttggtaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgt
accgatctgccgaagacggtctgctggaagttcaatacttttcaaaattctggataattga (SEQ ID NO: 20)

【 0 3 8 1 】

(アミノ酸)

【 0 3 8 2 】

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVSRLVLDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKA
GFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLLGPNASGVARTDASESIRALF
GTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNM
DRNVVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTIQNAVHC
TDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID NO: 21)

10

【 0 3 8 3 】

ヒトNME7-A:

【 0 3 8 4 】

(DNA)

【 0 3 8 5 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctcttgg
aacagatggcataagaaaatgcagcgcatggccctgattcttttgcctctgcgccagagaaaatggagttgttttttga(
SEQ ID NO: 22)

20

【 0 3 8 6 】

(アミノ酸)

【 0 3 8 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (SEQ ID NO: 23)

【 0 3 8 8 】

ヒトNME7-A1:

【 0 3 8 9 】

30

(DNA)

【 0 3 9 0 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctcttgg
aacagatggcataagaaaatgcagcgcatggccctgattcttttgcctctgcgccagagaaaatggagttgttttttccctt
caagtggagggtgtgggcccggcaaacactgctaaatttacttga (SEQ ID NO: 24)

【 0 3 9 1 】

(アミノ酸)

40

【 0 3 9 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (SEQ ID NO: 25)

【 0 3 9 3 】

ヒトNME7-A2:

【 0 3 9 4 】

(DNA)

【 0 3 9 5 】

atgaatcatagtgaagattcggttttcatcgagagtggatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatgagctttt

50

at t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a a a g a a t c a t c g c a c c t t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a
a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g a t
c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a g a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t g g
a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a c a a a g c t g g a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c a t
t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c
a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a
t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g
c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t t g a (SEQ ID NO: 26)

【 0 3 9 6 】

(アミノ酸)

10

【 0 3 9 7 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVVNFSRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (SEQ ID NO: 27)

【 0 3 9 8 】

ヒトNME7-A3:

【 0 3 9 9 】

(DNA)

【 0 4 0 0 】

a t g a a t c a t a g t g a a a g a t t c g t t t t c a t t g c a g a g t g g t a t g a t c c a a a t g c t t c a c t t c t t c g a c g t t a t g a g c t t t t
a t t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a a a g a a t c a t c g c a c c t t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a
a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g a t
c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a g a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t g g
a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a c a a a g c t g g a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c a t
t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c
a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a
t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g
c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a c a c t g c t a a a t t t a c t t g a (SEQ ID
NO: 28)

20

【 0 4 0 1 】

(アミノ酸)

30

【 0 4 0 2 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVVNFSRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFSSGGCGPANTAKFT- (S
EQ ID NO: 29)

【 0 4 0 3 】

ヒトNME7-B:

【 0 4 0 4 】

(DNA)

【 0 4 0 5 】

a t g a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a c c c c a t g c t g t c a g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a
t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g
g a g t a g t a c c c a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t
g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c
a a t c t t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t
t c t t c t g a (SEQ ID NO: 30)

40

【 0 4 0 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 0 7 】

50

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (SEQ ID NO:31)

【 0 4 0 8 】

ヒトNME7-B1:

【 0 4 0 9 】

(DNA)

【 0 4 1 0 】

atgaattgtacctgttgcattgttaaaccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgaga
tgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagttataaag
gagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataat
gctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaatgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatcttttgtaaaactaagatccagaatgctgttctactgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatact
tcttcaagatcttggataattagtga (SEQ ID NO: 32)

10

【 0 4 1 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 1 2 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID NO:33)

【 0 4 1 3 】

ヒトNME7-B2:

20

【 0 4 1 4 】

(DNA)

【 0 4 1 5 】

atgccttcaagtgagggtgtgggccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcattgttaaaccatgc
tgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttca
atatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagttataaaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaa
atgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgc
tgatcctgaaatgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatcttttgtaaaactaagatccagaatgctgttc
actgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttctga (SEQ ID NO: 34)

【 0 4 1 6 】

30

(アミノ酸)

【 0 4 1 7 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (SEQ ID N
O:35)

【 0 4 1 8 】

ヒトNME7-B3:

【 0 4 1 9 】

(DNA)

【 0 4 2 0 】

40

atgccttcaagtgagggtgtgggccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcattgttaaaccatgc
tgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttca
atatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagttataaaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaa
atgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgc
tgatcctgaaatgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatcttttgtaaaactaagatccagaatgctgttc
actgtactgatctgccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttcaagatcttggataattagtga (SEQ ID NO
: 36)

【 0 4 2 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 2 2 】

50

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-- (SEQ ID NO:37)

【 0 4 2 3 】

ヒトNME7-AB:

【 0 4 2 4 】

(DNA)

【 0 4 2 5 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttttatataactggctctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcattggccctgatcttttgcctctgctggccagagaaaatggagttgtttttcctt
caagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagt
gaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatgga
tcgggttaattgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatgggtgacagaaatgtatt
ctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcct
gaaattgcccggcattttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtac
tgatctgccagaggatggcctatttagaggttcaatacttcttcaagatcttggataatttagtga (SEQ ID NO: 38)

【 0 4 2 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 2 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
E IARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-- (SEQ ID NO:39)

【 0 4 2 8 】

ヒトNME7-AB1:

【 0 4 2 9 】

(DNA)

【 0 4 3 0 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttttatataactggctctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcattggccctgatcttttgcctctgctggccagagaaaatggagttgtttttcctt
caagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagt
gaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatgga
tcgggttaattgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatgggtgacagaaatgtatt
ctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcct
gaaattgcccggcattttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtac
tgatctgccagaggatggcctatttagaggttcaatacttcttctga (SEQ ID NO: 40)

【 0 4 3 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 3 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
E IARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF-- (SEQ ID NO:41)

【 0 4 3 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A配列:

【 0 4 3 4 】

(DNA)

【 0 4 3 5 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgatgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgtgcgcgatccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatggtccggactcatctcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga(
SEQ ID NO: 42)

10

【 0 4 3 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 3 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSPPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAAREMELFF-(SEQ ID NO:43)

【 0 4 3 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A1配列:

【 0 4 3 9 】

(DNA)

【 0 4 4 0 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgatgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgtgcgcgatccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatggtccggactcatctcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttccga
gctctggcgggtgcggtccggcaaacaccgccaaatttacctga(SEQ ID NO: 44)

20

【 0 4 4 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 4 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSPPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT-(SEQ ID NO:4
5)

30

【 0 4 4 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A2配列:

【 0 4 4 4 】

(DNA)

【 0 4 4 5 】

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggtagacccgaatgcttccctgctgcccgtacgaactgct
gttttatccgggcgatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgata
atctgcatctggaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctggctgatcgattatggcgac
cagtacaccgcgcgtcaactgggtagtcgaaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctgg
cgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccc
tggattttcatgtcgaccaccagtctcgcccggtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgca
atggaaattctgcgatgatgacgctatctgcaatggaaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgtgcgcgatccga
tgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatccgtaatgcagcacatggtccggactcatctcgcatcgg
cagctcgtgaaatggaactgtttttctga(SEQ ID NO: 46)

40

【 0 4 4 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 4 7 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVVNFSRQLVLI DYGD

50

QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPPANSVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (SEQ ID NO:47)

【 0 4 4 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A3配列:

【 0 4 4 9 】

(DNA)

【 0 4 5 0 】

atgaatcactccgaacgctttgttttatcgccgaatggtagacccgaatgcttccctgctgcgccgctacgaactgct
gttttatccgggcatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgata
atctgcatctggaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgattatggcgac
cagtacaccgcgctcaactgggtagtcgcaaaagaaaaaacgctggccctgatataaccggatgcaatctccaaagctgg
cgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccc
tggattttcatgtcgaccaccagctctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgca
atggaaattctgctgtagacgctatctgcaaatggaaacgctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgctaccga
tgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggtagcgaatgcagcacatggccggactcatctcgcatcgg
cagctcgtgaaatggaactgttttcccagactctggcggttgcggtccggcaaacaccgccaatttacctga (SEQ ID
NO: 48)

【 0 4 5 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 5 2 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSRLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPPANSVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFSSGGCGPANTAKFT- (S
EQ ID NO:49)

【 0 4 5 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B配列:

【 0 4 5 4 】

(DNA)

【 0 4 5 5 】

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaacgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtga
tgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gctgggttaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtactccgggtccgtgctgcgcatggaaattcagcaaaacaat
gccacaaaacggtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccggaaatcgacagctcatctgcgtccgggtaccctgcgcgc
aatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagtccaact
ttttctga (SEQ ID NO: 50)

【 0 4 5 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 5 7 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (SEQ ID NO:51)

【 0 4 5 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B1配列:

【 0 4 5 9 】

(DNA)

【 0 4 6 0 】

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaacgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtga
tgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gctgggttaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtactccgggtccgtgctgcgcatggaaattcagcaaaacaat
gccacaaaacggtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccggaaatcgacagctcatctgcgtccgggtaccctgcgcgc
aatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagtccaact

ttttcaaaattctggataattga(SEQID NO: 52)

【 0 4 6 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 6 2 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID NO:53)

【 0 4 6 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B2配列:

【 0 4 6 4 】

(DNA)

【 0 4 6 5 】

atgccgagctctggcgggtgcgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgc
agtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttca
acatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggtacggaa
atgtactccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggc
agatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaatccagaacgctgtgc
actgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga(SEQID NO: 54)

【 0 4 6 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 6 7 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (SEQ ID N
O:55)

【 0 4 6 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B3配列:

【 0 4 6 9 】

(DNA)

【 0 4 7 0 】

atgccgagctctggcgggtgcgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgc
agtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttca
acatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggtacggaa
atgtactccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggc
agatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaatccagaacgctgtgc
actgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga(SEQID NO: 5
6)

【 0 4 7 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 7 2 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ
ID NO:57)

【 0 4 7 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB配列:

【 0 4 7 4 】

(DNA)

【 0 4 7 5 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagttctgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgatattcgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgc
gaatggaaacgctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg

10

20

30

40

50

caccgatggatccgtaatgcagcacatggccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgttttcccga
gctctggcgggttgcgggtccggcaaaccgcgcaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgta
gaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatgga
ccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtact
ccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccg
gaaatcgcacgtcatctgctccgggtaccctgctgcgaatttttggtaaaacgaaaaaccagaacgctgtgcactgtac
cgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (SEQ ID NO: 58)

【 0 4 7 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 7 7 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIAHRLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (SEQ ID NO: 59)

【 0 4 7 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB1配列:

【 0 4 7 9 】

(DNA)

【 0 4 8 0 】

Atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagttctgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgatattcgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgc
gaatggaacgcctgctgggcccggcaaacctcagggtgtgctgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggatccgtaatgcagcacatggccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgttttcccga
gctctggcgggttgcgggtccggcaaaccgcgcaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgta
gaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatgga
ccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtact
ccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccg
gaaatcgcacgtcatctgctccgggtaccctgctgcgaatttttggtaaaacgaaaaaccagaacgctgtgcactgtac
cgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga (SEQ ID NO: 60)

【 0 4 8 1 】

(アミノ酸)

【 0 4 8 2 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIAHRLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (SEQ ID NO: 61)

【 0 4 8 3 】

マウスNME6

【 0 4 8 4 】

(DNA)

【 0 4 8 5 】

Atgacctccatcttgcgaagtccccaagctcttcagctcacactagccctgatcaagcctgatgcagttgcccaccact
gatcctggaggctgtttcatcagcagattctgagcaacaagttcctcatgtacgaacgagggaactgcagtggaagctgg
aggactgccggagggtttaccgagagcatgaaggcggtttttctatcagcggctgggtggagttcatgacaagtgggcca
atccgagcctatatccttgcccacaaagatgccatccaactttggaggacactgagtgaggaccaccagagtatctgagc
acgctatatagccccagattcaattcgtggaagtttgggcctcactgacacccgaaatactacccatggctcagactccg
tggtttccgccagcagagagattgcagcctcttccctgacttcagtgaacagcgctggatgaggaggagggaaccccg
ctgcgggtgtggctctgtgcactacagttccagaggaaggtatccactgtgcagctgaaacaggaggccacaaacaacctaa
caaaacctag (SEQ ID NO: 62)

10

20

30

40

50

【 0 4 8 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 8 7 】

MTSILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRTRELQWKLEDCRRFYREHEGRFFYQRLVEFMTSGP
IRAYILAHKDAIQLWRTLGMPTRVFRARYIAPDSIRGSLGLDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQ
LRCGPVHYSPEEGIHCAAETGGHKQPNTK-(SEQ ID NO:63)

【 0 4 8 8 】

ヒトNME6:

【 0 4 8 9 】

(DNA)

10

【 0 4 9 0 】

Atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttggaagccctcaggctctccagctcactctagccctgatcaa
gcctgacgcagtcgccccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaa
tgagagaactactgttgagaaaggaagattgccagaggtttaccgagagcatgaagggcggttttctatcagaggctg
gtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat
gggaccaccagagtggttccgagcacgccaatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacaccgcga
acaccacccatgggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaacagcgc
tggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagaggagggtgtccactatgtagctgg
aacaggaggcctaggaccagcctga(SEQ ID NO:64)

【 0 4 9 1 】

20

(アミノ酸)

【 0 4 9 2 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLGMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA-(SEQ ID NO:65)

【 0 4 9 3 】

ヒトNME6 1:

【 0 4 9 4 】

(DNA)

【 0 4 9 5 】

30

Atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttggaagccctcaggctctccagctcactctagccctgatcaa
gcctgacgcagtcgccccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaa
tgagagaactactgttgagaaaggaagattgccagaggtttaccgagagcatgaagggcggttttctatcagaggctg
gtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat
gggaccaccagagtggttccgagcacgccaatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacaccgcga
acaccacccatgggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaacagcgc
tggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga(SEQ ID NO:66)

【 0 4 9 6 】

(アミノ酸)

【 0 4 9 7 】

40

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLGMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPV-(SEQ ID NO:67)

【 0 4 9 8 】

ヒトNME6 2:

【 0 4 9 9 】

(DNA)

【 0 5 0 0 】

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgccccatccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgttgagaaaggaagattgccagaggtttaccgagagcatgaag

50

ggcgTTTTTctatcagaggctggagggttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgccacaaggatgcc
atccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttccgagcacgcatgtggccccagattctatccgtgggag
tttcggcctcactgacacccgcaacaccacccatgggtcggactctgtgggttccagccagcagagagattgcagccttct
tccctgacttcagtgaacagcgctggatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (SEQ ID NO:68)

【 0 5 0 1 】

(アミノ酸)

【 0 5 0 2 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (SEQ
ID NO:69)

【 0 5 0 3 】

ヒトNME6 3:

【 0 5 0 4 】

(DNA)

【 0 5 0 5 】

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccactcactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagagggtttaccgagagcattaag
ggcgTTTTTctatcagaggctggagggttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgccacaaggatgcc
atccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttccgagcacgcatgtggccccagattctatccgtgggag
tttcggcctcactgacacccgcaacaccacccatgggtcggactctgtgggttccagccagcagagagattgcagccttct
tccctgacttcagtgaacagcgctggatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagccagag
ggagggttccactatgtagctggaacaggaggcctaggaccagcctga (SEQ ID NO:70)

【 0 5 0 6 】

(アミノ酸)

【 0 5 0 7 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPE
GGVHYVAGTGGLGPA- (SEQ ID NO:71)

【 0 5 0 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6配列:

【 0 5 0 9 】

(DNA)

【 0 5 1 0 】

Atgacgcaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgaagcactgcaactgaccctggctctgatcaa
accggagcgtgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgagcaacaaatcttgatcgtgcgta
tgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgttttatcgcgcaacatgaaggcgtttcttttatcaacgcctg
gttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatctctggctcaciaagatgcgattcagctgtggcgtaccctgat
gggtccgacgcgcgtctttcgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggcttgaccgatcgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgctcccgtgaaatcgcggccttttcccggaacttctccgaacagcgt
tggtagcaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccgggtctgttatctccggaagggtgggtgtccattatgtggcggg
cacgggtgggtctgggtccggcatga (SEQ ID NO:72)

【 0 5 1 1 】

(アミノ酸)

【 0 5 1 2 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (SEQ ID NO:73)

【 0 5 1 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 1配列:

10

20

30

40

50

【 0 5 1 4 】

(DNA)

【 0 5 1 5 】

Atgacgcaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccctggctctgatcaa
accggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgagcaacaaattctgatcgtgcgtat
tgcggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggttttatcgcgaaatgaaggccgtttctttatcaacgcctg
gttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatctctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgctaccctgat
gggtccgacgcgcgtctttcggtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggtctgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcgctcccggtgaaatcgcgccgtttttcccggaactctccgaacagcg
tggtacgaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccggtctga (SEQ ID NO:74)

10

【 0 5 1 6 】

(アミノ酸)

【 0 5 1 7 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEPQLRCGPV- (SEQ ID NO:75)

【 0 5 1 8 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 2配列:

【 0 5 1 9 】

(DNA)

20

【 0 5 2 0 】

Atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgag
caacaaattctgatcgtgcgtatgcggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggttttatcgcgaaatgaag
gccgtttctttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatctctggctcacaagatgcg
attcagctgtggcgctaccctgatgggtccgacgcgcgtctttcggtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctc
gttcggtctgaccgatacgcgcaataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcgctcccggtgaaatcgcgccgtttt
tcccggaactctccgaacagcggttggtacgaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccggtctga (SEQ ID NO:76
)

【 0 5 2 1 】

(アミノ酸)

30

【 0 5 2 2 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEPQLRCGPV- (SEQ
ID NO:77)

【 0 5 2 3 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 3配列:

【 0 5 2 4 】

(DNA)

【 0 5 2 5 】

Atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcggccaccagcaaatcttgag
caacaaattctgatcgtgcgtatgcggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggttttatcgcgaaatgaag
gccgtttctttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatctctggctcacaagatgcg
attcagctgtggcgctaccctgatgggtccgacgcgcgtctttcggtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctc
gttcggtctgaccgatacgcgcaataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcgctcccggtgaaatcgcgccgtttt
tcccggaactctccgaacagcggttggtacgaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccggtctgttatctccggaa
gggtggttccattatgtggcgggcacgggtgggtctgggtccggcatga (SEQ ID NO:78)

40

【 0 5 2 6 】

(アミノ酸)

【 0 5 2 7 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA

50

IQLWRTL MGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPE
GGVHYVAGTGGLGPA-(SEQ ID NO:79)

【 0 5 2 8 】

新しい変異体と同様にNME6及びNME7も任意のアフィニティータグを持って発現されうるが、次のタグもって発現された：

【 0 5 2 9 】

ヒスチジン・タグ

【 0 5 3 0 】

(ctcgag)caccaccaccaccactga(SEQ ID NO:84)

【 0 5 3 1 】

Strept IIタグ

【 0 5 3 2 】

(accggt)tgagccatcctcagttcgaaaagtaatga(SEQ ID NO:85)

【 0 5 3 3 】

実施例6 - 大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-1配列

【 0 5 3 4 】

NME7 wt-cDNA、大腸菌での発現のために最適化されたコドンは、Genscript(NJ)によって本発明者のリクエストにより生成された。NME7-1は、次のプライマーを使用し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'-atcgatcatatgaatcactccgaacgc-3'(SEQ ID NO: 141)

リバーズ 5'-agagcctcgagattatccagaattttgaaaaagtattg-3'(SEQ ID NO: 142)

【 0 5 3 5 】

その後、断片は精製され、消化され(NdeI, XhoI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びXhoI間でクローンされた。

【 0 5 3 6 】

実施例7 - 大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-2配列

【 0 5 3 7 】

NME7-2は、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'に atcgatcatatgcatgacgttataaacac-3'(SEQ ID NO: 143)

リバーズ 5'-agagcctcgagattatccagaattttgaaaaagtattg-3'(SEQ ID NO: 144)

【 0 5 3 8 】

その後、断片は精製され、消化され(NdeI, XhoI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びXhoI間でクローンされた。

【 0 5 3 9 】

実施例8 - 大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A配列

【 0 5 4 0 】

NME7-Aは次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'-atcgacatatggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatg-3'(SEQ ID NO:145)

リバーズ 5'-actgcctcgaggaaaaacagttccatttcacgagctgccgatg-3'(SEQ ID NO:146)

【 0 5 4 1 】

その後、断片は精製され、消化され(NdeI, XhoI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びXhoI間でクローンされた。

【 0 5 4 2 】

実施例9 - 大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB配列

NME7-ABは、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'-atcgacatatggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatg-3'(SEQ ID NO:147)

リバーズ 5'-agagcctcgagattatccagaattttgaaaaagtattg-3'(SEQ ID NO:148)

10

20

30

40

50

【 0 5 4 3 】

その後、断片は精製され、消化され (NdeI , XhoI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びXhoI間でクローンされた。

タンパク質は、C-Term His Tagで発現される。

【 0 5 4 4 】

NME7-ABは次の プライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'-atcgacatatggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatg-3' (SEQ ID NO:149)

リバース 5'-agagcaccgggtattatccagaattttgaaaaagtattg-3' (SEQ ID NO:150)

【 0 5 4 5 】

その後、断片は精製され、消化され (NdeI , AgeI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びAgeI間でクローンされ、そこで、XhoIはStrep TagIIに続くAgeI及びHis Tag前に2つのストップコドンによって取り替えられた。タンパク質はC-Term Strep TagIIをもって発現される。

【 0 5 4 6 】

実施例10 - 大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6配列：

【 0 5 4 7 】

NME6は次の プライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'-atcgacatatgacgcaaaatctgggctcggaatg-3' (SEQ ID NO: 151)

リバース 5'-actgcctcgagtgccggacccagaccacccgtgc-3' (SEQ ID NO: 152)

【 0 5 4 8 】

その後、断片は精製され、消化され (NdeI , XhoI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びXhoI間でクローンされた。タンパク質はC-Term HisTagをもって発現される。

【 0 5 4 9 】

NME6は次の プライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された：

フォワード 5'-atcgacatatgacgcaaaatctgggctcggaatg-3' (SEQ ID NO: 153)

リバース 5'-actgcaccgggttgccggacccagaccacccgtgcg-3' (SEQ ID NO: 154)

【 0 5 5 0 】

その後、断片は精製され、消化され (NdeI , AgeI)、そして発現ベクターpET21bの制限部位NdeI及びAgeI間でクローンされ、そこで、XhoIはStrep TagIIに続くAgeI及びHis Tag前に2つのストップコドンによって取り替えられた。タンパク質はC-Term Strep TagIIをもって発現される。

【 0 5 5 1 】

実施例11 - 組み換えNME7-ABの生成

【 0 5 5 2 】

LB培養液(ルリア-ベルターニ培養液)はオーバーナイト培養の1/10で植えつけられ、そして、OD600が~0.5に達するまで、37℃で培養された。このポイントでは、組換え型タンパク質発現は、0.4mMイソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド(IPTG, Gold Biotechnology)で誘導され、そして培養は、5時間後に止められた。遠心分離(4℃で10分間の6000rpm)によって、セルを回収した後に、セルペレットはランニングバッファー(PBS pH7.4、360mM NaCl及び80mMイミダゾール)で再サスペンドした。その後、リゾチーム(1mg/mL、シグマ)、MgCl₂(0.5mM)及びDNAse(0.5 μg/mL、シグマ)が加えられた。

細胞懸濁は、37℃30分、回転台(275rpm)でインキュベートされ、5分間氷の上で超音波処理された。不溶性細胞残屑は、遠心分離(4℃、30分、20000rpm)によって除去された。その後、透明な溶解液は、ランニングバッファーで平衡に保たれたNi-NTAカラム(Qiagen)に適用された。カラムは、ランニングバッファーの4CVで、30mMイミダゾールが補われたランニングバッファー(4CV)で洗浄され、溶出は、70mMイミダゾールが補われたランニングバッファー(6CV)で、次いで、490mMイミダゾールが補われたランニングバッファーでカラムからタンパク質を溶出させた。NME7-ABは、分子ふるいクロマトグラフィー(Superdex

10

20

30

40

50

200)「FPLC」によってさらに精製された。

【0553】

実施例12 - 組み換えNME6の生成

【0554】

LB培養液(ルリア-ベルターニ培養液)はオーバーナイト培養の1/10で植えつけられ、そして、OD600が~0.5に達するまで、37℃で培養された。このポイントで、組換え型タンパク質発現は、0.4mMイソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド(IPTG, Gold Biotechnology)で誘導され、そして培養は、5時間後に止められた。遠心分離(4℃で10分間の6000rpm)によって、セルを回収した後に、セルペレットはランニングバッファー(PBS pH7.4、360mM NaCl及び80mMイミダゾール)で再サスペンドした。その後、リゾチーム(1mg/mL、シグマ)及びMgCl₂(0.5mM)及びDNAse(0.5 µg/mL、シグマ)が加えられた。細胞懸濁は、37℃30分、回転台(275rpm)でインキュベートされ、5分間氷の上で超音波処理された。不溶性細胞残屑は、遠心分離(4℃、30分、20000rpm)によって除去された。その後、透明な溶解液は、ランニングバッファーで平衡に保たれたNi-NTAカラム(Qiagen)に適用された。カラムは、8 CVで洗浄され、溶出は、420mMイミダゾールが補われたランニングバッファー(6CV)でカラムからタンパク質を溶出させた。NME6は、分子ふるいクロマトグラフィー(Superdex 200)「FPLC」によってさらに精製された。

【0555】

実施例13 - ナイーブ及びプライム化遺伝子の定量的PCR分析。

【0556】

標準分析法が、RT-PCRを行なうために使用された。使用されるプライマーは、以下にリストされる: RNAはTrizol登録商標試薬(Invitrogen)を使用して分離された。cDNAは、SuperScript II(Invitrogen)を使用し、ランダムヘキサマー(Invitrogen)で逆転写され、続いて、アプライドBiosystems7500リアルタイム装置において、アプライドBiosystems遺伝子発現分析(OCT4 P/N Hs00999634_gH, Nanog P/NHs02387400_g1, KLF2 P/N Hs00360439_g1, KLF4 P/N Hs00358836_m1, FOXa2 P/NHs00232764_m1, OTX2 P/N Hs00222238_m1, LHX2 P/N Hs00180351_m1, XIST P/NHs01079824_m1 and GAPDH P/N 4310884E)を使い、遺伝子FOXa2、XIST、KLF2、KLF4、NANOG及びOCT4について分析した。各サンプルは、3回繰り返して実行された。遺伝子発現は、GAPDHに標準化された。データは、コントロールに対し、フォールド(fold)チェンジとして表された。

【0557】

実施例14 - MUC1プルダウン分析は、NME1、NME6及びNME7がMUC1種タンパク質に結合することを示す。

【0558】

MUC1*細胞質尾部に対する抗体(Ab-5)を使いプルダウン分析が細胞パネルで行われた。MUC1抗体によってプルダウンされたタンパク質は、SDS-PAGEによって分離され、ウェスタンブロット技術を使い、NME1、NME6及びNME7に特異的な抗体で検査された。MUC1*陽性の乳癌細胞株T47D細胞(ATCC)、ヒト胚性幹細胞株BG01v(LifeTechnologies)、ヒトES細胞(HE S-3, BioTime Inc.)及びヒトiPS細胞(SC101A-1, System Biosciences Inc.) T47D癌細胞が、RPMI-1640(ATCC) + 10%FBS(VWR)でATCCプロトコルによって成長させた。全ての幹細胞は、8nM NM23-RS(組み換えNME1 S120G二量体)を含む最小幹細胞培地「MM」において培養された。幹細胞は、12.5 µg/mL抗MUC1* C3 mabで覆われたプラスチック容器で成長させた。細胞は氷上で10分間200 µL RIPAバッファーで溶解された。遠心分離によって細胞残屑の除去の後、上澄みは共免疫沈殿分析に使用された。MUC1*は、DynabeadsプロテインG(Life Technologies)に結合されたMUC1の細胞質尾部を認識するAb-5抗体(抗-MUC-1 Ab-5, ThermoScientific)を使ってプルダウンされた。ベッドは、RIPAバッファーで2度洗われ、還元性のバッファーに再サスペンドされた。上澄みのサンプルは、還元性SDS-PAGEにさらされ、次いでPVDF薄膜へのタンパク質の移送をした。

その後、薄膜は次のもので検査された:

A) 抗-NM23-H1(NME1)抗体(C-20, Santa Cruz Biotechnology);

10

20

30

40

50

B) 抗-NME6(Abnova);あるいは

C) 抗-NM23-H7抗体(B-9, Santa Cruz Biotechnology);

D) NME6の染色は、Supersignal(Pierce)を使用して増強された;そして

E) NME7の染色は、Supersignalを使用して増強された。

HRPに結合したそれぞれの二次抗体と培養の後、タンパク質は化学発光によって検知された。写真は、天然のNME1、NME6及びNME7がMUC1*陽性の乳癌細胞、ヒトES細胞、及びヒトiPS細胞に、及びそれらMUC1*に結合しているものに存在することを示す。HES-3ペレットに存在する細胞の数が、他のサンプルに存在する数より少なかったことに留意を要する。

【0559】

実施例15 - 天然のNME7と同様に組み換えNM23(S120G突然変異体H1二量体)、NME7-AB、も、MUC1*細胞外ドメインペプチドに結合し、受容体二量化を誘導しうる。

【0560】

30.0nmの直径の金のナノ粒子が、トムプソンら(ACS Appl.Mater. Interfaces, 2011, 3 (8), pp 2979–2987)によるNTA-SAM表面で覆われた。金のナノ粒子を覆うNTA-SAMは、その後、180 µM NiSO₄の等量で活性化され、室温で10分インキュベートされ、洗われ、10mMリン酸緩衝液(pH 7.4)へ再サスペンドした。その後、金のナノ粒子に、0.5 µM終濃度でPSMGFR N-10ペプチド(QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAHHHHHHH(SEQ ID NO: 155))がのせられ、そして10分間室温でインキュベートされた。大腸菌から発現精製された組み換えNME7-ABタンパク質は、溶液に、フリーに、示された濃度で添加された。粒子に固定化されたタンパク質が、互いに結合する、又は2つの異なる粒子上の2つの異なるペプチドに同時に結合するとき、粒子溶液カラーは、ピンク/赤から紫/青に変わる。もし、溶液にフリーに加えられたタンパク質が、粒子凝集をおこすならば、単一のペプチドに結合することは、2つ以上の粒子を、互いに隣接させることを引き起こさないもので、それはフリーのタンパク質が同系統のペプチドを二量化させるという強い証拠である。

【0561】

図7 (A)は、PSMGFR N-10ペプチドが積載されたNTA-Ni-SAM被覆ナノ粒子を示す。NME7-ABは、溶液に、フリーに、示された濃度で添加された。ピンクから粒子集合の紫/青への溶液色の変化は、溶液でフリーのNME7と粒子上のMUC1*ペプチド間の結合を示す。この結果は、溶液でのNME7が、MUC1*ペプチド用の2つの結合部位を持っていることを示す。抗MUC1*抗体のFabは、完全に該結合を阻害し、粒子凝集が、MUC1*ペプチド及びNME7の特異的相互作用によることを示している。(B)は、広範囲の濃度で、溶液にフリーに添加されたNME7-ABを示す。NME7が2つのペプチドに同時に結合することができることを示す、粒子凝集が観察される。(C)は、溶液において添加されたタンパク質のすべてを示す。NME7-ABは、ほぼ直ちに紫に変わった。NM23-RS(H1二量体)も又、ほぼ直ちに紫に変わり始めた。T47D乳癌細胞株溶解物、それは天然のNME7を含む、はさらに顕著に紫になった。

【0562】

実施例16 - NME1二量体あるいはNME7で培養されたヒトES及びiPS細胞は、X不活性化(ブライム化状態の証明)を示す核における縮合ヒストン-3の欠如によって証拠づけられるようなナープ状態にある。

【0563】

ヒトES(HES-3幹細胞: バイオタイム社)及びiPS(SC101A-Ipsc: System Biosciences)細胞は、8-10の継代でNME1二量体(NM23-RS)あるいはNME7(NME7-AB構築物)のいずれかを加え、最少培地(MM)において培養した。細胞は、MUC1*受容体のPSMGFR配列の遠位部分に結合する抗MUC1*単クローン抗体(MN-C3)の12.5 µg/mLで覆われたVita™プレート(ThermoFisher)上に植え付けられた。周期的に、10継代を通して、幹細胞のサンプルは、免疫細胞化学(ICC)によって分析され、ヒストン-3の細胞局在を決定するために共焦点顕微鏡(Zeiss LSM 510共焦点顕微鏡)上で分析された。ヒストン-3が核において縮合される場合(単一のドットとして現われる)、X染色体のコピーは不活性化され、また、細胞はもはや純粋な基底状態かナープ状態にはなかった。

もし幹細胞がブライム化状態(市販の幹細胞はすべてFGFにおいて培養することによりブ

10

20

30

40

50

ライム化状態に誘導された)からナীব状態に戻っていれば、ヒストン-3は「クラウド “雲”」と見なされるか、あるいはまさに斑点である若しくは検知できないだろう。

図12は、それらが標準プロトコルによってMEF上でのFGFにおいて育てられたという点を除いて、同じ出所由来の、コントロール細胞が、すべて、それらがすべてナীব状態ではなくプライム化状態に100%あることを確認できる、核において縮合されたヒストン-3(H3K 27me3)を示す。

逆に、10継代の間、NME7において培養された同じ出所細胞は、ほとんどが、それらが前X不活性化であって真のナীব状態であることを示す、縮合ヒストン-3もたない幹細胞を有した。図12に示される挿入物は、100%のナীবである単離された多くのクローンのうちの1つである。

【 0 5 6 4 】

実施例17 - 胚性幹細胞及びiPS細胞でのNME7の検知

【 0 5 6 5 】

iPS細胞(SC101-A1)と同様にヒトES細胞(BG01v及びHES-3)が、NMEベースの培地で培養され、そこにおいて細胞は抗MUC1*抗体の層上に植えうつけられた。NME7種を同定するために、細胞は、回収され、プロテアーゼ阻害剤(Pierce)が補完された、RIPAバッファ(Pierce)で溶解された。細胞溶解物(20 µL)は、12%のSDS-PAGE還元性ゲル上で電気泳動によって分離され、PVDF膜(GE Healthcare)に移された。当該プロット(Blot)は、3%ミルク含有PBS-Tでブロックされ、次に、4 で一夜、一次抗体(anti NM23-H7クローンB-9: Santa Cruz Biotechnology)とインキュベートされた。PBS-Tで洗浄後に、該膜は、室温で1時間、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)結合二次抗体(ヤギ抗マウス、Pierce)とインキュベートされた。シグナルが、Immun-Star Chemiluminescence kit (Bio-Rad)で検知された。ウェスタンブロットは、NME7が、開裂のような翻訳後修飾あるいは代替スプライスアイソフォームでありうる、~25~33 kDaの低分子量NME7種と同様に~40kDa種として存在することを示す。

【 0 5 6 6 】

実施例18 - iPS条件化培地でのNME7の検知

【 0 5 6 7 】

iPS条件化培地(20 µL)が、いずれかの12%SDS-PAGE還元性ゲル電気泳動によって分離され、PVDF膜(GE Healthcare)に移された。当該プロット(Blot)は、3%ミルク含有PBS-Tでブロックされ、次に、4 で一夜、一次抗体(anti NM23-H7クローンB-9: Santa Cruz Biotechnology)とインキュベートされた。PBS-Tで洗浄後に、該膜は、室温で1時間、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ(HRP)結合二次抗体(ヤギ抗マウス、Pierce)とインキュベートされた。シグナルが、Immun-Star Chemiluminescence kit (Bio-Rad)で検知された。ウェスタンブロットは、約30 kDaの分子量をもつ分泌されたNME7種を示す。組み換えNME7-ABが、33 kDaの分子量を持っており、同時に2つのMUC1*ペプチドに結合でき、及び多能性幹細胞成長、多分化能の誘導及び分化を阻害することをサポートすることに注目する。~25~30 kDaのNME7種は、細胞からの分泌を可能にしうる、開裂のような翻訳後修飾あるいは代替スプライスアイソフォームでありうる。

【 0 5 6 8 】

実施例19 - NME7 免疫沈澱及びマスマスペクトロフォトメトリーによる分析

【 0 5 6 9 】

プルダウン分析が、MUC1*陽性細胞のパネル上でNME7特異的抗体(NM23 H7 B9: Santa Cruz)を使用して行なわれた。ヒトES(BG01v及びHES-3)及びiPS(SC101-A1)細胞と同様に乳癌細胞(T47D)が、標準プロトコル(T47D)によって培養されたか、あるいは抗MUC1*抗体の表面でNMEベース化培地において培養された。細胞はプロテアーゼ阻害剤(Pierce)で補完された、RIPAバッファ(Pierce)で溶解された。細胞溶解物は、2時間4 でインキュベートされた組み換えNME7-ABの10 µgで補完された。その後、NME7は、DynabeadsプロテインG (Life technologies)に結合した、anti NM23-H7(B-9, Santa Cruz Biotechnology)と4 で一夜免疫沈澱された。

10

20

30

40

50

ベッドは、PBSで2度洗われ、また、免疫沈澱したタンパク質は、12%のSDS-PAGE還元性ゲル上で電気泳動によって分離された。タンパク質は銀染色法(Pierce)によって検知された。T47Dサンプル及びBGO1v細胞から、NME7と共に免疫沈澱させられた、タンパク質の~23 kDaバンドが切除され、マスマススペクトメトリ(Taplin Mass Spectrometry Facility, Harvard Medical School)で分析された。マスマススペクトメトリ分析は、切除されたタンパク質バンドが、すべて、以下に示されるようなNME7 NDPK Aドメインからの配列を含むことを示した。NME7のAドメインの下線が付された配列は、マスマススペクトメトリによって同定された。

【0570】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVVNFSRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPGANSVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCT
CCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVVEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN(SEQID NO:156)

10

【0571】

NME7と免疫沈澱した、より高い分子量タンパク質バンド、~30 kDa、はマスマススペクトメトリによって分析されなかった、それは、分解産物かもしれない内生的NME7タンパク質、あるいは互換的スプライスアイソフォーム、あるいは細胞溶解物に添加されたNME7-AB~33 kDaでありえた。

【0572】

実施例20 - NME7-ABが2つのMUC1*細胞外ドメインペプチドに同時に結合することを示すELISA分析

20

【0573】

C-末端システイン(PSMGFR-Cys)を担持するPSMGFRペプチドは、Imject Maleimide活性化BSAキット(ThermoFisher)を使用して、BSAに共有結合で結合した。PSMGFR-Cys結合BSAは、0.1M炭酸塩/重炭酸ソーダバッファpH 9.6で10 µg/mLに薄められ、50 µLが、96ウェルプレートの各々のウェルに添加された。4 ー一夜インキュベーション後、プレートは、PBS-Tで2度洗浄され、そして、3%BSA溶液がウェル上の残りの結合部位を阻止するために添加された。RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで2度洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈されたNME7が、異なる濃度で加えられた。RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで3x洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈された抗-NM23-H7 (B-9, Santa Cruz Biotechnology)が、1/500
の希釈で加えられた。RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで3x洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈されたヤギ抗マウスHRP が1/3333の希釈で加えられた。RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで3x洗われ、そして、NME7の結合がABTS溶液(Pierce)を使用して、415nmで分析された。

30

【0574】

ELISA MUC1*二量化:

NME7結合用のプロトコルが使用され、及び、NME7は11.6 µg/mLで使用された。

【0575】

RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで3x洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈されたHisTagged PSMGFRペプチド(PSMGFR-His)若しくはビオチン化PSMGFRペプチド(PSMGFRビオチン)が、異なる濃度で加えられた。RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで3x洗われ、そして、PBS-T+1%BSAで希釈された抗HisTagHRP(Abcam)若しくはstreptavidin-HRP(Pierce)が、1/5000の濃度で加えられた。RTで1時間後、プレートは、PBS-Tで3x洗われ、そして、BSAを結合した、別のPSMGFRペプチド(それは抗His抗体、あるいはstreptavidinによってシグナルすることができなかった)に既に結合していたNME7へのPSMGFRペプチドの結合が、ABTS溶液(Pierce)を使用して、415nmで分析された。

40

【0576】

実施例21 - NME6クローニング、発現及び精製

【0577】

WT NME6 cDNA、大腸菌での発現のために最適化されたコドンが、Genscript、NJによっ

50

て本発明者のリクエストにより合成された。その後、WT NME6 cDNAは、次のプライマーを使用して、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって増幅された:

5'-atcgacatatgacgcaaaatctgggctcggaaatg-3'(SEQ ID NO: 157)及び

5'-actgcctcgagtgccggacccagaccacccgtgc-3'(SEQ ID NO: 158)。

NdeIとXhoI制限酵素(ニューイングランドBiolabs)での消化の後、精製された断片が、同じ制限酵素で消化された、pET21bベクター(Novagen)へクローン化された。

【0578】

実施例22 - NME6タンパク質発現/精製

【0579】

LBブロス(Luria-Bertani broth)は一夜培養の1/10で植えつけられ、そして、OD600が~ 0.5に達するまで、37 °Cで培養された。このポイントで、組換え型タンパク質発現は、0.4 mMイソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド(IPTG, Gold Biotechnology)で誘導され、そして、培養は5時間後に止められた。遠心分離(4 °C、10分間、6000rpm)によって細胞を回収した後に、細胞ペレットはランニングバッファー(PBS pH7.4、360mM NaCl、10mMイミダゾール及び8M尿素)に再懸濁された。細胞サスペンションは、37 °Cで30分間、回転プラットフォーム(275rpm)でインキュベートされ、5分間氷上で超音波処理された。不溶性細胞残屑は、遠心分離(4 °C、30分間、20000rpm)によって除去された。その後、透明溶解物は、ランニングバッファーで平衡に保たれたNi-NTAカラム(Qiagen)に適用された。カラムは、ランニングバッファーの4CV、次に、420mMイミダゾールが補足されたランニングバッファー(8CV)でカラムからタンパク質を溶出する前に、30mMイミダゾールが補足されたランニングバッファー4CVで洗われた。その後、タンパク質は透析によって、リフォールディングされた。

【0580】

実施例23 - リフォールディングプロトコル

1. 100mMトリスpH 8.0、4M尿素、0.2mMイミダゾール、0.4M L-アルギニン、1mM EDTA及び5%グリセリンに対して一夜の透析分離
2. 100mMトリスpH 8.0、2M尿素、0.2mMイミダゾール、0.4M L-アルギニン、1mM EDTA及び5%グリセリンに対しての24時間透析分離
3. 100mMトリスpH 8.0、1M尿素、0.2mMイミダゾール、0.4M L-アルギニン、1mM EDTA及び5%グリセリンに対しての24時間透析分離
4. 100mMトリスpH 8.0、0.2mMイミダゾール、0.4M L-アルギニン、1mM EDTA及び5%グリセリンに対しての8時間透析分離
5. 25mMトリスpH 8.0、0.2mMイミダゾール、0.1M L-アルギニン、1mM EDTA及び5%グリセリンに対して一夜の透析分離
6. PBS pH 7.4、0.2mMイミダゾール、1mM EDTA及び5%グリセリンに対しての3x 3時間透析分離
7. PBS pH 7.4、0.2mMイミダゾール、1mM EDTA及び5%グリセリンに対しての一夜の透析分離
8. 4 °C、30分間でリフォールドタンパク質を遠心分離(18,500rpm)し、そしてさらなる精製のために、上澄みを集めた。さらに、タンパク質は、分子ふるいクロマトグラフィー(Superdex 200)によって精製された。

【0581】

ここに引用された参照のすべて全体は参照によって実施態様される。

【0582】

引用された参照リスト

1. Mahanta, S., et al. (2008). "A minimal fragment of MUC1 mediates growth of cancer cells." *PLoSOne*. 3(4): e2054.
2. Hikita, S. T., et al. (2008). "MUC1* mediates the growth of human pluripotent stem cells." *PLoSOne*. 3(10): e3312.
3. Smagghe, B. J., et al. (2013). "MUC1* ligand, NM23-H1, is a novel growth fa

ctor that maintains human stemcells in a more naive state." PLoS One. 8(3): e58601.

4. Lombardi, D., et al. (1995). "The association of the Nm23-M1 protein and beta-tubulin correlates with cell differentiation." Exp Cell Res 217(2): 267-71.

5. Okabe-Kado, J., et al. (1985). "Characterization of a differentiation-inhibitory activity from nondifferentiating mouse myeloid leukemia cells." Cancer Res 45(10): 4848-52.

6. Okabe-Kado, J., et al. (1992). "Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase." Biochem Biophys Res Commun 182(3):987-94.

7. Okabe-Kado, J., et al. (1995). "Inhibitory action of nm23 proteins on induction of erythroid differentiation of human leukemia cells." Biochim Biophys Acta 1267(2-3): 101-6.

8. Ligtenberg MJL, Vos HL, Genissen, AMC and Hilkens J. (1990) J. Biol. Chem. 265, 15573-15578

9. Baruch A et al. (1999) The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. Cancer Res 59:1552.

10. Kroemer G, et al. (2013) Victories and deceptions in tumor immunology, Oncology 2:1 e23687.

11. Rath N, Olson MF. Rho-associated kinases in tumorigenesis: re-considering ROK inhibition for cancer therapy. EMBO Rep. 2012;13(10):900-8

12. Fessler S, Wotkowicz M, Mahanta S, Bamdad C (2009) MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells, Breast Cancer Res Treat 118:113-124 DOI 10.1007/s10549-009-0412-3

13. Nichols J, Smith A (2009) Naive and primed pluripotent states. Cell Stem Cell 4:487-492.

14. Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, et al. (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 9222-9227.

15. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu C-P, Harris CP, et al. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Developmental Biology 227: 271-278.

16. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, et al. (2006) Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. Nat Biotechnol 24: 185-187.

17. Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, et al. (2005) Basic Fibroblast Growth Factor Supports Undifferentiated Human Embryonic Stem Cell Growth Without Conditioned Medium. STEM CELLS 23: 315-323.

18. Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, et al. (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat Methods 2: 185-190.

19. Liu W, Ma Q, Wong K, Li W, Ohgi K, Zhang J, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Brd4 and JMJD6-Associated Anti-Pause Enhancers in Regulation of Transcriptional Pause Release. Cell. 2013 Dec 19;155(7):1581-1595. PMID: PMC3886918.

20. Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AA, Caspi I, Krupalnik V, Zerbib M, Maza I, Mor N, Baran D, Weinberger L, Jaitin DA, Lara-Astiaso D, Blecher-Gonen R, Shipony Z, Mukamel Z, Hagai T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Tanay A, Amit I, Novershtern N, Hanna JH. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. 2013 Sep 18, Nature 502,65-70 DOI: 10.1038/nature12587

10

20

30

40

50

21. Faber A, Goessler UR, Hoermann K, Schultz JD, Umbreit C, Stern-Straeter J. SD F-1-CXCR4 axis: cell trafficking in the cancer stem cell niche of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2013 Jun;29(6):2325-2331.
22. Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3153-3161.
23. Mukherjee D, Zhao J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res.* 2013;3(1):46-57. PMID: PMC3555200 10
24. Herreros-Villanueva M, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajas AA-M, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis.* 2013;2:e61. PMID: PMC3759123
25. Sefah K, Bae K-M, Phillips JA, Siemann DW, Su Z, McClellan S, Vieweg J, Tan W. Cell-based selection provides novel molecular probes for cancer stem cells. *Int. J. Cancer.* 2013 Jun 1;132(11):2578-2588.
26. Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shen JJ, Tang DG. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene.* 2011 Sep 8;30(36):3833-3845. PMID: PMC3140601 20
27. Herreros-Villanueva M, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajas AA-M, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis.* 2013;2:e61. PMID: PMC3759123
28. Hong X, Chedid K, Kalkanis SN. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *Int. J. Oncol.* 2012 Nov;41(5):1693-1700.
29. Hong X, Chedid K, Kalkanis SN. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *Int. J. Oncol.* 2012 Nov;41(5):1693-1700. 30
30. Su H-T, Weng C-C, Hsiao P-J, Chen L-H, Kuo T-L, Chen Y-W, Kuo K-K, Cheng K-H. Stem cell marker nestin is critical for TGF- β 1-mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* 2013 Jul;11(7):768-779.
31. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 2008 Oct 21;6(10):e253. PMID: PMC2570424
32. Boyer et al, 2005, "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells", *Cell*, Vol. 122, 947-956 40
33. Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
34. Porter D et al. (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 365:725-733 DOI: 10.1056/NEJMoa1103849
35. Tiller T et al. (2013) A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. *MABs* 9:5(3) PMID: 23571156
36. Webb P A, Perisic O, Mendola CE, Backer JM and Williams RL. The crystal structure of a human nucleoside diphosphate kinase, NM23-H2. *J Mol Biol.* 1995, 251:574 50

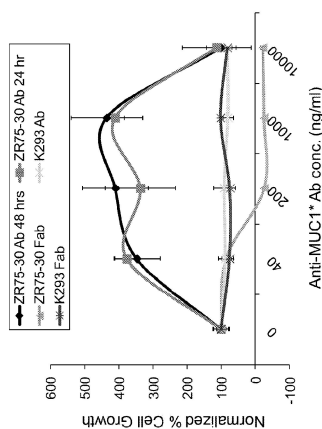
-587.

37. MinK, Song HK, Chang C, Kim SY, Lee KJ and Suh SW. Crystal structure of human annucleoside diphosphate kinase A, a metastasis suppressor. Proteins. 2002, 46: 340-342.

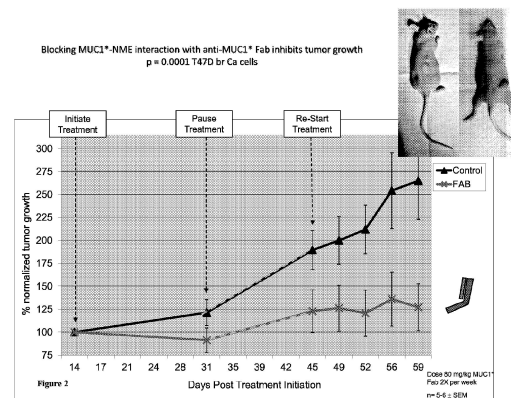
【 0 5 8 3 】

当業者は、本願明細書で記述の発明の各実施例への均等を、ルーチン実験を使用して認識するかあるいは確認することができるだろう。そのような均等物は、本願請求の範囲で包含されることが意図される。

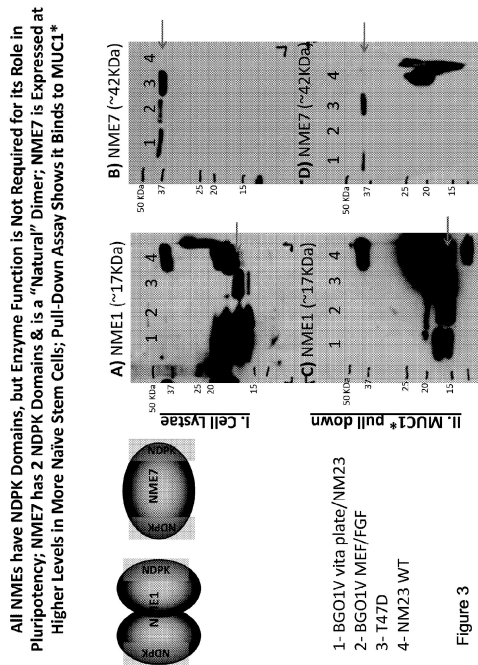
【 図 1 】



【 図 2 】

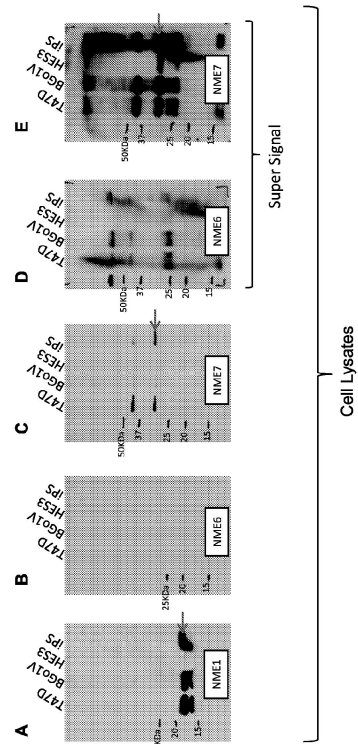


【 3 】

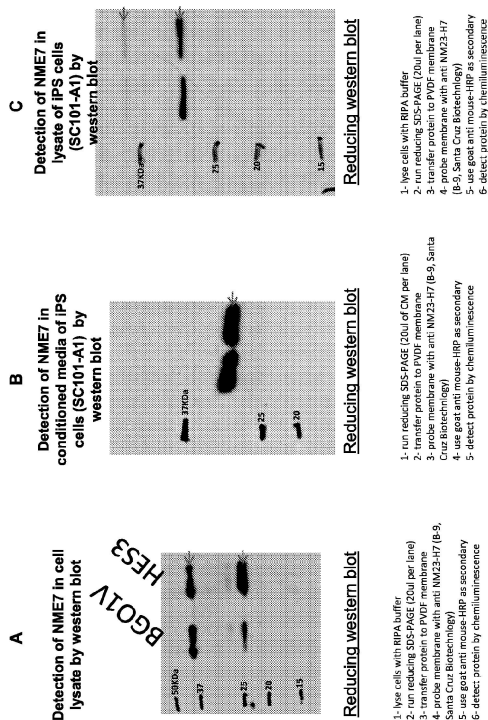


【 4 】

Western Blot Analysis of Cancer and Stem Cells, Probing for Presence of NME1, NME6 and NME7 in the Cell Lysates

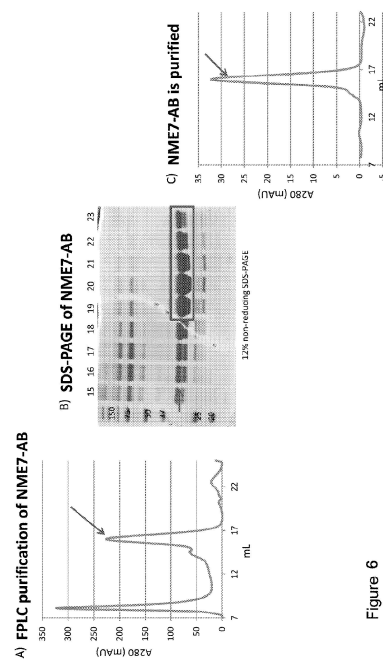


【 5 】



【 6 】

Recombinant NME7 novel variant containing NDPK domains A and B, "NME7-AB", expresses well with high yield in *E. coli* and as the soluble protein



【 図 7 】

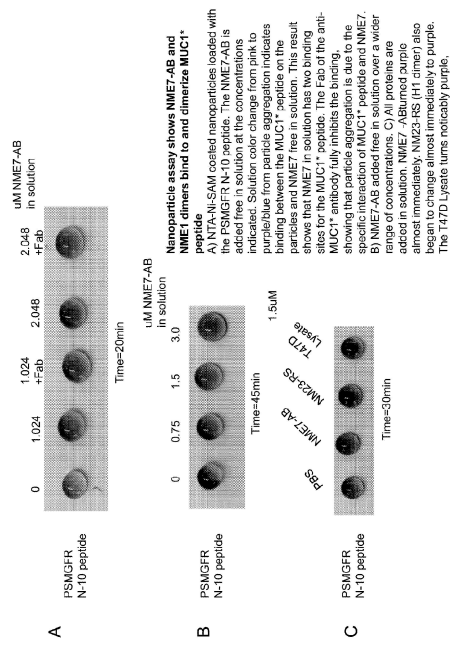


Fig. 7

【 図 8 】

ELISA shows NME7 Dimerizes MUC1*

MUC1* extra cellular domain peptide immobilized on plate was bound by NME7 to saturation; a second MUC1* peptide with a C-terminal His-tag or Biotin tag was added and visualized by HRP labeled antibody to either His-tag or HRP labeled streptavidin

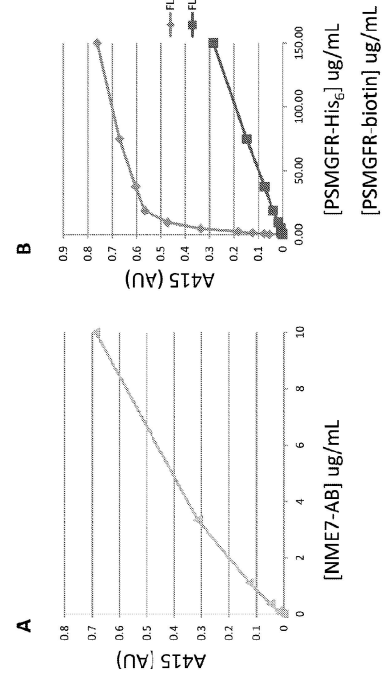
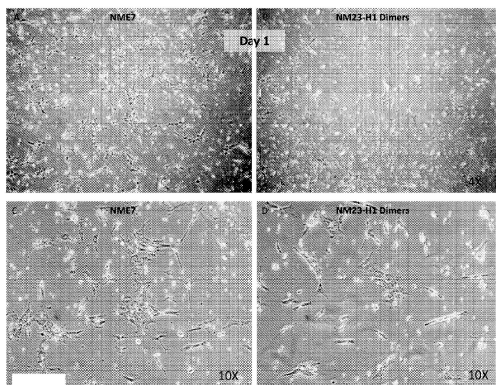
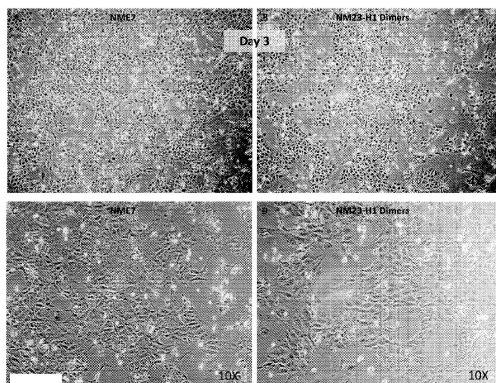


Fig. 8

【 図 9 】

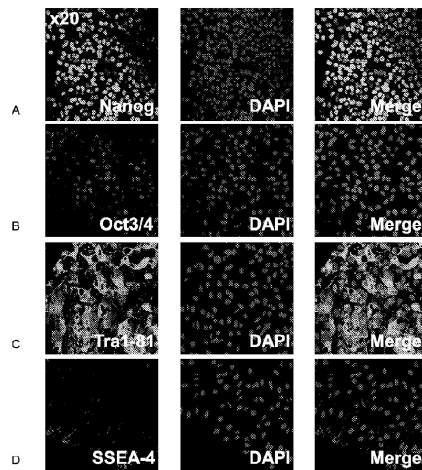


【 図 1 0 】



【 図 1 1 】

HES3.p81.VitaC3.NME7-AB p10



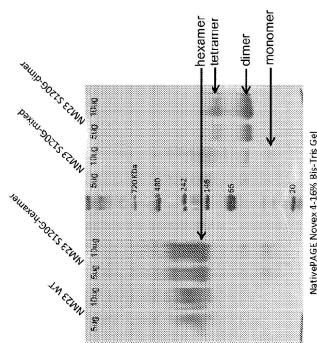
NME1 dimers or NME7 revert human stem cells to naïve, XaXa state



T47D + anti-NM23-H7 rabbit polyclonal – t=48h



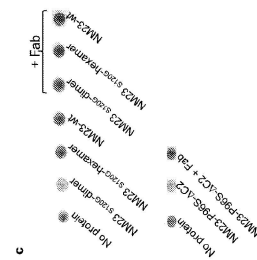
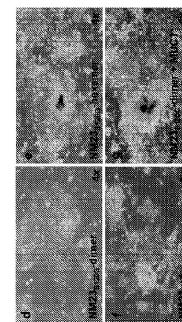
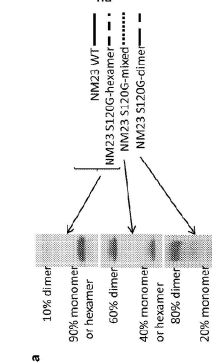
Native PAGE



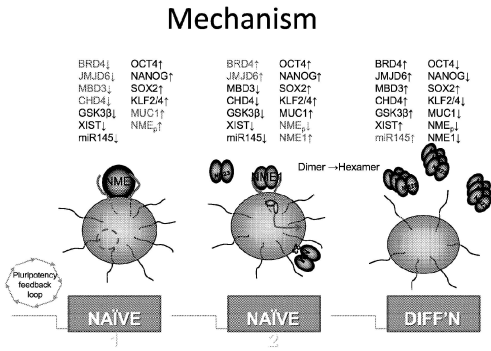
T47D + anti-NM23-H7 rabbit polyclonal – t=48h



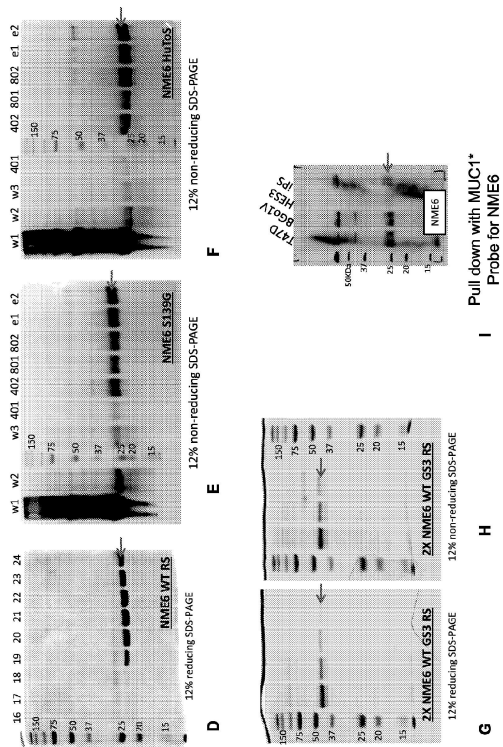
T47D + anti-NM23-H7 rabbit polyclonal – t=96h



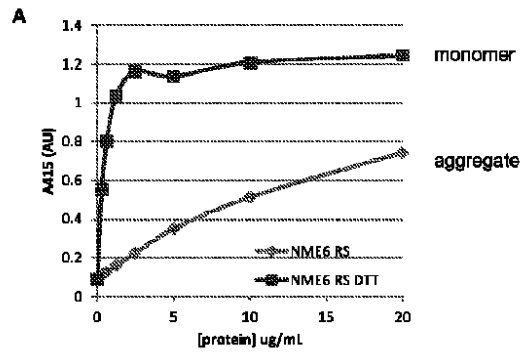
【 18 】



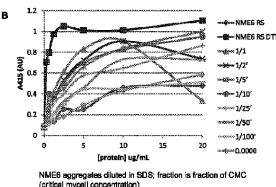
【 19 】



【 19 A 】

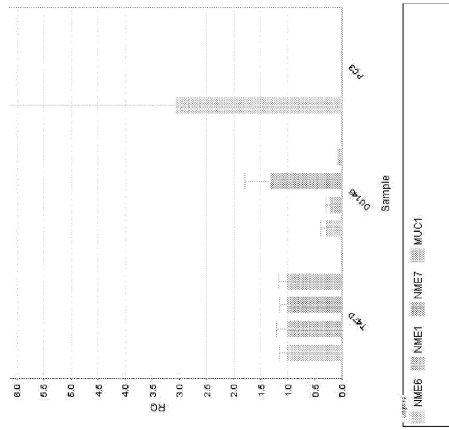


【 19 B 】



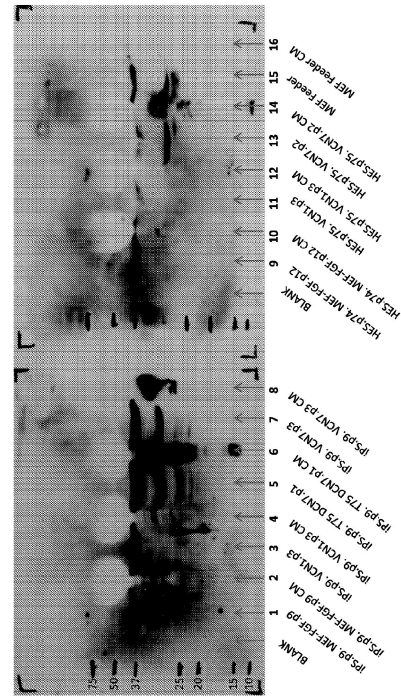
【 図 2 1 】

Quantitative PCR is used to Measure Expression Levels of NME1, NME6 and NME7 in MUC1-Positive Cancer Cell Lines T47D (breast) & DU145 (prostate) vs. MUC1-Negative Cancer Cell Line PC3 (prostate)



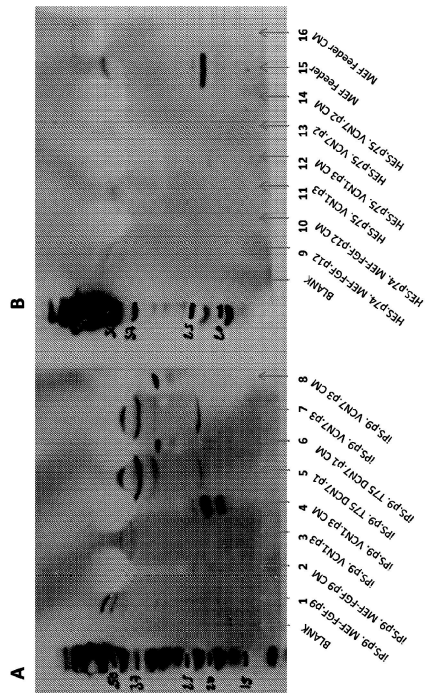
【 図 2 2 】

Stem Cell Lysates + Corresponding Conditioned Media Probed for Presence of NME-7

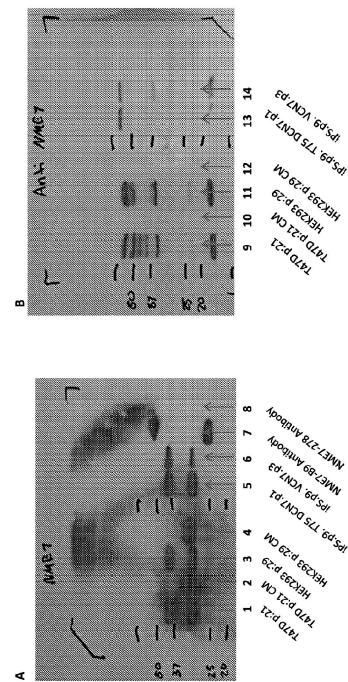


【圖 23】

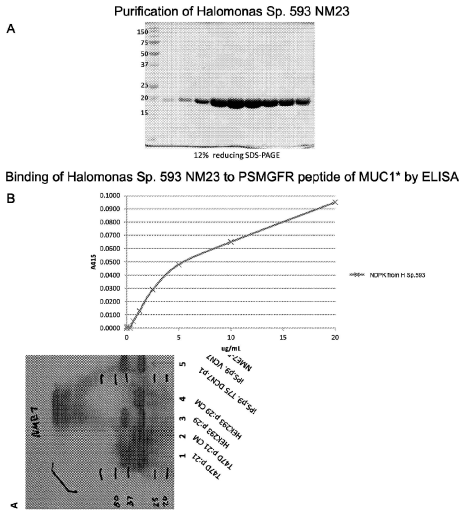
Stem Cell Lysates + Corresponding Conditioned Media Probed for presence of HIS-TAG to Identify Recombinant Protein added into Media



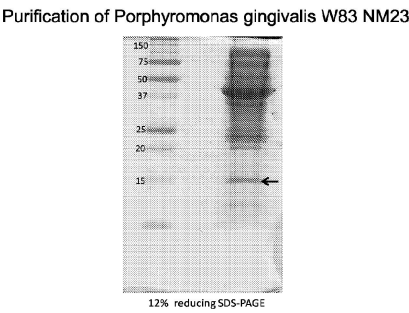
【 図 2 4 】



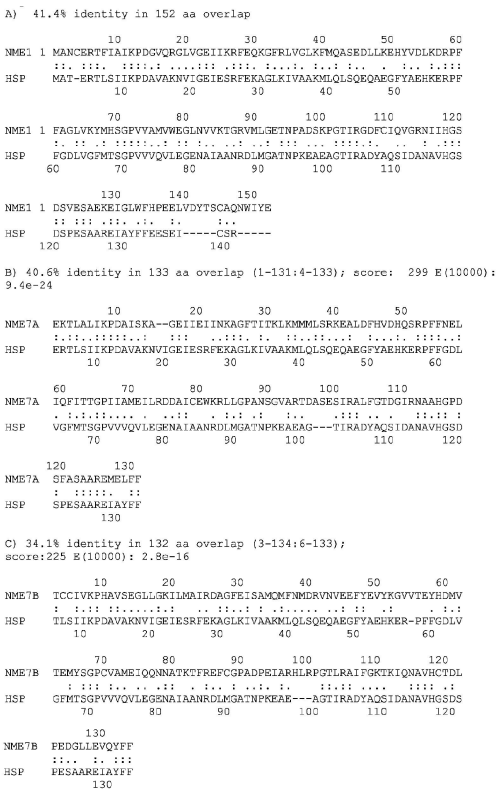
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】

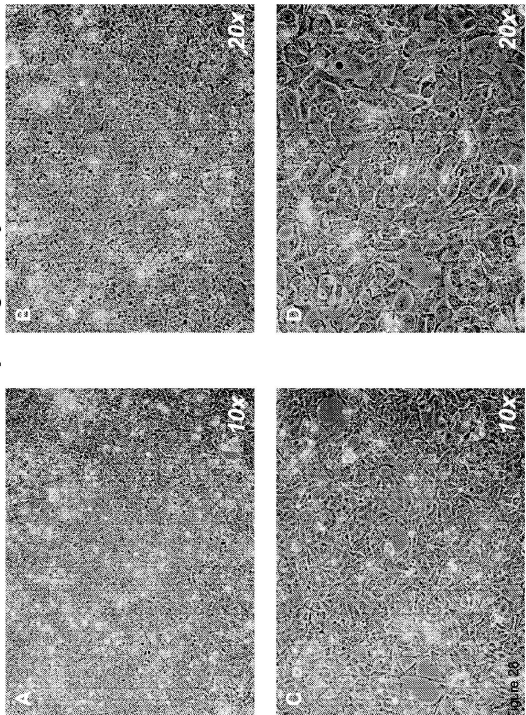


【 図 2 7 】

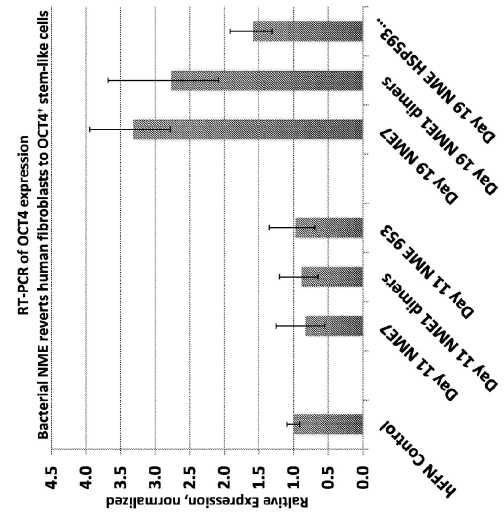


【 図 2 8 】

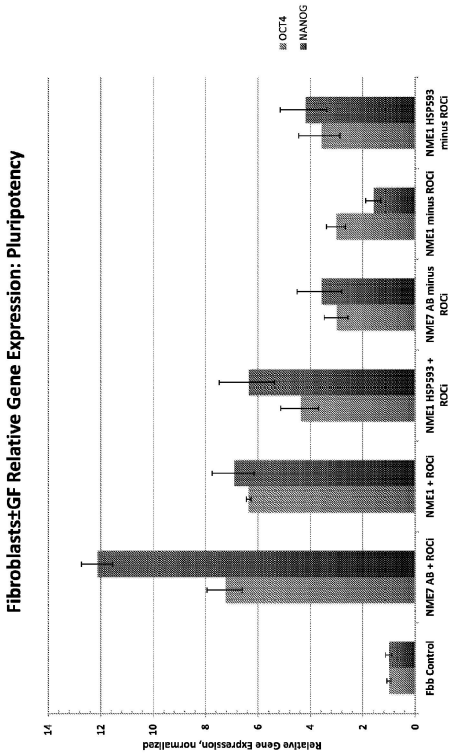
HES-3 VITAC3 – Human stem cells cultured in bacterial NME from Halomonas HSP593- passage 2, day 5



【 2 9 】



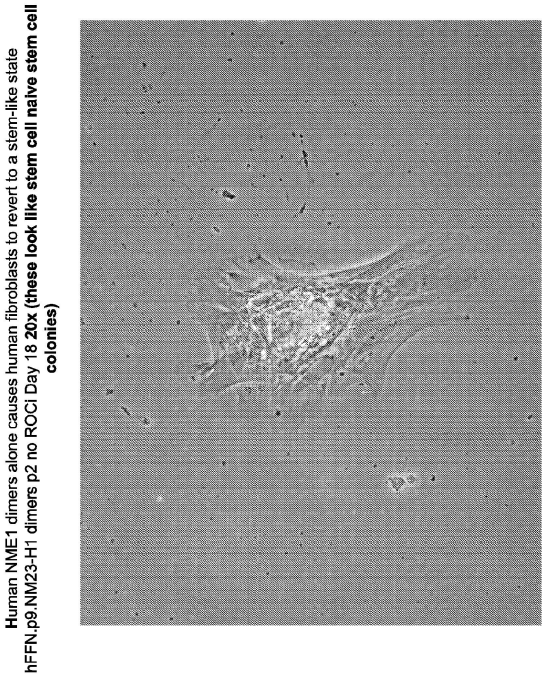
【 3 0 】



【 3 1 】

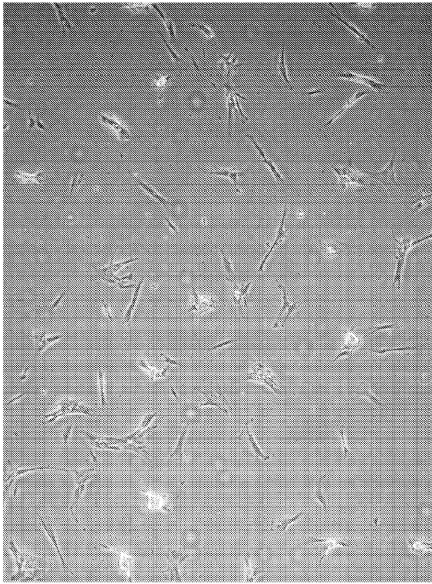


【 3 2 】



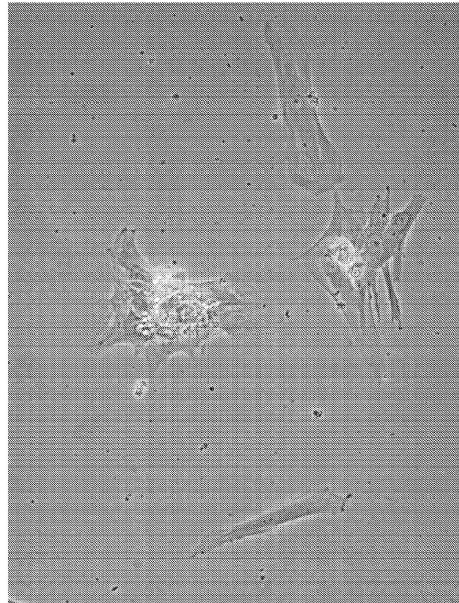
【 3 3 】

Bacterial Halomonas Sp 593 NME1 alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9, HSP593 p2 no ROCi Day 18 4x



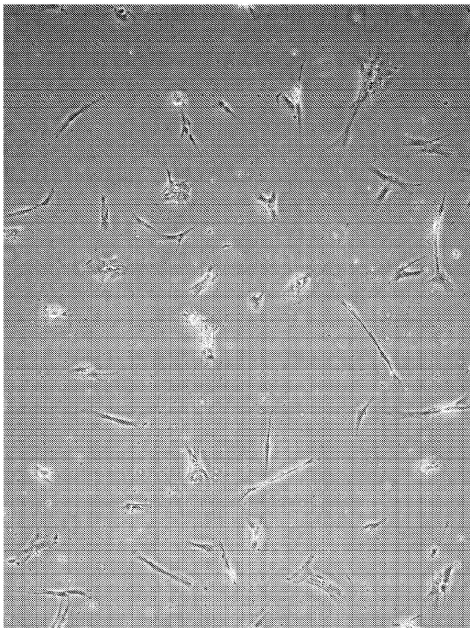
【 3 4 】

Bacterial HSP593 NME1 alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9, HSP593 p2 no ROCi Day 18 20x



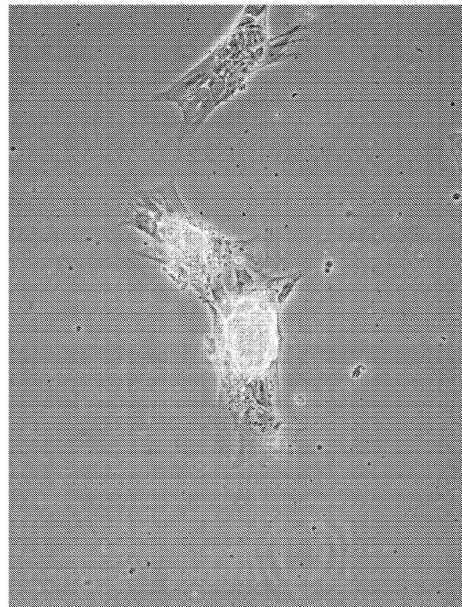
【 3 5 】

Human NME7-AB alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9, p2 no ROCi Day 18 4x



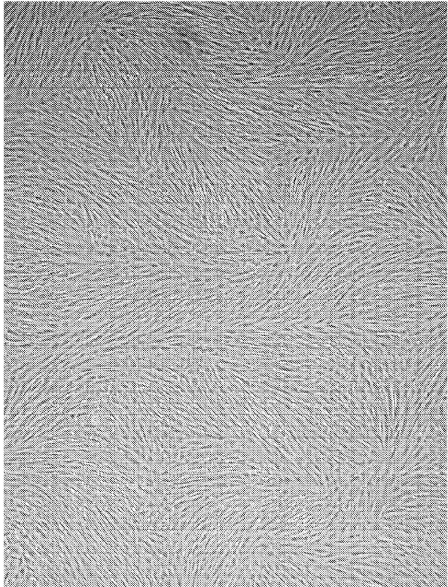
【 3 6 】

Human NME7-AB alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9, p2 no ROCi Day 18 20x



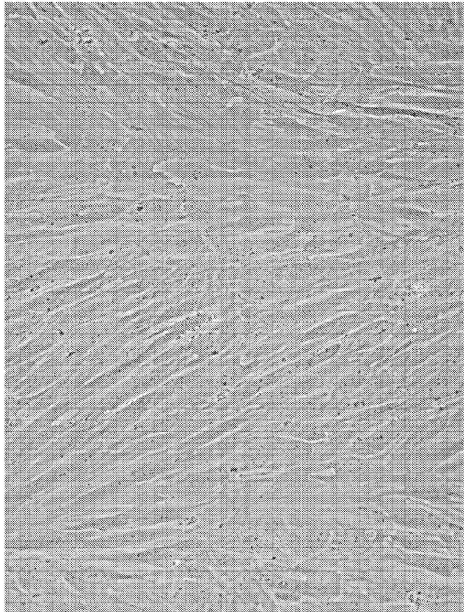
【 3 7 】

Control Cells: Human fibroblasts cultured in media in the absence of an NME protein
hFFN no ROCi Day 18 4x



【 3 8 】

Control Cells: Human fibroblasts cultured in media in the absence of an NME protein
hFFN no ROCi Day 18 20x



【 3 9 】

BRD4 Suppresses NME7, JMJD4 turns on NME1 (later stage self-regulating stem/cancer growth factor) In Earliest Naïve Stem Cells BRD4/JMJD4 Suppressed

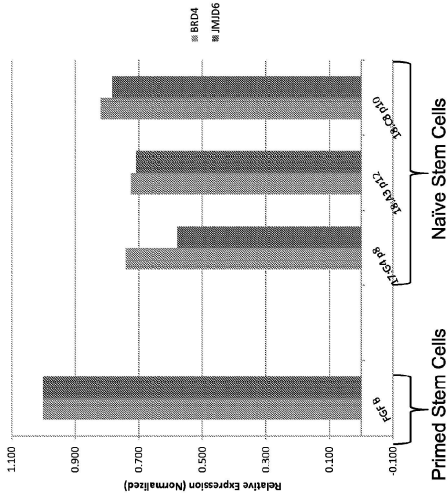
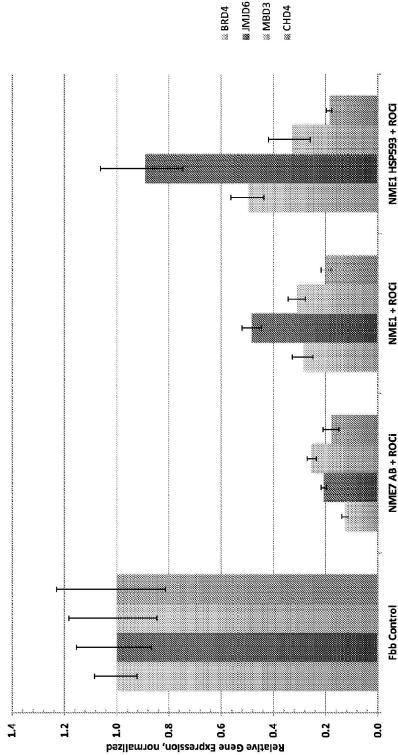


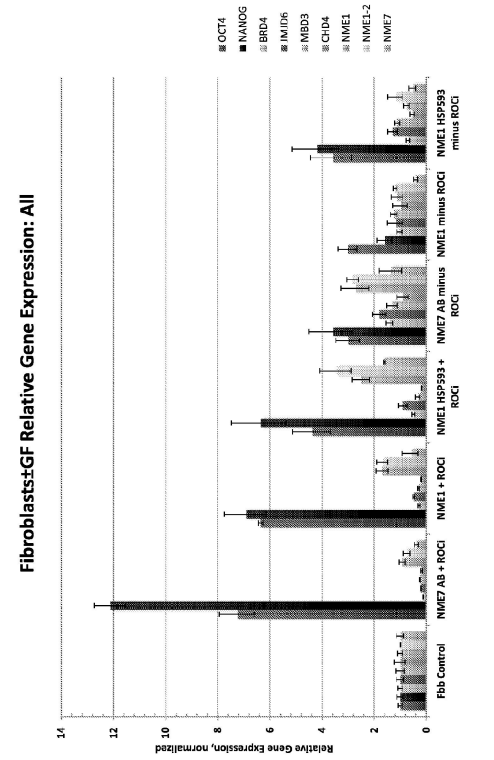
Figure 39

【 4 0 】

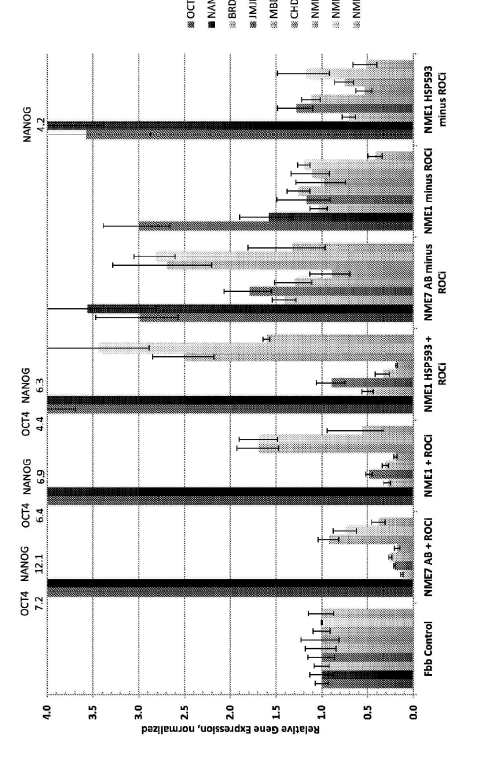
Fibroblasts±GF Relative Gene Expression: Chromatin Factors



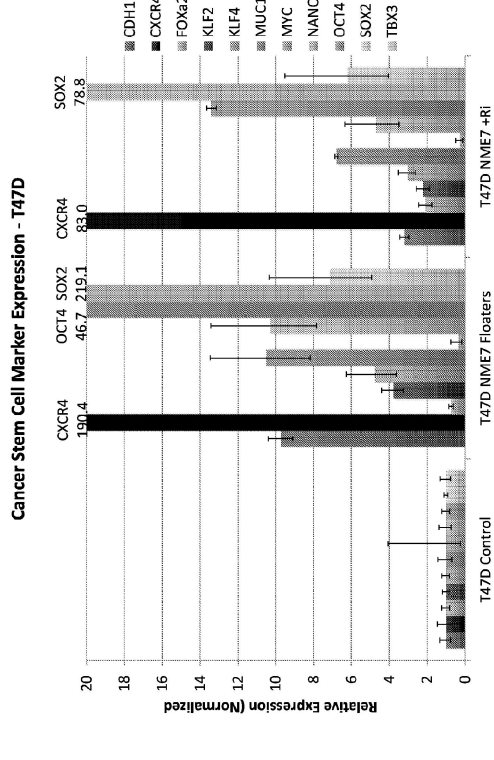
【 図 4 1 】



【 図 4 2 】



【 図 4 3 】



【 図 4 4 】

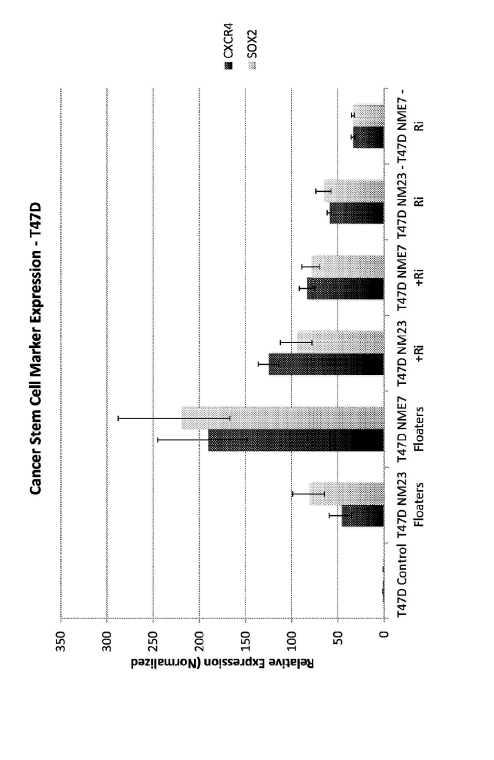
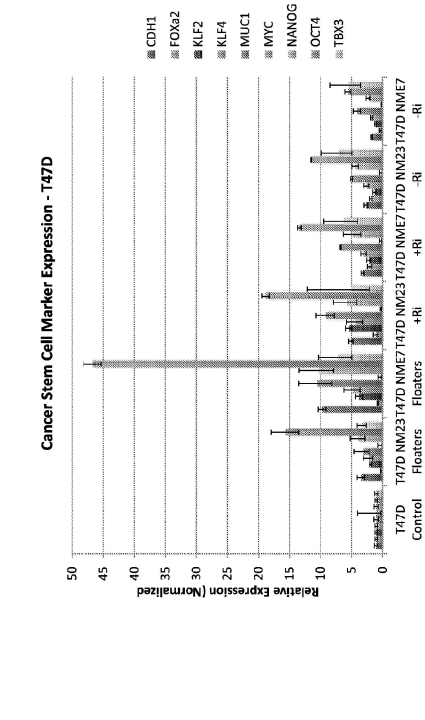
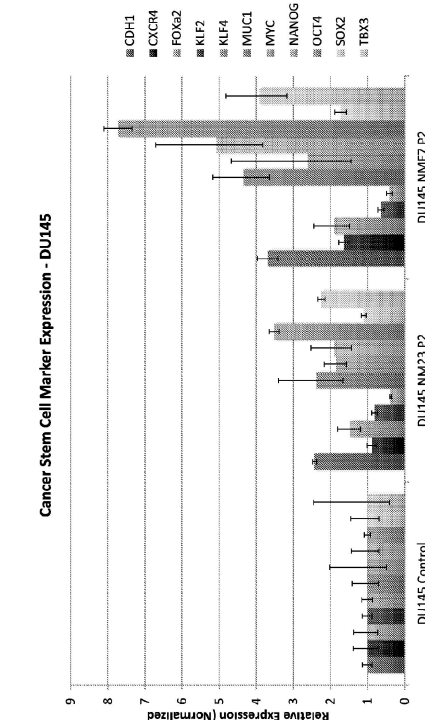


Figure 43

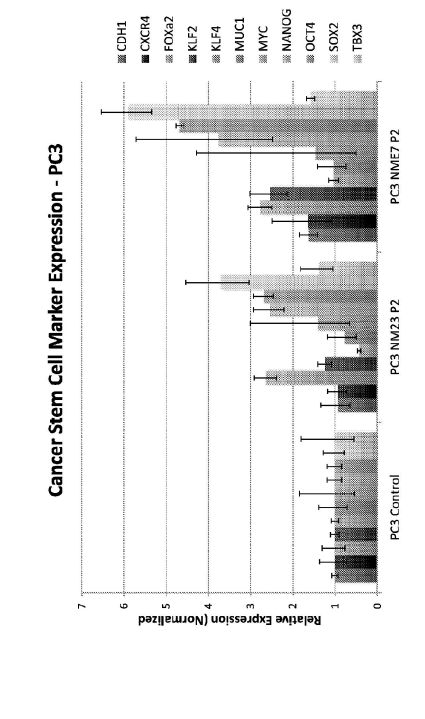
【 図 4 5 】



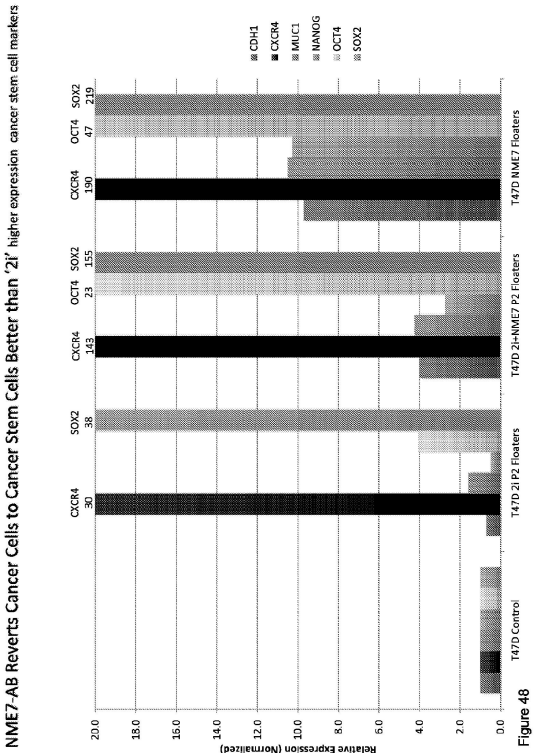
【 図 4 6 】



【 図 4 7 】



【 図 4 8 】

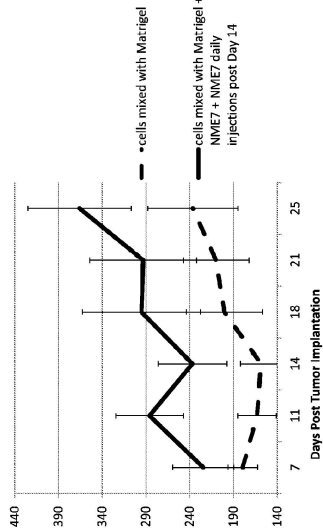


【 4 9 】

【 5 1 】

Cells mixed with NME7 followed by NME7 injections had an average of 144% increase in growth, whereas standard xenografts showed only a 57% increase in growth

T47D cells implanted into mice +/- NME7



'2i' inhibitors or recombinant NME7-AB revert cancer cells to cancer stem-like state
Note that Thompson's BRD4 and Hanna's Mbd3 are equally suppressed whether using 2i or just feeding with NME7

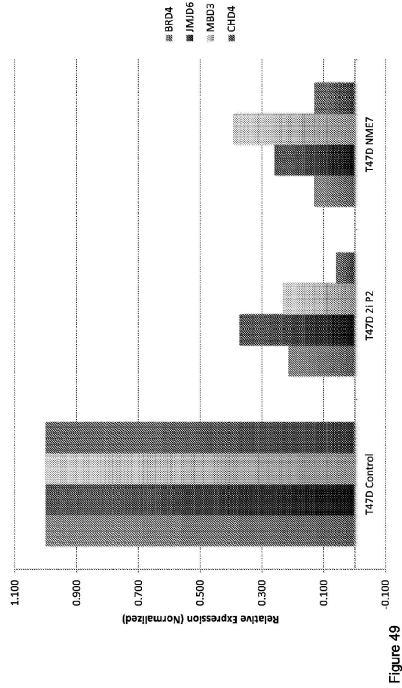
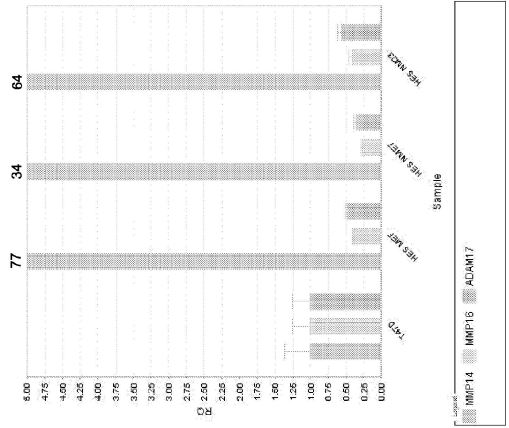
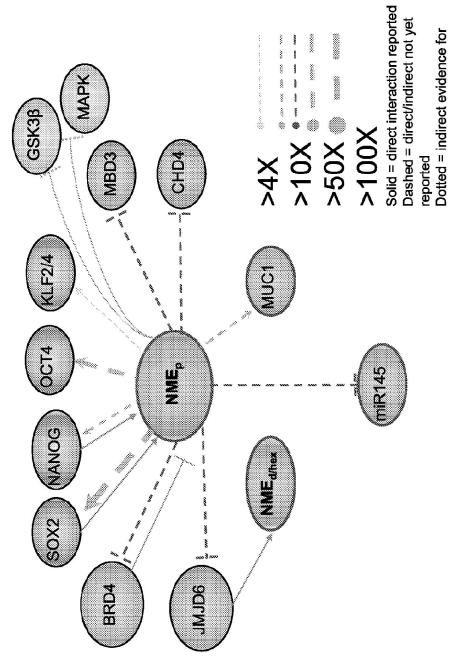


Figure 49

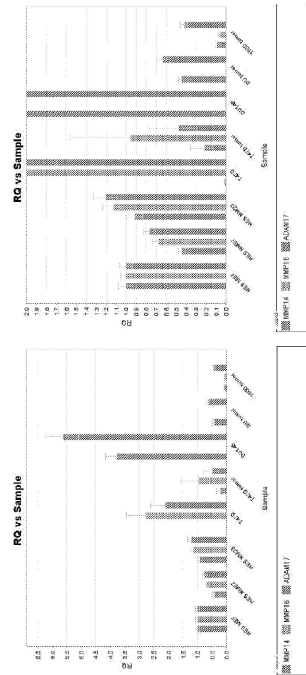
【 5 0 】

【 5 2 】

NME7 Interaction Map



【 5 3 】



【 5 5 】

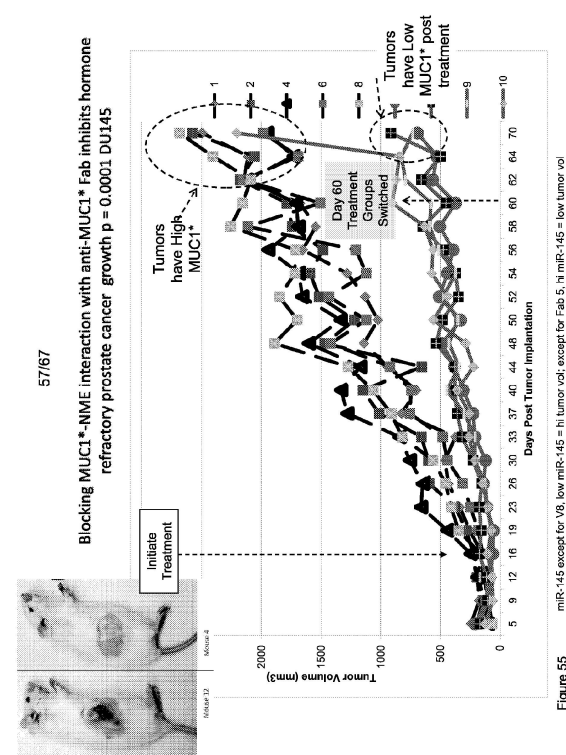
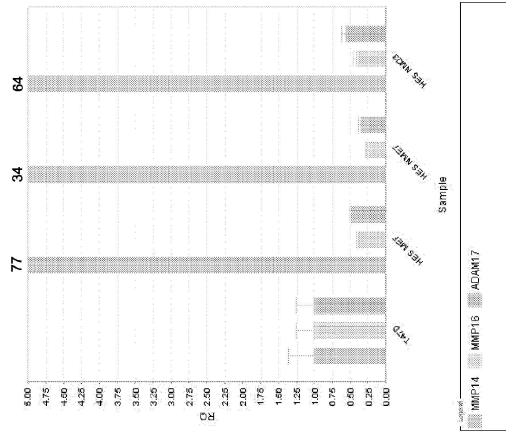
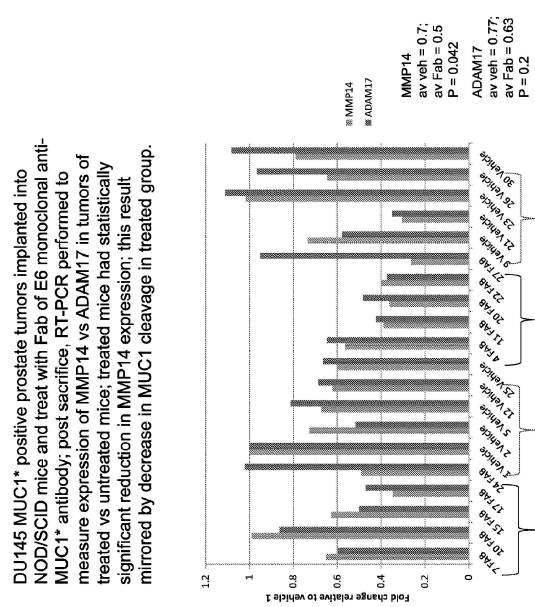


Figure 55

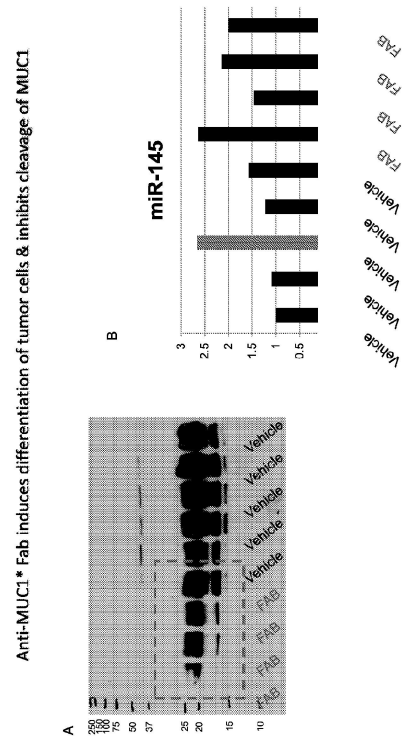
【 5 4 】



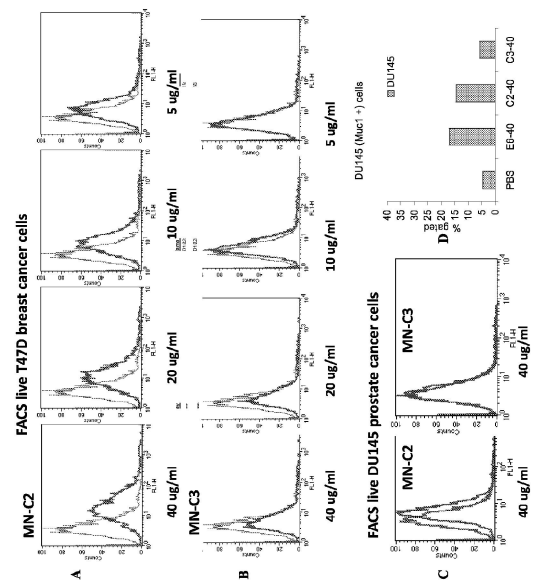
【 5 6 】



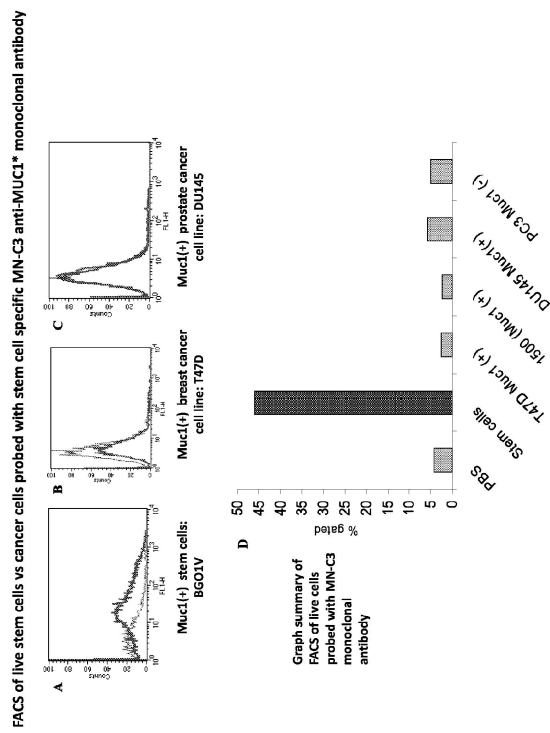
【 図 5 7 】



【 図 5 8 】



【 図 5 9 】



【 図 6 0 】

Stem Cell Specific mAbs (MN-C3 & MN-C8) do NOT Bind to DU145 Prostate cancer cells and do NOT inhibit cancer cell growth; Fabs of Cancer Specific Mabs (MN-C2 & MN-E6) Do

*The Fabs bind to and block ligand-induced dimerization of MUC1**

The Bivalent antibodies dimerize MUC1 and stimulate growth, pluripotency pathways*

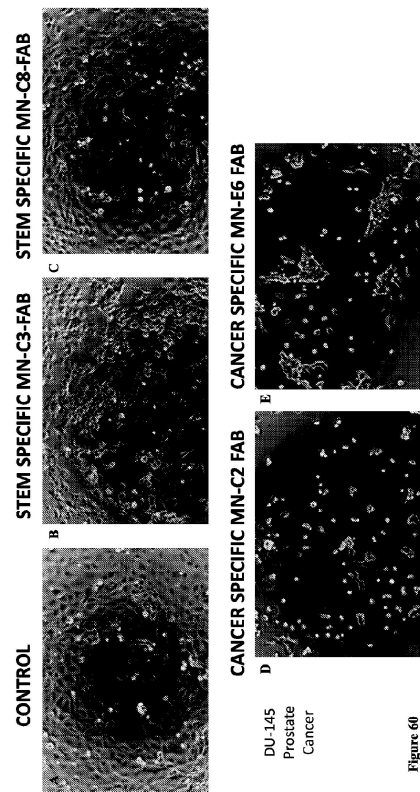


Figure 60

【図 6 1】

Sequence alignment of human NME1 to human NME7-A and -B domains

```

NME1      MANCERTFIAIKPDGVQRLVGEIIRFQNGFRLVGLKFMQASDGLKSHVYDLKDRPF 60
NME7A     ----ERTLAIKPDALSR--AGEIIEIINKAGFTITKIMMLSRKALDFHVDHQSPPF 54
          *: *: ***** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
          *: *: ***** : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

NME1      FAGLVKYMHSQPVVAMWEGLVNVRKGRVMLGETN---ADSKPGTIRGDFCIQVGRNII 117
NME7A     FNELIQFTITGPTIAMEILRDADICEWKRLLGPNAGVARTDASEIRALFGTDGIRNAA 114
          * *: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
          *: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

NME1      HGSDSVESAERKEIGLWFHPEELVDYVTSQAQNIYE 152
NME7A     HGDSFASAAEMELFF----- 131
          **: *: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

NME1      MANCERTFIAIKPDGVQRLVGEIIRFQNGFRLVGLKFMQASDGLKSHVYDLK-DRP 59
NME7B     ----NCTCCIVKPHAVSEGGLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYVYKGVVT 56
          : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
          : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

NME1      FFAGLVKYMHSQPVVAMWEGLVNVRKGRVMLGETNPA---KPGTIRGDFCIQVGRNII 116
NME7B     EYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFOGADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA 116
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

NME1      IHGSDSVESAERKEIGLWFHPEELVDYVTSQAQNIYE 152
NME7B     VHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN----- 139
          : * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
          : * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

【図 6 2】

Immunizing peptides derived from human NME7

1. LALIKPDA (SEQ ID NO:88)
2. MMMLSRKALDFHVDHQS (SEQ ID NO:89)
3. ALDFHVDHQS (SEQ ID NO:90)
4. EILRDDAICEWKRL (SEQ ID NO:91)
5. FNELIQFTITG (SEQ ID NO:92)
6. RDDAICEW (SEQ ID NO:93)
7. SGVARTDASEIRALFGTDGIRNAA (SEQ ID NO:94)
8. ELFFPSSGG (SEQ ID NO:95)
9. KFTNCTCCTIVKPHAVSEGGLGKILMA (SEQ ID NO:96)
10. LMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYVYKGVVT (SEQ ID NO:97)
11. EYFEVYKGVVTEYHD (SEQ ID NO:98)
12. EIQQNNATKTFREFOGADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA (SEQ ID NO:99)
13. YSGPCVAM (SEQ ID NO:100)
14. FREFCGP (SEQ ID NO:101)
15. VHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN (SEQ ID NO:102)
16. IQNAVHCTD (SEQ ID NO:103)
17. TDLPEDGLLEVQYFFKILDN (SEQ ID NO:104)
18. PEDGLLEVQYFFK (SEQ ID NO:105)
19. EINKAGFTITK (SEQ ID NO:106)
20. MLSRKALDFHVDHQS (SEQ ID NO:107)
21. NELIQFTIT (SEQ ID NO:108)
22. EILRDDAICEWKRL (SEQ ID NO:109)
23. SGVARTDASEIRALFGTDGI (SEQ ID NO:110)
24. SGVARTDASES (SEQ ID NO:111)
25. ALFGTDGI (SEQ ID NO:112)
26. NCTCCIVKPHAVSE (SEQ ID NO:113)
27. LGKILMAIRDA (SEQ ID NO:114)
28. EISAMQMFNMDRVNVE (SEQ ID NO:115)
29. EVYKGVVT (SEQ ID NO:116)
30. EYHDMVTE (SEQ ID NO:117)
31. EFCGPADPEIARHLR (SEQ ID NO:118)
32. AIFGKTKIQNAV (SEQ ID NO:119)
33. LPEDGLLEVQYFFKILDN (SEQ ID NO:120)
34. GPDSFASAAEMELFFP (SEQ ID NO:121)

【図 6 3】

Immunizing peptides derived from human NME7

35. ICEWKRL (SEQ ID NO:122)
36. LGKILMAIRDA (SEQ ID NO:123)
37. HAVSEGGLGK (SEQ ID NO:124)
38. VTEMYSGP (SEQ ID NO:125)
39. NATKTFREF (SEQ ID NO:126)
40. AIRDAGFEI (SEQ ID NO:127)
41. AICEWKRLLGPN (SEQ ID NO:128)
42. DHQSRPFF (SEQ ID NO:129)
43. AICEWKRLLGPN (SEQ ID NO:130)
44. VDHQSRPF (SEQ ID NO:131)
45. PDSFAS (SEQ ID NO:132)
46. KAGEIIEINKAGFTITK (SEQ ID NO:133)

【図 6 4】

Human NME1 peptides having high homology to human NME7 and bacterial NME proteins

47. MANCERTFIAIKPDGVQRLVGEIIRFE (SEQ ID NO:134)
48. VDLKDRPF (SEQ ID NO:135)
49. HGSDSVESAERKEIGLWF (SEQ ID NO:136)
50. ERTFIAIKPDGVQRLVGEIIRFE (SEQ ID NO:137)
51. VDLKDRPFFAGLVKYMHSQPVVAMVWEGLN (SEQ ID NO:138)
52. NIIHGSDSVESAERKEIGLWFHPEELV (SEQ ID NO:139)
53. KPDGVQRLVGEI (SEQ ID NO:140)

【配列表】

0006577872000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)		C 1 2 Q 1/68	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)		A 0 1 K 67/027	
		A 6 1 K 31/7088	

- (31)優先権主張番号 61/774,558
 (32)優先日 平成25年3月7日(2013.3.7)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/865,092
 (32)優先日 平成25年8月12日(2013.8.12)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/894,365
 (32)優先日 平成25年10月22日(2013.10.22)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/901,343
 (32)優先日 平成25年11月7日(2013.11.7)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/925,190
 (32)優先日 平成26年1月8日(2014.1.8)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/925,601
 (32)優先日 平成26年1月9日(2014.1.9)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/938,051
 (32)優先日 平成26年2月10日(2014.2.10)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/837,560
 (32)優先日 平成25年6月20日(2013.6.20)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US2013/050563
 (32)優先日 平成25年7月15日(2013.7.15)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US2013/051899
 (32)優先日 平成25年7月24日(2013.7.24)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US2013/055015
 (32)優先日 平成25年8月14日(2013.8.14)
 (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

前置審査

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2012/0156246(US, A1)
米国特許出願公開第2009/0092603(US, A1)
国際公開第2008/070171(WO, A1)
特表2012-505636(JP, A)
特表2012-529890(JP, A)
国際公開第2012/154759(WO, A1)
米国特許出願公開第2009/0148535(US, A1)
Cancer Res., 2010年, Vol. 70, No. 8 Suppl., Abstract No. 3866, URL, http://cancerres.aacrjournals.org/content/70/8_Supplement/3866
Stem Cells, 2012年, Vol. 30, pp. 2199-2211
Breast Cancer Res. Treat., 2009年, Vol. 118, No. 1, pp. 113-124
Cell Struct. Funct., 2010年, Vol. 35, No. 1, pp. 23-30

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/00 - 38/58
A61K 41/00 - 45/08
A61K 48/00
A61K 49/00 - 51/12
Caplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)