

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-515472

(P2004-515472A)

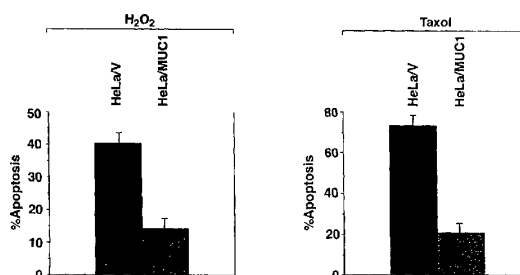
(43) 公表日 平成16年5月27日(2004.5.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/06	A 6 1 K 45/06		4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 110 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2002-526935 (P2002-526935)	(71) 出願人	503093349
(86) (22) 出願日	平成13年9月11日 (2001. 9. 11)		クフェ, ドナルド ダブリュー,
(85) 翻訳文提出日	平成15年3月10日 (2003. 3. 10)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/028548		1 8 1, ウェレスリー, グローブ ス
(87) 国際公開番号	W02002/022685		トリート 1 7 9
(87) 国際公開日	平成14年3月21日 (2002. 3. 21)	(71) 出願人	503093682
(31) 優先権主張番号	60/231, 841		大野 典也
(32) 優先日	平成12年9月11日 (2000. 9. 11)		東京都港区西新橋 3 - 2 5 - 8
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
		(74) 代理人	100062409
			弁理士 安村 高明
		(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
最終頁に続く			

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

(57) 【要約】

本発明は、一般的には癌治療、そしてより具体的には癌治療における介入点としてMUC 1と相互作用する調節剤または薬剤の使用に関連する。本発明は、MUC 1の細胞外ドメインが内因性リガンドの結合ドメインを提供し、そしてそのような結合がMUC 1の発癌性機能および癌細胞の増殖に関連するという発見に関連する、使用方法および薬学的組成物を包含する。広範には、本発明は、癌を処置する組成物および方法に関し、これらは、MUC 1 / ECD調節性の細胞増殖のアンタゴニストからなるかまたはこのアンタゴニストを含む、薬剤または治療方法を使用する。好ましくは、この方法および組成物は、MUC 1 / ECDに結合する薬剤、またはMUC 1の発癌性機能を活性化するMUC 1 / ECDリガンドに結合する薬剤を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

M U C 1 発現癌細胞の増殖を阻害する医薬の製造のための、M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 2】

前記 M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストが、前記 M U C 1 細胞外ドメインの発現を下方制御する、請求項 1 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 3】

前記 M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストが、M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターである、請求項 1 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

10

【請求項 4】

請求項 3 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含むフラグメント、あるいはそれらの保存的改変体である、使用。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 4 もしくは 5 のポリペプチド、またはそれらの保存的改変体である、使用。

【請求項 6】

請求項 3 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントである、使用。

20

【請求項 7】

請求項 3 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 の配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントである、使用。

【請求項 8】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 6 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

30

【請求項 9】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化されている、請求項 8 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 10】

前記モノクローナル抗体が、ヒトの抗体である、請求項 8 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 11】

前記抗体が、二重特異的抗体である、請求項 6 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

40

【請求項 12】

前記フラグメントが、抗体結合領域を含む、請求項 6 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 13】

請求項 6 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、あるいは細胞溶解性免疫応答または細胞障害性免疫応答を誘導するエフェクターに結合体化される、使用。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、サイトカイン、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、ビンカアル

50

カロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、または I g G 1 免疫グロブリンの F c 領域に結合体化される、使用。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、有効量の前記 M U C 1 細胞外アンタゴニストが、該 M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物として投与される、使用。

【請求項 16】

化学療法剤または放射物の投与をさらに含む、請求項 1 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 17】

癌の処置のために化学療法剤または放射物と組み合わせて使用する医薬の製造のための、M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 18】

前記 M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストが、前記 M U C 1 細胞外ドメインの発現を下方制御する、請求項 17 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 19】

前記 M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストが、M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターである、請求項 17 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含むフラグメント、あるいはそれらの保存的改変体である、使用。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合アンタゴニストが、配列番号 4 もしくは 5 のポリペプチド、またはそれらの保存的改変体である、使用。

【請求項 22】

請求項 19 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合インヒビターが、配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントである、使用。

【請求項 23】

請求項 19 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記 M U C 1 細胞外ドメイン結合アンタゴニストが、配列番号 1 の配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメントである、使用。

【請求項 24】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 22 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 25】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化されている、請求項 24 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 26】

前記モノクローナル抗体が、ヒトの抗体である、請求項 24 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 27】

前記抗体が、二重特異的抗体である、請求項 22 に記載の M U C 1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用。

【請求項 28】

前記フラグメントが、抗体結合領域を含む、請求項 22 に記載の M U C 1 細胞外ドメイン

10

20

30

40

50

アンタゴニストの使用。

【請求項 29】

請求項 22 に記載の MUC1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、あるいは細胞溶解性免疫応答または細胞障害性免疫応答を誘導するエフェクターに結合体化される、使用。

【請求項 30】

請求項 29 に記載の MUC1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記抗体またはそのフラグメントが、サイトカイン、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、または IgG1 免疫グロブリンの Fc 領域に結合体化される、使用。

10

【請求項 31】

請求項 17 に記載の MUC1 細胞外ドメインアンタゴニストの使用であって、前記化学療法剤が、アルキル化剤、トポイソメラーゼインヒビター、代謝拮抗剤、チューブリン相互作用剤、抗ホルモン剤、オルニチンデカルボキシラーゼインヒビターおよびチロシンキナーゼインヒビターからなる群から選択される、使用。

【請求項 32】

薬学的組成物であって、該薬学的組成物は、配列番号 1 のポリペプチド、または配列番号 1 の少なくとも 4 個の連続するアミノ酸を含むフラグメント、あるいはそれらの保存的改変体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 33】

前記ポリペプチドが、配列番号 5 のポリペプチド、またはその保存的改変体である、請求項 32 に記載の組成物。

20

【請求項 34】

配列番号 4 のポリペプチドまたはその保存的改変体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 35】

配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 からなる群から選択されるペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体またはそのフラグメント、ならびに薬学的に受容可能な塩を含む、薬学的組成物。

【請求項 36】

前記抗体またはそのフラグメントが、配列番号 1 の配列内のエピトープに結合する、請求項 35 に記載の組成物。

30

【請求項 37】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 36 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記モノクローナル抗体が、ヒト化される、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記モノクローナル抗体が、ヒト抗体である、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記抗体が、二重特異的抗体である、請求項 35 に記載の組成物。

40

【請求項 41】

前記フラグメントが、抗原結合領域を含む、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 42】

請求項 35 に記載の組成物であって、前記抗体またはそのフラグメントが、化学療法剤、放射性同位体、毒素、あるいは細胞溶解性免疫応答または細胞障害性免疫応答を誘導するエフェクターに結合体化される、組成物。

【請求項 43】

請求項 42 に記載の組成物であって、前記抗体またはそのフラグメントが、サイトカイン、代謝拮抗剤、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、抗生物質、アルキル化剤、天然由来の毒素、または IgG1 免疫グロブリンの Fc 領域に結合体化される、組成物。

50

【請求項 4 4】

M U C 1 の細胞外ドメインへのリガンドの結合を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下：

- (a) 配列番号 1 のポリペプチドまたは配列番号 5 のポリペプチドを含む、ポリペプチドを提供する工程；
 - (b) 該ポリペプチドを試験化合物および配列番号 4 内のエピトープに結合する抗体と接触させる工程；
 - (c) 該配列番号 1 のポリペプチドまたは配列番号 5 のポリペプチドへの、該配列番号 4 内のエピトープに結合する該抗体の結合が、適切なコントロールと比較して減少されるかどうかを測定する工程、
- を包含する、方法。

10

【請求項 4 5】

請求項 4 4 に記載の方法によって同定された化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 6】

M U C 1 発現癌細胞の増殖を阻害する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下：

- (a) M U C 1 発現癌細胞の集団を提供する工程；
 - (b) 該 M U C 1 陽性癌細胞の集団と試験化合物および配列番号 5 内のエピトープに結合する抗体とを接触させる工程；
 - (c) 該 M U C 1 発現癌細胞の集団の増殖が、適切なコントロールと比較することによって減少されるかどうかを測定する工程、
- を包含する、方法。

20

【請求項 4 7】

請求項 4 6 に記載の方法によって同定された化合物および薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。

【請求項 4 8】

M U C 1 の細胞該ドメインの発現を下方制御する化合物を同定する方法であって、該方法は、以下：

- (a) M U C 1 発現癌細胞の集団を提供する工程；
 - (b) 該 M U C 1 発現癌細胞の集団と試験化合物とを接触させる工程；
 - (c) 抗 - M U C 1 / E C D 抗体を利用して、M U C 1 / E C D 発現癌細胞中の M U C 1 / E C D を含むポリペプチドを同定する工程；および
 - (d) 該 M U C 1 / E C D を含むポリペプチドの発現が、該試験化合物が排除されたコントロールと比較して減少されるかどうかを測定する工程、
- を包含する、方法。

30

【請求項 4 9】

癌中の M U C 1 / E C D の細胞外ドメインの発現を下方制御する医薬の製造のための、N M - 3 の使用。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 0 0 年 9 月 1 1 日に提出された、仮申請連続番号第 6 0 / 2 3 1 , 8 4 1 号に対して優先権を主張する。合衆国政府は、N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e 、N a t i o n a l I n s t i t u t e o f H e a l t h 、D e p a r t m e n t o f H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e からの助成金番号 R 2 1 - C A 8 7 4 2 1 によって、本発明に権利を有し得る。

40

【0 0 0 2】

(本発明の分野)

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

【0 0 0 3】

50

(本発明の背景)

ヒトMUC1ムチン糖タンパク質は、ほとんどの腺上皮の管腔表面において、分泌上皮細胞の先端境界で発現される(Kuféra、1984)。癌において、MUC1は細胞膜および細胞質全体で高度に過剰発現される(Kuféra、1984; Pereyら、1992)。そうであるので、癌細胞におけるMUC1発現の異常パターンは、通常先端膜に見出されるMUC1に、細胞膜全体の機能を与え得る。MUC1ムチンの顕著な特徴は、各分子において25 - 100回タンデムに反復する、糖鎖付加20アミノ酸細胞外配列を含む外部ドメインである(StroussおよびDecker、1992)。ムチン糖鎖付加レベルは、管上皮組織の正常細胞より、癌細胞においてより低いようである(Kufé、米国特許第5,506,343号)。この低糖鎖付加が、完全に糖鎖付加したムチンでは隠された腫瘍特異的エピトープの曝露を引き起こす。

10

【0004】

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

【0005】

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

20

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

30

【0006】

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

40

【0007】

グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 β (GSK3 β)はまたMUC1/CDに直接結合し、そして β -カテニン結合モチーフに隣接するDRSPY部位のセリンをリン酸化し、それによってMUC1および β -カテニン間の結合を減少させる(Liら、1998)。それに加えて、c-SrcチロシンキナーゼもMUC1/CDのSPYEKVモチーフに結合およびリン酸化し、MUC1/CDと β -カテニンとの間の相互作用の増加、およびMUC1/CDとGSK3 β との間の相互作用の減少を引き起こす(Liら、2001)。

【0008】

50

MUC1はまた、細胞表面において上皮増殖因子受容体(EGF-R、HER1)と構成的に結合し、そして活性化EGF-RはMUC1/CDのSPYKEVモチーフのリン酸化を誘導する(Liら、2001(a))。MUC1/CDのEGF-Rによるリン酸化は、MUC1とc-Srcおよびβ-カテニンとの相互作用を増加させ、そしてMUC1とGSK3βとの間の相互作用を下方制御するようである。これらの結果は、MUC1がc-Src、β-カテニン、およびGSK3β経路のシグナル伝達を統合し、そして癌細胞におけるMUC1の異常な過剰発現によるこの統合されたシグナル伝達の異常調節(dysregulation)は、形質転換した表現型を促進し得るというモデルを支持する(Liら、2001(a))。

【0009】

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

【0010】

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

【0011】

(発明の要旨)

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

【0012】

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

【0013】

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

10

20

30

40

50

するフラグメントである。MUC1/ECD結合インヒビターは、そのような結合を阻害する抗体、ポリペプチド、および小分子を含む。「MUC1/ECD-P1結合インヒビター」とは、MUC1/ECDへの配列番号4内のエピトープに結合する抗体の結合の阻害によって同定される、MUC1/ECD結合インヒビターを意味する。

【0014】

本発明の1つの実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、配列番号1のポリペプチド、または以下のような配列番号1の少なくとも4個連続するアミノ酸を含むフラグメントである：T I N V、N V H D、V H D V、D V E T、V E T Q、E T Q F、T Q F N、Q F N Q、F N Q Y、N Q Y K、Q Y K T、Y K T E、K T E A、T E A A、E A A S、A A S R、A S R Y、S R Y N、R Y N L、Y N L T、N L T I、L T I S、T I S D、I S D V、S D V S、D V S V、V S V S、S V S D、V S D V、S D V P、D V P F、V P F P、P F P F、F P F S、P F S A、F S A Q、S A Q S、A Q S G、Q S G A、およびS G A G。他の実施形態において、MUC1/ECDインヒビターは、前述のペプチドの保存的改変体である。別の実施形態において、MUC1/ECD結合インヒビターは、配列番号4、配列番号5、またはその保存的改変体のポリペプチドである。

10

【0015】

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

20

【0016】

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

30

【0017】

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

【0018】

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

40

【0019】

本発明の他の局面は、MUC1/ECDアンタゴニストおよび薬学的に受容可能なキャリアを含む、薬学的組成物に関する。アンタゴニストが、MUC1/ECD結合インヒビターである場合、薬学的組成物は、配列番号1のポリペプチド、またはその少なくとも4個

50

連続するアミノ酸を含むフラグメント、あるいはそれらの保存的変体であり得る、MUC1/EC D結合インヒビター、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。いくつかの実施形態において、MUC1/EC Dインヒビターは、配列番号4、配列番号5、またはその保存的変体のポリペプチドであり得る。他の実施形態において、薬学的組成物は、MUC1/EC D結合インヒビターであって、かつ配列番号1、配列番号2および配列番号3からなる群から選択されるペプチドの配列内のエピトープに結合する抗体、および薬学的に受容可能なキャリアを含む。

【0020】

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

10

20

【0021】

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

30

40

【0022】

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

【0023】

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

50

【0024】

(発明の詳細な説明)

(I. ポリペプチド)

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

10

【0025】

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

20

【0026】

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

30

【0027】

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

40

【0028】

ポリペプチドの化学的誘導体も本発明に含まれる。「化学的誘導体」とは、官能性側鎖基の反応によって化学的に誘導体化された1以上の残基を有する、対象ポリペプチドをいう。このような誘導体化された残基としては、例えば、遊離アミノ基が、アミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンゾキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基またはホルミル基を形成するように誘導体化された分子が挙げられる。遊離力

50

ルボキシル基は、塩、メチルエステルおよびエチルエステルまたは他の型のエステル、あるいはヒドラジドを形成するように誘導体化され得る。遊離の水酸基は、O - アシル誘導体またはO - アルキル誘導体を形成するように誘導体化され得る。ヒスチジンのイミダゾール基は、N - インベンジルヒスチジン (N - i m b e n z y l h i s t i d i n e) を形成するように誘導体化され得る。

【 0 0 2 9 】

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

【 0 0 3 0 】

(I I . 抗体)

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

【 0 0 3 1 】

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

【 0 0 3 2 】

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

【 0 0 3 3 】

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

【 0 0 3 4 】

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

【 0 0 3 5 】

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

【 0 0 3 6 】

免疫後、抗体を産生する能力を有する体細胞（詳細には、Bリンパ球（B細胞））を、MAb生成プロトコールにおける使用のために選択する。これらの細胞は、生検脾臓、扁桃またはリンパ節から得られ得るか、または末梢血サンプルから得られ得る。脾臓細胞および末梢血細胞が、好ましい。しばしば、動物のパネルを免疫して、そして最も高い抗体力価を有する動物の脾臓を取り出し、そしてその脾臓からリンパ球を得る。

【0037】

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

10

【0038】

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

20

【0039】

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

【0040】

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

30

40

【0041】

本発明の抗体はまた、細胞溶解または細胞傷害性免疫反応を誘導する、種々の毒素分子またはエフェクター（例えば、IgG1免疫グロブリン）と結合体化され得る。従って、2つの成分は、種々の周知の化学手順のいずれかによって化学的に結合させ得る。例えば、

50

その連結は、ヘテロ二官能性架橋剤（例えば、SPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなど）によるものであり得る。毒素分子もまた、組換え手段（単鎖抗体の産生を介する）によって、抗体またはその結合領域に融合され得る。タンパク質鎖をコードする遺伝子は、当業者に公知の任意のクローニング手順によって、cDNA形態またはゲノム形態でクローニングされ得る（例えば、Sambrookら、1989を参照のこと）。種々の免疫毒素の組換え産生は、当該分野で周知であり、そして例えば、Thorpeら、1982(a)、Waldman、1991、およびPastanら、1992（これら全ては、本明細書中で参考として援用される）において見出され得る。種々の毒素分子が、本明細書中に記載の抗体結合体または融合タンパク質における、細胞傷害性ドメインとしての使用に適切である。免疫毒素の毒性成分として有用であることが公知の任意の毒素（好ましくは、組換え発現され得るタンパク質毒素）が、使用され得る。細胞傷害性ドメインとして特に有用なのは、細菌毒素（例えば、シュードモナス外毒素A（PE）、ジフテリア毒素、志賀毒素および志賀様毒素）、ならびに植物および真菌由来のリボソーム不活性化毒素（リシン、 α -サルシン、レストリクトトシン（restrictotoxin）、マイトジェリン（mitogellin）、トリカンソシン（tricanthosin）、サポリン-G（saporin-G）、サポリン-1、モモリジン（momordin）、ゲロニン（gelonin）、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、アブリン、モデシン（modectin）、およびGenetically Engineered Toxins、A. Frankel編、Marcel Dekker, Inc.、1992（本明細書中で参考として援用される）に記載される他の毒素）、およびそれらのタンパク質の任意の組換え誘導体である（本明細書中で参考として援用される、Olson、1981；米国特許第4,675,382号；および米国特許第4,894,443号を参照のこと）。

10

20

【0042】

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

【0043】

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

30

40

【0044】

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

50

【 0 0 4 5 】

(I I I . スクリーニングおよび診断アッセイ)

本発明は、様々なリガンドの M U C 1 / E C D への結合を阻害する化合物を同定する方法を提供する。結合リガンドは、ニューレグリン 2 アイソフォーム 5 (配列番号 2)、ニューレグリン 2 アイソフォーム 6 (配列番号 3) および M U C 1 / E C D に結合するいずれかのアイソフォームの断片、および好ましい実施形態においては、配列番号 4 中のエピトープに結合する抗体を含む。

【 0 0 4 6 】

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

10

20

【 0 0 4 7 】

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

30

【 0 0 4 8 】

代替のスクリーニングアッセイは、M U C 1 発現癌細胞の増殖に関してアンタゴニストおよびアゴニスト活性を示す、M U C 1 / E C D 結合阻害剤間を区別し得る。その方法は、M U C 1 陽性癌細胞、好ましくはヒト癌細胞の集団を必要とする。これは、M U C 1 を構成的に発現する細胞集団であり得るが、その集団は好ましくは M U C 1 を発現するように遺伝子工学的に作成した細胞型である。後者は、適当なコントロール細胞、例えば空のベクターで遺伝子工学的に操作した細胞を提供することに関して、そしてまた M U C 1 変異体を発現する細胞の構築を可能にするために、より用途が広い。遺伝子工学的に操作した M U C 1 癌細胞の例は、本明細書中で実施例 2 および 4 において例示されるような、S W 4 8 0 および H C T 1 1 6 結腸癌細胞を含むがこれに限らない。M U C 1 / E C D リガンド誘導細胞増殖の阻害は、アンタゴニスト活性を有する試験化合物を示す。コントロールは、空のベクターで遺伝子工学的に操作した癌細胞 (すなわち M U C 1 陰性) のインキュベーション、または試験化合物もしくは M U C 1 / E C D リガンドいずれかの非存在下における M U C 1 陽性細胞のインキュベーションを含み得る。後者のコントロールの 1 つは、アゴニストを同定する、すなわち試験化合物が存在し、そして M U C 1 / E C D リガンドが存在しないインキュベーションで癌細胞増殖の刺激が観察される。アゴニスト活性の特異性を、操作した M U C 1 陰性細胞の使用によって確立する。

40

【 0 0 4 9 】

さらに別のスクリーニングアッセイは、M U C 1 の細胞内ドメインの M U C 1 / E C D リガンド誘導リン酸化をモニターする。代替のスクリーニング方法論は、M U C 1 / E C D

50

リガンドが誘導する、MUC1とEGF-R、s-Src、 β -カテニン、GSK3 β またはp120との結合のモニタリングを採用する。そのようなリン酸化およびタンパク質結合をモニターする方法は、Liら(1998)、Liら(2001)、Liら(2001(a))ならびにLiおよびKufe(2001)で記載され、これらは全て本明細書中で参考文献に組み込まれる。

【0050】

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

10

【0051】

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

【0052】

20

(IV. 化学療法剤との組み合わせ)

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

30

【0053】

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

【0054】

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

40

【0055】

アルキル化剤は、細胞DNA、RNA、およびタンパク質分子、およびより小さいアミノ酸、グルタチオンおよび同様の化学物質と共有結合的な化学的付加物を形成する。一般的に、これらのアルキル化剤は、核酸、タンパク質、アミノ酸、またはグルタチオンのアミノ基、カルボキシル基、リン酸基、メルカプト基のような、細胞構成成分の求核性原子と反応する。癌治療におけるこれらアルキル化剤の機構および役割はよく理解されていない。典型的なアルキル化剤は、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラシルマスタードのようなナイトロジェンマスタード；

50

チオテパのようなアジリジン；ブスルファンのようなメタンスルホン酸エステル；カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシンのようなニトロソウレア；シスプラチン、カルボプラチンのような白金複合体；マイトマイシンおよびプロカルバジン、ダカルバジンおよびアルトレタミン（*altretamine*）のような生物還元性（*bioreductive*）アルキル化剤；ブレオマイシンを含むDNA鎖切断薬剤を含む。

【0056】

トポイソメラーゼは、複製の間に一過性のDNA鎖切断を始めて、鎖の自由な回転を可能にする、普遍的に存在する細胞酵素である。これら酵素の機能は、DNAの複製過程に決定的である。それら無しでは、DNAらせんのねじれたひずみが自由な回転を妨げ、DNA鎖は適当に分離することができず、そして細胞は最後には分裂せずに死ぬ。Topo IはDNA一本鎖切断の3'末端に結合し、一方Topo IIは二本鎖DNA切断の5'末端に結合する。DNAトポイソメラーゼII阻害剤は、以下のものを含む：アムサクリン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、イダルピシンおよびミトザントロンのようなインターカレーター；エトポシドおよびテニポシドのようなノンインターカレーター；イリノテカン（*CPT-11*）およびトポテカンを含むカンプトテシン（*camptothecin*）。代表的なDNAの浅い溝に結合する薬剤はプリカマイシンである。

10

【0057】

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

20

30

【0058】

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

【0059】

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

40

【0060】

タキサンと同様に、ビンカアルカロイドも、細胞内の微小管システムに影響を与えるように作用する。タキサンと対照的に、ビンカアルカロイドはチューブリンに結合して、そしてチューブリンサブユニットが微小管へポリマー化するのを阻害または予防する。ビンカアルカロイドはまた、微小管の脱ポリマー化を誘導し、それは微小管の組み立てを阻害して、そして細胞の中期での停止を媒介する。ビンカアルカロイドはまた、核酸およびタン

50

バク質合成；アミノ酸、環状AMP、およびグルタチオン合成；細胞呼吸にも効果を発揮し、そしてより高い濃度で免疫抑制活性を発揮する。

【0061】

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

10

【0062】

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

20

【0063】

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

【0064】

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

30

【0065】

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

40

【0066】

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

50

阻害剤は、適当にイマチニブ (imatinib) (Novartis)、OSI-774 (OSI Pharmaceuticals)、ZD-1839 (AstraZeneca)、SU-101 (Sugen) および CP-701 (Cephalon) を含む。

【0067】

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

【0068】

(V. 電離放射線)

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

【0069】

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

【0070】

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

【0071】

(VI. MUC1/ECDA発現のダウンレギュレーション)

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

【0072】

(VII. アンチセンスオリゴヌクレオチド)

本発明はまた、MUC1ならびにニューレグリン2アイソフォーム5および6のようなMUC1/ECDA野生型リガンドをコードする核酸分子の機能を調節するのに使用するために、アンチセンス化合物、特にオリゴヌクレオチドを採用する。MUC1発現の阻害は、MUC1/ECDAリガンドとの結合に利用可能なMUC1/ECDAのレベルを減少させる。MUC1/ECDAの内因性リガンドの発現の阻害は、そのようなリガンドのMUC1/

10

20

30

40

50

E C D への結合に付随する癌細胞に対する増殖効果を阻害または減少させる。アンチセンス方法論は、核酸は「相補的配列」と対を作る傾向があるという事実を利用する。相補的とは、ポリヌクレオチドは、標準的なワトソン・クリック相補的ルールによって塩基対形成し得るものであることを意味する。本発明のオリゴヌクレオチドは、情報配列、すなわちタンパク質をコードするもの、および 5' 非翻訳領域、3' 非翻訳領域、5' キャップ領域およびイントロン/エキソン連結部のような他の関連するリボヌクレオチドに対して完全にまたは部分的に標的化し得る。従って、本発明は、MUC1 および/またはニューレグリン2アイソフォーム5 および6のようなMUC1/ECD野生型リガンドをコードする核酸、好ましくはmRNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを提供する。mRNAへの干渉の全体効果は、ニューレグリンアイソフォーム5 および/または6の発現の調節である。そのような調節を、当該分野で慣習的である方法で測定し得る。10
それに加えて、癌細胞増殖または腫瘍増殖に対する効果を評価し得る。

【0073】

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

【0074】

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

【0075】

本発明のオリゴヌクレオチドの、別のさらなるまたは代替の修飾は、オリゴヌクレオチドの細胞取り込みを増強する1つまたはそれ以上の親油性部分へのオリゴヌクレオチドの化学的結合を含む。そのような親油性部分を、オリゴヌクレオチドのいくつかの異なる位置で、オリゴヌクレオチドに結合し得る。いくつかの好ましい位置は、3'末端ヌクレオチドの糖の3'位、5'末端ヌクレオチドの糖の5'位、およびあらゆるヌクレオチドの糖の2'位を含む。本発明のアンチセンス化合物はまた、薬剤学的に許容可能な塩およびブロドラッグを含む生物学的に同等な化合物を含む。40

【0076】

「特異的にハイブリダイズ可能な」および「相補的な」という用語は、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび標的核酸配列の間の安定なおよび特異的な結合を引き起こすのに十分な相補性の程度を示すために使用される。オリゴヌクレオチドは、特異的にハイブリダイズ可能であるために、その標的核酸配列に100%相補的である必要はない。オリゴヌクレオチドの標的への結合が、標的分子の正常機能に干渉して有用性の損失および産物タンパク質の発現の減少を引き起こし、そしてオリゴヌクレオチドの非標的配列に対する非特異的結合を避けるのに十分な程度の相補性が存在する場合、オリゴヌクレオチドは「特異的にハイブリダイズ可能」であると考えられる。50

【0077】

ニューレグリン2タンパク質ファミリーは、多くの選択的スプライシングアイソフォームからなる(Ringら、1999)。ニューレグリン2アイソフォーム5および6のコード配列は、各タンパク質の最初の416アミノ酸をコードするニューレグリン2遺伝子のエキソン1から6まで同じヌクレオチド配列を共有するが、アイソフォーム5のカルボキシ末端10アミノ酸およびアイソフォーム6のカルボキシ末端6アミノ酸をコードする配列において異なっている。エキソン1から6までのコードDNA配列は、それぞれ配列番号10から配列番号15までに組み込まれる。アイソフォーム5および6の最初の416アミノ酸をコードする配列は、配列番号10のヌクレオチド313から1012、配列番号11のヌクレオチド51-222、配列番号12のヌクレオチド230-348、配列番号13のヌクレオチド100から220、配列番号14のヌクレオチド111から187、および配列番号15のヌクレオチド123から181である。アイソフォーム5およびアイソフォーム6のカルボキシ末端をコードする配列は、それぞれ配列番号16のヌクレオチド132から164、および配列番号17のヌクレオチド30から50である。

10

【0078】

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

20

【0079】

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

30

【0080】

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

【0081】

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

40

【0082】

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

50

【0083】

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

【0084】

(VIIII. ワクチン)

本発明はまた、MUC1/ECDPепチド、例えば配列番号1またはその断片の、宿主哺乳類が宿主自身のMUC1/ECDPに対して作用するポリペプチドに対する抗体を産生する、ワクチンにおける使用を含む。ここでそのような断片は配列番号1の4つまたはそれ以上の連続するアミノ酸を含む。ワクチン調製技術は、Duffy (1980) およびそこで引用された参考文献によって記載されたように当該分野で一般的に公知である。それらは全て本明細書中で参考として援用される。 10

【0085】

MUC1/ECDPепチドを、タンパク質またはFicol1のようなキャリア分子に結合し得る。キャリアタンパク質は、好ましくは少なくとも約40,000ダルトン、そしてより好ましくは少なくとも約60,000ダルトンの分子量を有するものである。ワクチン処方は、薬学的に受容可能なキャリアを含み得、そしてまた処方の免疫原性を増強するために、水中油型システムまたは当該分野で公知の他のシステムのような、アジュバントシステムを含み得る。ペプチドまたは結合物は胃で分解され得るので、ワクチンは、好ましくは非経口的に投与される(例えば皮下、筋肉内、静脈内、または皮内注射)。投与量は、ワクチンの特異的活性に依存し、そして慣用的な実験によって容易に決定し得る。 20
処方を、単位投与量または複数投与量容器、例えば密閉アンプルおよびバイアルで提供し得、そして使用の直前に滅菌液体キャリアの添加のみを必要とする凍結乾燥状態で保存し得る。

【0086】

(IX. 処方)

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

【0087】

経口投与のために、本発明の組成物を、例えば不活性な希釈剤と、または吸収可能な食べられるキャリアと処方し得る、または硬いまたは軟らかい殻のゼラチンカプセルに封入し得る、または錠剤に圧縮し得る、または食事療法の食物に直接混合し得る。経口治療的投与のために、活性化合物を、賦形剤と混合して、そして摂取可能な錠剤、バツカル錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ、オブラート等の形式で使用し得る。そのような組成物および調製物は、もちろん様々であり得、そして簡便に単位重量の約2から約60%の間であり得る。そのような治療的に有用な組成物中の活性化合物の量は、適当な投与量が得られるものである。 30

【0088】

錠剤、トローチ、丸剤、カプセル等はまた、以下のものを含み得る：結合剤、トラガカントゴム、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチン；リン酸ジカルシウムのような賦形剤；コーンスターチ、ポテトスターチ、アルギン酸等のような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、およびスクロース、ラクトース、またはサッカリンのような甘味料を加え得る、またはペパーミント、冬緑油、またはチェリー香料のような香料。投与量単位がカプセルのためである場合、それは、上記の型の材料に加えて、液体キャリアを含み得る。様々なほかの材料が、コーティングとして、または投与量単位の物理的な形式を他の方法で改変するために存在し得る。例えば、錠剤、丸剤、またはカプセルを、セラック、糖、または両方でコートし得る。シロップまたはエリキシルは、活性化合物、甘味料としてスクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素およびチェリーまたはオレンジ味のような香料を含み得る。もちろん、投与量単位形式を調製するのに 40 50

使用されるあらゆる材料は、薬剤学的に純粋および採用される量において実質上無毒性でなければならない。それに加えて、他の化学療法化合物を、徐放性調製物および処方物に混合し得る。

【0089】

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

10

【0090】

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

20

【0091】

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

30

【0092】

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

【0093】

(X. 治療方法)

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

40

【0094】

本発明のMUC1/ECDAンタゴニストによる治療は、数秒から数週の範囲の間隔で照射および/または化学療法の前または後に行ない得る、および/またはそのような治療と同時に投与し得る。MUC1/ECDAンタゴニストおよび照射および/または化学療法が細胞に別々に適用される実施形態において、有意な時間が各伝達のに終了せず、2つまたは3つの処置の組み合わせが依然として細胞に対して有利な組み合わせた効果を発揮

50

し得ることを保証するために工程を行なわなければならない。そのような場合、細胞を治療薬剤または様相と、お互いの0.1から25時間以内に、より好ましくはお互いの1から4時間以内に、接触させることが企図される。約1時間から約2時間の遅延時間が最も好ましい。しかし、ある状況において、治療期間を有意に延長することが望ましい。ここで各投与の間に数日(2、3、4、5、6、または7)または数週(1、2、3、4、5、6、7、または8)が経過する。あらゆる場合において、本発明は、MUC1/ECDAンタゴニストを、電離放射線および/または化学療法剤の前に、後に、または同時に与え得ることを企図する。

【0095】

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

【0096】

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

【0097】

(本発明の実施例)

(実施例1: ペプチド)

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

【0098】

(実施例2: 抗MUC1-P1抗体)

(A. 抗体の産生)

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

【0099】

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

【0100】

(B. 抗MUC1 - P1抗体によるヒト癌細胞の刺激)

ヒトZR - 75 - 1癌細胞を、10%胎仔ウシ血清(FBS)を含むRPMI 1640培地中で80%のコンフルエンスまで増殖させ、そして6穴プレートにウェルあたり 1×10^4 細胞で移した。0.1%FBSを含む培地で一晚の飢餓状態の後、抗MUC1 - P1抗体を、図1に示した量で各ウェルに加え、そして48時間インキュベートした。0.1%FBSの存在下でさらに3日間インキュベートした後、細胞数を定量した。図1に示すように、抗MUC1 - P1は、用量依存的な様式で、ZR - 75 - 1細胞の増殖を刺激する。

【0101】

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

【0102】

(実施例3：内因性MUC1 ECDリガンド)

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

【0103】

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

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

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

【0104】

p E T 1 1 d - G S T - M U C 1 / E C D または p E T 1 1 d - G S T で形質転換した、対数増殖する E . c o l i B L 2 1 (D 3) p L y s S 細胞を、0 . 1 m M のイソプロピル - β - D - チオガラクトピラノシドと、25 で6時間インキュベートすることによって、G S T 融合タンパク質を調製した。細胞をペレット化して、20 % のスクロース、5 m M の M g C l ₂、0 . 5 % の N P - 4 0 を含む P B S に再懸濁して、次いで超音波処理した。10 , 0 0 0 × g で30分間、4 で遠心することによって破片を除去した。上清をバルク (b u l k) グルタチオンセファロース 4 B にかけて、そして4 で4時間インキュベートして、その後洗浄およびカラムに充填した。融合タンパク質を、50 m M の T r i s - H C l、p H 9 . 5 中10 m M のグルタチオンで溶出した。精製融合タンパク質を、P B S で透析した。

10

【0105】

培養細胞の細胞質ゾル画分を、40 m M の E D T A を含む P B S 中に Z R - 7 5 - 1 細胞を回収することによって調製した。P B S で洗浄した後、細胞を氷冷ホモジナイズ緩衝液 (20 m M の H e p e s - K O H、p H 7 . 5、10 m M の K C l、1 . 5 m M の M g C l ₂、1 m M のジチオトレイトール、1 m M の E G T A、1 m M の E D T A、およびプロテアーゼ阻害剤カクテル (R o c h e)) に再懸濁して、そして氷上に15分間置いた。懸濁液を D o u n c e ホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを、1 , 0 0 × g で5分間、4 で遠心した。上清を細胞質ゾル画分として回収し、そして0 で保存した。

【0106】

20

G S T - M U C 1 / E C D 融合タンパク質 (1 . 8 m g) を、400 μ l のグルタチオン - セファロース 4 B に固定化し、それをカラムに充填して、そして緩衝液 A (30 m M の T r i s - H C l、p H 7 . 5、5 m M の M g C l ₂、1 m M の E D T A、および1 m M のジチオトレイトール) で平衡化した。細胞質ゾル画分を、グルタチオン - セファロース 4 B カラムを通すことによってまず予備清澄化 (p r e c l e a r) し、そしてついで G S T - M U C 1 / E C D アフィニティークラムにかけて、それを次いで2 × 10 m l の緩衝液 A で2回洗浄した。カラムに結合したタンパク質を、2 m l の緩衝液 B (0 . 1 5 M の N a C l を含む緩衝液 A) を加えることによって溶出し、そしてそれぞれ0 . 4 m l の画分を回収した。2番目および3番目の画分を混合して、そしてドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) にかけた。コントロールとして、G S T タンパク質 (1 . 5 m g) を400 μ l のグルタチオン - セファロース 4 B に固定化し、そして実験を上記で記載したように行なった。その結果は、M U C 1 / E C D は45 k D a のタンパク質に結合することを示した。同様の実験をヒト M C F - 7 乳癌細胞の溶解物で行い、M U C 1 / E C D の45 k D a タンパク質との結合を確認した。

30

【0107】

G S T - M U C 1 / E C D 吸着質からの45 k D a をゲルから摘出し、アセトニトリルで脱水し、そして次いで100 m M の重炭酸アンモニウムで再水和した。次いでゲルの断片を、12 . 5 n g / μ l のトリプシン / 50 m M の重炭酸アンモニウムに懸濁した。消化を37 で10 - 12時間行なった。トリプシン消化ペプチドの塊を、V o y a g e r D E - P R O (P e r c e p t i v e B i o s y s t e m I n c .、F r a m i n g h a m、M A) を用いて、マトリクス補助レーザー脱離 / 電離 - 飛行時間型質量分析法 (M A L D I - T O F - M S) によって分析した。M L - 1 および M L - 2 と呼ばれる2つの関連するペプチドが、マスフィンガープリンティングによって同定された。M L - 1 (配列番号3) および M L - 2 (配列番号4) の配列は、2つのニューレグリンアイソフォーム、それぞれ N R G 2 スプライスアイソフォーム 5 および N R G 2 スプライスアイソフォーム 6 に関して以前に開示されたものである。

40

【0108】

(実施例 4 : 癌遺伝子としての M U C 1)

(A . M U C 1 は軟寒天において増殖を支持する)

M U C 1 の発現は、悪性表現型の発現に関して機能的に有意であることが示された。M U

50

C1を安定に発現する細胞系統を産生した。HCT116結腸癌細胞を、pIRES-puro2ベクターまたはpIRES-puro2-MUC1で、リポフェクタミン(lipofectamine)によってトランスフェクトし、ピューロマイシン抵抗性に関して選択した。空のベクター(HCT116/V)またはMUC1(HCT116/MUC1)のいずれかを安定に発現する単一クローンを有する、ヒトMUC1-陰性HCT116結腸癌細胞で研究を行なった。HCT116/VおよびHCT116/MUC1細胞を、軟寒天における足場独立性増殖に関してアッセイした。細胞(1×10^5 / 60 mm 皿)を、10%のFBSを添加した0.33%のアガロースを含むDMEM培地に懸濁し、そしてアガロースプラグ(10%のFBSを添加したDMEM中0.5%のアガロース)上に重ねた。細胞を4週間インキュベートし、その間新しい培地を毎週プレートに加えた。直径が70 μ mより大きなコロニーを4週間後に計測した。野生型MUC1の発現は、HCT116/V細胞で得られるものと比較して、コロニーのサイズおよび数の著しい増加と関連していた。これらの発見は、SW480/VおよびSW480/MUC1細胞で行なった同様の研究によって確認された。ここでMUC1の発現は再びSW480細胞の足場独立性増殖を支持することが示された。

10

【0109】

(B. MUC1はヌードマウスにおけるヒト腫瘍形成を支持する)

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

20

【0110】

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

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

30

【0111】

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

40

【0112】

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

MUC1が酸化ストレスに対するアポトーシス反応を阻害するかどうかを決定するために、空のベクターまたはMUC1を安定に発現するHeLa細胞を、1 mMの過酸化水素で1時間処理した。DNA内容を、エタノール固定細胞をヨウ化プロピジウムで染色し、そ

50

してFACSscan(Beckton Dickinson)によってモニターすることによって評価した。サブG1DNA内容を有する細胞の数を、MODFIT LTプログラム(Verity Software House、Tops Ham、ME)で決定した(Yuanら、1997)。細胞を、フローサイトメトリーによって、アポトーシスのマーカーとしてサブG1DNAの誘導に関して分析した。図4に示すように、その結果は、MUC1は酸化ストレスに対するアポトーシス反応を阻害することを示す。

【0113】

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

10

【0114】

(実施例7：MUC1発現に対するNM-3の効果)

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

【0115】

未処理細胞に比べて、NM-3処理細胞におけるDF3抗原の細胞内レベルの減少が観察された。ZR-75-1およびBT-20細胞系統において同様の結果が見出された。細胞内DF3抗原のNM-3による減少は、用量および時間依存的であることが示された。NM-3がMUC1DF3抗原の細胞外局在化を損傷したかどうかを決定するために、NM-3処理後の細胞培養培地上清中およびMCF-7細胞上の抗原レベルを調査した。DF3抗原のレベルは、両方の局在において抑制された。これらの発見は、NM-3はMUC1タンパク質の発現を阻害することを示唆する。

20

【0116】

NM-3のMUC1発現に対する効果は転写レベルで検出可能かどうかを決定するために、ハイブリダイゼーション研究を行なった。³²P標識DF3DNAプローブは、MCF-7細胞に対する48時間のNM-3処理の後、全細胞RNAにおいて4.5および7.0kbの2つの転写物にハイブリダイズした。両方のmRNAのレベルは、MCF-7細胞をNM-3の非存在下でインキュベートしたコントロールと比較して減少した。ZR-75-1およびBT-20細胞系統を用いて同じ結果が観察された。これらの発見は、DF3の発現は、それらの細胞系統に対するNM-3処理の後、転写レベルで調節されることを示唆する。

30

【0117】

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

40

【0118】

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

【0119】

(参考文献)

以下の参考文献は、例示的な手順または他の詳細な捕捉を提供する範囲で、本明細書中で

50

参考として具体的に援用される。

【 0 1 2 0 】

【 表 1 】

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

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

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

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

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

10

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

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

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

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

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

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

20

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

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

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

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

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

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

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

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

30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

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

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

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

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

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

20

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

Waldmann, Science, 252:1657, 1991.

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

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

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

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

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

30

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

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

【図面の簡単な説明】

【図1】

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

【図2】

図2は、空のベクター (S W 4 8 0 / V) または M U C 1 (S W 4 8 0 / M U C 1) を安定に発現する S W 4 8 0 細胞の増殖に対する抗 M U C 1 - P 1 抗体の効果を示す。 40

【図3】

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

【図4】

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

【図 1】

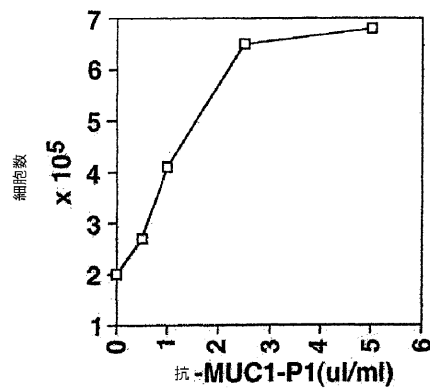


FIG. 1

【図 2】

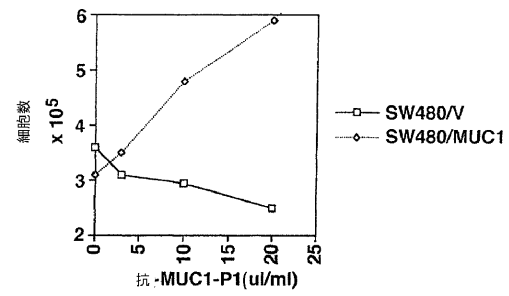


FIG. 2

【図 3】

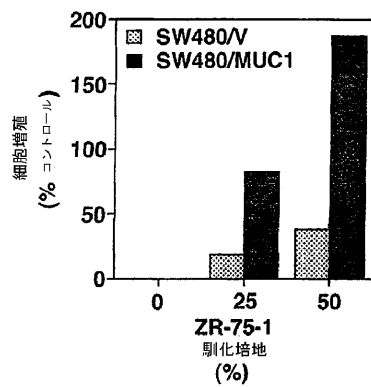


FIG. 3

【図 4】

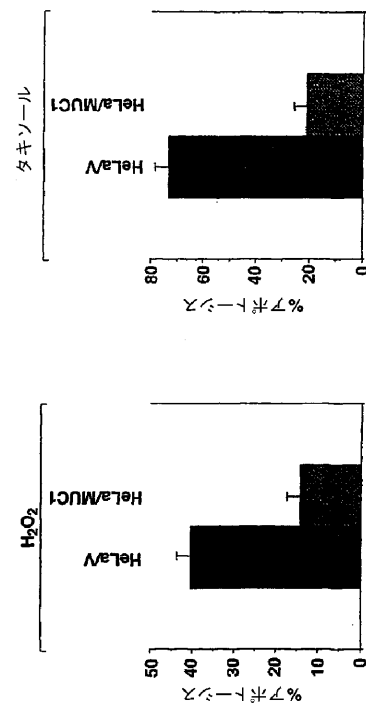


FIG. 4

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22685 A2

(51) International Patent Classification: C07K 16/00

(21) International Application Number: PCT/US01/28548

(22) International Filing Date:
11 September 2001 (11.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,841 11 September 2000 (11.09.2000) US

(71) Applicants and

(72) Inventors: KUFU, Donald, W. [US/US]; 179 Grove Street, Wellesley, MA 02181 (US). OHNO, Tsuneya [JP/US]; 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105 (JP).

(74) Agent: MOLONEY, Stephen, J.; Associate Counsel, Intellectual Property, Ilex Oncology, Inc., 4545 Horizon Hill Blvd., San Antonio, TX 78229 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,

CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

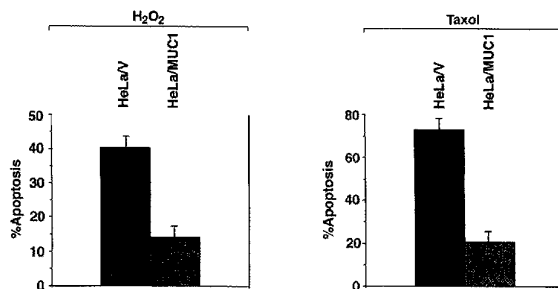
(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- without international search report and to be republished upon receipt of that report
- with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: MUC1 EXTRACELLULAR DOMAIN AND CANCER TREATMENT COMPOSITIONS AND METHODS DERIVED THEREFROM



(57) Abstract: The present invention provides compositions and methods for inhibiting the proliferation of cancer cells and for the treatment of tumors with antagonists of the binding of ligands to the extracellular domain of MUC1, such binding being related to an oncogenic function of MUC1.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

**MUC1 EXTRACELLULAR DOMAIN AND CANCER TREATMENT
COMPOSITIONS AND METHODS DERIVED THEREFROM**

5 This application claims priority to Provisional Application Serial No. 60/231,841,
filed September 11, 2000. The United States government may own rights in the present
invention pursuant to grant number R21-CA87421 from the National Cancer Institute,
National Institutes of Health, Department of Health and Human Services.

FIELD OF THE INVENTION

10

The present invention relates generally to the field of cancer therapy and more
specifically to the use of modulators or agents that interact with MUC1 as a point on
intervention in cancer therapy.

15

BACKGROUND OF THE INVENTION

The human MUC1 mucin glycoprotein is expressed on the apical borders of
secretory epithelial cells on the luminal surface of most glandular epithelia (Kufe *et al.*,
1984). In carcinomas, MUC1 is highly overexpressed throughout the entire cell
20 membrane and cytoplasm (Kufe *et al.*, 1984; Percy *et al.*, 1992). As such, the aberrant
pattern of MUC1 expression in carcinoma cells may confer a function for MUC1
normally found at the apical membrane to the entire cell membrane. The hallmark of
MUC1 mucin is an ectodomain comprising a glycosylated 20 amino acid extracellular
sequence that is tandemly repeated 25-100 times in each molecule (Strouss & Decker,
25 1992). The mucin glycosylation level appears to be lower in cancer cells than normal cells
of ductal epithelial tissue (Kufe, U.S. Pat. No. 5,506,343). This hypoglycosylation results
in the exposure of tumor-specific epitopes that are hidden in the fully glycosylated mucin.

Over ninety percent of breast cancers show an increased expression of MUC1
(also known as Mucin, Epithelial Membrane Antigen, Polymorphic Epithelial Mucin,
30 Human Milk Fat Globule Membrane antigen, Episialin, DF-3, etc., *see* Barry & Sharkey,

WO 02/22685

PCT/US01/28548

1985). Several clinical studies have suggested that mucinous tumor antigens expressed on the cell surface of tumor cells associate with poor prognosis of a variety of cancer types (Itzkowitz *et al.*, 1990).

MUC1 is expressed as both a transmembrane form and a secreted form (Finn *et al.*, 1995). The repeating sialyl epitopes of MUC1 (the 'ectodomain') are shed into the serum (Reddish *et al.*, 1996). The N-terminal ectodomain (the extracellular domain that is cleaved) of MUC1 consists of a variable number of the 20-amino acid tandem repeats that are subject to O-glycosylation. This mucin extends far above the cell surface and past the glycocalyx making it easily available for interactions with other cells. The C-terminal region of MUC1 includes a 37 amino acid transmembrane domain and a 72 amino acid cytoplasmic tail that contains sites for tyrosine phosphorylation. A approximately 45-amino acid extracellular domain remains following cleavage of the ectodomain. It is not known what enzyme is responsible for the cleavage of the ectodomain at this time. The extracellular domain or "MUC1/ECD," remaining, after cleavage of the ectodomain, typically includes the amino acid sequence:

TINVHDEVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAG.

The cytoplasmic domain of MUC1 ("MUC1/CD") encompasses multiple sub-domains that are important in intracellular signaling in cancer cells. β -Catenin binds directly to MUC1/CD at a SAGNGGSSL motif (Yamamoto *et al.*, 1997). β -Catenin, a component of the adherens junctions of mammalian epithelium, binds to cadherins at the intracellular surface of the plasma membrane and performs a signaling role in the cytoplasm as the penultimate downstream mediator of the wnt signaling pathway (Takeichi, 1990; Novak & Dedhar, 1999). The ultimate mediator of the wnt pathway is a nuclear complex of β -catenin and lymphoid enhancer factor/T cell factor (*Lef/Tcf*) which stimulates the transcription of a variety of target genes (*see e.g.*, Molenaar *et al.*, 1996; Brunner *et al.*, 1997). Defects in the β -catenin-*Lef/Tcf* pathway are involved in the development of several types of cancers (Novak & Dedhar, 1999).

Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) also binds directly to MUC1/CD and phosphorylates serine in a DRSPY site adjacent to the β -catenin binding motif, thereby

WO 02/22685

PCT/US01/28548

decreasing the association between MUC1 and β -catenin (Li *et al.*, 1998). In addition, the c-Src tyrosine kinase also binds to and phosphorylates a MUC1/CD SPYKEV motif, resulting in an increased interaction between MUC1/CD and β -catenin and a decreased interaction between MUC1/CD and GSK3 β (Li *et al.*, 2001).

5 MUC1 associates also constitutively with the epidermal growth factor receptor (EGF-R, HER1) at the cell membrane and activated EGF-R induces phosphorylation of the MUC1/CD SPYKEV motif (Li *et al.*, 2001(a)). EGF-R mediated phosphorylation of MUC1/CD appears to increase the interaction of MUC1 with c-Src and β -catenin and downregulate the interaction between MUC1 and GSK3 β . These results support a model
10 wherein MUC1 integrates the signaling among c-Src, β -catenin and GSK3 β pathways and dysregulation of this integrated signaling by aberrant overexpression of MUC1 in cancer cells could promote the transformed phenotype (Li *et al.*, 2001(a)).

The Armadillo protein p120^{cas} also binds directly to MUC1/CD resulting in the nuclear localization of p120 (Li & Kufe, 2001). P120 has been implicated in cell
15 transformation and altered patterns of p120 expression have been observed in carcinomas (see e.g., Jawhari *et al.*, 1999; Shimazui *et al.*, 1996). P120 is a v-Src tyrosine kinase substrate, binds to E-cadherin, and is implicated as a transcriptional coactivator (Reynolds *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*, 1994; Daniels & Reynolds, 1999). The observations that p120 localizes to both cell junctions and the nucleus have supported a role for p120, like
20 β -catenin, in the regulation of both cell adhesion and gene transcription. Decreased cell adhesion resulting from association of MUC1 and p120 may be involved in increased metastatic potential of MUC1-expressing tumor cells.

Thus the available evidence indicates that MUC1/CD functions to transfer signals from the extracellular domain to the nucleus, and utilizes signaling mechanisms that have
25 been implicated in adhesion receptor and growth factor signaling and cellular transformation. It is desirable to identify compositions and methods related to modulation of the MUC1-mediated signaling and its putative role in cellular transformation.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention encompasses methods of use and pharmaceutical compositions relating to the discovery that the extracellular domain of MUC1 provides
 5 binding domains for endogenous ligands and that such binding is related to an oncogenic function of MUC1 and the proliferation of cancer cells.

Broadly the invention relates to cancer treatment compositions and methods employing agents or treatment methodologies that comprise or include antagonists of MUC1/ECD modulated cell proliferation. Preferred are methods and compositions that
 10 comprise agents that bind to MUC1/ECD or that bind to MUC1/ECD ligands that activate the oncogenic function of MUC1.

Thus, one aspect of the present invention provides for a method for inhibiting the proliferation of cancer cells, comprising administration of an effective amount of a MUC1/ECD antagonist. MUC1/ECD antagonists are agents that downregulate or reduce
 15 the quantity of MUC1/ECD presented on cell surfaces, or downregulate the level of wild-type MUC1/ECD ligands available for binding to MUC1/ECD, and/or MUC1/ECD binding inhibitors. A "MUC1/ECD binding inhibitor" means a compound that inhibits the binding of MUC1 wild-type ligands, which may suitably include neuregulin 2 isoform 5 (SEQ ID NO: 2), neuregulin 2 isoform 6 (SEQ ID NO: 3), and appropriate fragments
 20 thereof, to MUC1/ECD or a compound that inhibits the binding of an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO. 4 to MUC1/ECD. Appropriate fragments of neuregulin 2 isoform 5 (SEQ ID NO: 2) and neuregulin 2 isoform 6 (SEQ ID NO: 3) are those that bind to MUC1/ECD. MUC1/ECD binding inhibitors include antibodies, polypeptides and small molecules that inhibit such binding. A "MUC1/ECD-PI binding inhibitor"
 25 means a MUC1/ECD binding inhibitor identified by inhibition of the binding to MUC1/ECD of an antibody the binds to an epitope within SEQ ID NO. 4.

In one embodiment of the invention, the MUC1/ECD inhibitor is the polypeptide of SEQ ID NO: 1, or a fragment comprising at least four consecutive amino acids of SEQ
 ID. NO: 1 such as TINV, NVHD, VHDV, DVET, VETQ, ETQF, TQFN, QFNQ, FNQY,
 30 NQYK, QYKT, YKTE, KTEA, TEAA, EAAS, AASR, ASRY, SRYN, RYNL, YNLT,

WO 02/22685

PCT/US01/28548

NLTI, LTIS, TISD, ISDV, SDVS, DVSV, VSVS, SVSD, VSDV, SDVP, DVPF, VPFP, PFPF, PFPS, PFSA, FSAQ, SAQS, AQSG, QSGA, and SGAG. In other embodiments, the MUC1/ECD inhibitor is a conservative variant of the foregoing peptides. In another embodiment, the MUC1/ECD binding inhibitor is the polypeptide of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, or conservative variants thereof.

In another embodiment of the present invention, the MUC1/ECD inhibitor is an antibody that binds to one or more epitopes in the MUC1/ECD sequence SEQ ID NO: 1. In other embodiments of the invention, the MUC1/ECD inhibitor is an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 3. The antibody may be a polyclonal or a monoclonal antibody. Monoclonal antibodies may be humanized or human monoclonal antibodies. It may also be a bispecific antibody or a fragment which comprises an antigen binding region. In some embodiments, the antibody is conjugated to a chemotherapeutic agent, radioisotope, toxin, or an effector that induces a cytolytic or cytotoxic immune response. Such conjugates may comprise a cytokine, an antimetabolite, an anthracycline, a vinca alkaloid, an antibiotic, an alkylating agent, a naturally derived toxin, or an Fc region of a IgG1 immunoglobulin.

In another embodiment, the method further comprises the administration of a chemotherapeutic agent or radiation in combination with a MUC1/ECD antagonist. Chemotherapeutic agents typically include alkylating agents, topoisomerase inhibitors, antimetabolites, tubulin interactive agents, anti-hormonal agents, ornithine decarboxylase inhibitors and tyrosine kinase inhibitors.

In various embodiments, the cancer cells are selected from the group consisting of skin cancer cells, prostate cancer cells, lung cancer cells, brain cancer cells, breast cancer cells, ovarian cancer cells, cervical cancer cells, liver cancer cells, pancreatic cancer cells; colon cancer cells, stomach cancer cells and leukemia cells.

Another aspect of the invention is a method for reducing tumor growth in a mammal comprising administration of a therapeutic amount of a chemotherapeutic agent or radiation and an effective amount of a MUC1/ECD antagonist. In a preferred embodiment, the mammal is human. In one embodiment the method is for treating refractory tumors comprising administration of a therapeutic amount of a

WO 02/22685

PCT/US01/28548

chemotherapeutic agent or radiation and an effective amount of a MUC1/ECD antagonist subsequent to treatment with one or more chemotherapeutic agents. In various embodiments, the tumor is a tumor of the skin, prostate, lung, brain, breast, ovary, cervix, liver, pancreas, colon, stomach or hematopoietic system.

5 Other aspects of the invention relate to pharmaceutical compositions comprising MUC1/ECD antagonists and a pharmaceutically acceptable carrier. Wherein the antagonist is a MUC1/ECD binding inhibitor that may be the polypeptide of SEQ ID NO: 1 or a fragment comprising at least four consecutive amino acids, or conservative variants thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. In some embodiments, the
10 MUC1/ECD inhibitor may be the polypeptide of SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, or conservative variants thereof. In other embodiments, the pharmaceutical composition comprises an antibody that is a MUC1/ECD binding inhibitor and binds to an epitope within sequences of the peptides selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3 and a pharmaceutically acceptable carrier.

15 The present invention also encompasses methods for screening MUC1/ECD binding inhibitor activity. One embodiment comprises a method of identifying a compound that inhibits the binding of ligands to MUC1/ECD, the method comprising: (a) providing a polypeptide comprising SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 5; (b) contacting said polypeptide with a test compound and a ligand to the extracellular domain of MUC1
20 selected from the group consisting of antibodies to MUC1/ECD that stimulate MUC1 mediated cancer cell proliferation and wild type ligands that bind to MUC1/ECD and stimulate cancer cell proliferation; and (c) determining whether the binding of said antibody to MUC1/ECD or wild type ligand is decreased relative to an appropriate control. Appropriate controls include, but are not limited to, assays wherein test
25 compounds are excluded. In one embodiment the MUC1/ECD antibody that stimulates MUC1 mediated cancer cell proliferation is an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO: 4. In other embodiments, the wild type ligands may suitably include neuregulin 2 isoform 5 (SEQ ID NO: 2) and appropriate fragments thereof and neuregulin 2 isoform 6 (SEQ ID NO: 3) and appropriate fragments thereof, wherein appropriate

WO 02/22685

PCT/US01/28548

fragments are those that bind to the SEQ ID NO: 1 and have suitable growth stimulatory activity.

Another embodiment is a method of identifying a compound that inhibits the proliferation of MUC1-expressing cancer cells, the method comprising: (a) providing a population of MUC1-expressing cancer cells; (b) contacting said population of MUC1-expressing cancer cells with a test compound and a ligand to the extracellular domain of MUC1 selected from the group consisting of antibodies to MUC1/ECD that stimulate MUC1 mediated cancer cell proliferation and wild type ligands that bind to MUC1/ECD and stimulate cancer cell proliferation; and (c) determining whether the proliferation of the population of MUC1-expressing cancer cells is decreased by comparison to an appropriate control. Appropriate controls include, but are not limited to, proliferation assays wherein test compounds are excluded. In one embodiment the MUC1/ECD antibody that stimulates MUC1 mediated cancer cell proliferation is an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO. 4. In other embodiments, the wild type ligands may suitable include neuregulin 2 isoform 5 (SEQ ID NO: 2) and appropriate fragments thereof and neuregulin 2 isoform 6 (SEQ ID NO: 3) and appropriate fragments thereof, wherein appropriate fragments are those that bind to the SEQ ID NO: 1 and have suitable growth stimulatory activity.

The present invention also provides methods for identifying compounds that downregulate MUC1/ECD expression. The method comprises: (a) providing a population of MUC1-expressing cancer cells; (b) contacting said population of MUC1-expressing cancer cells with a test compound; (c) utilizing an anti-MUC1/ECD antibody to identify polypeptides comprising MUC1/ECD in the MUC1-expressing cancer cells; and (d) determining whether the expression of polypeptides comprising MUC1/ECD is decreased in comparison to controls wherein the test compound was excluded.

The present invention also encompasses pharmaceutical compositions comprising compounds identified by the foregoing methods and a pharmaceutically acceptable carrier.

30

WO 02/22685

PCT/US01/28548

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

FIG. 1: Effect of anti-MUC1-P1 antibody on proliferation of ZR-75-1 breast carcinoma cells.

FIG. 2: Effect of anti-MUC1-P1 antibody on proliferation of SW480 cells stably expressing an empty vector (SW480/V) or MUC1 (SW480/MUC1).

FIG. 3: Effect of ZR-75-1 conditioned medium on proliferation of SW480 cells stably expressing an empty vector (SW480/V) or MUC1 (SW480/MUC1).

FIG. 4: Effect of MUC1 on H₂O₂ and taxol-induced apoptosis in HeLa cells stably expressing an empty vector (HeLa/V) or MUC1 (HeLa/Muc1). The results are expressed as the percentage apoptosis (mean±SE) of three separate experiments.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**I. Polypeptides**

The polypeptides of the present invention can be created by synthetic techniques or recombinant techniques which employ genomic or cDNA cloning methods.

Polypeptides can be routinely synthesized using solid phase or solution phase peptide synthesis. Methods of preparing relatively short polypeptides peptides, such as P0 (SEQ ID NO: 9), P1 (SEQ ID NO: 4), P2 (SEQ ID NO: 6) and P3 (SEQ ID NO: 7), by chemical synthesis are well known in the art. Such polypeptides could, for example be produced by solid-phase peptide synthesis techniques using commercially available equipment and reagents such as those available from Milligen (Bedford, Mass.) or Applied Biosystems-Perkin Elmer (Foster City, CA). Alternatively, segments of such polypeptides could be prepared by solid-phase synthesis and linked together using segment condensation methods such as those described by Dawson *et al.*, (1994). During chemical synthesis of such polypeptides, substitution of any amino acid is achieved simply by replacement of the residue that is to be substituted with a different amino acid monomer.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

Wild-type MUC1/ECD ligand polypeptides can be identified as exemplified in Example 3 herein. Recombinant MUC1/ECD ligands can then be prepared by methods known in the art.

The polypeptides of the present invention include variant polypeptides. By "variant" polypeptide is intended a polypeptide sequence modified by deletion or addition of one or more amino acids at one or more sites in the sequence; or substitution of one or more amino acids at one or more sites within the sequence. Variant polypeptides encompassed by the present invention retain the desired biological activity of the polypeptide from which they are derived. Such variants will have at least 40%, 50%, 60%, 70%, generally at least 75%, 80%, 85%, preferably about 90% to 95% or more, and more preferably about 98% or more sequence identity to the amino acid sequence of the polypeptide from which they are derived. The percentage of sequence identity, also termed homology, between a polypeptide native and a variant sequence may be determined by comparing the two sequences using the Gap program (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wisconsin), which uses the algorithm of Smith and Waterman, (1981).

The polypeptides of the present invention also include variant polypeptides with one or more conservative substitutions. For the purposes of classifying amino acid substitutions as conservative, amino acids are grouped as follows: Group I (hydrophobic sidechains): norleucine, met, ala, val, leu, ile; Group II (neutral hydrophilic side chains): cys, ser, thr; Group III (acidic side chains): asp, glu; Group IV (basic side chains): asn, gin, his, lys, arg; Group V (residues influencing chain orientation): gly, pro; and Group VI (aromatic side chains): trp, tyr, phe. Conservative substitutions involve substitutions between amino acids in the same class.

Also encompassed by the present invention are chemical derivatives of polypeptides. "Chemical derivative" refers to a subject polypeptide having one or more residues chemically derivatized by reaction of a functional side group. Such derivatized residues include, for example, those molecules in which free amino groups have been derivatized to form amine hydrochlorides, *p*-toluene sulfonyl groups, carbobenzoxy

WO 02/22685

PCT/US01/28548

groups, *t*-butyloxycarbonyl groups, chloroacetyl groups or formyl groups. Free carboxyl groups may be derivatized to form salts, methyl and ethyl esters or other types of esters or hydrazides. Free hydroxyl groups may be derivatized to form O-acyl or O-alkyl derivatives. The imidazole group of histidine may be derivatized to form N-imbenzylhistidine.

The term "polypeptide" as used herein indicates a molecular chain of amino acids and does not refer to a specific length of the product.

II. Antibodies

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers monoclonal antibodies (including full length monoclonal antibodies), polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g., bispecific antibodies), and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity.

Methods for generating polyclonal antibodies are well known in the art. Briefly, a polyclonal antibody is prepared by immunizing an animal with an antigenic composition and collecting antisera from that immunized animal. A wide range of animal species can be used for the production of antisera including rabbit, mouse, rat, hamster, guinea pig and goat.

As is well known in the art, a given composition may vary in its immunogenicity. It is often necessary therefore to boost the host immune system, as may be achieved by coupling a polypeptide immunogen to a carrier. Exemplary and preferred carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA). Other albumins such as ovalbumin, mouse serum albumin or rabbit serum albumin can also be used as carriers. Means for conjugating a polypeptide to a carrier protein are well known in the art and include glutaraldehyde, *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimide ester, carbodiimide and bis-biotinized benzidine. As is also well known in the art, the immunogenicity of a particular immunogen composition can be enhanced by the use of non-specific stimulators of the immune response, known as adjuvants. Exemplary and preferred adjuvants include complete Freund's adjuvant (a non-specific stimulator of the

WO 02/22685

PCT/US01/28548

immune response containing killed *Mycobacterium tuberculosis*), incomplete Freund's adjuvants and aluminum hydroxide adjuvant.

The serum for an immunized animal may be used as is for various applications or the desired antibody fraction may be purified by well-known methods, such as affinity chromatography using another antibody or a peptide bound to a solid matrix.

Monoclonal antibodies (MAbs) may be readily prepared through use of well-known techniques, such as those exemplified in U.S. Patent 4,196,265, incorporated herein by reference. Typically, this technique involves immunizing a suitable animal with a selected immunogen composition, e.g., a purified or partially purified expressed polypeptide. The immunizing composition is administered in a manner that effectively stimulates antibody producing cells.

The methods for generating monoclonal antibodies (MAbs) generally begin along the same lines as those for preparing polyclonal antibodies. The use of rats may provide certain advantages (Goding, 1986), but mice are preferred, with the BALB/c mouse being the most routinely used and generally gives a higher percentage of stable fusions.

Following immunization, somatic cells with the potential for producing antibodies, specifically B lymphocytes (B cells), are selected for use in the MAb generating protocol. These cells may be obtained from biopsied spleens, tonsils or lymph nodes, or from a peripheral blood sample. Spleen cells and peripheral blood cells are preferred. Often, a panel of animals will have been immunized and the spleen of animal with the highest antibody titer will be removed and obtaining lymphocytes from the spleen.

The antibody-producing B lymphocytes from the immunized animal are then fused with cells of an immortal myeloma cell, generally one of the same species as the animal that was immunized. Myeloma cell lines suited for use in hybridoma-producing fusion procedures preferably are non-antibody-producing, have high fusion efficiency, and have enzyme deficiencies that render them incapable of growing in certain selective media that support the growth of only the desired fused cells (hybridomas). Selected hybridomas are serially diluted and cloned into individual antibody-producing cell lines, which can then be propagated indefinitely to provide MAbs.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

In accordance with the present invention, fragments of the monoclonal antibody of the invention can be obtained from the monoclonal antibody produced as described above, by methods which include digestion with enzymes such as pepsin or papain and/or cleavage of disulfide bonds by chemical reduction. Alternatively, monoclonal antibody fragments encompassed by the present invention can be synthesized using an automated synthesizer, or by expression of full-length gene or of gene fragments in *E. coli* or other recombinant microorganisms and cell lines.

The present invention also encompasses various antibody conjugates. Conjugates with fluorescein markers are prepared by methods known in the art, such as conjugation in the presence of coupling agents or by reaction with an isothiocyanate. Conjugates with metal chelates are similarly produced. Other moieties to which antibodies may be conjugated include radionuclides such as ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ²¹²Bi, ²¹¹At, ¹⁸⁸Re, ¹⁰⁹Pd, ⁴⁷Sc, ²¹²Pb, and ¹⁵³Sm and the like, as described in Gansow, 1991, which is herein incorporated by reference.

Monoclonal antibodies of the invention can also be coupled to conventional chemotherapeutic agents such as an antimetabolite, an anthracycline, a vinca alkaloid, an antibiotic or an alkylating agent. Drugs that may be coupled to the antibodies for targeting include compounds such as doxorubicin, cyclophosphamide, cisplatin, adriamycin, estramustine, fluorouracil, ethinyl estradiol, mitoxantrone, methotrexate, finasteride, taxol, and megestrol. Methods of coupling may be direct via covalent bonds, or indirect via linking molecules, and will generally be known in the art for the particular drug selected and are made using a variety of bifunctional protein coupling agents. Examples of such reagents are SPDP, IT, bifunctional derivatives of imidoesters such as dimethyl adipimidate HCl, active esters such as disuccinimidyl suberate, aldehydes such as glutaraldehyde, bisazido compounds such as bis-(R-azidobenzoyl) hexanediamine, bisdiazonium derivatives such as bis-(R-diazoniumbenzoyl)ethylenediamine, diisocyanates such as tolylene 2,6-diisocyanate, and bis-active fluorine compounds such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. (*See, e.g., Thorpe et al., 1982, herein incorporated by reference.*)

WO 02/22685

PCT/US01/28548

The antibodies of the present invention may also be conjugated with various toxin molecules or an effector such as IgG1 immunoglobulin, which induces cytolytic or cytotoxic immune response. Thus, the two components may be chemically bonded together by any of a variety of well-known chemical procedures. For example, the linkage
5 may be by way of heterobifunctional cross-linkers, e.g. SPDP, carbodiimide, glutaraldehyde, or the like. The toxin molecules may also be fused to the antibody or binding regions thereof by recombinant means, such as through the production of single chain antibodies. The genes encoding protein chains may be cloned in cDNA or in genomic form by any cloning procedure known to those skilled in the art (*see e.g.*,
10 Sambrook *et al.*, 1989). The recombinant production of various immunotoxins is well-known within the art and can be found, for example in Thorpe *et al.*, 1982(a), Waldmann, 1991, and Pastan *et al.*, 1992, all herein incorporated by reference. A variety of toxin molecules are suitable for use as the cytotoxic domain in the antibody conjugates or fusion proteins described here. Any toxin known to be useful as the toxic component of
15 an immunotoxin may be used, preferably a protein toxin that may be recombinantly expressed. Particularly useful as the cytotoxic domain are bacterial toxins such as Pseudomonas exotoxin A (PE), diphtheria toxin, shiga toxin and shiga-like toxin, and ribosome inactivating toxins derived from plants and fungi, including ricin, α -sarcin, restrictotocin, mitogellin, tricanthosin, saporin-G, saporin-I, momordin, gelonin,
20 pokeweed antiviral protein, abrin, modeccin and others described in Genetically Engineered Toxins, ed. A. Frankel, Marcel Dekker, Inc., 1992, herein incorporated by reference, and any recombinant derivatives of those proteins (*see* Olsnes 1981; U.S. Pat. No. 4,675,382; and U.S. Pat. No. 4,894,443, herein incorporated by reference).

The antibody may also be a bispecific antibody which recognizes both the
25 MUC1/EC2 and an antigen which promotes the release of a cytokine such as IL-1, TNF alpha and CD16, CD2, CD3 L.C. CD28, which in turn, will activate the release of IFN gamma or TNF alpha, respectively.

The MAb's of the present invention encompass chimeric Mabs, including,
"humanized" forms of non-human (e.g., murine) Mabs. Humanized Mabs are chimeric
30 antibodies which contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues which are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the framework regions are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. (see Jones *et al.*, 1986; Riechmann *et al.*, 1988; and Presta, 1992). Fully human MAbs are preferred in the therapeutic methods of the present invention.

"Single-chain FV" or "sFv" antibody fragments of the present invention comprise the VH and VL domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Generally, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the VH and VL domains which enables the sFv to form the desired structure for antigen binding (see Pluckthun, 1994).

III. Screening and Diagnostic Assays

The present invention provides for methods for identifying compounds that inhibit the binding of various ligands to MUC1/ECD. The binding ligands include neuregulin 2 isoform 5 (SEQ ID NO: 2), neuregulin 2 isoform 6 (SEQ ID NO: 3) and fragments of either isoform that bind to MUC1/ECD and, in a preferred embodiment, an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO: 4.

In one embodiment, the screening method utilizes an *in vitro* competitive binding assay, wherein the capacity of a test compound to inhibit the binding of the

WO 02/22685

PCT/US01/28548

10 aforementioned ligands to a polypeptide comprising SEQ ID NO.1 or SEQ ID NO: 5 is assessed. In such an assay, the polypeptide comprising MUC1/ECD derived sequences SEQ ID NO.1 or SEQ ID NO: 5 may be conjugated to another protein or produced as a fusion protein, *e.g.*, the GST-MUC1/ECD fusion protein exemplified herein in Example 3. Other suitable conjugates and fusion proteins may be made by one of skill in the art utilizing procedures known in the art. The polypeptides or MUC1/ECD ligands may be labeled with a radioisotope or fluorescent label (*e.g.*, phycobiliproteins, such as phycoerythrin and allophycocyanins, fluorescein and Texas red). Alternatively an enzyme, such as peroxidase, may be used and conjugated either directly or indirectly via a biotin and avidin or streptavidin system. Decreased binding upon introduction of a test compound is indicative of competitive binding.

15 A compound that inhibits the binding of ligands to MUC1/ECD may be a modulator, that is an antagonist or agonist of the biological activity initiated by MUC1/ECD binding by neregulin 2 isoforms 5 or 6. *E.g.*, the antibody raised to polypeptide P1 (SEQ ID. NO 4) is expected to inhibit binding of the wild-type ligands but acts as an agonist for the MUC1/ECD binding site, *i.e.*, it stimulates proliferation of carcinoma cells. In contrast, appropriate compounds, such as the MUC1/ECD polypeptide SEQ ID NO. 1, will bind to the endogenous wild-type ligands thereby preventing binding to MUC1/ECD and consequently acting as an antagonist, *i.e.*, preventing or decreasing the proliferation of carcinoma cells that would be otherwise observed upon binding of the MUC1/ECD ligands.

20 An alternative screening assay can discriminate between MUC1/ECD binding inhibitors that exhibit antagonist and agonist activity in regard to the proliferation of MUC1-expressing cancer cells. The method requires a population of MUC1-positive cancer cells, preferably human cancer cells. This could be a population of cells that constitutively expresses MUC1, but the population is preferably of a cell type engineered to express MUC1. The latter are more versatile in regard to providing cells for appropriate controls, *e.g.* cells engineered with an empty vector, and also for enabling the construction of cells expressing MUC1 mutants. Examples of engineered MUC1 cancer cells include, but are not limited to, SW480 and HCT116 colon cancer cells as

WO 02/22685

PCT/US01/28548

exemplified in Examples 2 and 4 herein. Inhibition of MUC1/ECD ligand-induced cell proliferation will indicate a test compound with antagonist activity. Controls may comprise incubation of cancer cells engineered with an empty vector (*i.e.* MUC1-negative) or incubation of MUC1-positive cells in the absence of either the test compound or the MUC1/ECD ligand. One of the latter controls will identify agonists, *i.e.*, stimulation of cancer cell proliferation observed in incubations in which the test compound is present and the MUC1/ECD ligand is absent. Specificity of the agonist activity is established by use of engineered MUC1-negative cells.

Yet another screening assay monitors MUC1/ECD ligand induced phosphorylation of the intracellular domain of MUC1. Alternate screening methodologies employ monitoring of MUC1/ECD ligand induced association of MUC1 with EGF-R, s-Src, β -catenin, GSK3 β or p120. Methods for monitoring such phosphorylation and protein associations are described in Li *et al.*, (1998), Li *et al.*, (2001), Li *et al.*, (2001(a)) and Li & Kufe, (2001), all herein incorporated by reference.

The present invention also provides for methods for identifying compounds that downregulate the expression of MUC1/ECD. In some embodiments of the invention, labeled antibodies to MUC1/ECD are utilized to visualize the expression of MUC1/ECD in appropriate cell lines by flow cytometry or by immunohistochemistry, using methods known in the art. Alternatively, the expression of MUC1 can be estimated by immunoblotting or by probing total cellular RNA with labeled DNA probes, *e.g.*, as described in Example 7 herein.

Estimation of the expression of MUC1/ECD can also be used for diagnostic methodologies, wherein antibodies to MUC1/ECD are utilized to investigate the expression of MUC1/ECD on or in cells derived from a subject. Such antibodies can also be utilized for imaging of cancer cells within a subject. Imaging is performed by labeling the anti-MUC1/ECD antibody, *e.g.*, with a radiolabel, and injecting the antibody to a subject and monitoring the location of the antibody within the body of said subject.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

IV. Combination with Chemotherapeutic Agents

The present invention encompasses the use of the MUC1/ECD antagonists in combination with chemotherapeutic agents. While not being limited by any particular theory, MUC1 inhibits the apoptotic response to genotoxic stress induced by certain chemotherapeutic agents, and thereby induces resistance to such agents. MUC1/ECD antagonists may be used to mitigate this MUC1 mediated response to chemotherapeutic agents, thereby enhancing the effectiveness of such agents. In this regard, MUC1/ECD antagonists will be useful for the treatment cancer cells resistant to chemotherapeutic agents, including residual cancers remaining or reoccurring after cancer chemotherapy.

10 The foregoing rationale also pertains to the combination of MUC1/ECD antagonists and ionizing radiation.

The chemotherapeutic agents useful in the methods of the invention include the full spectrum of compositions and compounds which are known to be active in killing and/or inhibiting the growth of cancer cells. The chemotherapeutic agents, grouped by mechanism of action include DNA-interactive agents, antimetabolites, tubulin interactive agents, anti-hormonals, anti-virals, ODC inhibitors and other cytotoxics such as hydroxy-urea. Any of these agents are suitable for use in the methods of the present invention.

DNA-interactive agents include the alkylating agents, *e.g.*, cisplatin, cyclophosphamide, altretamine; the DNA strand-breakage agents, such as bleomycin; the intercalating topoisomerase II inhibitors, *e.g.*, dactinomycin and doxorubicin; the nonintercalating topoisomerase II inhibitors such as, etoposide and teniposide; and the DNA minor groove binder plicamycin.

The alkylating agents form covalent chemical adducts with cellular DNA, RNA and protein molecules and with smaller amino acids, glutathione and similar chemicals. Generally, these alkylating agents react with a nucleophilic atom in a cellular constituent, such as an amino, carboxyl, phosphate, sulfhydryl group in nucleic acids, proteins, amino acids, or glutathione. The mechanism and the role of these alkylating agents in cancer therapy is not well understood. Typical alkylating agents include: nitrogen mustards, such as chlorambucil, cyclophosphamide, ifosfamide, mechlorethamine, melphalan, uracil mustard; aziridine such as thiotepa; methanesulphonate esters such as busulfan;

WO 02/22685

PCT/US01/28548

nitroso ureas, such as carmustine, lomustine, streptozocin; platinum complexes such as cisplatin, carboplatin; bioreductive alkylators, such as mitomycin and procarbazine, dacarbazine and altretamine; DNA strand-breaking agents including bleomycin.

Topoisomerases are ubiquitous cellular enzymes which initiate transient DNA strand breaks during replication to allow for free rotation of the strands. The functionality of these enzymes is critical to the replication process of DNA. Without them, the torsional strain in the DNA helix prohibits free rotation, the DNA strands are unable to separate properly, and the cell eventually dies without dividing. Topo I links to the 3'-terminus of a DNA single strand break, while Topo II links to the 5'-terminus of a double strand DNA break. DNA topoisomerase II inhibitors include the following: intercalators such as amsacrine, dactinomycin, daunorubicin, doxorubicin, idarubicin and mitoxantrone; nonintercalators such as etoposide and teniposide; camptothecins including irinotecan (CPT-II) and topotecan. A representative DNA minor groove binder is plicamycin.

The antimetabolites generally exert cytotoxic activity by interfering with the production of nucleic acids by one or the other of two major mechanisms. Some of the drugs inhibit production of the deoxyribonucleoside triphosphates that are the immediate precursors of DNA synthesis, thus inhibiting DNA replication. Some of the compounds are sufficiently like purines or pyrimidines to be able to substitute for them in the anabolic nucleotide pathways. These analogs can then be substituted into the DNA and RNA instead of their normal counterparts. The antimetabolites useful herein include: folate antagonists such as methotrexate and trimetrexate; pyrimidine antagonists such as fluorouracil, fluorodeoxyuridine, azacitidine, cytarabine, and floxuridine; purine antagonists include mercaptopurine, 6-thioguanine, fludarabine, pentostatin; sugar modified analogs include cytarabine, fludarabine; ribonucleotide reductase inhibitors include hydroxyurea.

Tubulin interactive agents interfere with cell division by binding to specific sites on Tubulin, a protein that polymerizes to form cellular microtubules. Microtubules are critical cell structure units. When the interactive agents bind on the protein, the cell

WO 02/22685

PCT/US01/28548

cannot properly form microtubules. Tubulin interactive agents include vincristine and vinblastine, both alkaloids and the taxanes (paclitaxel and docetaxel).

Although their mechanisms of action are different, both taxanes and vinca
alkaloids exert their biological effects on the cell microtubules. Taxanes act to promote
5 the polymerization of tubulin, a protein subunit of spindle microtubules. The end result is
the inhibition of depolymerization of the microtubules, which causes the formation of
stable and nonfunctional microtubules. This disrupts the dynamic equilibrium within the
microtubule system, and arrests the cell cycle in the late G₂ and M phases, which inhibits
cell replication.

10 Like taxanes, vinca alkaloids also act to affect the microtubule system within the
cells. In contrast to taxanes, vinca alkaloids bind to tubulin and inhibit or prevent the
polymerization of tubulin subunits into microtubules. Vinca alkaloids also induce the
depolymerization of microtubules, which inhibits microtubule assembly and mediates
cellular metaphase arrest. Vinca alkaloids also exert effects on nucleic acid and protein
15 synthesis; amino acid, cyclic AMP, and glutathione synthesis; cellular respiration; and
exert immunosuppressive activity at higher concentrations.

Antihormonal agents exert cytotoxic activity by blocking hormone action at the
end-receptor organ. Several different types of neoplasm require hormonal stimulation to
propagate cell reproduction. The antihormonal agents, by blocking hormone action,
20 deprive the neoplastic cells of a necessary stimulus to reproduce. As the cells reach the
end of their life cycle, they die normally, without dividing and producing additional
malignant cells. Antihormonal agents are typically derived from natural sources and
include: estrogens, conjugated estrogens and ethinyl estradiol and diethylstilbestrol,
chlortrianisen and idenestrol; progestins such as hydroxyprogesterone caproate,
25 medroxyprogesterone, and megestrol; androgens such as testosterone, testosterone
propionate; fluoxymesterone, methyltestosterone.

Adrenal corticosteroids are derived from natural adrenal cortisol or
hydrocortisone. They are used because of their anti-inflammatory benefits as well as the
ability of some to inhibit mitotic divisions and to halt DNA synthesis. these compounds
30 include prednisone, dexamethasone, methylprednisolone, and prednisolone.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

Leutinizing-releasing hormone agents or gonadotropin-releasing hormone antagonists are used primarily in the treatment of prostate cancer. These include leuprolide acetate and goserelin acetate. They prevent the biosynthesis of steroids in the testes.

Anti-hormonal agents include antiestrogenic agents such as tamoxifen, antiandrogen agents such as flutamide, and antiadrenal agents such as mitotane and aminoglutethimide.

ODC (or ornithine decarboxylase) inhibitors inhibit cancerous and pre-cancerous cell proliferation by depleting or otherwise interfering with the activity of ODC, the rate limiting enzyme of polyamine biosynthesis important to neoplastic cell growth. In particular, polyamine biosynthesis wherein ornithine is converted to the polyamine, putrescine, with putrescine being subsequently converted to spermidine and spermine appears to be an essential biochemical event in the proliferation of neoplastic growth in a variety of cancers and cancer cell lines and the inhibition of ODC activity or depletion of ODC in such neoplastic cells has been shown to reduce polyamine levels in such cells leading to cell growth arrest; more differentiated cell morphology and even cellular senescence and death. In this regard, ODC or polyamine synthesis inhibitors are considered to be more cytotoxic agents functioning to prevent cancer reoccurrence or the conversion of pre-cancerous cells to cancerous cells than cytotoxic or cell killing agents. A suitable ODC inhibitor is eflornithine or α -difluoromethyl-ornithine, an orally available, irreversible ODC inhibitor, as well as a variety of polyamine analogs which are in various stages of pre-clinical and clinical research.

Other cytotoxics include agents which interfere or block various cellular processes essential for maintenance of cellular functions or cell mitosis as well as agents which promote apoptosis. In this regard, hydroxyurea appears to act via inhibitors of the enzyme ribonucleotide reductase whereas asparaginase enzymatically converts asparagine into non-functional aspartic acid thereby blocking protein synthesis in a tumor.

Compositions of the MUC1/ECD antagonists of present invention can also be used in combination with antibodies to HER-2, such as Trastuzumab (Herceptin (H)). In addition, the present invention also encompasses the use of MUC1 domain antagonists in combination with epidermal growth factor receptor-interactive agents such as tyrosine

WO 02/22685

PCT/US01/28548

kinase inhibitors. Tyrosine kinase inhibitors suitably include imatinib (Norvartis), OSI-774 (OSI Pharmaceuticals), ZD-1839 (AstraZeneca), SU-101 (Sugen) and CP-701 (Cephalon).

- 5 When used in the treatment methods of the present invention, it is contemplated that the chemotherapeutic agent of choice can be conveniently used in any formulation which is currently commercially available, and at dosages which fall below or within the approved label usage for single agent use.

V. Ionizing Radiation

- 10 In the present invention, the term "ionizing radiation" means radiation comprising particles or photons that have sufficient energy or can produce sufficient energy *via* nuclear interactions to produce ionization (gain or loss of electrons). An exemplary and preferred ionizing radiation is an x-radiation. Means for delivering x-radiation to a target tissue or cell are well known in the art. The amount of ionizing radiation needed in a
15 given cell generally depends on the nature of that cell. Means for determining an effective amount of radiation are well known in the art. Used herein, the term "an effective dose" of ionizing radiation means a dose of ionizing radiation that produces cell damage or death when given in conjunction with the MUC1/ECD antagonists of the present invention, optionally further combined with a chemotherapeutic agent.

- 20 Dosage ranges for x-rays range from daily doses of 50 to 200 roentgens for prolonged periods of time (3 to 4 weeks), to single doses of 2000 to 6000 roentgens. Dosage ranges for radioisotopes vary widely, and depend on the half-life of the isotope, the strength and type of radiation emitted, and the uptake by the neoplastic cells.

- Any suitable means for delivering radiation to a tissue may be employed in the
25 present invention, in addition to external means. For example, radiation may be delivered by first providing a radiolabeled antibody that immunoreacts with an antigen of the tumor, followed by delivering an effective amount of the radiolabeled antibody to the tumor. In addition, radioisotopes may be used to deliver ionizing radiation to a tissue or cell.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

VI. Downregulation of MUC1/ECD Expression

The present invention also encompass compounds that downregulate MUC1/ECD expression. One such compound is the isocoumarin NM-3 (2-(8-hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1 *H*-2-benzopyran-3-yl) propionic acid). NM-3 and other isocoumarins suitable to downregulate the expression of MUC1/ECD are disclosed in U.S. patent No. 6,020,363, the entirety of which is herein incorporated by reference. Other suitable compounds include 2-substituted estradiol compounds such as 2-methoxyestradiol and 2-hydroxyestradiol. These and other suitable estradiol derivatives are disclosed in U.S. Patent No. 6,239,123, the entirety of which is herein incorporated by reference. Other compounds suitable for downregulating MUC1/ECD expression include antisense oligonucleotides that target nucleic acid molecules encoding MUC1, as described below.

VII. Antisense Oligonucleotides

The present invention also employs antisense compounds, particularly oligonucleotides, for use in modulating the function of nucleic acid molecules encoding MUC1 and MUC1/ECD wild-type ligands, such as neuregulin 2 isoforms 5 and 6. Inhibition of MUC1 expression will decrease the levels of MUC1/ECD available for binding to MUC1/ECD ligands. Inhibition of the expression of the endogenous ligands of MUC1/ECD will prevent or decrease the proliferative effect on cancer cells associated with the binding of such ligands to MUC1/ECD. Antisense methodology takes advantage of the fact that nucleic acids tend to pair with "complementary sequences." By complementary, it is meant that polynucleotides are those capable of base-pairing according to the standard Watson-Crick complementary rules. The oligonucleotides of the present invention may be targeted wholly or in part to informational sequences, *i.e.*, those coding for a protein, and other associated ribonucleotides such 5'-untranslated regions, 3'-untranslated regions, 5' cap regions and intron/exon junctions. Thus, the invention provides oligonucleotides which specifically hybridize with nucleic acids, preferably mRNA, encoding MUC1 and/or MUC1/ECD wild-type ligands such as neuregulin 2 isoforms 5 and 6. The overall effect of interference with mRNA is modulation of expression of neuregulin isoforms 5 and/or 6. Such modulation can be

WO 02/22685

PCT/US01/28548

measured in ways that are routine in the art. In addition, effects on cancer cell proliferation or tumor growth can be assessed.

It is understood that an oligonucleotide need not be 100% complementary to its target nucleic acid sequence to be specifically hybridizable. An oligonucleotide is specifically hybridizable when binding of the oligonucleotide to the target interferes with the normal function of the target molecule to cause a loss of utility, and there is a sufficient degree of complementarity to avoid non-specific binding of the oligonucleotide to non-target sequences under conditions in which specific binding is desired, i.e., under physiological conditions in the case of in vivo assays or therapeutic treatment.

The antisense compounds in accordance with this invention preferably comprise from about 4 to about 50 nucleobases. Particularly preferred are antisense oligonucleotides comprising from about 8 to about 30 linked nucleobases. The oligonucleotides used in accordance with this invention may be conveniently and routinely made through the well-known technique of solid phase synthesis. In the context of this invention, the term "oligonucleotide" refers to an oligomer or polymer of ribonucleic acid or deoxyribonucleic acid. This term includes oligonucleotides composed of naturally-occurring nucleobases, sugars and covalent intersugar (backbone) linkages as well as oligonucleotides having non-naturally-occurring portions which function similarly. Such modified or substituted oligonucleotides are often preferred over native forms because of desirable properties such as, for example, enhanced cellular uptake, enhanced binding to target and increased stability in the presence of nucleases. Examples of some preferred modified oligonucleotides include those containing phosphorothioates, phosphotriesters, methyl phosphonates, short chain alkyl or cycloalkyl intersugar linkages or short chain heteroatomic or heterocyclic intersugar linkages.

Another additional or alternative modification of the oligonucleotides of the present invention involves chemically linking to the oligonucleotide one or more lipophilic moieties which enhance the cellular uptake of the oligonucleotide. Such lipophilic moieties may be linked to an oligonucleotide at several different positions on the oligonucleotide. Some preferred positions include the 3' position of the sugar of the 3' terminal nucleotide, the 5' position of the sugar of the 5' terminal nucleotide, and the 2'

WO 02/22685

PCT/US01/28548

position of the sugar of any nucleotide. The antisense compounds of the present invention also include bioequivalent compounds, including pharmaceutically acceptable salts and prodrugs.

The terms "specifically hybridizable" and "complementary" are used to indicate a degree of complementarity sufficient to result in stable and specific binding between the antisense oligonucleotide and the target nucleic acid sequence. An oligonucleotide need not be 100% complementary to its target nucleic acid sequence to be specifically hybridizable. An oligonucleotide considered "specifically hybridizable" when binding of the oligonucleotide to the target interferes with the normal function of the target molecule to cause a loss of utility and decrease in expression of the product protein, and there is a sufficient degree of complementarity to avoid non-specific binding of the oligonucleotide to non-target sequences.

The neuregulin 2 protein family comprises a number of alternatively spliced isoforms (Ring *et al.*, 1999). The coding sequences for neuregulin 2 isoforms 5 and 6 share the same nucleotide sequence from exons 1 through 6 of the neuregulin 2 gene that code for the first 416 amino acids of each protein but differ in the sequence coding for the carboxy terminal 10 amino acids of isoform 5 and for the carboxy terminal 6 amino acids of isoform 6. The coding DNA sequences of exons 1 through 6 are incorporated in SEQ ID NO: 10 through SEQ ID NO: 15 respectively. The sequences coding for the first 416 amino acids of isoforms 5 and 6 are nucleotides 313 through 1012 of SEQ ID NO 10, nucleotides 51-222 of SEQ ID NO: 11, nucleotides 230-348 of SEQ ID NO: 12, nucleotides 100 through 220 of SEQ ID NO: 13, nucleotides 111 through 187 of SEQ ID NO: 14 and nucleotides 123 through 181 of SEQ ID NO: 15. The sequences coding for the carboxy terminals of isoform 5 and isoform 6 are nucleotides 132 through 164 of SEQ ID NO: 16 and nucleotides 30 through 50 of SEQ ID NO: 17 respectively.

As SEQ ID NO: 16 and SEQ ID NO: 17 are apparently not shared by other neuregulin gene products, in a preferred embodiment, the antisense oligonucleotide comprises a sequence of at least 4 nucleotides that is complementary to a region between nucleotides 132 and 164 of SEQ ID NO: 16 or nucleotides 30 through 50 of SEQ ID NO: 17. In a more preferred embodiment, the antisense oligonucleotides comprises a

WO 02/22685

PCT/US01/28548

sequence of at least 8 nucleotides that is complementary to a region between nucleotides 132 and 164 of SEQ ID. NO: 16 or nucleotides 30 through 50 of SEQ ID NO: 17.

In other embodiments, the antisense oligonucleotide comprises a sequence of at least 4 nucleotides that is complementary to a region between nucleotides 313 through 1012 of SEQ ID. NO 10, or a region between nucleotides 51-222 of SEQ ID. NO: 11, or a region between nucleotides 230-348 of SEQ ID NO: 12, or a region between nucleotides 100 through 220 of SEQ ID. NO: 13, or a region between nucleotides 111 through 187 of SEQ ID. NO: 14, or a region between nucleotides 123 through 181 of SEQ ID. NO: 15. In another embodiment the antisense oligonucleotide is at least 8 nucleotides that is complementary to a region of the one the foregoing nucleotides sequences.

In other embodiments, the antisense oligonucleotide comprises a sequence of at least 4 nucleotides, and preferably a sequence of at least 8 nucleotides, that is complementary to a non-coding region of SED ID NOS: 10 through 17.

In other embodiments of the invention, MUC1 directed antisense oligonucleotides comprise a sequence of at least 4 nucleotides that is complementary to SEQ ID NO: 18. In preferred embodiments, the antisense oligonucleotides comprises a sequence of at least 8 nucleotides that is complementary to SEQ ID NO: 18

The present invention also encompasses expression vectors comprising an expression control system that directs production of a transcript of the foregoing antisense oligonucleotides. In addition, the present invention provides for methods of hybridization comprising providing one of the foregoing antisense oligonucleotides and contacting such oligonucleotide with a nucleic acid comprising the target sequence under conditions that permit hybridization of the oligonucleotide with the nucleic acid. Also included are methods of inhibiting translation of mRNA comprising providing one of the foregoing antisense oligonucleotides and providing a cell comprising mRNA comprising the target sequence and introducing the oligonucleotide into the cell, wherein the oligonucleotide inhibits translation of the mRNA in the cell.

Another aspect of the present invention provides for pharmaceutical compositions comprising an antisense oligonucleotide of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

VIII. Vaccines

The present invention also encompasses the use of MUC1/ECD peptides, *e.g.*, SEQ ID NO: 1 or fragments thereof, wherein such fragments comprise four or more consecutive amino acids of SEQ ID NO. 1, in a vaccine wherein the host mammal generates antibodies to the polypeptide which also act against the host's own MUC1/ECD. Vaccine preparation techniques are generally known in the art as described by Duffy (1980), and references cited therein, all of which are incorporated herein by reference.

The MUC1/ECD peptides may be conjugated to a carrier molecule such as a protein or Ficoll. The carrier protein is preferably one with a molecular weight of at least about 40,000 dalton and more preferably at least about 60,000 dalton. The vaccine formulation may comprise a pharmaceutically acceptable carrier and may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems and other systems known in the art. Since the peptides or conjugates may be broken down in the stomach, the vaccine is preferably administered parenterally (for instance, subcutaneous, intramuscular, intravenous, or intradermal injection). The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use.

IX. Formulations

The MUC1/ECD antagonists including binding inhibitors or oligonucleotides employed in the compositions and methods of the present invention can be formulated in a variety of conventional pharmaceutical formulations and administered to cancer patients, in need of treatment, by any one of the drug administration routes conventionally employed including oral, intravenous, intraarterial, parental or intraperitoneal.

For oral administration the compositions of the present invention may be formulated, for example, with an inert diluent or with an assimilable edible carrier, or enclosed in hard or soft shell gelatin capsules, or compressed into tablets, or incorporated

WO 02/22685

PCT/US01/28548

directly with the food of the diet. For oral therapeutic administration, the active compound may be incorporated with excipients and used in the form of ingestible tablets, buccal tablets, troches, capsules, elixirs, suspensions, syrups, wafers, and the like. Such compositions and preparations may, of course, be varied and may conveniently be
5 between about 2 to about 60% of the weight of the unit. The amount of active compounds in such therapeutically useful compositions is such that a suitable dosage will be obtained.

The tablets, troches, pills, capsules and the like may also contain the following: a binder, a gum tragacanth, acacia, cornstarch, or gelatin; excipients, such as dicalcium phosphate; a disintegrating agent, such as corn starch, potato starch, alginic acid and the
10 like; a lubricant, such as magnesium stearate; and a sweetening agent, such as sucrose, lactose or saccharin may be added or a flavoring agent, such as peppermint, oil of wintergreen, or cherry flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it may contain, in addition to materials of the above type, a liquid carrier. Various other materials may be
15 present as coatings or to otherwise modify the physical form of the dosage unit. For instance, tablets, pills, or capsules may be coated with shellac, sugar or both. A syrup or elixir may contain the active compounds sucrose as a sweetening agent methyl and propylparabens as preservatives, a dye and flavoring, such as cherry or orange flavor. Of course, any material used in preparing a dosage unit form should be pharmaceutically
20 pure and substantially non-toxic in the amounts employed. In addition, other chemotherapeutic compounds may be incorporated into sustained-release preparation and formulations.

In regard to formulations comprising oligonucleotides, colloidal dispersion systems may be used as delivery vehicles to enhance the *in vivo* stability of the
25 oligonucleotides and/or to target the oligonucleotides to a particular organ, tissue or cell type. Colloidal dispersion systems include, but are not limited to, macromolecule complexes, nanocapsules, microspheres, beads and lipid-based systems including oil-in-water emulsions, micelles, mixed micelles, liposomes and lipid:oligonucleotide complexes of uncharacterized structure.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

Pharmaceutical formulations of the compositions of the present invention which are suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that each syringability
5 exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms
10 can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and
15 gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the compositions of the present invention in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active
20 ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution
25 thereof.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any
30 conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the

WO 02/22685

PCT/US01/28548

therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the composition.

X. Treatment Methods

5 Tumors that can be suitably treated with the methods of the present invention include; but are not limited to, tumors of the brain (glioblastomas, medulloblastoma, astrocytoma, oligodendroglioma, ependymomas), lung, liver, spleen, kidney, lymph node, small intestine, pancreas, blood cells, colon, stomach, breast, endometrium, prostate, testicle, ovary, skin, head and neck, esophagus, bone marrow, blood and other tissue. The
10 tumor may be distinguished as metastatic and non-metastatic. Pre-malignant lesions may also be suitably treated with the methods of the present invention.

The treatment with the MUC1/ECD antagonists of the present invention may precede or follow irradiation and/or chemotherapy by intervals ranging from seconds to weeks and/or be administered concurrently with such treatments. In embodiments where
15 the MUC1/ECD antagonists and irradiation and/or chemotherapy are applied separately to the cell, steps should be taken to ensure that a significant period of time does not expire between the time of each delivery, such that the combination of the two or three treatments would still be able to exert an advantageously combined effect on the cell. In such instances, it is contemplated that one would contact the cell with the treatment
20 agents or modalities within amount 0.1 to 25 h of each other and, more preferably, within about 1 to 4 h of each other, with a delay time of only about 1 h to about 2 h being most preferred. In some situations, it is desirable to extend the time period of treatment significantly, however, where several days (2, 3, 4, 5, 6 or 7) or several weeks (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) lapse between the respective administrations. In any case, the invention
25 contemplates that the MUC1/ECD antagonists may be given before, after or even simultaneously with the ionizing radiation and/or chemotherapeutic agent.

Some chemotherapeutic agents transiently induce MUC1 expression on cancer cells 0.5 to 12 hours after contact of the carcinoma cells with the chemotherapeutic agents. Thus, in some embodiments the administration of MUC1/ECD binding
30 inhibitors, especially antibodies to the MUC/ECD sequence SEQ ID NO. 1, optionally

WO 02/22685

PCT/US01/28548

conjugated to a toxin or radionucleotide, is coordinated with the increased expression of MUC1 on the cancer cells. In other embodiments, agents other than chemotherapeutic agents may be used to increase MUC1 expression prior to treatment with a MUC1 binding inhibitor, especially antibodies to the MUC/ECD sequence SEQ ID NO. 1, optionally conjugated to a toxin or radionucleotide.

In the methods of the present invention, the actual dosage of MUC1/ECD antagonists employed will depend on a variety of factors including the type and severity of cancer being treated, and the additive or synergistic treatment effects of the MUC1/ECD antagonists and the other treatment modality or modalities selected.

10

EXAMPLES OF THE INVENTION

Example 1: Peptides

The MUC1/ECD polypeptide sequence, as typically found in MUC1-expressing cells, is provided by SEQ ID NO: 1. A number of polypeptide sequences have been synthesized by standard techniques. These include peptides P1 (SEQ ID NO: 2), P2 (SEQ ID NO: 5) and P3 (SEQ ID NO: 6), which are polypeptide fragments of MUC1/ECD. P1 (SEQ ID NO: 2) represents amino acids 5 through 20 of MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) with a cysteine added at the carboxy terminal. P2 (SEQ ID NO: 5) represents amino acids 13 through 28 of MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) with a cysteine added at the carboxy terminal. P3 (SEQ ID NO: 6) represents amino acids 27 through 44 of MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) with a cysteine at the carboxy terminal. In addition, the synthesized polypeptide sequence SEQ ID NO: 7 incorporates amino acids 6 through 24 of MUC1/ECD (SEQ ID NO: 1) with a cysteine added at the carboxy terminal. The synthesized polypeptide P0 (SEQ ID NO: 8) incorporates a 19 amino acid sequence occurring in the MUC1 protein occurring just prior to the amino terminus of MUC1/ECD and represents the a potential cleavage site. A cysteine was again added at the carboxy terminal of the sequence at it occurs in the MUC 1 sequence.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

Example 2: Anti-MUC1-P1 Antibody**A. Generation of Antibody**

The polypeptide P1 (SEQ. ID NO: 4), contains the QYK motif and other sequences homologous to ligand binding domains of cytokine receptors (Zrihan-Licht, *et al.*, 1994). A polyclonal antibody was raised in rabbits against polypeptide P1 (SEQ ID NO. 4) conjugated to KLH. Serum was prepared by standard methods.

Polyclonal antibodies were also raised against the polypeptide SEQ ID NO: 7, whereby the immunogen was formed by conjugating the polypeptide SEQ ID NO: 7 to KLH. Antibodies have been obtained from 2 rabbits, designated 3402-1 and 3402-2. Both serum and affinity purified antibody preparations have been prepared by standard methodologies.

B. Stimulation of Human Carcinoma Cells by Anti-MUC1-P1-Antibody

Human ZR-75-1 carcinoma cells were grown to 80% confluence in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS) and then passed onto a 6-well plate at 1×10^4 cells per well. After overnight starvation in medium containing 0.1% FBS, anti-MUC1-P1 antibody was added to each well at the amounts indicated in FIG. 1 and incubated for 48 hours. Cell numbers were quantified after another 3 days of incubation in the presence of 0.1 % FBS. As shown in FIG. 1, anti-MUC1-P1 stimulates the growth of ZR-75-1 cells in a dose dependent fashion.

To assess the specificity of anti-MUC1-P1 antibody stimulation, human MUC1-negative SW480 colon cancer cells were stably transfected to express empty vector (SW480/V) or MUC1 (SW480/MUC1). SW480 colon cancer cells were transfected with either pCMV-IE-ak1-dhfr vector or pCMV-IE-ak1-dhfr-MUC1 using lipofectamide (Ligtenburger *et al.*, 1992). Cells were grown in the presence of 800 $\mu\text{g/ml}$ G418 (neomycin) and serially diluted to single-cell populations. Single cell clones that express MUC1 (SW480/MUC1) were selected. Both SW480 cells types were grown to 80 % confluence in DMEM containing 10% FBS and plated onto 6-well plates at 5×10^4 cells per well. After overnight starvation in medium containing 0.1% FBS, anti-MUC1-P1 antibody was added at the indicated concentrations and incubated for 48 hr. Cell numbers were quantified after a further day of incubation (3 days total). As shown in FIG. 2, anti-

WO 02/22685

PCT/US01/28548

MUC1-P1 stimulates the growth of SW480/MUC1 cells but not SW48-0/V cells. These findings confirm that the anti-MUC1-P1 antibody stimulates the growth of human carcinoma cells by specifically interacting with MUC1.

5 Example 3: Endogenous MUC1 ECD Ligands

The finding that anti-MUC1-P1 stimulates growth of human carcinoma cells is suggestive of the potential existence of natural MUC1 ECD ligands. To investigate this potential, ZR-75-1 cells were screened as a possible source of MUC1 ligand(s). Conditioned medium was prepared by culturing ZR-75-1 cells in RPMI 1640 medium
10 containing 0.1% FBS for 72 hr and then preparing a supernatant. The conditioned medium was added to SW480/V and SW480/MUC1 cells that were growth arrested in DME containing 0.1% FBS as previously described. Conditioned medium was added at the concentration indicated in Fig. 3 and the cells were maintained for 3 days prior to quantification of cell numbers. As shown in FIG. 3, ZR-75-1 cells express a soluble
15 ligand that stimulates carcinoma cell growth by binding to MUC1.

To identify the soluble MUC1 ligand(s), a fusion protein comprising the MUC1/ECD (SEQ ID. No: 1) and glutathione S-transferase (GST) was prepared. GST was amplified by PCR using a set of primers as follows:

5'-ATTAGGCTAGCCTGGTTCGCGTGGTTCTATGTCCCCTATACTAGGTTA-3',
20 and 5'-CAAGGGGATCCCTACGGAACCAGATCCGATTTTGG-3', and inserted between the NheI and BamHI sites of pET-11d (the "pET-11d-GST vector"). MUC1/ECD was amplified by PCR using a set of primers as follows:
5'-TCTGGCCATGGGAGAAGTACCATCAAT-3', and
5'-AGCGCGCTAGCCCAGCCTGGCACCCCAGC-3', and inserted between the NcoI
25 and NheI sites of pET11d-GST vector (the "pET11d-GST-MUC1/ECD" vector).

The GST fusion protein was prepared by incubating logarithmically growing E. coli BL21(D3)pLysS cells transformed with pET11d-GST-MUC1/ECD or pET11d-GST with 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside for 6 hr at 25 °C. Cells were pelleted and resuspended in PBS containing 20 % sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.5 % NP-40, then
30 sonicated. Debris was removed by centrifugation at 10,000 x g for 30 min. at 4 °C. The

WO 02/22685

PCT/US01/28548

supernatant was applied to bulk glutathione sepharose 4B and incubated for 4 hr at 4 °C prior to washing and packing into a column. The fusion protein was eluted with 10 mM glutathione in 50 mM Tris-HCl, pH 9.5. The purified fusion protein was dialyzed with PBS.

- 5 Cytosolic fractions of cultured cells were prepared by harvesting ZR75-1 cells in PBS containing 40mM EDTA. After washing with PBS, cells were resuspended with ice-cold homogenized buffer (20 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA and protease inhibitors cocktail (Roche) and put on ice for 15 min. The suspension was homogenized with a Dounce
10 homogenizer. The homogenate was centrifuged at 1,00 x g for 5 min at 4 °C. The supernatant was collected as a cytosol fraction and stored at 0 °C.

- The GST-MUC1/ECD fusion protein (1.8 mg) was immobilized on 400 µl of glutathione-sepharose 4B, which was packed into a column and equilibrated with buffer A (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol). The
15 cytosolic fraction was first precleared by passing it through a glutathione-sepharose 4B column and was then loaded onto the GST-MUC1/ECD affinity column which was then washed twice with 2 x 10 ml of buffer A. The protein bound to the column was eluted by the addition of 2 ml of buffer B (buffer A containing 0.15 M NaCl), and fractions of 0.4 ml each were collected. The second and third fractions were mixed and loaded on
20 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). As a control, the GST protein (1.5 mg) was immobilized on 400 µl of glutathione-sepharose 4B and the experiment performed as described above. The results demonstrated that MUC1/ECD binds to a 45 kDa protein. A similar experiment was performed with lysates of human MCF-7 breast carcinoma cells confirmed the binding of MUC1/ECD with a 45 kDa
25 protein.

The 45 kDa from the GST-MUC1/ECD adsorbate was excised from the gel, dehydrated with acetonitrile, and then rehydrated with 100 mM ammonium bicarbonate. The gel pieces were then suspended in 12.5 ng/µl trypsin/50 mM ammonium bicarbonate. Digestion was carried out at 37 °C for 10-12 hr. The masses of the trypsin-digested

WO 02/22685

PCT/US01/28548

peptides were analyzed by matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectroscopy (MALDI-TOF-MS) using a Voyager DE-PRO (Perceptive Biosystem Inc., Framingham, MA). Two related proteins, designated ML-1 and ML-2, were identified by mass fingerprinting. The sequences of ML-1 (SEQ ID NO: 3) and ML-2 (SEQ ID NO: 4) are as those previously disclosed for two neuregulin isoforms, NRG2 splice isoform 5 and NRG2 splice isoform 6 respectively.

Example 4: MUC1 as an Oncogene

A. MUC1 supports growth in soft agar

The expression of MUC1 was shown to be functionally significant regarding the exhibition of the malignant phenotype. Cell lines that stably express MUC1 were generated. HCT116 colon cancer cells were transfected with pIRES-puro2 vector or pIRES-puro2-MUC1 by lipofectamine and selected for puromycin-resistance. Studies were performed with human MUC1-negative HCT116 colon cancer cells with single clones that stably express either the empty vector (VCT116/V) or MUC1 (HCT116/MUC1). The HCT 116/V and HCT116/MUC1 cells were assayed for anchorage-independent growth in soft agar. Cells (1×10^5 / 60 mm dish) were suspended in 0.33% agarose-containing DMEM medium supplemented with 10 % FBS and layered over an agarose plug (0.5 % agarose in DMEM supplemented with 10 % FBS). The cells were incubated to 4 weeks, during which time fresh medium was added to the plates every week. Colonies larger than 70 μ m in diameter were counted after 4 weeks. Expression of wild-type MUC1 was associated with a marked increase in the size and number of colonies compared to that obtained with HCT/116/V cells. These findings were confirmed by similar studies performed with SW480/V and SW480/MUC1 cells wherein MUC1 expression was again shown to support anchorage-independent growth of SW480 cells.

B. MUC1 supports human tumor formation in nude mice

To assess the effects of MUC1 on human tumor growth in vivo. Five to six week old athymic, Balbc/nu/nu mice (Taconic, Germantown, NY) were injected subcutaneously in the right flank with 1×10^6 HCT116/V or HCT 116/MUC1 cells.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

Tumors (4 mice/group) were measured twice a week. Tumor volumes were calculated by the following formula: $\frac{1}{2}(\text{length} \times \text{width}^2)$. Experiments were terminated when tumor volume exceeded 2 cm³. Measurements of tumor volume over time demonstrated little HCT116/V cell growth. By comparison there was a marked increase in the growth of

5 HCT116/MUC1 tumors.

Example 5: MUC1 Expression is Induced by Oxidative and Genotoxic Stress

To determine whether MUC1 is induced in response to oxidative stress, MCF-7 cells were treated with hydrogen peroxide. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-DF3/MUC1 antibody. Lysates were prepared by suspending MCF-7 cells in

10 lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 3 mM NaF, 1 mM sodium vanadate, 1mM DTT with protease inhibitors and either 1% NP-40 or 1% Brij-96) for 30 min. on ice. Lysates were cleared by centrifugation and equal amounts of proteins were resolved by SDS-PAGE. Proteins were then transferred to nitrocellulose filters, blocked by incubation in 5 % non-fat dry milk in PBS with 0.05 % Tween-20 and probed

15 with anti-MUC1 antibody (Pandey *et al.*, 1995). Anti-actin was used as a control. The results demonstrated that MUC1 is rapidly and transiently induced in response to oxidative stress while there was no effect of hydrogen peroxide on levels of actin expression.

Similar studies were performed with genotoxic agents. The results demonstrate

20 that treatment of MCF-7 cells with daunorubicin is associated with a rapid and transient induction of MUC1, and not actin, expression. The available evidence indicates that MUC1 is induced by diverse cytotoxic agents, including taxol, cisplatin and ionizing radiation.

Example 6: MUC1 Inhibits the Apoptotic Response to Oxidative and Genotoxic Stress

To determine whether MUC1 inhibits the apoptotic response to oxidative stress, HeLa cells stably expressing the empty vector or MUC1 were treated with 1 mM

30 hydrogen peroxide for 1 hr. DNA content was assessed by staining ethanol-fixed cells with propidium iodide and monitoring by FACScan (Beckton Dickerson). Numbers of

WO 02/22685

PCT/US01/28548

cells with sub-G1 DNA content were determined with a MODFIT LT program, (Verity Software House, Topsham, ME) (Yuan *et al.*, 1997). The cells were analyzed for induction of sub-G1 DNA by flow cytometry as a marker of apoptosis. As shown in FIG. 4, the results demonstrate that MUC1 inhibits the apoptotic response to oxidative stress.

5 The induction of apoptosis in cells treated with 0.01 mM taxol for 20 hr was assessed by measuring sub-G1 DNA content of HeLa cells expressing empty vector or MUC1. As shown in FIG. 4, as with oxidative stress, taxol-induced apoptosis was inhibited by MUC1 expression.

10 **Example 7: Effect of NM-3 on MUC1 Expression**

MCF-7 cells were treated with NM-3 (2-(8-hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1 *H*-2-benzopyran-3-yl) propionic acid) at 100-400 µg/ml for 48 hr. DF3 antigen levels were visualized by immunoblot analysis with DF3 MAbs (Kufe, U.S. Patent 5,506,343, herein incorporated by reference).

15 A decrease in the intracellular levels of DF3 antigen of NM-3 treated cells relative to non-treated cells was observed. Similar results were found in ZR-75-1 and BT-20 cell lines. The NM-3 mediated decrease of intracellular DF3 antigen was shown to be both dose- and time dependent. To determine whether NM-3 impaired the extracellular localization of the MUC1 DF3 antigen, the antigen levels in cell culture medium
20 supernatants and on MCF-7 cells after NM-3 treatment were investigated. The levels of DF3 antigen were reduced in both localizations. These findings suggest that NM-3 inhibits MUC1 protein expression.

Hybridization studies were performed to determine whether the effect of NM-3 on MUC1-expression was detectable at the transcriptional level. A ³²P-labelled DF3 DNA
25 probe hybridized to two transcripts of 4.5 and 7.0 kb in total cellular RNA after NM-3 treatment on MCF-7 cells for 48 hr. The levels of both mRNA were decreased relative to controls wherein MCF-7 cells were incubated in the absence of NM-3. The same results were observed using ZR-75-1 and BT-20 cell lines. These findings suggest that DF3 expression is regulated at the transcriptional level after NM-3 treatment on those cell
30 lines.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

To determine whether NM-3 inhibits the expression of cellular surface proteins as well, the level of epidermal growth factor receptor (EGF-R) expression after NM-3 treatment was tested on MCF-7, ZR-75-1 and BT-20 cell lines. Compared to controls wherein cells were incubated in the absence of NM-3, there were no detectable changes in

5 EGF-R expression after NM-3 treatment. These results indicate a selective effect of NM-3 on MUC1 expression without inhibition of surface molecular expression.

The present invention has been shown by both description and examples. The Examples are only examples and cannot be construed to limit the scope of the invention. One of ordinary skill in the art will envision equivalents to the inventive process

10 described by the following claims that are within the scope and spirit of the claimed invention.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

- 5 Barry & Sharkey, Hum. Pathol., 16:225-7, 1985.
Brunner *et al.*, Nature, 385:829-833, 1997.
Daniels & Reynolds, Mol. Cell. Biol., 19:3614-23, 1999.
Dawson *et al.*, Science 266:776, 1994.
Duffy, in Vaccine Preparation Techniques, Noyes Data Corporation of Park Ridge, N.J.,
10 1980.
Finn *et al.*, Immunol. Rev. 145:61-89, 1995.
Gansow, Int. J. Rad Appl. Instrum. [B], Nucl. Med. Biol. 18:369-381, 1991.
Goding, In: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2d ed., Orlando, Fla., Academic Press, pp. 60-61, 1986.
15 Itzkowitz *et al.*, Cancer, 66:1960-6, 1990.
Jawhari *et al.*, J. Pathol., 189:180-85, 1999.
Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986.
Kufe *et al.*, Hybridoma, 3:223-232, 1984.
Li *et al.*, Mol Cell Biol., 18:7216-24, 1998.
20 Li *et al.*, J. Biol. Chem., 276:6061-64, 2001.
Li *et al.*, J. Biol Chem, e-publication manuscript C100359200, August 1, 2001(a).
Li & Kufe, Biochem Biophys. Res. Commun., 281, 440-43, 2001.
Ligtenburger *et al.*, Cancer Res., 15:2318-2324, 1992.
Molenaar *et al.*, Cell, 86:391-399, 1996.
25 Novak & Dedhar, Cell Mol. Life Sci., 523-37, 1999.
Olsnes & Pihl, Pharmac. Ther. 25:355-381, 1981.
Pandey *et al.*, Cancer Res., 55:4000-4003, 1995.
Pastan *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 61:331-354, 1992.
Perey *et al.*, Cancer Res., 52:2563-68, 1992.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

- Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113:269-315, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, 1994.
- Presta, Curr. Op. Struct Biol. 2:593-596, 1992.
- Reddish *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., 42:303-9, 1996.
- 5 Reynolds *et al.*, Mol. Cell. Biol. 9:629-38, 1989.
- Reynolds *et al.*, Mol. Cell. Biol., 14:8333-41, 1994.
- Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988.
- Ring *et al.*, Human Genet., 104:326-32, 1999.
- Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.
- 10 Shimazui *et al.*, Cancer Res., 56:4154-58, 1996.
- Smith & Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482-489, 1981.
- Strouss & Decker, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., 27:57-92, 1992.
- Takeichi, Annu. Rev. Biochem., 59:237-52, 1990.
- 15 Thorpe *et al.*, Immunological Rev. 62:119-158, 1982.
- Thorpe *et al.*, Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, pp. 168-190 Academic Press, NY 1982(a).
- Waldmann, Science, 252:1657, 1991.
- Yamamoto *et al.*, J. Biol. Chem. 272:12492-94, 1997.
- 20 Yuan *et al.*, PNAS, 94:1437-1440, 1997.
- Zrihan-Licht, *et al.*, FEBS Let., 356:130-36, 1994.
- U.S. Pat. No. 4,675,382
- U.S. Pat. No. 4,894,443,
- U.S. Pat. No. 5,506,343

25

WO 02/22685

PCT/US01/28548

WHAT IS CLAIMED IS:

1. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist for the manufacture of a medicament to inhibit the proliferation of MUC1-expressing cancer cells.
2. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 1, wherein said MUC1 extracellular domain antagonist downregulates the expression of the MUC1 extracellular domain.
3. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 1, wherein said MUC1 extracellular domain antagonist is a MUC1 extracellular domain binding inhibitor.
4. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 3, wherein said MUC1 extracellular domain binding inhibitor is the polypeptide of SEQ ID NO: 1, or a fragment comprising at least four consecutive amino acids of SEQ ID NO: 1, or conservative variants thereof.
5. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 3, wherein said MUC1 extracellular domain binding inhibitor is the polypeptide of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 or conservative variants thereof.
6. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 3, wherein said MUC1 extracellular domain binding inhibitor is an antibody or fragment thereof that binds to an epitope within sequences of the peptides selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3.
7. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 3, wherein said MUC1 extracellular domain binding inhibitor is an antibody or fragment thereof that binds to an epitope within sequence of SEQ ID NO: 1.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

8. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 6, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
9. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 8, wherein said monoclonal antibody is humanized.
10. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 8, wherein said monoclonal antibody is a human antibody.
11. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 6, wherein said antibody is a bispecific antibody.
12. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 6, wherein said fragment comprises an antigen binding region.
13. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 6, wherein said antibody or fragment thereof is conjugated to a chemotherapeutic agent, radioisotope, toxin, or an effector that induces a cytolytic or cytotoxic immune response.
14. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 13, wherein said antibody or fragment thereof is conjugated to a cytokine, an antimetabolite, an anthracycline, a vinca alkaloid, an antibiotic, an alkylating agent, a naturally derived toxin, or an Fc region of a IgG1 immunoglobulin.
15. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 1, wherein said effective amount of a MUC1 extracellular antagonist is administered as a composition comprising said MUC1 extracellular domain antagonist and a pharmaceutically acceptable carrier.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

16. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 1, further comprising administration of a chemotherapeutic agent or radiation.

17. A use of a MUC1 extracellular domain antagonist for the manufacture of a medicament for use in combination with a chemotherapeutic agent or radiation for the treatment of cancer.

18. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 17, wherein said MUC1 extracellular domain antagonist downregulates the expression of the MUC1 extracellular domain.

19. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 17, wherein said MUC1 extracellular domain antagonist is a MUC1 extracellular domain binding inhibitor.

20. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 19, wherein said MUC1 extracellular domain binding inhibitor is the polypeptide of SEQ ID NO: 1, or a fragment comprising at least four consecutive amino acids of SEQ ID NO: 1, or conservative variants thereof.

21. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 19, wherein said MUC1 extracellular domain binding antagonist is the polypeptide of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 or conservative variants thereof.

22. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 19, wherein said MUC1 extracellular domain binding inhibitor is an antibody or fragment thereof that binds to an epitope within sequences of the peptides selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

23. The use of a MUC1 extracellular domain binding antagonist of claim 19, wherein said MUC1 extracellular domain binding antagonist is an antibody or fragment thereof that binds to an epitope within sequence of SEQ ID NO: 1.
24. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 22, wherein said antibody is a monoclonal antibody.
25. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 24, wherein said monoclonal antibody is humanized.
26. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 24, wherein said monoclonal antibody is a human antibody.
27. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 22, wherein said antibody is a bispecific antibody.
28. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 22, wherein said fragment comprises an antigen binding region.
29. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 22, wherein said antibody or fragment thereof is conjugated to a chemotherapeutic agent, radioisotope, toxin, or an effector that induces a cytolytic or cytotoxic immune response.
30. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 29, wherein said antibody or fragment thereof is conjugated to a cytokine, an antimetabolite, an anthracycline, a vinca alkaloid, an antibiotic, an alkylating agent, a naturally derived toxin, or an Fc region of a IgG1 immunoglobulin.
31. The use of a MUC1 extracellular domain antagonist of claim 17, wherein said chemotherapeutic agent is selected from the group consisting of alkylating agents,

WO 02/22685

PCT/US01/28548

topoisomerase inhibitors, antimetabolites, tubulin interactive agents, anti-hormonal agents, ornithine decarboxylase inhibitors and tyrosine kinase inhibitors.

32. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 1, or a fragment comprising at least four consecutive amino acids of SEQ ID. NO: 1, or conservative variants thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

33. The composition of claim 32, wherein said polypeptide is the polypeptide of SEQ ID NO: 5, or conservative variants thereof.

34. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide of SEQ ID NO: 4 or conservative variants thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

35. A pharmaceutical composition comprising an antibody or fragment thereof that binds to an epitope within sequences of the peptides selected from the group consisting of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 and SEQ ID NO: 3 and a pharmaceutically acceptable carrier.

36. The composition of claim 35, wherein said antibody or fragment thereof binds to an epitope within sequence of SEQ ID NO: 1.

37. The composition of claim 36, wherein said antibody is a monoclonal antibody.

38. The composition of claim 37, wherein said monoclonal antibody is humanized.

39. The composition of claim 37, wherein said monoclonal antibody is a human antibody.

40. The composition of claim 35, wherein said antibody is a bispecific antibody.

WO 02/22685

PCT/US01/28548

41. The composition of claim 35, wherein said fragment comprises an antigen binding region.

42. The composition of claim 35, wherein said antibody or fragment thereof is conjugated to a chemotherapeutic agent, radioisotope, toxin, or an effector that induces a cytolytic or cytotoxic immune response.

43. The composition of claim 42, wherein said antibody or fragment thereof is conjugated to a cytokine, an antimetabolite, an anthracycline, a vinca alkaloid, an antibiotic, an alkylating agent, a naturally derived toxin, or an Fc region of a IgG1 immunoglobulin.

44. A method of identifying a compound the inhibits the binding of ligands to the extracellular domain of MUC1, the method comprising:

(a) providing a polypeptide comprising the polypeptide of SEQ ID. NO: 1 or the polypeptide of SEQ ID NO: 5;

(b) contacting said polypeptide test compound and an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO: 4;

(c) determining whether the binding of said antibody that binds to an antibody to an epitope within SEQ ID NO: 4 to the polypeptide SEQ ID. NO: 1 or the polypeptide of SEQ ID NO: 5 is decreased relative to an appropriate control.

45. A pharmaceutical composition comprising a compound identified by the method of claim 44 and a pharmaceutically acceptable carrier.

46. A method of identifying a compound that inhibits the proliferation of MUC1-expressing cancer cells, the method comprising:

(a) providing a population of MUC1-expressing cancer cells;

(b) contacting said population of MUC1-positive cancer cells with a test compound and an antibody that binds to an epitope within SEQ ID NO: 5;

WO 02/22685

PCT/US01/28548

(c) determining whether the proliferation of said population of MUC1-expressing cancer cells is decreased by comparison to an appropriate control.

47. A pharmaceutical composition comprising a compound identified by the method of claim 46 and a pharmaceutically acceptable carrier.

48. A method of identifying a compound that downregulates the expression the extracellular domain of MUC1, the method comprising:

- (a) providing a population of MUC1-expressing cancer cells;
- (b) contacting said population of MUC1-expressing cancer cells with a test compound;
- (c) utilizing an anti-MUC1/ECD antibody to identify polypeptides comprising MUC1/ECD in the MUC1/ECD-expressing cancer cells; and
- (d) determining whether the expression of polypeptides comprising MUC1/ECD is decreased in comparison to controls wherein the test compound was excluded.

49. The use of a NM-3 for the manufacture of a medicament to downregulate the expression of the extracellular domain of MUC1/ECD in a cancer.

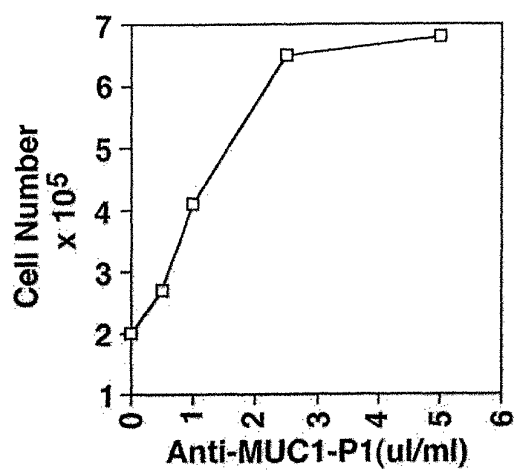


FIG. 1

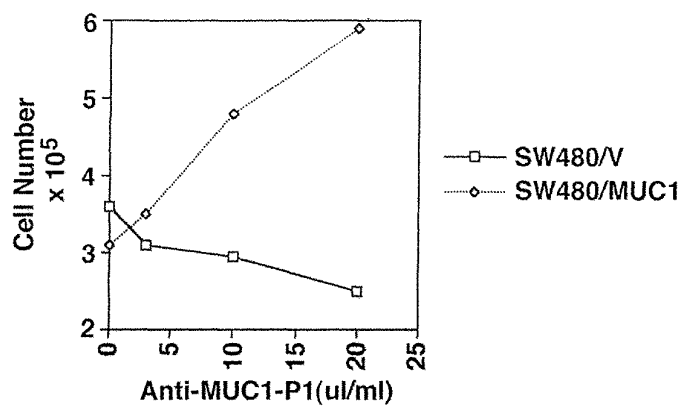


FIG. 2

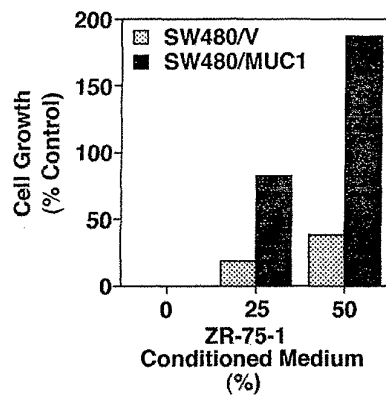


FIG. 3

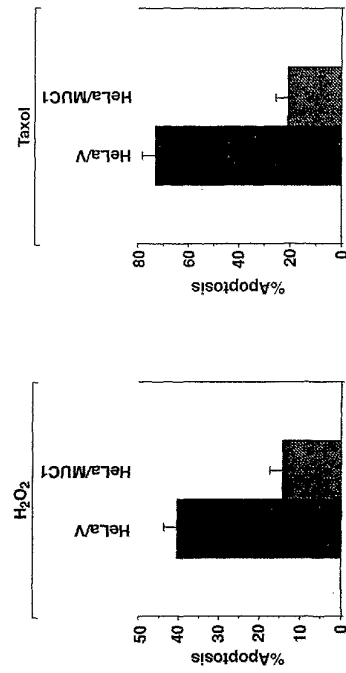


FIG. 4

WO 02/22685

PCT/US01/28548

SEQUENCE LISTING

<110> Kufe, Donald W.
Ohno, Tsuneya

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

<130> MUC1 APPLICATION

<150> 60/231,841

<151> 2000-09-11

<160> 18

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

<210> 2

<211> 426

WO 02/22685

PCT/US01/28548

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 02/22685

PCT/US01/28548

130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 02/22685

PCT/US01/28548

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

WO 02/22685

PCT/US01/28548

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 02/22685

PCT/US01/28548

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 02/22685

PCT/US01/28548

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Thr Leu Asp Leu Asn
420

WO 02/22685

PCT/US01/28548

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

<220>
<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 4

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

Cys

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

<220>
<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 5

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

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

<220>

WO 02/22685

PCT/US01/28548

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 6

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

Cys

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 7

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

Gly Ala Cys

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

WO 02/22685

PCT/US01/28548

<400> 8

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

Tyr Asn Leu

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SYNTHESIZED SEQUENCE

<400> 9

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

Phe Arg Glu Cys
20

<210> 10

<211> 1054

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

ccctgcagaa gccgcgctcc ctactcggtc cgggggcaga gggggcgaga gagagcaagt 60

gggcgggcgt cccatctctc gcatactcct ccaggtcctg gcgcacaggg tgggagcgct 120

WO 02/22685 PCT/US01/28548

```

ggctgctgcc ggctgctgca tgcgggccc cttgcgcct gccccctgcc ctactgggc 180
cacctccccc ggctgcccgt ggagggttaa gaggcgctaa cgttacgctg ttccggttt 240
tccagcgggc totgtttccc ctcccaggc ggcggcggct gagcggcggg gcccccaaa 300
tggcctgggc agatgcggca ggtttgctgc tcagcgtgc cgcgcgcgc actggagaag 360
ggctcgtgca gcagctacag cgacagcagc agcagcagca gcgagaggag cagcagcagc 420
agcagcagca gcagcagagc cggcagcagc agcaggagca gcagcaaca cagcagcatc 480
tctcgtccc ctgcgcgcc agagccggc ccgcagcaac agccgcagcc ccgcagccc 540
gcagcccgga gagcgcgcgc cgtttcgcga gccgcagccg ccggcggcat gaggcgcgac 600
ccggccccc gcttctccat gctgctcttc ggtgtgtcgc tcgcctgcta ctgcgccagc 660
ctcaagtcag tgcaggacca gggtacaag gcacccgtg tggtagggg caaggtagc 720
gggctgggcc cagcggggg ctccagctcc aacagcacc gagagccgcc gcctcgggt 780
cgggtggcgt tggtaaagg gctggacaag tggccgctcc ggagcgggg gctgcagcgc 840
gagcaggtag tcagcgtgg ctctgtgtg ccgctcgaaa ggaaccagc ctacatctt 900
ttcttgagc ccacggaaca gcccttagtc ttaagacgg cctttgccc cctcgatacc 960
aacggcaaaa atctcaaga agaggtgggc aagatcctgt gcactgacty cggtaggtcg 1020
ccccctcct ttgctggaga aaggggggag gggc 1054

```

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

WO 02/22685

PCT/US01/28548

<400> 11
 gcactgcgcc taccaccacc gtgctcacct acctgccttg taaccacag ccaccgggcc 60
 caagttgaag aagatgaaga gccagacggg acaggtgggt gagaagcaat cgctgaagtg 120
 tgaggcagca gccggttaac ccagccttc ctaccgttgg ttcaaggatg gcaaggagct 180
 caaccgcagc cgagacatcc gcataaata tggcaacggc aggtaagcaa tatccagcct 240
 gtctctccatc caagcagctg cctccctcc tctcgagaag gagtggcctg aactgggcag 300
 aggccagggc tgtgccccca gactcaacca tgggaaccagt cccagccctt ctccatactc 360
 ccttctcttg ccactccag ccttcttctt gcagctcggg gacctcttg tcatggtgg 419

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

<400> 12
 gccactagtc ctgcctgtg ttgtcctaag ggcccaaggc tccctgcagc tgcagggact 60
 ccgtgcccc cctggactcc agaaattgct ggggggaggg aatctcctc ccatctaagc 120
 tgcagggcc cttgtgctct gtggagagag gcaaccgctg ggtgactgct ggggagccac 180
 agccggccct ggctcagcc tctccctt ttatccctc ctaaccaga aagaactcac 240
 gactacagtt caacaagggt aaggtggagg acgctgggga gtatgtctgc gaggccgaga 300
 acatcctggg gaaggacacc gtccggggcc ggctttacgt caacagcggg aggtggggcc 360
 agacagaggg aagggtccta gaggggttg gcagggcggg ccagtggccc cccagccctt 420
 ggggcctgca tgtgatccat ctgcactca actccctcc ctctgtctgc tgccatatca 480

WO 02/22685

PCT/US01/28548

agccctagat ctc 493

<210> 13
<211> 350
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 13
ggtcacatctc cagttttgac gtggggcatg aaggagatga ttcttggggc ctagggatag 60

ttctcagtgcg tcactggcac atgtctctca taccctcagt gagcaccacc ctgtcctcct 120

ggtcgggggca cgcccgggaag tgcaacgaga cagccaagtc ctattgcgtc aatggaggcg 180

tctgctacta catcgagggc atcaaccagc tctcctgcaa gtaagtacc agtaggggtg 240

ggcatgggag caagaacagg gtaggagatg ctgggtcaga agtggagggc tctaggaaaa 300

gaggggtcca agccactgac aagaggctcc caaggggtgt agacaggaag 350

<210> 14
<211> 326
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 14
aagtgcctga cttggttttt ctcatctc acgtgtgact ttgatttcta accttagcct 60

cgcgatgat gccagtttgt tctgtgattt ttcccccttt ccttctccag atgtccaaat 120

ggattcttcg gacagagatg ttgggagaaa ctgcctttgc gattgtacat gccagatcct 180

aagcaaagta tgtttgaaga taaaaacaca agtccttgct ccttagaaag cttctgggtg 240

cagtcocccc aatgtagggc atagggccag gggtgttggg tgttttgatc ttggctgtt 300

WO 02/22685

PCT/US01/28548

ttgttttgtt tctcttttct tttttg 326

<210> 15
<211> 310
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 15
aatacaaatg gtaacggtgg caaggaaccc agctggcatt ggcagagacc cgtgccgggg 60
tggtgcaatg cctgtgtctt gctatcctgg ctctctcttt ctggttttct ttcttttggg 120
agggtgtcctg tgggatacac cggggacagg tgtcagcagt tgcgaatggt caacttctcc 180
agtatgtctc ttcttcttat ttcttctctt ccttgggtgac tgacagtctc cccctgggga 240
gggatggggc cttgcttagc aagactaggg ggagatgtag aggggtgtct gcgctcctta 300
gaggagacgg 310

<210> 16
<211> 259
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 16
ggatggaaag gagctgggca ggacctgagc tggggagagc ctatggcttt gggggcaaa 60
gggtctctgc accactatcc ctatggggtt tgctctctgc cccacccctc acatctaccc 120
tacctctgca gaagccgagg agctgtacca gaagagggtc ctgaccatca cgggcatctg 180
cgtggctctg ctggctgtgg gcatcgtctg tgtggtgccc tactgcaaga ccaagtgagt 240
gtcactcact caagctggg 259

WO 02/22685

PCT/US01/28548

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

<400> 17
ttgtgacct cgtcttcttg cactgccaga gcaccttgga ttgaattaa agggatatgaa 60
acctctgtgt gtcactcagc accatctgcg tggccctctt ccacagcctc cgatgccatg 120
tgtgctgaat gtttggttct ctttccaaa aatggaaaag ggaatgattcc aaaaatctct 180
cctggcccca tcgagatgtc ctatcataaa ctacgttgat ttagcaggag acgaaagaag 240
ctcatgaaca gaaggcca 258

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

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

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

<400> 18
gaattcagaa ttttagacco ttggccttg gggtccatcc tggagacct gaggtctaag 60

WO 02/22685	PCT/US01/28548
ctacagcccc tcagccaacc acagaccctt ctctggctcc caaaaggagt tcagtcccag	120
aggggtggtca cccacccttc agggatgaga agttttcaag ggggtattact caggcactaa	180
cccagagaaa gatgacagca cattgccata aagttttggt tgtttttctaa gccagtgcga	240
ctgcttatit tagggatttt ccgggatagg gtggggaagt ggaaggaatc ggcgagtaga	300
agagaaagcc tgggagggtg gaagttaggg atctagggga agtttggtctg atttggggat	360
gcgggtgggg gaggtgctgg atggagttta gtgaaggata ggggtcctga gggaggatgc	420
ccgaagtect cccagaccga ctactcacg gtggcagcgg cgacactcca gtcatatcaa	480
gatccgcggg gatgagagag caggaggcgg gggctgcccc tgaggtagcg gggaggccgg	540
ggggccgggg ggcggacggg acgagtgcaa tattggcggg ggaaaaaaca acactgcacc	600
gcgtccgctc cctcccgccc gcccgggccc ggatcccgct cccacccgcc tgaagccggc	660
ccgacccgga acccgggccc ctggggagtt gggttcacct tggaggccag agagacttgg	720
cgcccggaag caaagggaat ggcgaagggg agggggggag gagaacggga gtttgcggag	780
tccagaaggc cgcctttccga cgcggggcg ttgcgcgcgc ttgctcttta agtactcaga	840
ctgcgcggcg cgagccgtcc gcatggtgac gcgtgtccca gcaaccgaac tgaatggctg	900
ttgcttggca atgcggggag ttgaggtttg gggccggcca cctagctact cgtgttttct	960
ccggcctgcg agttgggggg ctcccgctc cccggccgc tccctgggcgc gctgacgtca	1020
gatgtcccca ccccgccag cgctgcccc aagggtctcg ccgcacacaa agctcggcct	1080
cgggcgccgg cgcgcgggcg agagcgggtg tctctgcct gctgatctga tgcgtccaa	1140
tcccgctgct cgccgaagtg tttttaagt gttctttcca acctgtgtct ttggggctga	1200

WO 02/22685

PCT/US01/28548

```

gaactgtttt ctgaatacag gcggaactgc ttccgtcggc ctagaggcac gctgcgactg 1260
ggggaccocaa gttccacgtg ctgcgcgggc ctgggatagc ttctccccc cgtgcactgc 1320
tgccgcacac acctcttggc tgcgcgcac taccgacctc acgtgtgctt ttgcccccg 1380
ctacgtgcct acctgtcccc aataccactc tgctcccaa aggatagttc tgtgtccgta 1440
aatcccatte tgtaccacca cctactctct gccccccct tttttgttt gagacggagc 1500
tttgtctgt cgccaggct ggagtcaat ggcgcgatct cggtcactg caacctcgc 1560
ctcccggtt caagcgatc tcctgcctca gcctcctgag tagctgggt tacagcgccc 1620
gccaccacgc tcggctaatt ttgtagttt ttagtagaga cgaggtttca ccatcttggc 1680
caggctggtc ttgaacctc gaacttgta tccactcgc tcggccttc aaagtgttgg 1740
gattacgggc gtgacgaccg tgccacgcat ctgcctctta agtacataac ggccacaca 1800
gaacgtgtcc aactccccg ccacgttcc aacgtctct cccacatacc tcggtgcccc 1860
ttccacatac ctcaggacco caccgctta gctccatttc ctccagacgc caccaccacg 1920
cgtcocggag tgccccctcc taaagctcc agccgtccac catgctgtgc gtctctcct 1980
ccctggccac ggcagtgacc ctctctccc gggccctgct tccctctgc gggctctgct 2040
gcctcaetta ggcagcgctg ccctactcc tctccgccg gtccgagcgg cccctcagct 2100
tcggcgccca gcccgcgaag gctcccggtg accactagag ggcgggagga gctcctggcc 2160
agtggtggag agtggcaagg aagacccta gggttcatcg gagccaggt ttactccctt 2220
aagtggaat ttcttcccc actcctcctt ggctttctcc aaggaggga cccaggctgc 2280
tggaaagtcc ggctggggg gggactgtg gttcagggga gaacggggtg tggaacggga 2340

```

WO 02/22685

PCT/US01/28548

```

cagggagcgg ttagaagggt ggggctattc cgggaagtgg tggggggagg gagccaaaa 2400
ctagcaccta gtccactcat tatccagccc ttttatttct cggccgctct gcttcagtgg 2460
accgggggag ggcggggaag tggagtggga gacctagggg tgggcttccc gaccttgctg 2520
tacaggacct cgacctagct ggctttgttc cccatcccca cgttagttgt tggcctgagg 2580
ctaaaactag agcccagggg cccaagtgc cagactgccc ctccccctc cccgggagcc 2640
agggagtggg tggtgaaagg gggaggccag ctggagaaca aacgggtagt cagggggttg 2700
agcgattaga gcccttgtac cctacccagg aatgggttgg gaggaggagg aagaggtagg 2760
aggtagggga gggggcgggg ttttgtcacc tgtcacctgc tcgctgtgcc tagggcgggc 2820
ggcgggggag tgggggggac ggtataaagc ggtaggcgcc tgtgcccgtc ccacctctca 2880
agcagccagc gcctgcctga atctgttctg cccctcccc accatttca ccaccacat 2940
gacacgggc acccagctct ctttcttctt gctgctgctc ctacagtgc ttacaggta 3000
ggggcacgag gtggggagtg ggctgccctg cttaggtggg ctctgtggtc tttctgtggg 3060
ttttgtcccc tggcagatgg caccatgaag ttaaggtaag aattgcagac agaggctgcc 3120
ctgtctgtgc cagaaggagg gagaggctaa ggacaggctg agaagagtg ccccaaccc 3180
tgagagtggg taccaggggc aagcaaatgt cctgtagaga agtctagggg gaagagagta 3240
gggagaggga aggccttaaga ggggaagaaa tgcaggggcc atgagccaag gcctatgggc 3300
agagagaagg aggcctgtgc aggaaggag gcttccaacc cagggyttac tgaggctgcc 3360
cactcccag tcctctggt attatttctc tggtgccag agcttatatt tttcttctgc 3420
tcttattttt ccttcataaa gaaccaaccc tatgacttta actcttaca gctaccacag 3480

```

WO 02/22685

PCT/US01/28548

```

ccccaaacc cgcaacagtt gttacagggt ctggtcatgc aagctctacc ccaggtaggag 3540
aaaaggagac ttgggtctacc cagagaagtt cagtggccag ctctactgag aagaatgctg 3600
tgagtatgac cagcagcgtg ctctccagcc acagcccggt ttcaggctcc tccaccactc 3660
agggacagga tgtcactctg gccccggcca cggaaaccagc ttcaggttca gctgccacct 3720
ggggacagga tgtcacctcg gtcccagtcg ccaggccagc cctgggctcc accaccgcgc 3780
cagcccaaga tgtcacctca gccccggaca acaagccagc cccgggctcc accgcccccc 3840
cagcccaagg tgtcacctcg gccccggaca ccaggccgga cccgggctcc accgcccccc 3900
cagcccatgg tgtcacctcg gccccggaca acaggccgga cttgggctcc accgcccccc 3960
cagtcacaaa tgtcacctcg gctcagggt ctgcatcagg ctgagcttct actctggtgc 4020
acaacggcac ctctgccagg gctaccacaa cccagccag caagagcact ccattctcaa 4080
ttccagcca ccaactctgat actcctaaca cccttgccag ccatagcacc aagactgatg 4140
ccagtagcac tcaccatagc acggtacctc ctctcacctc ctcaaatcgc agcacttctc 4200
ccagttgtgc tactgggggc tctttctttt tctgtcttt tcaatttca aacctccagt 4260
ttaattcttc tctggaagat cccagcacgc actactacca agagctgcag agagacattt 4320
ctgaaatggt ggtatcggc ctttctctcc ccatgctccc ctgaagcagc catcagaact 4380
gtccacaccc ttgcatcaa gcccgagtc tttccctctc accccagttt ttgcagattt 4440
ataacaagg gggttttctg ggcctctcca atattaagtt caggtagcgt tctgggtgtg 4500
gaccagtggt ggtggttga ggggtgggtg gtggtcatga ccgtaggag gactggtgca 4560
cttaaggttg ggggaagagt gctgagccag agctgggacc cgtggctgaa gtgccattt 4620

```

WO 02/22685

PCT/US01/28548

```

ccctgtgacc aggccaggat ctgtggtggt acaattgact ctggccttcc gagaaggtag 4680
catcaatgtc cagcagctgg agacacagtt caatcagtat aaaacggaag cagcctctcg 4740
atataacctg acgatctcag acgtcagcgg tgaggctact tccctggctg cagccagcac 4800
catgccgggg cccctctcct tccagtgtct gggtcccgcc tctttcctta gtgctggcag 4860
cgggaggggc gcctctctctg ggagactgcc ctgaccactg cttttccttt tagtgagtga 4920
tgtgccattt cctttctctg cccagtctgg ggctgggggtg ccaggctggg gcctgcgct 4980
gctggtgctg gtctgtgttc tggttgcgct ggccattgtc tatctcattg ccttggtgag 5040
tgcagtcctc ggcctctgat agagccccc ggtagaaggc actccatggc ctgccataac 5100
ctctatctc cccaggctgt ctgtcagtgc cgcgaaaga actacgggca gctggacatc 5160
tttcagccc gggataccta ccatcctatg agcgagtacc ccacctaaca caccatggg 5220
cgctatgtgc cccctagcag taccgatcgt agcccctatg agaaggtgag attgggcccc 5280
acaggccagg ggaagcagag ggtttggctg ggcaaggatt ctgaaggggg tacttgaaa 5340
acccaagag cttggaagag gtgagaagtg gcgtgaagtg agcaggggag ggcctggcaa 5400
ggatgagggg cagaggtcag aggagttttg ggggacaggc ctgggaggag actatggaag 5460
aaagggggcc tcaagaggga gtggcccccac tgccagaatt cctaaaagat cattggccgt 5520
ccacattcat gctggctggc gctggctgaa ctggtgccac cgtggcagtt ttgtttgtt 5580
ttgtttttt gcacccagag gcaaatggg tgagcacta tgcccagggg agcccttccc 5640
gaggagtccc aggggtgagc ctctgtgcc ctaatcctc cctaggaatg gagggtagac 5700
cgagaaaggc tggcataggg ggaggtttcc caggtagaag caagaagaag tgtcagcaga 5760

```

WO 02/22685

PCT/US01/28548

ccaggtgagc gtgggtgcc gtaggggttct tgggagcttc aaggagcaa ggaacgctcc 5820
 ctcttctctc tctgggtctt tctctatggg acctagtaaa taattactgc agccacctga 5880
 ggctggaaaa ccactocagg tgggggagga gagagtttag tttcttgct ctattttcc 5940
 tctctctga gacctcctc tctcggttt acaagacac agatacacc cgtcccccaa 6000
 aacacacaca cacacacaca cacacacacc tcttaggtt ggaacagcag agaattggag 6060
 gacaaggggg ctgattagag ccaagaagag ggagtgaagg agagcagagg gaggagggca 6120
 gccctgttta cagtcacctg gctgggtggg tggcagggtc tctctctgaa ttaaccttt 6180
 gagagctggc caggactctg gactgattac cccagcctgg ggtggcatcc aggggctcta 6240
 ggaggtaact tttgtctct accctggatc tcttttctt ccaccaggt ttctgcaggt 6300
 aatgggtggc gcagcctctc ttacacaaac ccagcagtg cagccacttc tgccaacttg 6360
 taggggcacg tcgcccgtg agctgagtg ccagccagtg ccattccact ccactcaggt 6420
 tcttcagggc cagagccctc gcaccctgtt tgggctgggt agctgggagt tcaggtgggc 6480
 tgctcacacg tcttcagag gccccaocaa tttctcgac acttctcagt gtgtggaagc 6540
 tcatgtgggc ccctgaggct catgcctggg aagtgttgtg gtgggggctc ccaggaggac 6600
 tggccagag agccctgaga tagcggggat cctgaactgg actgaataaa acgtgggtctc 6660
 ccactgggc caactctga tctttcatct gtgaccctg ggcagcaggg cgtcagaatg 6720
 tgtgtgaggg ggctggggga ggagacaggg aggcaggag gcagtaagga gcgagtttgt 6780
 ttgagaagca ggagatgtga ggaggagggt acattgggga gtaggggtgg cctgaggagc 6840
 cacctctggc taacctggc agcaaaagag gaaggaggaa acgaaacca ggcnggcttt 6900

WO 02/22685

PCT/US01/28548

```

ggagggctag cgtgactggg ctccgtgact gagctctgtg tgccagtggc tctccctct 6960
cctcgccctg cccacgccct ccttgccctt ggcattggtg ccccaggtg gctctattct 7020
tagctgtccg ggtgtgaagt aaatccttgg gcagtataa cagcccagag tcaacagggt 7080
tgagataagc agaggctggg tcagatccgg gcgctggcac cagggccagc cccctccctg 7140
accccgctn cccaccagc ctgctgcccc tgggggtgnc tccacaacac cctgggaatg 7200
gggaagtggc tctggttccc tgaccccttt ggcacaggca cgttgccgtt ccttcgaccg 7260
cattccocca gggcctgtgc tgcaggcctg gaagccctga ttggggcctg ccaccagcag 7320
ccagagagct atgttccttg gcagctgtga tgcgctcagg ccgggcccag acacgtgtgg 7380
caggaggett agagcacctg cctggggcct tcctctctca ggcaccagat ccattggttg 7440
ctcctgccta gaaccacagc ctagcaccct tgcctccctc cgcctaccac acccagcaca 7500
gaaactcaca ggaatgattg cgtcaggga aggcagagat gtgcctggca tcacagtitta 7560
ttgtttataa accatgacaa taacagctgt tgcctcagcac aggcctagca gagcccactg 7620
caggggggacg gcagcgggca ccagaggcct tgcctggccc aacccaatgg gaacaccag 7680
actcagctg gtccccaagg gagacttggc acattggcat ggggtgtgga caggtaaagc 7740
atgcaagagg gagaagagg acataagggg catgcccgtg cgggggtgtg ggacccaat 7800
aaataaagca ggalgacagg gtccctctcc cctcaccagg aatgcctgac agcgtccagc 7860
cccaaagcct gcctgtocca aggctgtagt tcagcatcaa cagggcaggg agcttggcag 7920
ggcaagggca gagctggaga tcatgccagc tnttcagggt gccctccctc ccaatcagcc 7980
tggggggcac aggacaggga tggagaaggg gctctctcca tggcttgggt aacatgcaa 8040

```

WO 02/22685

PCT/US01/28548

```
aggcaggtca tagggcagac tcagtggggg tgggggcctg gctaacaagc aatggagaga 8100
acggggggcca tccagagagg ttggcagaag agagccctg ggtcaagaga aaactttggg 8160
gaagacaaga cacgggagaa g 8181
```

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/022685 A3(51) International Patent Classification: A61K 39/00,
C07K 16/18, A61K 38/17, 47/48, 51/10, 31/00, G01N
33/50

(21) International Application Number: PCT/US01/28548

(22) International Filing Date:
11 September 2001 (11.09.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/231,841 11 September 2000 (11.09.2000) US

(71) Applicants and

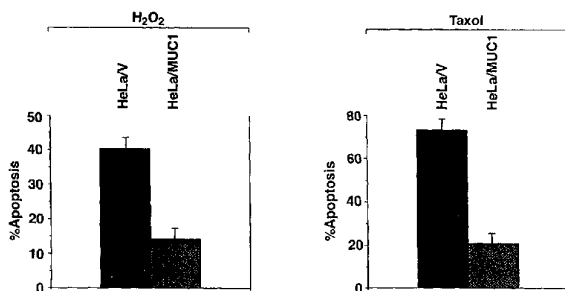
(72) Inventors: KUFU, Donald, W. [US/US]; 179 Grove
Street, Wellesley, MA 02181 (US); OHNO, Tsuneya
[JP/US]; 3-25-8 Nishi-Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105
(JP).(74) Agent: MONEV, Stephen, J.; Associate Counsel, In-
tellectual Property, Ilex Oncology, Inc., 4545 Horizon III
Blvd., San Antonio, TX 78229 (US).(81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KL, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

[Continued on next page]

(54) Title: MUC1 EXTRACELLULAR DOMAIN AND CANCER TREATMENT COMPOSITIONS AND METHODS DERIVED THEREFROM



(57) Abstract: The present invention provides compositions and methods for inhibiting the proliferation of cancer cells and for the treatment of tumors with antagonists of the binding of ligands to the extracellular domain of MUC1, such binding being related to an oncogenic function of MUC1.

WO 02/022685 A3

WO 02/022685 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/28548
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/00 C07K16/18 A61K38/17 A61K47/48 A61K51/10 A61K31/00 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ, EPO-Internal, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	P. CIBOROWSKI ET AL.: "Screening of anti-Muc1 antibodies for reactivity with native (ascites) and recombinant (baculovirus) Muc1 and for blocking Muc1 specific cytotoxic T-lymphocytes." TUMOR BIOLOGY, vol. 19, no. suppl. 1, 1998, pages 147-151, XP002071242 Basel, Switzerland abstract	1-3, 6-15, 22-30, 35-43
A	WO 93 20841 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE) 28 October 1993 (1993-10-28) claims	1-3, 6-15, 22-30, 35-43
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *8* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 July 2002		15/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentsaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/28548

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. TONDINI ET AL.: "Evaluation of monoclonal antibody DF3 conjugated with ricin as a specific immunotoxin for in vitro purging of human bone marrow." CANCER RESEARCH, vol. 50, no. 4, 15 February 1990 (1990-02-15), pages 1170-1175, XP008004616 Baltimore, MD, USA abstract	1-3, 6-15, 22-30, 35-43
A	S. HIGASHIYAMA ET AL.: "A novel brain-derived member of the epidermal growth factor family that interacts with ErbB3 and ErbB4." JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 122, no. 3, 1997, pages 675-680, XP000775819 Tokyo, JP abstract figure 1	6,22,35
A	WO 00 25827 A (MENARINI RICERCH S.P.A.) 11 May 2000 (2000-05-11) figure 3 claim 16	1-5, 17-21, 32-34
A	T. NAKASHIMA ET AL.: "Inhibition of angiogenesis by a new isocoumarin, NM-3." THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS, vol. 52, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 426-428, XP000940445 Tokyo, Japan the whole document	49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/US 01/28548

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9320841	A	28-10-1993	AU	683413 B2	13-11-1997
			AU	3789493 A	18-11-1993
			DE	69329643 D1	14-12-2000
			DE	69329643 T2	01-03-2001
			EP	0636029 A1	01-02-1995
			JP	7505775 T	29-06-1995
			WO	9320841 A1	28-10-1993
			US	5506343 A	09-04-1996
WO 0025827	A	11-05-2000	IT	MI982330 A1	02-05-2000
			AU	1152200 A	22-05-2000
			BR	9914892 A	17-07-2001
			CN	1324406 T	28-11-2001
			CZ	20011521 A3	17-10-2001
			WO	0025827 A2	11-05-2000
			EP	1124956 A2	22-08-2001
			TR	200101141 T2	21-09-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
// C 0 7 K 16/28	G 0 1 N 33/566	
C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	A
	C 0 7 K 16/28	

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 クフェ , ドナルド ダブリュー .

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

(72) 発明者 大野 典也

東京都港区西新橋 3 - 2 5 - 8

F ターム (参考) 2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
FB03
4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 CA04 CA05 CA06 CA07 DA02 EA04
GA11 GA18 HA03 HA08 HA12 HA14
4B063 QA01 QA18 QQ20 QR33 QR41 QR48 QR59 QR69 QR77 QS12
QS36 QX01
4C084 AA02 AA17 AA20 BA01 BA08 BA19 CA25 DC50 MA02 NA05
NA14 ZB262 ZC022 ZC751 ZC752
4C085 AA13 AA14
4H045 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA72 FA74

专利名称(译)	MUC1细胞外结构域和由其获得的癌症治疗组合物		
公开(公告)号	JP2004515472A	公开(公告)日	2004-05-27
申请号	JP2002526935	申请日	2001-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	点击铁唐纳德在AW 大野 典也		
申请(专利权)人(译)	Kufe, 唐纳德W... 大野 典也		
[标]发明人	クフェドナルトダブリュー 大野典也		
发明人	クフェ, ドナルド ダブリュー. 大野 典也		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K45/06 A61P35/00 C07K14/47 C07K16/28 C07K16/30 C12N15/09 C12N15/11 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K16/3092 A61K38/00 A61K2039/505 C07K14/4727 C07K16/28 C07K16/30 C07K16/3015 C07K2317/34 C07K2317/74 C12N2310/111 C12N2310/14 C12N2310/53		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61K45/06 A61P35/00 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/02 C12N15/00.A C07K16/28		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR33 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR59 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS12 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA19 4C084/CA25 4C084/DC50 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB262 4C084/ZC022 4C084/ZC751 4C084/ZC752 4C085/AA13 4C085/AA14 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/231841 2000-09-11 US		
其他公开文献	JP5165175B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

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

