

(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2006-504630

(P2006-504630A)

(43) 公表日 平成18年2月9日(2006.2.9)

| (51) Int. Cl.                | F I               | テーマコード (参考)     |
|------------------------------|-------------------|-----------------|
| <b>CO7K 16/18 (2006.01)</b>  | CO7K 16/18 ZNA    | 2GO45           |
| <b>A61K 39/395 (2006.01)</b> | A61K 39/395 C     | 4BO24           |
| <b>A61P 35/00 (2006.01)</b>  | A61K 39/395 L     | 4BO64           |
| <b>A61P 35/04 (2006.01)</b>  | A61P 35/00        | 4CO85           |
| <b>CO7K 2/00 (2006.01)</b>   | A61P 35/04        | 4HO45           |
|                              | 審査請求 未請求 予備審査請求 有 | (全 74 頁) 最終頁に続く |

|               |                              |          |   |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号     | 特願2003-586171 (P2003-586171) | (71) 出願人 | 504326804<br>ダイアックス コーポレイション<br>アメリカ合衆国, 02139, マサチュー<br>セッツ州, ケンブリッジ, テクノロジー<br>スクエア 300番地 |
| (86) (22) 出願日 | 平成15年4月16日 (2003.4.16)       | (74) 代理人 | 100083806<br>弁理士 三好 秀和  |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成16年11月11日 (2004.11.11)     | (74) 代理人 | 100095500<br>弁理士 伊藤 正和  |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2003/011808            | (72) 発明者 | ホーゲンブーム、ヘンドリカス アール<br>. ジェイ. エム.<br>オランダ国 エイイー マーストリヒト<br>エヌエルー6214 ヘルトグシッゲル<br>46          |
| (87) 国際公開番号   | W02003/089451                |          |   |
| (87) 国際公開日    | 平成15年10月30日 (2003.10.30)     |          |   |
| (31) 優先権主張番号  | 60/374, 432                  |          |   |
| (32) 優先日      | 平成14年4月22日 (2002.4.22)       |          |   |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ムチンポリペプチドに特異的な抗体

## (57) 【要約】

MUC1 タンパク質の開裂の後に細胞表面上に残っているMUC1 細胞外断片上に存在する、MUC-H上のエピトープに特異的な、抗体およびペプチドリガンドを本明細書で記述している。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

s h e d M U C 1 上には存在しないが、M U C 1 の任意の細胞表面発現形態上で発現している、M U C 1 上のエピトープに特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 2】

s h e d M U C 1 上に存在しない、M U C 1 上の細胞表面エピトープに特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 3】

s h e d M U C 1 上には存在せず、全長非クリップ M U C 1 タンパク質の部分の場合の、M U C 1 - S t u b b l e 上に存在しない、M U C 1 上のエピトープに特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンド。

10

## 【請求項 4】

M U C 1 タンパク質の細胞外領域の C - 末端 6 5 アミノ酸に特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 5】

前記ポリペプチドリガンドが、M U C 1 タンパク質の V N T R 領域に結合しない、請求項 1 に記載の単離ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 6】

前記ポリペプチドリガンドが、ペプチドリガンドである、請求項 1 に記載の単離ポリペプチドリガンド。

20

## 【請求項 7】

前記ポリペプチドリガンドが、足場ペプチド、直鎖ペプチド、または環状ペプチドである、請求項 6 に記載の単離ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 8】

前記ポリペプチドリガンドが抗体である、請求項 1 に記載の単離ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 9】

前記抗体が、配列番号：2 からなるポリペプチドに特異的に結合する、請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 10】

前記抗体が、ヒト抗体である、請求項 8 に記載の抗体。

30

## 【請求項 11】

前記抗体が、原型免疫グロブリンである、請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 12】

前記抗体が、機能的部分と共役している、請求項 8 に記載の抗体。

## 【請求項 13】

前記機能的部分が、薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体である、請求項 12 に記載の抗体。

## 【請求項 14】

配列番号：2 に対する結合に関して、請求項 9 に記載の抗体と競合可能である、単離抗体。

40

## 【請求項 15】

配列番号：2 および配列番号：1 間の複合体に対する結合に関して、請求項 9 に記載の抗体と競合可能である、単離抗体。

## 【請求項 16】

前記抗体が、配列番号：2 の N - 末端 5 1 アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合する、請求項 9 に記載の抗体。

## 【請求項 17】

配列番号：2 からなるポリペプチドに特異的に結合する、単離非抗体ポリペプチドリガンド。

50

## 【請求項 18】

前記ポリペプチドリガンドが、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しない、請求項17に記載の単離非抗体ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 19】

前記リガンドが、配列番号：2の最初の51アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合する、請求項17に記載の単離非抗体ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 20】

前記ポリペプチドリガンドが、機能的部分に共役している、請求項17に記載の単離非抗体ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 21】

前記機能的部分が、薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体である、請求項17に記載の単離非抗体ポリペプチドリガンド。

## 【請求項 22】

試料中のMUC1-Hを検出する方法であって、

(a) 試料を提供すること、

(b) (a)の試料と、MUC1-Hを含むポリペプチドへ特異的に結合するポリペプチドリガンドを、前記ポリペプチドリガンドのMUC1-Hへの結合を許容する条件下で、接触させること、および

(c) 前記ポリペプチドリガンドの、試料中のMUC1-Hとの結合を検出し、この結合の検出が、試料中のMUC1-Hの存在を示唆すること、  
を含み、これによって試料中のMUC1-Hを検出する、方法。

## 【請求項 23】

MUC1-Hに特異的なポリペプチドリガンドを同定する方法であって、以下の

(a) 候補MUC1-H結合ポリペプチドを発現しているファージを含む、ファージライブラリーを提供すること、

(b) 前記ファージライブラリーを、MUC1-Hタンパク質と接触させること、および

(c) MUC1-Hタンパク質のファージへの結合を検出すること、

を含み、これによって、MUC1-Hに特異的なポリペプチドリガンドを同定する、方法。

## 【請求項 24】

細胞を殺す方法であって、以下の

(a) 細胞を提供すること、

(b) (a)の細胞と、MUC1-Hを含むポリペプチドに特異的に結合するポリペプチドリガンドを、前記ポリペプチドリガンドのMUC1-Hへの結合を許容する条件下で、接触させること、

を含み、これによって細胞を殺す方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(技術背景)

MUC1は、400kD以上の分子量を持つ、多くの上皮細胞、例えば乳房(breast)、卵巣、膀胱、肺の先端表面上に発現した、膜貫通型糖タンパク質である(Zotter, S.ら, (1988) Cancer Rev. 11-12: 56-101; Winterrford, C.M.ら(1999) J. Histochem. Cytochem. 47: 1063-74)。MUC1遺伝子は、クロモソーム1q21-24上に局在し(Swallow, D.M.ら(1987) Nature 328: 82-4)、7つのエキソンを含む(Lancaster, C.A.ら, (1990) Biochem. Biophys. Res. Commun. 173: 1019-29)。MUC1タンパク質は3つの部分、大きな細胞外領域、膜貫通領域(Ligtenberg, M.J.ら(1992) J. Biol. Chem. 267: 6171-7)、および細胞質テール、からな

10

20

30

40

50

る。このタンパク質は、2つの形態、膜糖タンパク質またはshed形態で存在しうる。タンパク質のshed形態への変換に際して、細胞外領域が、おそらく、カリクレイン様セリンプロテアーゼによって細胞表面で開裂され、膜の細胞外表面上の、短い「スタッブル(stubble)」タンパク質を後に残す。(V N T R (可変数タンデムリピート(Variable Number Tandem Repeat)領域)を含む領域を膜結合領域から外すための)細胞外領域の2つの予想される開裂部位は、Parryら(Parry, S.ら(2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 283:715-20)によって決定されたように、膜貫通領域上流の65および、おそらく52アミノ酸である。タンパク質分解部位はそれぞれ、配列FRPGとSVVVの間、および配列FREGとTINVの間である。このクリッピング(clipping)の後に、膜貫通部分と細胞外部分の間の連結があることが考えられるが、この連結は未知のままである(Parry, S.ら(2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 283:715-20)。shed細胞外MUC1は、開裂部位の後ろのN-末端部分である(Wreschner, D.H.ら(1990) Eur. J. Biochem. 189:463-73; Ligtenberg, M.J.ら(1992) J. Biol. Chem. 267:6171-6177)。細胞外部分は、可変数タンデムリピート(V N T R)領域をもち、その繰り返しの数は、個体間で異なり、北ヨーロッパ集団においては、21および125繰り返しの間で異なる(Gendler, S.J.(1990) J. Biol. Chem. 265:15286-15293)。

#### 【0002】

細胞外部分は、繰り返し領域の折りたたみによるロッド様(rod-like)の堅い立体構造を持ち、細胞膜の上方に200~500nm伸びている(Hilkens, J.(1992) Trends Biochem. Sci. 17:359-363)。MUC1タンデムリピートは、すべての繰り返しが、5つの潜在的なO型糖鎖付加部位を持つことから、非常に糖付加されており、MUC1の糖質含有量が50%以上である可能性がある(Gendler, S.J.(1990) J. Biol. Chem. 265:15286-15293; Muller, S.ら(1997) J. Biol. Chem. 272:24780-93; Patton, S.ら(1995) Biochem. Biophys. Acta 1241:407-23)。腫瘍細胞、例えば上皮の腺癌において、MUC1が過剰発現され、正常組織と比較して、異なった糖鎖付加がされ、新規の意味不明なペプチドおよび糖質エпитープ(epitope)をさらす。正常組織において、MUC1は、細胞の先端部位で発現され、一方、腫瘍組織においては、MUC1は、細胞全体で発現される。shed形態への開裂に際して、タンデムリピートを含む、MUC1の細胞外N-末端部位がshedされ、膜貫通C-末端部位を細胞表面に残す。MUC1のこのshed形態と、膜貫通領域および細胞内領域に結合した、残ったMUC1の細胞外領域(MUC1-Stubble)の間の推測される相互作用を経て、shed分子は、細胞表面上にしばしば残る可能性があるが、最終的に、未知の機構でshedされる。

#### 【0003】

MUC1タンパク質はまた、SEA領域(「ウニ精子タンパク質-エンテロキナーゼ-アグリ」(Sea urchin sperm protein-Enterokinase-Agrin)領域)も含む。このタンパク質および他のタンパク質において、この領域は、糖鎖構造を調節または結合すると提案されている(Bork, P.ら(1995) Protein Sci. 4:1421-5)。MUC1において、この領域はタンデムリピート領域の後に続き、この後に、膜貫通領域が続く。SEA領域が大きな細胞外断片上の糖鎖付加残基と相互作用し、従って、細胞表面上のMUC-1のshed形態を維持するのに役立つことが仮定されてきた。SEA領域内で、推定上のプロテアーゼ開裂部位がまだ存在する、つまり無傷なSEA領域(非クリップMUC1内の)なのか、あるいはMUC1のshed形態との相互作用に関連しうるSEA領域のクリップC-末端部分(MUC-Stubbleの一部として)かどうかは分かっていない。

## 【0004】

多くのMUC1タンパク質のスプライスバリエーション (splice variants) が単離されてきた。これらは、タンデムリピートを欠くスプライスバリエーションであり、従って、短いN-末端領域、SEA領域の大部分、膜貫通領域および細胞内領域からなる。これらには、MUC1/X、MUC1/X/alt、MUC1/Y、MUC1/Y/alt、MUC1/VおよびMUC1/V/altが含まれ、これらのタンパク質に対する抗体が作製された (Wreschner、国際特許第WO 96/03502号)。これらのタンパク質は、通常全長タンパク質で見られるタンデムリピートの配列が欠損している。MUC1/Yは、腫瘍に関連している (Baruch, A.ら (1997) Int. J. Cancer 71:741-9)。MUC1/Yは、MUC1に関して記述されたような酵素開裂部位では開裂しない。Hartmanら ((1999)、Int. J. Cancer 82:256-267) もまた、MUC1/Yタンパク質に対するモノクローナル抗体を示しており、ひとはMUC1の細胞外領域の30 N-末端アミノ酸と反応するもので、他方はMUC1の細胞外領域の14 C-末端アミノ酸に反応するものを含む。しかしながら、これらの抗体は、MUC1も認識するために、MUC1/Yまたはプロテアーゼ開裂後に細胞上に残っている細胞外領域いずれにも特異的ではない。

10

## 【0005】

タンデムリピートの腫瘍関連ペプチドエピトープに対する多くの抗体は、それぞれ特異的に上皮腫瘍に結合する。これらの抗体はまた、しばしば、血清MUC1に結合するが、常に同一の程度ではない (Norum, L. F.ら (1998) Tumour Biol 19 (Suppl 1):134-46)。タンデムリピートに対する抗体は異なる内在化 (internalization) 特性を持つ (Pietersz, G. A. (1997) Cancer Immunol. Immunother. 44:323-8)。MUC1のタンデムリピートに対する抗体およびペプチドは、放射免疫シンチグラフィ (radio immune scintigraphy) およびラジオイムノセラピー (radio immunotherapy) にて成功裡に使用されている。このような治療において、いくつかの抗MUC1抗体の効果は、患者の血清中のshed MUC1に対する抗体の結合によって妨害され、抗体を静脈注射した場合に、問題を引き起こす可能性がある。例えば、抗体の用量は、ほとんどの抗体が血清MUC1へ結合し、細胞MUC1への結合に有効な抗体を残さないようにしなければならない。さらに、多重エピトープを持つshed MUC1と、1つまたはそれ以上の結合部位を持つ抗体間の大きな免疫複合体の形成が、肝臓における複合体の蓄積、急速なクリアランス (clearance) およびこの変化した薬物動態学に関連する毒性副作用 (例えば血清病) を引き起こす可能性がある。抗体を、細胞毒性薬剤または放射アイソトープで標識した場合、そのような影響が、抗体の有効性に害を及ぼす可能性がある。

20

30

## 【0006】

従って、MUC1のshed形態を認識はしないが、細胞表面上のMUC1の残りの部分を認識する抗体は、これらの治療障害を引き起こすことがなく、優れた標的化薬剤である可能性がある。

## 【0007】

多くの抗MUC1抗体のもう一つの不利点は、これらが、細胞表面から比較的遠くに排除されるエピトープを標的としており、補体依存性細胞障害 (Complement-Dependent Cytotoxicity) のような天然の抗体仲介免疫エフェクター類 (antibody-mediated immune effectors) の有効性を減少させることである。従って、細胞表面により近く局在するMUC1エピトープに対する抗体を用いた腫瘍細胞の標的化が、その抗腫瘍細胞の有効性を劇的に増加させる。

40

## 【0008】

(本発明の概要)

本発明は、部分的に、本発明者らが、MUC1-Hとして一緒にグルーブ化してきた、

50

MUC1 関連エピトープに特異的に結合するポリペプチドリガンドを提供する。MUC1 - H に対する抗体は、MUC1 - s t u b b l e または可溶性 MUC1 と MUC1 - S t u b b l e 複合体間で形成される複合体に関連したエピトープを認識し、従って、s h e d MUC1 に対して同等の親和性での結合は欠く。MUC1 - H は、s h e d MUC1 上に存在しないが、MUC1 の任意の細胞表面発現形態上に存在するエピトープを含む。MUC1 - H はまた、全長、非クリップ MUC1 (または MUC1 の非クリップスプライスバリエーション) にて、隠れているが、MUC1 の特異的開裂の後、MUC1 の細胞表面結合残根上 (または MUC1 のスプライスバリエーション) にのみ現れるエピトープを含むことから、MUC1 - H ( i d d e n ( h i d d e n 「隠れる」 ) ) と名付けられている。さらに、MUC1 - H は、MUC - s t u b b l e (おそらく、MUC1 の選択的スプライシング形態から由来する) と結合したままである、MUC1 の s h e d 形態と、MUC - s t u b b l e それ自身間で形成されるようなエピトープを含み、このような立体的エピトープは、細胞表面結合 MUC1 上のみが存在し、血清 MUC1 上には存在しない可能性がある。MUC1 - H 上の隠れたエピトープのほとんどは、MUC1 の細胞外領域の C - 末端アミノ酸 (MUC - S t u b b l e) 内に基づいており、通常、非クリップ MUC1 または MUC1 のスプライスバリエーション上の該ポリペプチドリガンドによって検出可能ではない、この配列内で、直線または立体エピトープであり得る。MUC - S t u b b l e は、P a r r y らによって定義されたように、MUC1 の膜貫通領域上流の 65 または 52 アミノ酸からなり得るが、タンパク質のプロテアーゼ開裂の部位特異性に依存して、この領域内の他の N - 末端残基にて開始も可能である。例えば、このようなエピトープは、(例えば S E A 領域によってコードされた領域など) MUC1 の s h e d 形態との相互作用に関連する、MUC - S t u b b l e 上の領域を含みうる。そのようなエピトープが、s h e d MUC1 との相互作用によって、通常カバーされることを想定すると、後者の解離に際し、それらは露出されることになる。他の MUC1 - H エピトープは、S t u b b l e と s t u b b l e 自身の連結部において、クリッピングした後、MUC1 の N - 末端領域の複合化によって形成された立体構造的エピトープを含み、そのような場合に、配列は少なくとも MUC1 の細胞外領域の C - 末端 65 アミノ酸の部分を含みうる。MUC1 - H エピトープは、配列番号：2 にて列記したような、MUC1 - S t u b b l e の代表的な配列内の、直線または立体構造的配列によって形成されうる。「配列番号：2 へのリガンドの結合 ( B i n d i n g o f a l i g a n d t o 配列番号：2 )」は、配列番号：2 の全配列からなる任意のエピトープとのリガンドの相互作用のみでなく、N - 末端の他の開裂部位での開裂によって、より短くなる配列番号：2 の断片からなるエピトープとの相互作用も意味する。例えば、配列番号：2 の、第 14 残基で開始する、52 アミノ酸配列からなるエピトープも含まれる。好ましい実施形態において、ポリペプチドリガンドは、抗体である (この語句には、抗原結合断片が含まれる)。他の好ましい実施形態においては、ポリペプチドリガンドが、改変足場 ( m o d i f i e d s c a f f o l d ) ポリペプチドまたはペプチドである。また他の好ましい実施形態において、ペプチド (例えば、6 ~ 25 アミノ酸のポリペプチド) は、環状ペプチドまたは直鎖ペプチドである。ポリペプチドリガンドは、多重鎖タンパク質 (例えば少なくとも 2 つのペプチドまたはポリペプチドを含む) であり得る。多重鎖タンパク質の例は、抗体である。多くの実施例が、本明細書にて、抗体リガンドに関して開示されている一方で、本発明が、本明細書で提供する、任意のポリペプチドリガンド (例えば抗体および非抗体リガンド) を用いて実施可能であることが理解される。

#### 【0009】

本発明は、s h e d MUC1 上には存在しないが、MUC1 の任意の細胞表面発現形態上には存在する、MUC1 上のエピトープに特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンドを特徴とする。前記単離ポリペプチドリガンドは、ポリペプチドリガンドが、MUC1 タンパク質の V N T R 領域に結合しないようなものであり得る。ポリペプチドリガンドは、ペプチドリガンド、例えば足場 ( s c a f f o l d ) ペプチド、直線ペプチドまたは環状ペプチドであり得る。ポリペプチドリガンドは、抗体であり得る。抗体は、配列番号： 50

2、またはその断片（例えば配列番号：3）からなるポリペプチドに特異的に結合可能であり、または抗体は、そのような抗体と競合する抗体であり得る（例えば、配列番号：2またはその断片（例えば配列番号：3）への結合に関して競合する、または配列番号：2と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する、または、配列番号：3と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する）。抗体は、配列番号：2のN-末端51アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能であるか、または配列番号：2のN-末端38アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能である。抗体は、ヒト抗体または無傷の免疫グロブリンであり得る。抗体は、機能的部分、例えば薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体に共役可能である。

【0010】

本発明はまた、shed MUC1上には存在せず、全長非クリップMUC1タンパク質の部の場合に、MUC1-Stubble上に存在しない、MUC1上のエピトープに結合する、単離ポリペプチドリガンドも特徴とする。単離ポリペプチドリガンドは、前記ポリペプチドリガンドが、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しないようなものであり得る。ポリペプチドリガンドは、ペプチドリガンド、例えば足場ペプチド、直線リガンド、または環状リガンドであり得る。ポリペプチドリガンドは抗体であり得る。抗体は、配列番号：2、またはその断片（例えば配列番号：3）からなるポリペプチドに特異的に結合可能であり、または抗体は、そのような抗体と競合する抗体であり得る（例えば、配列番号：2またはその断片（例えば配列番号：3）への結合に関して競合する、または配列番号：2と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する、または、配列番号：3と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する）。抗体は、配列番号：2のN-末端51アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能であるか、または配列番号：2のN-末端38アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能である。抗体は、ヒト抗体または無傷の免疫グロブリンであり得る。抗体は、機能的部分、例えば薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体に共役可能である。

【0011】

本発明は、さらに、MUC1タンパク質の細胞外領域のC-末端65アミノ酸に特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンドを特徴とする。単離ポリペプチドリガンドは、前記ポリペプチドリガンドが、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しないようなものであり得る。ポリペプチドリガンドは、ペプチドリガンド、例えば足場ペプチド、直線リガンド、または環状リガンドであり得る。ポリペプチドリガンドは抗体であり得る。抗体は、配列番号：2、またはその断片（例えば配列番号：3）からなるポリペプチドに特異的に結合可能であり、または抗体は、そのような抗体と競合する抗体であり得る（例えば、配列番号：2またはその断片（例えば配列番号：3）への結合に関して競合する、または配列番号：2と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する、または、配列番号：3と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する）。抗体は、配列番号：2のN-末端51アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能であるか、または配列番号：2のN-末端38アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能である。抗体は、ヒト抗体または無傷の免疫グロブリンであり得る。抗体は、機能的部分、例えば薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体に共役可能である。

【0012】

さらなる態様において、本発明は、MUC1タンパク質の細胞外領域のC-末端52アミノ酸に特異的に結合する、単離ポリペプチドリガンドを特徴とする。単離ポリペプチドリガンドは、前記ポリペプチドリガンドが、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しないようなものであり得る。ポリペプチドリガンドは、ペプチドリガンド、例えば足場ペプチド、直線リガンド、または環状リガンドであり得る。ポリペプチドリガンドは抗体である。抗体は、配列番号：2、またはその断片（例えば配列番号：3）からなるポリペプチドに特異的に結合可能であり、または抗体は、そのような抗体と競合する抗体であり得る（例えば、配列番号：2またはその断片（例えば配列番号：3）への結合に関して競合する、または配列番号：2と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する、または

10

20

30

40

50

、配列番号：3と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する)。抗体は、配列番号：2のN-末端51アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能であるか、または配列番号：2のN-末端38アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能である。抗体は、ヒト抗体または無傷の免疫グロブリンであり得る。抗体は、機能的部分、例えば薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体に共役可能である。

【0013】

さらなる態様において、本発明は、配列番号：2またはその断片からなるポリペプチドに特異的に結合する、単離非抗体リガンドを特徴とする。単離ポリペプチドリガンドは、前記ポリペプチドリガンドが、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しないようなものであり得る。ポリペプチドリガンドは、ペプチドリガンド、例えば足場ペプチド、直線リガンド、または環状リガンドであり得る。ポリペプチドリガンドは抗体であり得る。抗体は、配列番号：2、またはその断片(例えば配列番号：3)からなるポリペプチドに特異的に結合可能であり、または抗体は、そのような抗体と競合する抗体であり得る(例えば、配列番号：2またはその断片(例えば配列番号：3)への結合に関して競合する、または配列番号：2と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する、または、配列番号：3と配列番号：1間の複合体への結合に関して競合する)。抗体は、配列番号：2のN-末端51アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能であるか、または配列番号：2のN-末端38アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合可能である。抗体は、ヒト抗体または無傷の免疫グロブリンであり得る。抗体は、機能的部分、例えば薬物、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体に共役可能である。

10

20

【0014】

他の態様において、本方法には、試料中のMUC1-Hを検出する方法を特徴とし、ここで、本発明は、(a)試料を提供すること、(b)(a)の試料と、MUC1-Hを含むポリペプチドに特異的に結合するポリペプチドリガンドを、前記ポリペプチドリガンドのMUC1-Hへの結合を許容する条件下で、接触させること、および(c)前記ポリペプチドリガンドの、試料中のMUC1-Hとの結合を検出し、この結合の検出が、試料中のMUC1-Hの存在を示唆すること、が含まれ、これによって、試料中のMUC1-Hを検出する。

【0015】

他の態様において、本発明は、MUC1-Hに対して特異的なポリペプチドリガンドを同定する方法を特徴とし、ここで、本方法には、(a)候補MUC1-H結合ポリペプチドを発現しているファージを含む、ファージライブラリーを提供すること、(b)前記ファージライブラリーを、MUC1-Hタンパク質と接触させること、および(c)MUC1-Hタンパク質のファージへの結合を検出すること、が含まれ、これによって、MUC1-Hに特異的なポリペプチドリガンドを同定する。

30

【0016】

さらなる態様において、本発明は、細胞を殺す方法を特徴とし、ここで、本方法には、(a)細胞を提供すること、(b)(a)の細胞と、MUC1-Hを含むポリペプチドに特異的に結合するポリペプチドリガンドを、前記ポリペプチドリガンドのMUC1-Hへの結合を許容する条件下で、接触させること、が含まれ、これによって細胞を殺す。

40

【0017】

「特異的に結合する(specifically binds)」により、ポリペプチドリガンドには、参考文献にて本明細書に組み込まれている、抗細胞質領域抗体である先行技術抗体、またはWreschner、国際特許第WO96/03502号に記載されたようなMUC/Z、MUC/X、Muc1/X/alt、MUC1/Y、MUC1/Y/alt、MUC1/V、MUC1/V/alt、MUC1/W、MUC1/W/alt、MUC1/ZまたはMUC1/Z/altに結合する抗体、または、Hartmanら、1999、Int. J. Cancer 82:256-267)にて記載された10D2/36抗体、Hilkensら(1998)Tumor Biol. 19(suppl 1):67-70)に記載のM29および232A抗体が含まれないことを意味する。M

50

U C 1 - H に対する抗体は、これらの公知の抗体によって認識される構造を認識しない。これらの公知の抗体は、s t u b b l e 配列内と同様に、原型 M U C 1 または全長 M U C 1 / Y 内に存在するエピトープに結合する。本発明の抗体は、これらの抗体によって定義されたエピトープを認識しない。

【0018】

W r e s c h n e r および H a r t m a n らの先行技術抗体は、少なくとも以下の配列、M U C 1 タンパク質（配列番号：1）、M U C 1 / X タンパク質（配列番号：3）、M U C 1 / X / a l t タンパク質（配列番号：4）、M U C 1 / Y （配列番号：5）、M U C 1 / Y / a l t タンパク質（配列番号：6）、M U C 1 / V タンパク質（配列番号：7）、M U C 1 / V / a l t タンパク質（配列番号：8）の1つに結合する。

10

【0019】

好ましい実施形態において、ポリペプチドリガンドは、M U C 1 タンパク質、または s h e d M U C 1 タンパク質の V N T R 領域に結合しない。

【0020】

本発明は、M U C 1 タンパク質の細胞外領域の C - 末端 6 5 アミノ酸または C - 末端 5 2 アミノ酸内の、M U C 1 - H エピトープに特異的に結合する、精製ポリペプチドリガンドを特徴とする。好ましくは、このリガンドは、M U C 1 タンパク質の V N T R 領域には結合しない。このリガンドは、プロテアーゼによる V N T R 領域の解離後のみ、本配列内のエピトープを認識する。

【0021】

本発明はまた、配列番号：2 からなるポリペプチドに特異的に結合する精製抗体、また、配列番号：2 への結合に関してそのような抗体と競合可能である、精製第二抗体をも特徴とする。本発明はまた、全長 M U C 1 の s h e d 形態の開裂によって現れる立体的エピトープからなるポリペプチドに特異的に結合するが、M U C 1 の s h e d 形態からなるポリペプチドに結合しない、精製抗体も特徴とする。本発明はまた、配列番号：1（M U C 1 配列）および配列番号：2 からの寄与での、立体的エピトープからなるペプチドに特異的に結合するが、配列番号：1 からなるポリペプチドには結合しない、精製抗体も特徴とする。本発明はまた、配列番号：2 に結合することに関して、上記抗体と競合可能である、精製第二抗体も特徴とする。他の抗体と競合可能である抗体、の関連で「競合する（c o m p e t e w i t h）」は、細胞結合フローサイトメトリック（f l o w c y t o m e t r i c）解析にて、または特定の試験（例えば、E L I S A、R I A など）において、10 ~ 100 倍モル過剰（m o l a r e x c e s s）で使用した場合に、少なくとも 50 %、M U C 1 - H 特異的抗体の結合を減少可能であることを意味する。

20

30

【0022】

本発明はまた、配列番号：2 の最初の 5 1 アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合する精製抗体を特徴とし、また、配列番号：2 の最初の 5 1 アミノ酸からなるポリペプチドのエピトープに特異的に結合する精製抗体をも特徴とする。本発明はまた、配列番号：1 および配列番号：2 からなる寄与での、立体的エピトープからなるポリペプチドに特異的に結合するが、配列番号：1 からなるポリペプチドには結合しない、精製抗体を特徴とし、また、配列番号：2 の最初の 5 1 アミノ酸への結合に関して、そのような抗体と競合可能な精製第二抗体をも特徴とする。

40

【0023】

本発明はまた、配列番号：2 からなるポリペプチドに特異的に結合し、好ましくは、M U C 1 タンパク質の V N T R 領域に結合しない、単離非抗体ペプチドを特徴とする。本発明はまた、配列番号：2 からなるポリペプチドに特異的に結合する単離非抗体ペプチド、およびまた、配列番号：2 への結合に関して、そのようなペプチドと競合可能な精製第二非抗体ペプチドを特徴とする。本発明はまた、全長 M U C 1 の s h e d 形態の開裂によって現れた、立体的エピトープからなるポリペプチドに特異的に結合するが、M U C 1 の s h e d 形態からなるポリペプチドには結合しない、精製非抗体ペプチドも特徴とする。本発明はまた、配列番号：1（M U C 1 配列）および配列番号：2 からなる寄与での、立体的

50

的エピトープからなるポリペプチドに特異的に結合するが、配列番号：1からなるポリペプチドには結合しない、精製非抗体ペプチドを特徴とする。本発明はまた、配列番号：2への結合に関して、上記抗体およびペプチドと競合可能である、精製第二非抗体ペプチドも特徴とする。

**【0024】**

本発明はまた、MUC1タンパク質のC-末端領域に特異的に結合する、精製ポリペプチドも特徴とし、そこで、前記ポリペプチドは、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しない。本発明はまた、MUC1-Hタンパク質に特異的に結合する精製ポリペプチドを特徴とし、そこで、前記ポリペプチドは、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しない。本発明はまた、配列番号：2の最初の51または38アミノ酸からなるポリペプチドに特異的に結合する精製ポリペプチドも特徴とする。本発明はまた、配列番号：1（MUC1配列）および配列番号：2からの寄与での、立体的エピトープからなるポリペプチドに特異的に結合するが、配列番号：1からなるポリペプチドには結合しない、精製ポリペプチドを特徴とし、前記ポリペプチドは、MUC1タンパク質のVNT R領域に結合しない。本発明はまた、配列番号：2の最初の51アミノ酸からなるポリペプチドのエピトープに特異的に結合する、精製ポリペプチドを特徴とし、また、配列番号：2の最初の51または38アミノ酸への結合に関して、そのようなポリペプチドと競合可能な、精製第二ポリペプチドも特徴とする。

10

**【0025】**

他の態様において、本発明は、試料中のMUC1-Hを検出する方法を特徴とし、本方法は、(a)試料を提供すること、(b)(a)の試料と、配列番号：2を含むポリペプチドに特異的に結合するポリペプチドリガンドを、前記ポリペプチドリガンドのMUC1-Hへの結合を許容する条件下で、接触させること、および(c)前記ポリペプチドリガンドの、試料中のMUC1-Hとの結合を検出し、この結合の検出が、試料中のMUC1-Hの存在を示唆すること、が含まれ、これによって、試料中のMUC1-Hを検出する。試料中にて検出したMUC1-Hは遊離しているか、生物学的要素、例えば細胞またはファージに付着してよく、そこでエピトープとして提示されうる。

20

**【0026】**

本発明はまた、MUC1-Hに特異的なポリペプチドリガンドを同定する方法も特徴とし、(a)候補MUC1-H結合ポリペプチドを発現しているファージを含む、ファージライブラリーを提供すること、(b)前記ファージライブラリーを、MUC1-Hタンパク質と接触させること、および(c)MUC1-Hタンパク質のファージへの結合を検出すること、が含まれ、これによって、MUC1-Hに特異的なポリペプチドリガンドを同定する。試料中にて検出したMUC1-Hは遊離しているか、生物学的要素、例えば細胞またはファージに付着してよく、そこでエピトープとして提示されうる。

30

**【0027】**

本発明はまた、MUC1-またはMUC1-H-含有細胞を、細胞と、本発明にしたがったポリペプチドリガンドとを、細胞削除を許容する条件下で接触させることによって、削除または殺害する方法も特徴とする。好ましくは、本方法は、*in vitro*または*ex vivo*で実施する。

40

**【0028】**

本発明のポリペプチドリガンドは、ペプチドリガンド、例えば足場ペプチド、直線ペプチドまたは環状ペプチドであり得る。ポリペプチドリガンドは抗体であり得る。抗体は、ヒト抗体、キメラ抗体、組換え型抗体、ヒト化抗体、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体であり得る。抗体は、無傷の免疫グロブリン、例えばIgA、IgG、IgE、IgD、IgMまたはこれらのサブタイプであり得る。抗体は、第二の異なるポリペプチド、治療薬剤、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体であり得る、機能的部位（例えば、生物学的または化学的機能を持つ化合物）に共役可能である。

**【0029】**

本発明のポリペプチドリガンドは、機能的部位、例えば、第二の異なるポリペプチド、

50

治療薬剤、細胞毒性薬剤、検出可能部位または固体支持体に共役可能である。

【0030】

「MUC1タンパク質(MUC1 protein)」は、全長、多様型、高分子量糖タンパク質を意味し、通常、分泌上皮細胞によって発現されるが、悪性乳上皮細胞においては、豊富に発現され、非悪性細胞によって発現されている場合には、O型糖結合糖側鎖によって、異なって糖付加される傾向にあり、正常のムチン様の特徴を履行している。MUC1遺伝子産物は、大きな細胞外領域、膜貫通領域および細胞質テールを含む、膜貫通タンパク質である。細胞外領域は、数の上で約20~約100繰り返しで変動する、20アミノ酸繰り返しモチーフでの可変数タンデムリピート(VNTR)領域を含む。そのようなMUC1タンパク質の1つは、配列番号：1にて示されている。

10

【0031】

「MUC1-H」タンパク質は、MUC1ポリペプチド上に発見されたエピトープの集団を意味し、MUC1の開裂の後に、細胞表面上に残っているMUC1-タンパク質またはタンパク質の誘導体内に存在し、shed MUC1上、または全長非クリップMUC1上で存在せず、そして、異なる。エピトープは、MUC-1 Stubble内、またはこれによって部分的に形成されるものを基準としうる。エピトープは、開裂が起こった後、またはMUC1のクリップN-末端領域が細胞表面上から離れた後のみで、露出されうる。MUC1-Hに相当する代表的なエピトープは、配列番号：2にて、または配列番号：2およびMUC1のクリップ形態によって形成された複合体にて、または配列番号：2および配列番号：1によって形成された複合体にて存在しうる。

20

【0032】

「MUC1/X」は、配列番号：3で示したような、MUC1タンパク質のスプライスバリエーションを意味する。同様に、「MUC1/X/alt」(配列番号：4)、「MUC1/Y」(配列番号：5)、「MUC1/Y/alt」(配列番号：6)、「MUC1/V」(配列番号：7)および「MUC1/V/alt」(配列番号：8)もまた、MUC1タンパク質のスプライスバリエーションである。

【0033】

「VNTR領域(VNTR region)」または同義語「タンデムリピート配列(tandem repeat array)」は、可変数のタンデムリピートを持つ全長MUC1タンパク質の領域を意味する。繰り返しユニットは、一般的に、繰り返し間で多少のばらつきがあるが、20アミノ酸タンデムリピートユニットPDTRPAPGSTAPP AHGV TSAである。明確な繰り返しの数は、固体間で異なり、北ヨーロッパ集団においては、21と125繰り返しの間で異なりうる(Gendler, S. J. (1990) J. Biol. Chem. 265:15286-15293)。

30

【0034】

本明細書で使用するところの、「エピトープ(epitope)」または「抗原決定基(antigenic determinant)」は、MUC1-Hに結合している特定のポリペプチドリガンドと接触する分子の部分の意味する。タンパク質またはタンパク質の断片を、宿主を免疫化するために使用する場合、タンパク質の多くの領域は、タンパク質上の該領域または三次元構造に特異的に結合する抗体の産出を誘導し得、これらの領域または構造が、エピトープまたは抗原決定基として呼ばれる。エピトープまたは抗原決定基は、抗体への結合に関して、本来の抗原(すなわち、免疫応答を誘発するために使用する免疫原)と競合しうる。エピトープは、抗原からの直線配列を本質的に含む、直線、または他の配列によって遺伝子的に分散されているが、ポリペプチドリガンドに対する結合部位にて構造的に一緒に存在する配列を含む立体構造的であり得る。

40

【0035】

抗MUC1-Hリガンドは、高い親和性および特異性で、ヒトMUC1-Hに結合し、従って、診断、予防または治療薬剤として、in vivoおよびin vitroによって使用されうる。好ましくは、リガンドはMUC1-Hに特異的に結合する。本明細書で使用するところの、「特異的に結合する(specific binding)」は、

50

抗体の特性、つまり(1) MUC1-H、例えばヒトMUC1-Hに、少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ の親和性で、好ましく結合する、および(2) MUC1-H以外の非特異的抗原(例えばBSA、カゼイン)に対する結合に関するその親和力よりも、少なくとも2倍、50倍、100倍またはそれ以上である親和性で、MUC1-H、例えばヒトMUC1-Hに好ましく結合する、抗体の特徴を意味する。

#### 【0036】

従って、本発明は、抗MUC1-H抗体、抗体断片、およびその薬理的組成物、ならびにそのような抗体および断片を作製するための核酸、組換え体発現ベクターおよび宿主細胞を提供する。in vitroまたはin vivoいずれかで、MUC1-Hを検出するため、またはMUC1-H発現細胞、例えばMUC1-H発現癌細胞を削除または殺傷するために、本発明の抗体を使用する方法もまた、本発明に含まれる。「削除または殺傷(ablate or kill)」は、細胞が破壊されるまたは非機能的になること、すなわち細胞が完全に破壊されるか、さらなる分裂が不可能になる、または他の細胞の分化のシグナリングが完全に破壊されうることの意味する。

10

#### 【0037】

本発明のポリペプチドリガンドは、例えば高い親和性および特異性にて、MUC1-H、好ましくはヒトMUC1-Hと結合して、相互に作用する。例えば、ポリペプチドリガンドは、少なくとも $10^7 M^{-1}$ 、好ましくは少なくとも $10^8 M^{-1}$ 、 $10^9 M^{-1}$ または $10^{10} M^{-1}$ の親和定数で、ヒトMUC1-Hに結合する。好ましくは、ポリペプチドリガンドは、例えば細胞外MUC1-H、またはMUC1タンパク質の「stubble」部分、もっとも好ましくは、細胞外MUC1-H、またはヒトMUC1タンパク質の「stubble」部分(例えば配列番号: 2)と結合して、相互に作用する。

20

#### 【0038】

1つの実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、本明細書で記述した抗体のエピトープのすべてまたは部分に結合する。抗MUC1-Hリガンドは、本明細書で記述した抗体の、ヒトMUC1-Hへの結合を、障害、例えば競合的に障害可能である。抗MUC1-Hリガンドは、エピトープ、例えば立体構造的または直線エピトープに結合し得、結合した時にエピトープは、本明細書で記述した抗体の結合を防止する。エピトープは、空間的または機能関連的に非常に近くにあり、例えば直線配列で、または抗体によって認識されたものに対し、構造的に、重複した、または隣接したエピトープがある。1つの実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、ヒトMUC1(配列番号: 1)の約アミノ酸253から約アミノ酸382の領域内で、全体として、または部分的に局在するエピトープに結合する。好ましくは、エピトープには、ヒトMUC1のSEA領域の少なくとも一部分及び/又はMUC1ポリペプチド上に見つめられたエピトープの集まりが含まれ、MUC1ポリペプチドはMUC1-タンパク質またはMUC1の開裂の後に細胞表面上に残ったタンパク質の誘導体内に存在し、shed MUC1上または全長非クリップMUC1上に存在しない、stubble内の領域を認識する、抗体6D3/12、10D2/36、232AまたはM29によって規定されるエピトープと異なる。MUC1ポリペプチド上に見られたエピトープの集団が含まれる。そのようなエピトープは、MUC-1 Stubble内に基づくか、部分的にそれによって形成されうる。エピトープは、開裂が起こった後、またはMUC1のクリップN-末端領域が細胞表面より解離した後にのみ露出されうる。MUC1-Hに相当する典型的なエピトープは、配列番号: 2、または配列番号: 2および配列番号: 1によって形成された複合体に存在しうる。

30

40

#### 【0039】

ヒトMUC1-Hを含むエピトープは、上皮細胞上および多くの腫瘍細胞上で発現される。本発明の抗体は、これらの細胞の細胞表面、とりわけ生細胞の細胞表面に結合する。腫瘍細胞の相異なる遺伝的および構造的構成が、正常上皮細胞に優先して、特定の腫瘍細胞または腫瘍細胞のごく一部でのMUC1-Hエピトープの露出を導きうる。とりわけ腫瘍において、より高いMUC1発現レベル、異なったプロテアーゼ発現スペクトル、糖付加の異なった量および性質によって、及び/又は改変タンパク質分解開裂パターンおよび

50

非極性発現パターンによって引き起こされる可能性がある。V N T R エピトープと比較して、より細胞表面に近い M U C 1 - H の存在で、抗 V N T R 抗体で見られたものより強い抗体 F c 仲介抗腫瘍細胞活性を引き起こすことが予想される。好ましくは、本発明のポリペプチドリガンドもまた、M U C 1 - H と内在化し、抗体、例えば、細胞毒性または標識薬剤と競合する薬剤の細胞内伝達を許容する。従って、本発明のポリペプチドリガンドは、M U C 1 - H タンパク質を発現する、生正常、良性増殖性、および癌性細胞を標的化するために使用可能である。そのような内在化は、結合 M U C 1 タンパク質バリエーションの天然の内在化に基づいてよく、またはポリペプチドリガンド上に提供されるシグナルによって、増強または産出されうる。

#### 【0040】

好ましい実施形態において、ポリペプチドリガンドは抗体である。本明細書で使用するところの、語句「抗体 ( a n t i b o d y ) 」は、少なくとも1つ、好ましくは2つの、重 ( H ) 鎖可変領域 ( 本明細書では V H と略す )、および少なくとも1つ、好ましくは2つの軽 ( L ) 鎖可変領域 ( 本明細書では V L と略す ) を含むタンパク質を示す。V H および V L 領域はさらに、語句「相補性決定領域 ( c o m p l e m e n t a r i t y d e t e r m i n i n g r e g i o n s ) 」(「C D R」) と呼ぶ超可変の領域にさらに分けられ、語句「フレームワーク領域 ( f r a m e w o r k r e g i o n s ) 」( F R ) の、より保存された領域が分散する。フレームワーク領域および C D R の程度は、正確に規定されてきた ( 全体として、参考文献を本明細書に組み込んだ。K a b a t , E . A . ら ( 1 9 9 1 ) S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , F i f t h E d i t i o n , U . S . 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 s , N I H P u b l i c a t i o n N o . 9 1 - 3 2 4 2 ; C h o t h i a , C . ら ( 1 9 8 7 ) J . M o l . B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 を参照のこと )。それぞれの V H および V L は、3つの C D R および 4つの F R からなり、以下の順番、F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4 で、アミノ末端からカルボキシ末端まで並ぶ。

#### 【0041】

抗体の V H または V L 鎖はさらに、すべてのまたは一部の重または軽鎖定常領域を含みえ、これによって、それぞれ重または軽免疫グロブリン鎖を形成し得る。1つの実施形態において、抗体は、2つの重免疫グロブリン鎖および2つの軽免疫グロブリン鎖の四量体であり、そこで、重および軽免疫グロブリン鎖は、例えばジスルフィド結合によって内部連結する。重鎖定常領域は、3つの領域、C H 1、C H 2 および C H 3 からなる。軽鎖定常領域は、1つの領域、C L からなる。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合領域を含む。抗体の定常領域は、典型的には、免疫系の種々の細胞 ( 例えばエフェクター ( e f f e c t o r ) 細胞 ) および古典的補体型の第一補体 ( C 1 q ) を含む、宿主組織または因子への結合を仲介する。語句「抗体」は、I g A、I g G、I g E、I g D、I g M ( ならびにそのサブタイプ ) の本来の免疫グロブリンを含み、そこで免疫グロブリンの軽鎖は、カッパまたはラムダ型であり得る。

#### 【0042】

本明細書で使用するところの、語句「免疫グロブリン ( i m m u n o g l o b u l i n ) 」は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にコードされている、1つまたはそれ以上のポリペプチドからなるタンパク質を意味する。認識されたヒト免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ ( I g A 1 および I g A 2 )、ガンマ ( I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 )、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。全長免疫グロブリン「軽鎖 ( l i g h t c h a i n ) 」( 約 2 5 K d または 2 1 4 アミノ酸 ) は、N H 2 末端における可変領域遺伝子 ( 約 1 1 0 アミノ酸 ) および C O O H - 末端におけるカッパまたはラムダ定常領域遺伝子によってコードされている。全長免疫グロブリン「重鎖 ( h e a v y c h a i n ) 」( 約 5 0 k D または 4 4 6 アミノ酸 ) は同様に、可変領域遺伝子 ( 約 1 1 6 アミノ酸 ) および他の上記の定常領域遺伝子の1つ、例えばガンマ ( 約 3 3 0 アミノ酸をコード

10

20

30

40

50

している)によってコードされている。

【0043】

語句「抗体」はまた、抗体の抗原結合断片を含む。本明細書で記載するところの語句、抗体の「抗原結合断片(antigen-binding fragment)」(または単に「抗体部分(antibody portion)」または「断片(fragment)」)は、MUC1-H(例えばヒトMUC1-H)に特異的に結合する能力を保持した、全長抗体の1つまたはそれ以上の断片を意味する。語句、抗体の「抗原結合断片」内に含まれる結合断片の例には、(i)Fab断片、VL、VH、CLおよびCH1領域からなる一価断片、(ii)F(ab')<sub>2</sub>断片、ヒンジ領域にて、ジスルフィド架橋によって結合した2つのFab断片を含む二価断片、(iii)VHおよびCH1領域からなるFd断片、(iv)抗体の単一腕のVLおよびVH領域からなるFv断片、(v)VH領域からなる、dAb断片(Wardら,(1989)Nature 341:544-546)、および(vi)単離相補性決定領域(CDR)が含まれる。さらに、Fv断片の2つの領域、VLおよびVHは、分離した遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え法を用い、VLおよびVH領域が一価分子(単鎖Fv(scFv))として知られる:例えば、Birdら(1988)Science 242:423-426;およびHoustonら(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883を参照のこと)を形成するようになってできる、単一タンパク質鎖として作成可能である合成リンカーによって、結合可能である。そのような単鎖抗体もまた、語句、抗体の「抗原結合断片」内に含まれることが意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、これらの断片は、本来の抗体と同様の様式での使用のために選別される。

10

20

【0044】

抗体は好ましくは、単一特異的、例えばモノクローナル抗体、またはその抗原結合断片である。語句「単一特異的抗体(monospecific antibody)」は、特定の標的、例えばエピトープに対する、単一の結合特異性および親和性を表す抗体を意味する。この語句には、本明細書で使用されるところの、単一分子組成物の、その抗体または断片の調製物を意味する、「モノクローナル抗体(monoclonal antibody)」または「モノクローナル抗体組成物(monoclonal antibody composition)」が含まれる。

30

【0045】

抗MUC1-H抗体は、全長(例えば、IgG(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(例えばIgA1、IgA2)、IgDおよびIgE、ただし好ましくはIgG)でありえ、または抗原結合断片(例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、またはscFv断片)のみを含みうる。抗体またはその抗原結合断片には、2つの重鎖免疫グロブリンおよび2つの軽鎖免疫グロブリンが含まれ得、または単鎖抗体であり得る。抗体は、任意に、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンまたはミュー定常領域遺伝子から選択された定常領域を含み得る。好ましい抗MUC1-H抗体には、本質的にヒト抗体、例えばヒトIgG1定常領域またはその一部からの重および軽鎖定常領域が含まれる。本明細書で使用するところの、「アイソタイプ(isotype)」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされている、抗体クラス(例えばIgMまたはIgG1)を意味する。

40

【0046】

好ましい実施形態において、抗体(またはその断片)は、組換え体または改変抗MUC1-H抗体、例えば、キメラ、ヒト化、脱免疫化、またはin vitro合成抗体である。本明細書で使用するところの語句「組換え体(recombinant)」または「改変(modified)」ヒト抗体は、宿主細胞内にトランスフェクト(transfected)した組換え体発現ベクターを用いて発現した抗体、組換え体より単離した抗体、コンビナトリアル(combinatorial)抗体ライブラリー、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックである動物(例えばマウス)から単離した抗体のよ

50

うな、組換え体方法によって調製、発現、作製または単離するすべての抗体、または他のDNA配列へ、ヒト免疫グロブリン遺伝子配列をスプライシングすることを含む、他の任意の方法によって調製、発現、調製または単離した抗体を含むことが意図される。そのような組換え体抗体には、ヒト化、CDR移植、キメラ、脱免疫化、*in vitro*合成抗体を含み、任意に、ヒト生殖細胞系列免疫グロブリン配列から由来した、定常領域が含まれる。

【0047】

また、本発明の範囲内は、重複したエピトープと結合するまたは競合的に阻害する抗体、またはその抗原結合断片、および抗MUC1-H抗体、例えば重複したエピトープと結合または競合的に阻害する抗体の本明細書で開示したMUC1-Hへの結合、単一特異的抗体のMUC1-Hへの結合である。抗MUC1-H抗体の任意の組み合わせが、本発明の範囲内であり、例えば、MUC1-Hの異なる領域へ結合する2つまたはそれ以上の抗体、例えばMUC1-H上の2つの異なるエピトープに結合する抗体、例えば二重特異性抗体が範囲内である。

10

【0048】

1つの実施形態において、抗MUC1-H抗体またはその抗原結合断片には、少なくとも1つの軽または重鎖免疫グロブリン（または好ましくは、少なくとも1つの軽鎖免疫グロブリンと、少なくとも1つの重鎖免疫グロブリン）が含まれる。好ましくは、それぞれの免疫グロブリンには、本質的に、それぞれ抗MUC1-H軽または重鎖可変領域からのCDRと同一の、少なくとも1つ、2つ、および好ましくは3つの相補性決定領域（CDR's）をもつ、軽または重鎖可変領域が含まれる。

20

【0049】

他の実施形態において、抗MUC1-H抗体、またはその抗原結合断片の、軽または重鎖可変フレームワーク（*framework*）には、ヒト軽または重鎖可変フレームワークからの、例えば、ヒト成熟抗原、ヒト生殖細胞系列配列またはコンセンサス配列からの軽または重鎖可変フレームワーク残基からの、少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、15、16または17のアミノ酸残基が含まれる。1つの実施形態において、ヒト軽鎖可変フレームワークからのアミノ酸残基は、ヒト生殖細胞系列において、同一の位置で見られた残基と同一である。好ましくは、ヒト軽鎖可変フレームワークからのアミノ酸残基が、同一の位置における、ヒト生殖細胞系列にて、もつとも共通の残基である。

30

【0050】

本明細書に記述の抗MUC1-Hリガンドは、そのみで使用可能であり、例えば、対象に投与可能であり、非誘導体形態または非共役形態で*in vitro*で使用可能である。他の実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、誘導体化、改変、または他の機能的分子、例えば他のペプチド、タンパク質、アイソトープ、細胞または不溶性支持体に連結可能である。例えば、抗MUC1-Hリガンドは、抗体（例えば、もしリガンドが、二重特異性または多重特異性抗体を形成するための抗体の場合）、毒素、放射性同位体、治療的（例えば細胞毒性または細胞増殖抑制性）薬剤または特に一部分などの、1つまたはそれ以上の他の分子の存在に機能的に連結可能である。例えば、抗MUC1-Hリガンドは、放射活性イオン（例えば、 $^{125}\text{I}$ または $^{125}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ または $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ または $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{225}\text{Ac}$ または $^{225}\text{Ac}$ 、 $^{186}\text{Re}$ または $^{186}\text{Re}$ 、または $^{212}\text{Bi}$ または $^{212}\text{Bi}$ ）に連結可能である。

40

【0051】

他の態様において、本発明は、組成物、例えば、薬理的に許容可能な担体、賦形剤または安定剤、および少なくとも1つの本明細書で記述の抗MUC1-Hリガンド（例えば、抗体またはその断片）を含む、薬理的組成物を提供する。1つの実施形態において、組成物、例えば薬理的組成物には、2つまたはそれ以上の、前述の抗MUC1-Hリガンドの連結が含まれる。

50

## 【 0 0 5 2 】

他の態様において、本発明は、単独または他の治療的併用、例えば細胞毒性薬剤または標識化薬剤、例えば、本明細書で記載の細胞毒性薬剤または標識化薬剤との組み合わせでの使用のための、抗MUC1-H抗体（またはその断片）、例えば、本明細書で記載の抗MUC1-H抗体（またはその断片）を含む、癌障害を処置、予防、または検出するための、MUC1-H抗体またはそのような薬剤の組み合わせをどのように使用するかの説明書も含む、キットを特徴とする。

## 【 0 0 5 3 】

本発明はまた、本明細書で記述の、重鎖および軽鎖免疫グロブリンまたは免疫グロブリン断片をコードしている核酸配列も特徴とする。例えば、本発明は、本明細書に記述の抗MUC1-H抗体分子の、それぞれ重鎖および軽鎖可変領域をコードしている第一および第二核酸を特徴とする。他の態様において、本発明は、本発明の核酸を含む、宿主細胞およびベクターを特徴とする。

10

## 【 0 0 5 4 】

他の態様において、本発明は、抗MUC1-H抗体、またはその抗原結合断片を産出する方法を特徴とする。本方法には、重鎖可変領域、例えば本明細書で記載の重鎖可変領域をコードしている第一核酸を提供すること、軽鎖可変領域、例えば本明細書で記載の軽鎖可変領域をコードしている第二核酸を提供すること、および抗原結合タンパク質を形成するための、前記軽および重鎖可変領域のアセンブルを許容する条件下で、宿主細胞内で、第一および第二核酸を発現させること、が含まれる。第一および第二核酸は、連結または非連結可能であり、例えば、それぞれ同一または異なるベクター上に発現可能である。

20

## 【 0 0 5 5 】

宿主細胞は、真核細胞、例えば、哺乳類細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または原核細胞、例えば大腸菌（*E. coli*）であり得る。例えば、哺乳類細胞は、培養細胞または細胞株であり得る。具体例としての哺乳類細胞は、リンパ球細胞株（例えばNSO）、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞（CHO）、COS細胞、卵母細胞、形質転換動物からの細胞、例えば乳房上皮細胞が含まれる。例えば、本明細書で記述の抗体をコードしている核酸は、形質転換動物内で発現可能である。1つの実施形態において、核酸を、組織特異的プロモーター（例えば、乳房特異的プロモーター）の制御下におき、抗体を、形質転換動物内に産出する。例えば、抗体分子を、形質転換ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギまたは齧歯類のような形質転換動物の乳内にて分泌させる。

30

## 【 0 0 5 6 】

本発明はまた、細胞、例えば正常、良性または増殖性細胞（例えば、肺、乳房、腎臓、尿路上皮、大腸、前立腺または肝臓癌及び/又は転移）のような細胞を、治療、例えば削除または殺傷する方法も特徴とする。本発明の方法には、細胞を治療、例えば削除または殺傷するために必要な量で、細胞を抗MUC1-Hリガンドと接触させることが含まれる。リガンドには、細胞毒性実在物が含まれる。本発明の方法は、例えば、疾病、例えば癌（例えば悪性または転移性疾病）または非癌性疾病（例えば、良性または増殖性疾病）を、そのような疾病を治療または予防するのに効果的な量で、抗MUC1-Hリガンドを対象に投与することによって治療または阻止するために使用可能である。

40

## 【 0 0 5 7 】

目的の方法は、培養中の細胞上、例えば*in vitro*または*ex vivo*で使用可能である。例えば、癌性または転移性細胞（例えば肺、乳房、腎臓、尿路上皮、大腸、前立腺、肺癌または転移細胞）を、培養培地中で、*in vitro*にて培養可能であり、接触段階が、抗MUC1-Hリガンドを培養培地に加えることによって達成される。本方法は、*in vivo*（例えば治療的または予防的）プロトコールの一部として、対象中に存在する細胞（例えば癌性または転移細胞）上で実施可能である。*in vivo*実施形態に関して、接触段階が、対象中で達成され、リガンドが細胞へ結合し、細胞を治療、例えば殺傷または削除すること両方を許容するのに効果的な条件下で、抗MUC1-Hリガンドを対象に投与することが含まれる。

50

## 【0058】

本発明の方法は、例えば、固形腫瘍、軟組織腫瘍、転移性障害を限定はしないが含む、癌性疾患を治療または阻止するために使用可能である。固形腫瘍の例には、影響を受ける肺、乳房、リンパ、胃腸管（例えば大腸）、および性尿器管（例えば腎臓、尿路上皮細胞）咽頭に影響を及ぼすような多種の臓器系の、悪性腫瘍、例えばサルコーマ、腺癌およびカルシノーマ、ならびにほとんどの大腸癌、腎臓癌、腎臓細胞カルシノーマ、肝臓癌、肺の非小細胞カルシノーマ、小腸の癌および咽頭の癌のような悪性腫瘍を含む腺癌が含まれる。上述した癌の転移性障害もまた、本発明の方法および組成物を用いて治療または阻止可能である。

## 【0059】

対象は、哺乳類、例えば霊長類、好ましくはより高次の霊長類、例えばヒト（例えば、本明細書で記述した疾病、例えば癌を患っているか、そのリスクのある患者）であり得る。

## 【0060】

抗MUC1-H抗体またはその断片、例えば本明細書で記述したような、抗MUC1-H抗体またはその断片は、全身に（例えば経口、非経口、皮下、静脈内、筋肉内、腹膜内、鼻腔内、経粘膜、または吸入によって）、局所に、または鼻、のどおよび気管支管のような粘膜に適用することによって、対象に投与可能である。

## 【0061】

本発明の方法は、さらに、例えば腫瘍サイズの減少、腫瘍マーカー、例えば癌特異的抗原のレベルの減少、例えば骨スキャンでの、新規障害の発現の減少、新規疾患関連症状の発現の減少、または軟組織量の大きさの減少または安定化、臨床結果の改善に関連した任意のパラメータ、の1つまたはそれ以上の減少に関して、対象をモニタする方法を含みうる。対象は、1つまたはそれ以上の以下の期間でモニタ可能である。処置の開始前、治療の間、治療の1つまたはそれ以上の要素を投与した後。モニタリングは、同様の抗MUC1-Hリガンドでのさらなる治療、または追加薬剤による追加治療に関する必要性を評価するために使用可能である。一般的に、上述の、1つまたはそれ以上のパラメータの減少は、対象が改善された状況であることを示す。

## 【0062】

抗MUC1-Hリガンドは、それによってMUC1-H発現細胞を削除または殺傷するための、非共役形態で、それのみで使用可能である。例えば、リガンドが抗体の場合、削除または殺傷は、補体仲介細胞溶解及び/又はエフェクター細胞仲介細胞殺傷のような抗体依存細胞殺傷機構によって仲介されうる。他の実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、MUC1-H発現細胞を殺傷または削除するのに効果的な、基質、例えば細胞毒性薬剤またはその一部に結合可能である。例えば、抗MUC1-Hリガンドは、放射活性イオン（例えば -、 - または - 放射体）、例えばヨウ素（ $^{131}\text{I}$ または $^{125}\text{I}$ ）、イットリウム（ $^{90}\text{Y}$ ）、リウテリウム（ $^{177}\text{Lu}$ ）、アクチニウム（ $^{225}\text{Ac}$ ）、またはビスマス（ $^{213}\text{Bi}$ ）に連結可能である。本発明の方法および組成物は、他の治療方法との組み合わせで使用可能である。1つの実施形態において、本発明の方法には、細胞毒性薬剤との組み合わせ、および前記疾患を治療するまたは阻止するために効果的な量で、抗MUC1-Hリガンド、例えば抗MUC1-H抗体またはその断片を対象に投与することが含まれる。リガンドおよび細胞毒性薬剤は、同時にまたは連続的に投与可能である。他の実施形態において、本発明の方法および組成物は、外科及び/又は放射手順と組み合わせで使用される。

## 【0063】

他の態様において、本発明は、*in vitro*にて、試料中の（例えば生物学的試料、組織生検、例えば癌性障害）、MUC1-Hタンパク質の存在を検出するための方法の特徴とする。目的の方法は、本明細書で記述の疾病、例えば癌性疾患を、評価、例えば診断または病期決定するために使用可能である。本方法には、（i）抗MUC1-HリガンドとMUC1-Hタンパク質の相互作用が起こることを許容する条件下で、本明細書に記

10

20

30

40

50

述したように、試料（および任意に、参照、例えば対照、試料）を、抗MUC1-Hリガンドと接触させること、および（ii）抗MUC1-Hリガンドと、試料（および任意に、参照、例えば対照、試料）間の複合体の形成を検出すること、が含まれる。複合体の形成は、MUC1-Hタンパク質の存在することを示し、本明細書で記述の治療のための好適性または必要性を示し得る。例えば、参照試料、例えば対照試料と比較して、試料中の複合体の形成に統計学的に有意な変化がある場合、これは、試料中のMUC1-Hの存在を示す。

#### 【0064】

さらに他の態様において、本発明は、*in vivo*（例えば対象内の*in vivo*画像化（*imaging*））での、MUC1-Hの存在を検出するための方法を提供する。目的の方法は、本明細書で記述の疾病、例えば癌性疾病を、評価、例えば診断または病期決定するために使用可能である。本方法には、（i）抗MUC1-HリガンドとMUC1-Hタンパク質の相互作用が起こることを許容する条件下で、抗MUC1-Hリガンド（例えば抗体またはその抗原結合断片）を対象（および任意に対照対象）に投与すること、（ii）リガンドおよびMUC1-H間の複合体の形成を検出すること、が含まれ、そこで、参照、例えば対照対象または対象の基準線と比べて、対象内での複合体の形成が、統計学的に有意に変化する場合に、これはMUC1-Hの存在を示す。

#### 【0065】

他の実施形態において、本明細書で記述したような疾病（例えば癌性疾病）を診断する、または病期決定しうるための方法が提供される。本方法には、（i）前記疾病を患っている、またはリスクを持っている対象を同定すること、（ii）疾病に影響を受けている組織または細胞の試料を得ること、（iii）結合薬剤とMUC1-Hタンパク質の相互作用が起こることを許容する条件下で、前記試料または対照試料を、抗MUC1-Hリガンドと接触させること、および（iv）複合体の形成を検出すること、が含まれる。参照試料、例えば対照試料と比較して、試料中の複合体の形成に統計学的に有意な変化がある場合、これは疾病または疾病の病期を示す。

#### 【0066】

好ましくは、*in vivo*および*in vitro*診断方法で使用される抗MUC1-Hリガンドは、結合したまたは結合していない結合薬剤の検出を促進するために、直接的または間接的に標識化される。好適な検出可能な基質には、種々の酵素、補欠分子族、蛍光物質、化学発光物質および放射活性物質が含まれる。1つの実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、放射活性イオン、例えばインジウム（ $^{111}\text{In}$ ）、ヨウ素（ $^{131}\text{I}$ または $^{125}\text{I}$ ）、イットリウム（ $^{90}\text{Y}$ ）、アクチニウム（ $^{225}\text{Ac}$ ）、またはビスマス（ $^{213}\text{Bi}$ ）、硫黄（ $^{35}\text{S}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、ロージウム（ $^{188}\text{Rh}$ ）、またはリン（ $^{32}\text{P}$ ）と結合する。他の実施形態において、リガンドは、NMR造影剤と標識化する。

#### 【0067】

本発明はまた、一連のアミノ酸および核酸配列を含む、ポリペプチドおよび核酸を提供する。

#### 【0068】

本明細書で使用するところの、語句「本質的に同一（*substantially identical*）」（または「本質的に相同（*substantially homologous*）」）は、第二アミノ酸またはヌクレオチド配列に対して同一または等価（例えば同様の側鎖、例えば保存アミノ酸基質）な十分な数のアミノ酸残基またはヌクレオチドを含む、第一アミノ酸またはヌクレオチド配列で、第一および第二アミノ酸またはヌクレオチド配列が同一の活性であるようなものであることを示すため、本明細書で使用する。抗体の場合、第二抗体は、同一の特異性を持ち、少なくとも50%の親和性を持つ。

#### 【0069】

本明細書で開示した配列に対して配列類似性または相同性（例えば、少なくとも約85

10

20

30

40

50

%配列同一性)を持つ配列もまた、本発明の一部である。いくつかの実施形態において、配列同一性は、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上であり得る。あるいは、核酸部分が、選択的ハイブリッド形成条件(例えば非常に厳密なハイブリッド形成条件)下でストランド(strand)の相補体にハイブリッド形成しうる場合に、本質的な同一性が存在する。核酸は、全細胞、細胞溶解物または部分的に精製または本質的に純粋な形態にて存在しうる。

#### 【0070】

2つの配列間の「相同性(homology)」または「配列同一性(sequence identity)」(これらの語句は本明細書で同義的に使用される)の計算は、以下のように実施される。配列を、最適な比較目的のために並べる(例えば、最適配置のために、第一および第二アミノ酸または核酸配列の1つまたは両方に、ギャップを導入することが可能であり、非相同配列は、比較目的のために無視可能である)。好ましい実施形態において、比較目的のために配置した参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは約60%、さらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、100%である。ついで相当するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置でのアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第一配列での位置が、第二配列の相当する位置で同一のアミノ酸またはヌクレオチドによって占領されている場合、この分子は、その位置で同一である(本明細書で使用されているように、アミノ酸または核酸「相同性」は、アミノ酸または核酸「同一性」と等価である)。2つの配列間のパーセント同一性は、配列によって共有されている同一の位置の数の関数であり、2つの配列の最適配置のために導入する必要があるギャップの数、それぞれのギャップの長さを計算に入れる。

#### 【0071】

2つの配列間の配列の比較と、パーセント同一性の決定は、数学的アルゴリズムを用いて達成可能である。好ましい実施形態において、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、BLOSUM62マトリックスまたはPAM250マトリックスいずれかを用いて、また16、14、12、10、8、6または4のギャップ量および1、2、3、4、5または6の長さ量を用いて、GCGソフトウェアパッケージ(Accelrys, Cambridge, UK)中のGAPプログラム内に組み込まれた、NeedlemanおよびWunsch((1970)J. Mol. Biol. 48:444-453)のアルゴリズムを用いて決定される。また他の好ましい実施形態において、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、NWSgapdna.CMPマトリックス、および40、50、60、70または80のギャップ量および1、2、3、4、5または6の長さ量を用いて、GCGソフトウェアパッケージ中で、GAPプログラムを用いて決定される。特に好ましいパラメータセット(および実施者が、分子が本発明の配列同一性または相同性制限内であるかどうかを決定するためにどのパラメータを適用すべきかどうかに関して、わからない場合、使用すべきものは、ギャップペナルティー12、ギャップ伸長ペナルティー4およびフレームシフトギャップペナルティー5での、BLOSUM62スコアリングマトリックスである。

#### 【0072】

本明細書で使用するところの語句「相同性(homologous)」は、「類似性(similarity)」と同義語であり、適度な数のアミノ酸挿入または欠損も存在しうるが、対象配列が、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換によって参照配列からは異なることを意味する。参照配列に対する相同性または類似性の程度を計算する現在の好ましい方法は、アルゴリズムデフォルト、または計算配列関連性の意義を決定するために推奨されたパラメータを用いる、いずれかの場合での、BLASTアルゴリズム(National Center of Biotechnology Information(NCBI)、National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USAで入手可能)の使用を介したものである。2つのアミノ酸またはヌクレオチド配列間のパーセント同一性はまた、PAM120重量残基表、1

10

20

30

40

50

2のギャップ長ペナルティーおよび4ギャップペナルティーを用いて、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれた、E. MeyersおよびW. Miller(1989)CABIOS, 4:11-17)のアルゴリズムを用いても決定可能である。

#### 【0073】

本明細書で使用するところの、語句「低厳重さ、中間厳重さ、高厳重さ、または非常に高い厳重さ条件下でハイブリッド形成する(hybridizes under low stringency, medium stringency, high stringency, or very high stringency conditions)」は、ハイブリッド形成および洗浄に対する条件を記述している。ハイブリッド形成反応を実施するためのガイドラインは、そのすべてが、参考文献にて本明細書に組み込まれている、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)、6.3.1-6.3.6で見ることができる。水性および非水性方法が、参考文献にて記述されており、いずれも使用可能である。本明細書で参考にされている特異的ハイブリッド形成条件は以下のものである。(1)約45、6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中、ついで少なくとも50で0.2xSSC、0.1%SDS中での2回の洗浄、の低厳重さ条件(洗浄の温度は、低厳重さ条件に関して、55まであげられる)、(2)約45にて6xSSC、ついで60にて、0.2xSSC、0.1%SDS中の1回またはそれ以上の洗浄、の中間厳重さ条件、(3)約45にて6xSSC、ついで、65にて0.2xSSC、0.1%SDS中1回またはそれ以上の洗浄、の高厳重さ条件、および好ましくは(4)65にて0.5Mリン酸ナトリウム、7%SDS、ついで、65にて0.2xSSC、1%SDSでの1回またはそれ以上の洗浄、の非常に高い厳重さ条件。非常に高い厳重さ条件(4)が、好ましい条件であり、他に特定しない限り使用されるべきものである。

#### 【0074】

本発明の結合薬剤ポリペプチドが、ポリペプチド機能に本質的な影響を持たない、さらなる保存または非必須アミノ酸置換基をもちうるということが理解される。特定の置換基が許容されるか、すなわち、結合活性のような、求められる生物学的特性に悪影響を与えないかどうかは、Bowier(1990)Science 247:1306-1310)にて記述されたように決定されうる。「保守アミノ酸置換基(conservative amino acid substitution)」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を持つアミノ酸残基で置換されるものである。同様の側鎖を持つアミノ酸残基のファミリーが、本技術分野で定義されてきた。これらのファミリーには、塩基性側鎖(例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非電荷極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、ベータ分岐側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)のアミノ酸が含まれる。

#### 【0075】

「非必須(non-essential)」アミノ酸残基は、「必須(essential)」アミノ酸残基が結果としてそのような変化を引き起こす一方で、生物学的活性を損なうことなしに、またはより好ましくは、本質的に変化することなしに、結合薬剤、例えば抗体の野生型配列から変化しうる残基である。

#### 【0076】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な記述および請求項により、さらに明らかになるであろう。

#### (詳細な説明)

本明細書では、細胞表面結合MUC1上に存在するが、shed MUC1上には存在し

10

20

30

40

50

ない、エピトープの集団、MUC1-Hに対する抗体およびリガンドを記述している。MUC1-Hに対する抗体およびリガンドは、MUC1-stubble、または可溶性MUC1とMUC1-Stubble複合体間で形成される複合体に関連するエピトープを認識し、従って、shed MUC1への等価の親和性をもった結合を欠く。MUC-Hは、全長、非クリップMUC1（またはMUC1の非クリップスプライスバリエーション）中に隠れているエピトープを含み、MUC1（またはMUC1のスプライスバリエーション）の特異的開裂の後の、MUC1の細胞表面結合スタンプ(stump)上にのみ現れ、従ってMUC1-H(hidden(hidden(隠れる)))と呼ばれる。さらに、MUC1-Hは、（おそらくMUC1の別のスプライシング形態から由来する）MUC-stubbleに結合したままである、MUC1のshed形態と、MUC-stubbleそれ自身の間で形成される、そのエピトープを含み、そのような立体的エピトープは、血清MUC1上ではなく、細胞表面結合MUC1上にのみ存在する可能性が高い。MUC1-H上のほとんどの隠れたエピトープは、MUC1の細胞外領域(MUC1-Stubble)の、C-末端65アミノ酸内に基づき、非クリップMUC1またはMUC1のスプライスバリエーション上の、該ポリペプチドリガンドによっては通常検出可能ではない、本配列内の直線または立体的エピトープであり得る。そのようなエピトープは、（例えばSEA領域によってコードされた領域など）MUC1のshedf形態との相互作用に参与するMUC-Stubble上の領域を含みうる。そのようなエピトープは、shed MUC1との相互作用によって通常覆い被さっている場合、後者の解離に際し、それらは露出されるようになる。他のMUC1-Hエピトープには、Stubbleとの連結部でクリッピングされた後のMUC1のN-末端領域と、stubbleそれ自身の複合体によって形成される、立体エピトープが含まれ、そのような場合、本配列は、MUC1の細胞外領域のC-末端65アミノ酸の、少なくとも一部分が含まれうる。MUC1-Hエピトープは、配列番号：2にて列記したような、MUC1-Stubbleの代表的な配列を持つ、直線または立体配列によって形成されうる。好ましい実施形態において、ポリペプチドリガンドは、抗体（本語句には、抗原結合断片が含まれる）である。他の好ましい実施形態において、ポリペプチドリガンドは、改変足場ポリペプチドまたはペプチドである。また他の好ましい実施形態では、ペプチド（例えば6～25アミノ酸のポリペプチド）は、環状ペプチドまたは直線ペプチドである。ポリペプチドリガンドは、（例えば、少なくとも2つのペプチドまたはポリペプチドを含む）多重鎖タンパク質であり得る。多重鎖タンパク質の例は、抗体である。本明細書で記述している多くの例が、抗体リガンドに関して開示されている一方で、本発明が、本明細書で提供するポリペプチドリガンド（例えば、抗体および非抗体リガンド）を用いて実施可能であることが理解される。

#### 【0077】

本発明は、部分的に、MUC1-Hに結合するタンパク質を同定するための方法を提供する。多くの場合、同定したタンパク質は、少なくとも部分的に特異的である。

#### 【0078】

MUC1-Hにおいて、SEA領域は、部分的に開裂し、完全MUC1分子と比較して、構造的差違が許容される。

#### 【0079】

MUC1-Hにおいて、SEA領域は、部分的に開裂し、完全MUC1分子と比較して、構造的差違が許容される。

#### 【0080】

MUC1-Hエピトープは、MUC1とは異なる。治療のために、内在化が、毒性薬剤、放射活性ラベルなどを伝達するために重要であり得る。従って、本発明のポリペプチドリガンドは、好ましくはまた、MUC1-Hで内在化され、これにより、抗体に共役した薬剤、例えば、細胞毒性または標識化薬剤の細胞内伝達が可能になる。従って、本発明のポリペプチドリガンドは、生正常、良性過形成およびMUC1-Hエピトープを発現している癌性細胞を標的化するために使用可能である。そのような内在化は、結合MUC1タンパク質バリエーションの通常の内化に基づいてよく、またはポリペプチドリガンド上で提

10

20

30

40

50

供されるシグナルによって増強または産出されうる。MUC1-Hに対する抗体およびペプチドは、従って、研究、診断および治療において、腫瘍を標的とするために使用可能である。

#### 【0081】

本方法には、MUC1-Hに結合するタンパク質をコードしているメンバーを同定するために、ライブラリーを提供すること、およびライブラリーをスクリーニングすること、が含まれる。

#### 【0082】

スクリーニングは、多くの方法で実施可能である。例えば、ライブラリーは、ディスプレイライブラリーであり得る。ライブラリーは、環状ペプチドライブラリー、例えば、そのすべてが参考文献にて本明細書に組み込まれている、米国特許第6,197,526B1で記述されたライブラリーのようなものであり得る。

10

#### 【0083】

MUC1-Hは、タグ化および組換え体発現しうる。MUC1-Hは、精製され、支持体、例えば常磁性ビーズまたは他の磁氣的に反応する粒子に連結しうる。

#### 【0084】

MUC1-Hはまた、細胞表面に発現されうる。ディスプレイライブラリーは、MUC1-Hを発現する細胞上で選別可能である。ディスプレイライブラリーは、例えば、MUC1-Hを発現している場合のみ、細胞に特異的に結合するメンバーを同定するために選別可能である。

20

#### 【0085】

##### A. ペプチドライブラリー

MUC1-Hに結合するペプチドリガンドもまた本明細書に含まれる。本明細書で使用するところの語句「ペプチドリガンド (peptide ligand)」または「結合分子 (binding molecule)」は、任意の分子、ポリペプチド、ペプチドミミックまたは形質転換細胞 (「トランスフォーマント (transformant)」) を意味し、これらは他の分子、ポリペプチド、ペプチドミミックまたはトランスフォーマントと、結合複合体の形成が可能である。「MUC1-Hペプチドリガンド (MUC1-H peptide ligand)」または「MUC1-H結合分子 (MUC1-H binding molecule)」は、MUC1-Hと複合体を形成する結合分子である。MUC1-Hペプチドリガンドの定義にまた含まれるものとしては、特定の結果のために改変された、ポリペプチドのようなものが含まれる。熟慮した改変の特例は、結合部分のクロマトグラフ支持体または他の基質への連結を目的とする、C-末端またはN-末端アミノ酸置換またはポリペプチド鎖延長、およびアミノ酸位置間で、以前のジスルフィド結合よりもより安定な結合の形成を目的とする、例えば反応性の側鎖を持つ天然には存在しないアミノ酸残基のような、ジスルフィド結合を通常形成するシステイン残基の対の置換が含まれる。すべてのそのような改変結合分子もまた、これらが、MUC1-H及び/又はMUC1-H様ポリペプチドに結合する能力を保持する限り、本発明にしたがった結合分子と考えられる。

30

#### 【0086】

##### 1. 結合および放出条件の選択

本発明にしたがったポリペプチド結合分子は、結合および放出を特定のあらかじめ選ぶ特性を示すMUC1-H結合ペプチドを、同定する方法で、ファージディスプレイ技術を用いて同定される。この方法論に従って、2つの溶解条件、すなわち、結合条件と放出条件があらかじめ選ばれる。結合条件は、発見された結合ポリペプチドが、標的MUC1-H (またはMUC1-H様ポリペプチド) に結合することが望まれる溶解条件のセットであり、放出条件は、発見された結合ポリペプチドが、MUC1-Hに結合しない (すなわちMUC1-Hから解離する) ことが望まれる溶解条件のセットである。2つの条件は、条件に到達する容易さ、他の精製段階との適合性、他の親和性培地と比較して、条件間で変化させるコストが低いことなど、実施者の基準を満足させるために選択されうる。好

40

50

ましくは、2つの溶解条件は、標的タンパク質（MUC1-HまたはMUC1-H様ポリペプチド）の安定性または活性に悪影響を与えることなく、少なくとも1つの溶液パラメータに関して明らかに異なるように選択される。例えば、本明細書で記述した好適な結合ペプチドに関するスクリーニングを実施する場合、結合剤は、エチレングリコール含有緩衝液の存在下で、または低pH（すなわちpH 2）の条件下で、またはこれらの条件の組み合わせで、標的より解離するように選択され、これは結合に関して必要な条件とは異なる。有利に変えることが可能な他のパラメータは、結合および溶出緩衝液中の塩、例えばNaClの濃度である。

【0087】

## 2. 親結合領域 (Parental Binding Domain) の選択

MUC1-Hの望む結合および放出に関する、特定の溶解条件を選択することとともに、親結合領域が、望む結合および放出の力を表す、設計された結合分子のための、構造鋳型として利用するために選択される。結合領域は、天然に存在するタンパク質または合成タンパク質、またはタンパク質の領域または領域であってよい。親結合領域は、親結合領域およびMUC1-H間の公知の相互作用の理解に基づいて選択されうるが、これは重要ではない。事実、親結合領域は、MUC1-Hとすべてに関して親和性を持つことは最も重要ではなく、その目的は、多数の類似体（「ライブラリー (library)」）を生成可能であり、多数の類似体が、望む結合および放出特性（および選択した任意の他の特性）を示す、1つまたはそれ以上の類似体を含む、構造を提供することである。以上で議論した、結合条件および放出条件は、親結合領域として役立つ実際のポリペプチドの知識、または親結合領域が属するタンパク質または領域のクラスの知識、または完全に独立して、親結合領域の選択の知識にて、選択可能である。同様に、結合及び/又は放出条件は、結合領域およびMUC1-H間の公知の相互作用に関して、例えば、1つまたは両方の溶解条件下での相互作用を支持するために選択可能であり、または、そのような公知の相互作用には関係なく、選択可能である。同様に、親結合領域は、結合領域類似体が、結合または放出条件下で不安定である場合、有用な結合分子を得ることができない可能性があることを認識しなければならないが、結合及び/又は放出条件を考慮に入れながら、選択可能である。

【0088】

親結合領域の性質は、MUC1-H分子に対して試験される誘導ペプチド（類似体）の特性に非常に影響を与える。親結合領域を選択する際、どのように類似体領域が、MUC1-Hに、提示されるか、すなわち、どの立体配座MUC1-Hおよび類似体が接触するのか、を考慮することが最も重要である。好ましい実施形態において、例えば、類似体は、両方とも、そのすべてが参考文献にて本明細書に組み込まれている、Kayら、Pharage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, (Academic Press, Inc.; San Diego 1996) および米国特許第5,223,409号 (Ladnerら) にて記述されたような技術を用いて、類似体をコードしている合成DNAを、複製可能遺伝的パッケージ内へ挿入することによって合成され、結果として、M13ファージのような微生物の表面上に領域をディスプレイする。

【0089】

ファージディスプレイライブラリーの形成に関して、結合領域鋳型として、体系化されていない、つまり直線ペプチドとは対照的に構造化したポリペプチドを使用することが好ましい。タンパク質内の表面残基の変異は、通常タンパク質の全構造または（大きさ、安定性および変性温度のような）一般的特性にほとんど効果がなく、一方で、同時に、表面残基の変異は、タンパク質の結合特性に深く影響を与える。より強くペプチド区画を拘束するほど、ある特定の標的により結合しなくなる。しかしながら、結合した場合、この結合は、よりきつく、より特異的である可能性がある。従って、親結合領域を選択すること、言い換えれば、ある程度の厳密性を持つフレームワーク内で拘束された、ポリペプチド類似体に関する構造を選択することが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0090】

好ましくは、領域誘導体のライブラリーを生成するための、鋳型または親領域として使用されるタンパク質領域は、小タンパク質またはポリペプチドであり得る。小タンパク質またはポリペプチドは、大きなタンパク質に対して、いくつかの利点を提示する。第一に、結合部位あたりの質量が減少する。低分子量を持つ、非常に安定なタンパク質領域、例えばKunitz領域(～7kDa)、Kazal領域(～7kDa)、Cucurbita maximaトリプシン阻害剤(CMTI)領域(～3.5kDa)、およびエンドセリン(～2kDa)は、抗体(150kDa)または単鎖抗体(30kDa)よりも、グラムあたり、非常に高い結合を示しうる。第二に、表面有用性が低いので、非特異的結合の可能性が減少する。第三に、小タンパク質またはポリペプチドは、より大きなタンパク質または固体に関して実施不可能である方法で、固有の拘束部位を持つように、遺伝工学的に改変可能である。例えば、小タンパク質は、(例えばクロマトグラフィーマトリックスに対して)拘束するために好適な部位のみで、リシンのみを持つように改変可能であるが、これは、抗体に関しては実現可能ではない。第四に、拘束されたポリペプチド構造は、1つのフレームワークから他へ、原型のまま、構造領域とともに移動させる場合に、その機能性を保持することがあり得る。例えば、結合領域構造は、(例えば、フェージ上に提示した)ライブラリー内での提示のために使用したフレームワークから、提示フレームワークから削除された、またはクロマトグラフィー基質上で固定された単離タンパク質に変換可能であり得る。

10

## 【0091】

本発明にしたがったポリペプチドの固定化は、例えば、クロマトグラフマトリックス上で、トランスフォーマント宿主細胞から分泌されたMUC1-Hを含む、全血または条件付き培地のような、溶液に対して、十分なMUC1-H分離培地を形成するのに、熟慮される。適切な結合領域鋳型を選択することによって、単一遊離(通常ジスルフィド結合を形成する、他のシステインとは対になっていない)システインを持つ結合ポリペプチドが単離可能である。そのようなチオール機能ポリペプチドは、ヨードアセタミド、ヨード酢酸、または同様な -ヨードカルボン酸基とのチオエーテルによって、基質への非常に安定な固定化のために使用可能である。

20

## 【0092】

同様に、ポリペプチド領域のC-末端カルボキシル基は、アルデヒド機能基質または他のアミン反応基質との反応のために、ヒドラジン(-NH-NH<sub>2</sub>)に変換しうる。本技術は好ましい。

30

## 【0093】

親結合領域としての使用のために好適であり、以下の有用な情報が入手可能である、多くの小、安定タンパク質領域が存在する。(1)アミノ酸配列、(2)いくつかの相同性領域の配列、(3)3次元構造、及び/又は(4)pH、温度、塩度、有機溶媒、酸化剤に対する安定性データ。いくつかの例としては、Kunitz領域(58アミノ酸、3ジスルフィド結合)、Cucurbita maximaトリプシン阻害剤領域(31アミノ酸、3ジスルフィド結合)、グアニリン(guanylin)関連領域(14アミノ酸、2ジスルフィド結合)、グラム陰性細菌からの熱安定性エンテロトキシン(entero toxin)IA関連領域(18アミノ酸、3ジスルフィド結合)、EGF領域(50アミノ酸、3ジスルフィド結合)、クリングル(kringl)領域(60アミノ酸、3ジスルフィド結合)、真菌炭化水素結合領域(35アミノ酸、2ジスルフィド結合)、エンドセリン(endothelin)領域(18アミノ酸、2ジスルフィド結合)、およびストレプトコッカス(streptococcal)G-IgG-結合領域(35アミノ酸、ジスルフィド結合無し)があげられる。これらの、すべてではないが、ほとんどが、構造を維持し、安定化させるジスルフィド結合を含む。親結合領域はまた、公知のタンパク質の相同的であるかまたはない、微小タンパク質の単一ループ(1ジスルフィド)に基づいている。例えば、7～9アミノ酸の拘束ループを、MUC1-HおよびMUC1-H様ポリペプチド結合分子を単離するための、ライブラリーを形成するために使用し

40

50

た。これらの領域に基づくライブラリー、好ましくは、ファージ上に提示されたライブラリーは、簡単に構築可能であり、本発明にしたがった結合分子の選択のために使用可能である。

【0094】

### 3. 親結合領域類似体のライブラリーの提供

一旦親結合領域が選択されたならば、潜在的結合分子のライブラリーを、標的、この場合、MUC1-H及び/又はMUC1-H様タンパク質に対して、望む結合条件および(任意に)望む溶出(放出)条件下で、スクリーニングするために作製する。ライブラリーは、類似体のシリーズを作ることによって作製され、各類似体は、領域のアミノ酸配列において、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換を持つこと以外は、親結合領域に相当する。アミノ酸置換は、少なくともほとんどの置換に関して、その構造を明らかに変えることなしに、領域の結合特性を変えることが予想される。変異のために選択されるアミノ酸位置(可変アミノ酸位置)は、表面アミノ酸位置、すなわち、領域が、そのもっとも安定な立体配座を取る場合に、領域の外表面(すなわち溶液に露出される表面)上にあらわれる、領域のアミノ酸配列中の位置であることが好ましい。もっとも好ましくは、変異されるアミノ酸位置は、置換の効果を最大化するために、隣接するか、または互いに近くにある。さらに、余計なアミノ酸を、親結合領域の構造内に加えることが可能である。好ましい実施形態において、本質的に、かなりの重大な情報が、MUC1-Hの他の分子、とりわけ親結合領域との相互作用を考慮して入手可能である場合、結合相互作用に対して必須であるアミノ酸の位置は、類似体ライブラリーを構築する工程で決定および保存されうる(すなわち、結合のために必須のアミノ酸は変異しない)。

【0095】

類似体ライブラリーを作製する目的は、MUC1-H分子との反応に関する、非常に大きな数の潜在的結合分子を提供することであり、一般的に、ライブラリー中、類似体の数が大きければ大きいほど、先に選択された、または放出に関して望ましい条件下で、MUC1-Hに結合するおよび放出する、少なくとも1つのライブラリーのメンバーが存在する確率が大きくなる。単一のライブラリーが、すべての設計した類似体を含み得、含まれる配列が、公知であり、ほぼ同一の数で存在するので、特定の鑄型構造にしたがい、特定の位置でのアミノ酸の変化が制限される設計したライブラリーが非常に好ましい。それに反して、アミノ酸配列中のただ6つの位置でのランダム置換は、6000万類似体を提供し、これは、ファージディスプレイのように強力なスクリーニング技術を使用する場合でさえ、実際の限界を提示し始めるライブラリーサイズである。これよりも大きなライブラリーは、取り扱いに問題をもたらし、例えば、発酵容器は異常な大きさの物が必要であり、さらに重要なのは、調製したライブラリーに提示される、すべての計画したポリペプチド配列の変異が急に減少する傾向にある。従って、変異のために設計されたアミノ酸位置が、類似体の結合特性における置換の効果を最大化するように考慮され、置換において使用するように許容された、または計画されたアミノ酸残基は、例えば、ライブラリーが結合に関して選別されうる溶解条件下で、類似体が結合するようになる可能性のあるということに基づいて、制限される、設計した、またはバイアスのかかったライブラリーを作製することが好ましい。

【0096】

先に示唆したように、Kayら、上記、およびLadnerら、米国特許第5,223,409号にて議論された技術は、選択した親結合領域に相当する類似体のライブラリーを調製することにおいて、とりわけ有用であり、その類似体は、標的MUC1-H分子に関して、膨大な数の類似体の大規模スクリーニングに好適な形態で、存在し得る。複製可能な遺伝的パッケージ、およびもっとも好ましいバクテリオファージの使用は、新規で、外因性DNA区画を、非ネイティブDNAによってコードされたポリペプチドが、ファージの表面上に現れるように、バクテリオファージのゲノム(または他の増幅可能な遺伝的パッケージ)に導入することを含む、新規のポリペプチド結合物を作製する強力な方法である。挿入したDNAが、配列多様性を含む場合、それぞれの受容ファージが、DNAに

よってコードされた鑄型（親）アミノ酸配列の1つのバリエーションを提示し、ファージ集団（ライブラリー）は、非常に大きな、異なるが、関連するアミノ酸配列を提示する。

【0097】

本発明にしたがったMUC1-H結合物を得るための、スクリーニング手順において、ファージライブラリーを、通常固体支持体上に固定した、標的MUC1-H分子と接触させ、結合を可能にする。非結合物を結合物より分離する。種々の方法にて、結合したファージをMUC1-Hから解離させ、回収し、増幅する。ファージを、細菌細胞の感染を通して増幅可能であるので、小数の結合ファージでも、結合実在物をコードしている遺伝子配列を明らかにするのに十分である。これらの技術を用いて、集団中2000万中約1つの結合ファージを回収することが可能である。1000万~2000万またはそれ以上の潜在的結合ポリペプチドをそれぞれ提示している1つまたはそれ以上のライブラリーを、高い親和性のMUC1-H結合物を見つけるために、迅速に選別可能である。選別工程を実施しているときに、集団の多様性は、ただ良い結合物が残るまで、すなわち工程が収束するまで各ラウンドで減少する。典型的には、ファージディスプレイライブラリーは、いくつもの非常に関連した結合物（1000万あたり10~50結合物）を含みうる。収束の指標には、非常に関連した配列の、（ファージ力価によって測定される）増加した結合および回収が含まれる。結合ペプチドの第一組を同定した後、配列情報を使用して、さらなる望む特性を持つ、例えば、特定のフィードストリーム（feed stream）において、MUC1-Hと特定の断片または非常に関連する不純物間の識別をもつ、メンバーに対してバイアスのかかった他のライブラリーを設計可能である。

【0098】

そのような技術は、膨大な数の潜在的結合分子を選別することを可能にするだけでなく、結合/溶出サイクルを繰り返すこと、および初期の基準を満たす類似体提示パッケージを選別するために、二次的な、バイアスのかかったライブラリーを構築すること、を現実的にする。これらの技術を用いて、類似体のバイアスのかかったライブラリーを、スクリーニング条件下で、強く（すなわち高い親和性で）結合するメンバーを明らかにするために、スクリーニングしうる。

【0099】

4. ペプチド類似体の合成

以上で概略した手順につづいて、MUC1-H及び/又はMUC1-H様ポリペプチドに対するさらなる結合分子を、本明細書で記述したファージディスプレイライブラリーまたは他のファージディスプレイライブラリー、または、潜在的結合分子の集団（例えば、有機化合物、ランダムペプチドライブラリーなどの組み合わせライブラリー）から単離しうる。一旦単離されたなら、任意の個々の結合ペプチドの配列、または任意の結合分子の構造を、解析可能であり、結合物を、公知の方法を用いて、任意の望む量で産出可能である。例えば、その配列がわかっているので、本明細書で記述したポリペプチド結合分子は、化学合成と、それに続くネイティブな立体配座、すなわち正確なジスルフィド結合連結を得るのに適切な酸化条件下での処理によって有利に産出可能しうる。合成は、当業者によく公知の方法論によって実施しうる（Kelleyら、Genetic Engineering Principles and Methods, (Setlow, J. K., ed.), Plenum Press, NY., (1990) vol. 12, pp. 1-19; Stewartら、Solid-Phase Peptide Synthesis (1989), W. H. Freeman Co., San Franciscoを参照のこと）。本発明の結合分子は、化学合成によって、または半合成によってのいずれかで作成可能である。化学合成または半合成方法により、天然には存在しないアミノ酸残基を挿入する可能性が許容される。

【0100】

本発明のポリペプチド結合分子は、好ましくは固相ペプチド合成を用いて調製される（Merrifield (1963) J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Houghten (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:

10

20

30

40

50

5132)。固相合成は、保護アミノ酸を、好適な樹脂に結合させることによって、予想されるポリペプチドのカルボキシ末端にて始まり、その樹脂とは、後に簡単に開裂する結合を形成するために、C-末端アミノ酸のカルボキシ基と反応する、例えば、クロロメチル樹脂およびプロモメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、アミノメチル樹脂、ベンズアルデヒド樹脂、またはt-アルキルオキシカルボニル-ヒドラジン樹脂のような、ハロメチル樹脂である。-アミノ保護基を、例えば塩化メチレン中のトリフルオロ酢酸(TFA)で除去し、例えばTEA中で中和した後、合成の次のサイクルに進める準備が出来る。ついで残っている-アミノ、もし必要なら、側鎖保護アミノ酸を、連続的に、望む順番で、縮合によって連結し、樹脂に連結した中間体化合物を得る。あるいは、いくつかのアミノ酸を、お互いに結合させて、増大固相ポリペプチド鎖へのオリゴペプチドの添加の前にオリゴペプチドを形成させうる。

10

## 【0101】

2つのアミノ酸、またはアミノ酸とペプチド、またはペプチドとペプチド間の縮合は、アジド法、混合酸無水物法、DCC(ジシクロヘキシルカルボジイミド)法、活性エステル法(p-ニトロフェニルエステル法、BOP[ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸]法、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル法)およびウッドワード薬剤K法のような、通常の方法に従って実施可能である。

## 【0102】

ペプチドの化学合成で共通なのは、鎖が完全に組み合わされた後に、最終的に除去されるまでの、種々のアミノ酸部位の反応性側鎖の、好適な保護基での保護である。また、物質がカルボキシル基で反応し、ついで、-アミノ-保護基を選択的に除去することによってその局所で続く反応が起こる一方での、アミノ酸または断片上の-アミノ基の保護が一般的である。従って、合成の一段階として、中間体化合物が産出され、つまり側鎖保護基を持つ種々の残基とともに、ポリペプチド鎖中の望む配列中に局在する各アミノ酸残基を含むのが一般的である。ついで、続く精製の望ましい得られた産物を産出するように、これらの保護基を、一般的には同時に除去する。

20

## 【0103】

-および-アミノ側鎖基を保護するための典型的な保護基の例としては、ベンジルオキシカルボニル(Z)、イソニコチルオキシカルボニル(iNOC)、O-クロロベンジルオキシカルボニル[Z(NO<sub>2</sub>)]、p-メトキシベンジルオキシカルボニル(Z(OMe))、t-ブトキシカルボニル(Boc)、t-アミオキシカルボニル(Aoc)、イソボルニルオキシカルボニル、アダマチルオキシカルボニル、2-(4-ピフェニル)-2-プロピルオキシカルボニル(Bpoc)、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)、メチルスルホニルエトキシカルボニル(Msc)、トリフルオロアセチル、フタリル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル(NPS)、ジフェニルホスフィノチオイル(Ppt)、ジメチロホスフィノチオイル(Mpt)などがあげられる。

30

## 【0104】

カルボキシ基に関する保護基の例としては、例えば、ベンジルエステル(OBzl)、シクロヘキシルエステル(Chx)、4-ニトロベンジルエステル(ONb)、t-ブチルエステル(Obut)、4-ピリジルメチルエステル(OPic)などがあげられる。アミノ基およびカルボキシル基以外の官能基を持っているアルギニン、システインおよびセリンのような特定のアミノ酸は、特定の要求として、好適な保護基によって保護されることが望ましい。例えば、アルギニン中のグアニジノ基は、ニトロ、p-トルエンスルホニル、ベンジルオキシカルボニル、アダマンチルオキシカルボニル、p-メトキシベンゼンスルホニル、4-メトキシ-2,6-ジメチルベンゼンスルホニル(Mds)、1,3,5-トリメチルフェニルスルホニル(Mts)などで保護される。システイン中のチオール基は、p-メトキシベンジル、トリフェニルメチル、アセチルアミノメチルエチルカルバモイル、4-メチルベンジル、2,4,6-トリメチル-ベンジル(Tmb)などで保護され得、セリン中のヒドロキシル基は、ベンジル、t-ブチル、アセチル、テトラヒ

40

50

ドロピラニルなどで保護されうる。

【0105】

望むアミノ酸配列が完了した後、中間体ポリペプチドを、樹脂からポリペプチドを開裂させるだけでなく、すべての残っている側鎖保護基をも開裂させる、液体HFおよび1つまたはそれ以上のチオ含有スカベンジャーのような薬剤による処理によって、樹脂支持体から除去する。HF開裂に続いて、タンパク質配列をエーテルで洗浄し、大容量の希釈酢酸に移し、pHを、水酸化アンモニウムによって約8.0に調整して、攪拌する。pH調整に際し、ポリペプチドは、その望む立体配座をとる。

【0106】

本発明にしたがったポリペプチドはまた、サービスとして、ポリペプチド合成を提供している会社によって、商業的に調製されうる（例えばBACHEM バイオサイエンス社（Bioscience, Inc.）、King of Prussia, Pa、クオリティコントロールドバイオケミカルズ社（Quality Controlled Biochemicals, Inc.,）Hopkinton, Mass.）。

【0107】

B. ディスプレイライブラリー

ディスプレイライブラリーを、MUC1-Hに結合するタンパク質を同定するために使用する。ディスプレイライブラリーは、構成要素の集合であり、各構成要素には、ペプチド成分をコードまたは同定する、利用可能ポリペプチド成分および還元可能成分が含まれる。ポリペプチド成分は、任意の長さの、例えば、3つのアミノ酸～300以上のアミノ酸であり得る。選択において、ライブラリーに各メンバーのポリペプチド成分を、MUC1-Hにてプローブし、もしポリペプチド成分が、MUC1-Hに結合する場合、ディスプレイライブラリーメンバーを、典型的には、支持体上での保持によって同定する。

【0108】

保持されたディスプレイライブラリーメンバーを、支持体より回収し、解析する。解析には、増幅、および同一または異質の条件下での連続選択が含まれうる。例えば、ポジティブおよびネガティブ選択を交互に実施可能である。解析にはまた、ポリペプチド成分のアミノ酸配列の決定、および詳細な特徴に対する、ポリペプチド成分の精製も含まれうる。

【0109】

様々なフォーマットは、ディスプレイライブラリーに関して使用可能である。例には、以下が含まれる。

【0110】

1. ファージディスプレイ

1つのフォーマットは、ウイルス、とりわけバクテリオファージを使用する。このフォーマットは、「ファージディスプレイ（phage display）」と呼ばれる。ペプチド成分は、典型的には、バクテリオファージコートタンパク質に共有結合する。結合は、コートタンパク質に融合するペプチド成分をコードしている核酸を翻訳することで結果として結合となる。結合には、柔軟性のあるペプチドリンカー、プロテアーゼ部位、または終止コドンの抑制の結果として組み込まれたアミノ酸が含まれうる。ファージディスプレイは、例えば、Ladnerら、米国特許第5,223,409号、Smith(1985) Science 228:1315-1317、国際特許第WO92/18619号、第WO91/17271号、第WO92/20791号、第WO92/15679号、第WO93/01288号、第WO92/01047号、第WO92/09690号、第WO90/02809号、de Haardら(1999) J. Biol. Chem. 274:18218-30、Hoogenboomら(1998) Immunotechnology 4:1-20、Hoogenboomら、(2000) Immunology Today 2:371-8、Fuchsら(1991) Bio/Technology 9:1370-1372、Hayら(1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85、Huseら(1989) Science 246:12

10

20

30

40

50

75-1281、Griffithsら(1993)EMBO J. 12:725-734、Hawkinsら(1992)J. Mol. Biol. 226:889-896、Clacksonら(1991)Nature 352:624-628、Gramら(1992)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580、Garrardら(1991)Bio/Technology 9:1373-1377、Rebarら(1996)Methods Enzymol. 267:129-49、Hoogenboomら(1991)Nuc. Acids Res. 19:4133-4137、およびBarbasら(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982にて記述されている。

#### 【0111】

ファージディスプレイシステムは、線状ファージ(ファージf1、fdおよびM13)ならびに他のバクテリオファージ(例えば、T7バクテリオファージおよびラムドイドファージ、例えばSantini(1998)J. Mol. Biol. 282:125-135、Rosenbergら(1996)Innovations 6:1-6、Houshmetら、(1999)Anal. Biochem. 268:363-370を参照のこと)に関して開発されてきた。線状ファージディスプレイシステムは、典型的には、マイナーなコートタンパク質、遺伝子IIIタンパク質、および遺伝子VIタンパク質のような、メジャーなコートタンパク質への融合を用いるが、遺伝子VIIタンパク質、遺伝子VIIIタンパク質、遺伝子IXタンパク質のような他のコートタンパク質、またはそれらの領域もまた使用されうる(例えば国際特許第WO00/71694号を参照のこと)。好ましい実施形態において、融合は、遺伝子IIIタンパク質の領域、例えばアンカー領域または「stump」へのものである(例えば、遺伝子IIIタンパク質アンカー領域の記述に関して、米国特許第5,658,727号を参照のこと)。

#### 【0112】

ペプチド成分の価数もまた制御可能である。ペプチド成分をコードしている配列の、完全なファージゲノム内へのクローニングにより、遺伝子IIIタンパク質のすべての複製物が、ペプチド成分に融合するので、その結果多価ディスプレイとなる。価数の減少のために、ファージミド(phagemid)システムが使用可能である。このシステムにおいて、遺伝子IIIに融合したペプチド成分をコードしている核酸は、典型的には、700ヌクレオチド以下の長さのプラスミド上に存在する。プラスミドには、プラスミドを含むバクテリア細胞が、ヘルパーファージ、例えばM13K01に感染した場合に、プラスミドがバクテリオファージ内に挿入されるように、複製のファージ複製基点が含まれる。ヘルパーファージは、遺伝子IIIおよび、ファージの複製およびアセンブルに必要な他のファージ遺伝子のそのままのコピーを提供する。ヘルパーファージは、ヘルパーファージゲノムが、野生型複製基点を持つプラスミドと相対して、ファージプラスミド内に効果的に組み込まれないように、不完全複製基点を持つ。

#### 【0113】

ペプチド成分を提示しているバクテリオファージは、標準のファージ準備法、例えば増殖培地からのPEG沈殿を用いて、増殖および回収可能である。

#### 【0114】

個々のディスプレイファージの選別の後、選択されたペプチド成分をコードしている核酸を、選択したファージを用いて細胞を感染させる。個々のコロニーおよびプラークをピックアップし、核酸を単離配列可能である。

#### 【0115】

##### 2. 細胞に基づくディスプレイ

また他のフォーマットにおいて、ライブラリーは、細胞-ディスプレイライブラリーである。タンパク質は、細胞、例えば真核または原核細胞の表面上に提示される。原核細胞の例には、大腸菌細胞、B. subtilis(B. subtilis)細胞、胞子が含まれる(例えば、Luら(1995)Biotechnology 13:366を参照のこと)。真核生物の例には、酵母(例えば、サッカロマイセスセルビシエ(Sacchar

10

20

30

40

50

omyces cerevisiae)、チゾサッカロマイセス ポンプ (Schizosaccharomyces pombe)、ハンセウラ (Hansenula) またはピキア パストリス (Pichia pastoris) が含まれる。酵母表面ディスプレイは、例えば Boder and Wittrop (1997) Nature Biotech. 15: 553 - 557 および 2001 年 10 月 1 日に出願された、表題「多重鎖真核生物ディスプレイベクターおよびその使用 (Multi-Chain Eukaryotic Display Vectors And The Uses Thereof.)」の米国仮出願特許明細書番号第 60/326,320 号にて記述されている。この明細書は、Fab 断片のような、免疫グロブリンタンパク質を提示するために使用可能な、酵母ディスプレイシステムを記述しており、また重鎖と軽鎖の組み合わせを産出するためのマッチングの使用を記述している。

10

#### 【0116】

1つの実施形態において、多彩な核酸配列を、酵母ディスプレイのためベクター内にクローニングする。クローニングは、多彩な配列を、領域 (または完全な) 酵母細胞表面タンパク質、例えば Aga2、Aga1、Flo1、または Gas1 に結合させる。これらのタンパク質の領域は、膜貫通領域 (例えば Flo1) によって、またはリン脂質二重膜 (例えば Gas1) への共有結合によって、多彩な核酸配列によってコードされたポリペプチドをつなぎうる。ベクターは、1つの鎖が酵母表面タンパク質に連結するように、2つのポリペプチド鎖を細胞表面上で発現するように設定しうる。例えば、2つの鎖は、免疫グロブリン鎖であり得る。

20

#### 【0117】

##### 3. リボソームディスプレイ

RNA および RNA によってコードされているポリペプチドを、RNA を翻訳しているリボソームを安定化させることによって物理的に結合させ、初期のポリペプチドをそのまま接着させておくことが可能である。典型的に、高二価  $Mg^{2+}$  濃度および低温が使用される。例えば、Mattheakis ら (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9022 および Hanes ら (2000) Nature Biotech. 18: 1287 - 92、Hanes ら (2000) Methods Enzymol. 328: 404 - 30 および Schaffitzel ら (1999) J. Immunol. Methods 231: 119 - 35 を参照のこと。

30

#### 【0118】

##### 4. ペプチド - 核酸融合

他のフォーマットは、ペプチド - 核酸融合を使用する。ポリペプチド - 核酸融合は、例えば Roberts and Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12297 - 12302 および米国特許第 6,207,446 号にて記述されたように、共有結合にて付随したプロマイシン基を含む、mRNA の *in vitro* 翻訳によって産出可能である。ついで mRNA を、DNA に逆転写し、ポリペプチドに架橋する。

#### 【0119】

##### 5. 他のディスプレイフォーマット

また他のディスプレイフォーマットは、ポリペプチド成分が、ポリペプチドを同定する非核酸タグに結合する、非生物学的ディスプレイである。例えば、タグは、ポリペプチドまたは放射高周波タグを提示しているビーズに結合した化学的タグであり得る (例えば米国特許第 5,874,214 号を参照のこと)。

40

#### 【0120】

##### 6. 足場

ディスプレイの足場には、抗体 (例えば、Fab 断片、一本鎖 Fv 分子 (scFv)、単一領域抗体、ラクダ抗体、およびラクダ化抗体)、T-細胞受容体、MHC タンパク質、細胞外領域 (例えばフィブロネクチン III 型繰り返し、EGF 繰り返し)、プロテアーゼ阻害剤 (例えば Kunitz 領域、エコチン、BPTI、その他)、TPR 繰り返し

50

、トリホイル構造、亜鉛フィンガー領域、DNA結合タンパク質、特定一量体DNA結合タンパク質、RNA結合タンパク質、酵素、例えばプロテアーゼ（特に不活性化プロテアーゼ）、RNase、チャペロン、例えばチオレドキシン、およびヒートショックタンパク質、および細胞内シグナル領域（SH2およびSH3領域など）が含まれる。

#### 【0121】

足場領域を評価するための適切な基準には、(1)アミノ酸配列、(2)いくつかの相同領域の配列、(3)三次元構造、及び/又は(4)pH、温度、塩度、有機溶媒、酸化物濃度の範囲における安定性データ、が含まれる。1つの実施形態において、足場領域は、小さな、安定タンパク質領域、例えば、100、70、50、40、または30アミノ酸以下のタンパク質である。領域には、1つまたはそれ以上のジスルフィド結合が含まれ得、または金属、例えば亜鉛をキレートしうる。

10

#### 【0122】

小足場領域の例には、Kunitz領域（58アミノ酸、3ジスルフィド結合）、Cucurbita maxima トリプシン阻害剤領域（31アミノ酸、3スルフィド結合）、グアニリン関連領域（14アミノ酸、2ジスルフィド結合）、グラム陰性細菌からの熱安定性エンテロトキシンIA関連領域（18アミノ酸、3ジスルフィド結合）、EGF領域（50アミノ酸、3ジスルフィド結合）、クリングル領域（60アミノ酸、3ジスルフィド結合）、真菌炭化水素結合領域（35アミノ酸、2ジスルフィド結合）、エンドセリン領域（18アミノ酸、2ジスルフィド結合）、およびストレプトコッカ（Streptococcal）IgG-結合領域（35アミノ酸、ジスルフィド結合無し）

20

#### 【0123】

小細胞内足場領域の例には、SH2、SH3およびEVH領域が含まれる。一般的に、任意のモジュラー領域、細胞内および細胞外領域を使用可能である。

#### 【0124】

足場領域の他の有用な型は、免疫グロブリン（Ig）領域である。ディスプレイに関する免疫グロブリン領域の使用方法を、以下に記述している（例えば、「抗体ディスプレイライブラリー（Antibody Display Libraries）」を参照のこと）。

#### 【0125】

ディスプレイ技術はまた、リガンド、例えば抗体リガンド、とりわけ標的のエピトープを得るために使用可能である。これは、例えば、特定のエピトープを欠き、エピトープ内で、例えばアラニンで変異された、非標的分子と競合することをを用いて実施可能である。そのような非標的分子を、以下で記述するようにネガティブ選択手順にて使用可能である。これは標的ヘディスプレイライブラリーが結合したときの競合分子として、または例えば標的に特異的でない、ディスプレイライブラリーメンバーを解離する洗浄溶液中に捕獲するための先溶出薬剤として用いられる。

30

#### 【0126】

##### 7. 反復選択

1つの好ましい実施形態において、ディスプレイライブラリー技術は、反復モードで使用される。第一ディスプレイライブラリーを、標的に関して、1つまたはそれ以上のリガンドを同定するために使用する。これらの同定されたリガンドを、ついで、第二ディスプレイライブラリーを形成するために変異誘発法（mutagenesis method）を用いて変化させる。ついでより高い親和性リガンドを、第二ライブラリーから、例えば、より高い厳密度、またはより競合的結合および洗浄条件を用いることによって、選択する。

40

#### 【0127】

いくつかの遂行にて、突然変異誘発は、結合表面にて存在することが公知であるか、あり得る領域を標的化する。例えば同定したリガンドが抗体の場合、突然変異誘発を、本明細書で記述したような、重鎖または軽鎖のCDR領域に指向することが可能である。さら

50

に、突然変異誘発を、CDRの近くまたは隣接するフレームワーク領域に指向させることが可能である。抗体の場合、突然変異誘発はまた、例えば、正確な段階的改善をするために、1つまたは数個のCDRに制限することも可能である。同様に、同定したリガンドが酵素の場合、突然変異誘発を、活性部位および周辺に指向させることができる。

#### 【0128】

いくつかの突然変異誘発技術の例には、エラープローンPCR (error-prone PCR) (Leungら(1989) Technique 1:11-15)、組換え、ランダム開裂を用いるDNAシャッフリング (Stemmer(1994) Nature 389:391、「核酸シャッフリング (nucleic acid shuffling)」、RACHITT<sup>TM</sup> (Cocoら(2001) Nature Biotech. 19:354)、部位特異的突然変異誘発 (Zoolerら(1987) Nucl. Acids. Res. 10:6487-6504)、カセット式 (cassette) 突然変異誘発 (Reidhaar-Olson(1991) Methods Enzymol. 208:564-586) および変性オリゴヌクレオチドの挿入 (Griffithsら(1994) EMBO J. 13:3245) が含まれる。

#### 【0129】

反復選択の1つの例において、本明細書で記述した方法は、第一に、少なくとも標的に対して最小の結合特異性または最小活性、例えば、1 nM、10 nMまたは100 nMより大きな、結合に関する平衡解離定数をもって、MUC1-Hに結合するディスプレイライブラリーからポリペプチドリガンドを同定するために使用される。最初の同定されたポリペプチドリガンドをコードしている核酸配列を、変異の導入に関する、鋳型核酸として使用し、よりいっそう特性を増した(例えば結合親和性、速度論または安定性)第二ポリペプチドリガンドを同定するため使用される。

#### 【0130】

##### 8. オフ-レート (Off-Rate) 選択

遅い解離速度が、とりわけ、ポリペプチドとその標的間の相互作用に関して、高い親和性の予想であり、本明細書で記述した方法は、標的への結合相互作用に関して、望む速度論解離速度(すなわち減少した速度)を持つリガンドを単離するために使用可能である。

#### 【0131】

ディスプレイライブラリーから、遅い解離リガンドに関して選択するために、ライブラリーを、固定化標的に接触させる。ついで固定化標的を、非特異的または弱い結合生物分子を除去する、第一溶液で洗浄する。ついで固定化標的を、遊離標的の飽和量、すなわち粒子に接着しない標的の複製を含む、第二溶液で溶出する。遊離標的は、標的から解離する生物分子に結合する。再結合は、固定化標的の非常に低い濃度と比べて、遊離標的飽和量によって、効果的に防止される。

#### 【0132】

第二溶液は、本質的に生理的であるか、または厳重である、溶解条件を持ちうる。典型的には、第二溶液の溶解条件は、第一溶液の溶解条件と同一である。第二溶液の画分を、時間的に適切に回収し、遅延画分から、早期に区別する。より遅い画分には、早期画分中の生物分子よりも、標的からより遅い速度で、解離した生物分子が含まれる。

#### 【0133】

さらに、インキュベーションを延長した後でさえ、標的に結合したままの、ディスプレイライブラリーメンバーを回収することが可能である。これらは、カオトロピック (chaotropic) 条件を用いて解離するか、または標的に結合している間に増幅するか、いずれかが可能である。例えば、標的に結合したファージを、バクテリア細胞に接触可能である。

#### 【0134】

##### 9. 特異性の選択またはスクリーニング

本明細書で記述したディスプレイライブラリースクリーニング法には、非標的分子に結合するディスプレイライブラリーメンバーを廃棄する選択またはスクリーニング工程が含

10

20

30

40

50

まれうる。非標的分子の例には、(i)全長MUC1タンパク質、(ii)MUC1/Xタンパク質、(iii)MUC1/X/altタンパク質、(iv)MUC1/Yタンパク質、(v)MUC1/Y/altタンパク質、(vi)MUC1/Vタンパク質、(vii)MUC1/V/altタンパク質、(viii)MUC1/Wタンパク質、(ix)MUC1/W/altタンパク質、(x)MUC1/Zタンパク質、または(xi)MUC1/Z/altタンパク質が含まれる。

#### 【0135】

1つの実施において、「ネガティブ選択(negative selection)」と呼ばれる段階を、標的と関連した非標的分子間、および関連するが、相異なる非標的分子間の区別するために使用する。ディスプレイライブラリーまたはそのプールを、非標的分子に接触させる。非標的に結合しない試料のメンバーを回収し、これを次の、標的分子に対する結合に関して、または次のネガティブ選択に関しての、選択で使用する。ネガティブ選択段階は、標的分子に結合するライブラリーメンバーを選択する前、または後であり得る。

10

#### 【0136】

他の実施において、スクリーニング段階を使用する。ディスプレイライブラリーメンバーを、標的分子への結合に関して単離し、それぞれの単離したライブラリーメンバーを、非標的分子(例えば、以上で列記した非標的)への結合のその能力に関して試験する。例えば、ハイスループット(high-throughput)ELISAスクリーンを使用して、このデータを得ることが可能である。ELISAスクリーンはまた、標的に対する各ライブラリーメンバーの結合に関して、定量的データを得るために使用可能である。非標的および標的結合データを、(例えばコンピュータおよびソフトウェアを使用して)比較して、標的MHC-ペプチド複合体へ特異的に結合するライブラリーメンバーを同定する。

20

#### 【0137】

##### C. 多様性

ディスプレイライブラリーには、提示されたポリペプチド中の1つまたはそれ以上の位置における変異が含まれる。該位置での変異は、合成または天然であり得る。いくつかのライブラリーに関し、合成および天然両方の多様性が含まれる。

#### 【0138】

##### 1. 合成多様性

ライブラリーは、人工的に合成した配列から由来する、多様な核酸配列の領域を含む。典型的には、それぞれの該位置で、ヌクレオチドの分布を含む、変性したオリゴヌクレオチド集団から形成される。該配列の含有物は、分布に関してランダムである。合成多様性の変性源の1つの例は、NNNを含むオリゴヌクレオチドであって、Nは、等しい比で、任意の4つのヌクレオチドである。

30

#### 【0139】

合成多様性はまた、例えば、該トリヌクレオチドにおける核酸配列中のコドンの数を、NNNよりも小さい分布に制限するために、より制約することも可能である。例えば、そのような分布は、コドンのいくつかの位置で、4つよりも少ないヌクレオチドを用いて、制約可能である。さらに、トリヌクレオチド追加技術を用いて、さらに分布を制約できる。

40

#### 【0140】

「トリヌクレオチド追加技術(trinucleotide addition technology)」と呼ばれるものが、例えば、Wellsら(1985)Gene 34:315-323、米国特許第4,760,025号および第5,869,644号で記述されている。オリゴヌクレオチドは、一度に1コドン(すなわちトリヌクレオチド)を固相支持体上で合成する。支持体には、多くのオリゴヌクレオチドが平衡して合成されるように、合成に関して、多くの官能基を含む。支持体を、まず、第一部位に関して、コドンの組の混合物を含む溶液に曝露する。ユニットを、さらにユニットが加わらないよ

50

うに保護する。第一の混合物を含む溶液を洗浄して除去し、固相を、第二部位に関してコドンの組を含む第二混合物を、結合した第一ユニットに加えられるように、脱保護する。その工程を、繰り返して、連続して、多重のコドンを組み立てる。トリヌクレオチド追加技術により、該位置で、多くのアミノ酸をコード可能な核酸の合成が可能になる。これらのアミノ酸の頻度は、混合液中のコドンの割合によって制御可能である。さらに、該位置でのアミノ酸の選択は、単一のヌクレオチドの混合物を、合成中に添加する場合のように、コドン表の象限には制限されない。

#### 【0141】

##### 2. 天然多様性

ライブラリーは、相違する天然に存在する配列に由来する（または異なる天然に存在する配列に基づいて合成される）多様な核酸配列の領域を含みうる。ディスプレイライブラリーに含まれる天然多様性の例は、免疫細胞に存在する配列多様性である（以下も参照のこと）。核酸は、これらの免疫細胞より調製され、ポリペプチドディスプレイのためのフォーマット内に操作される。天然多様性の他の例は、異なる生物種間の配列の多様性である。例えば、多様な核酸配列を、土壌のような環境試料から増幅し、ディスプレイライブラリーを構築するために使用可能である。

10

#### 【0142】

##### D. 抗体ディスプレイライブラリー

1つの実施形態において、ディスプレイライブラリーは、それぞれが、免疫グロブリン領域、例えば免疫グロブリン可変領域を含む、ポリペプチドの多様なプールを提示する。ディスプレイライブラリーはとりわけ、例えば、ヒト抗原を認識するヒトまたは「ヒト化（humanized）」抗体を同定するために有用である。そのような抗体は、癌のようなヒト疾病を処置するために、治療として使用可能である。抗体の定常およびフレームワーク領域がヒトであるので、これらの治療様抗体は、抗原として、認識および標的化されることが避けられうる。定常領域をまた、ヒト免疫系のエフェクター機能を強化するために最適化する。in vitroディスプレイ選択工程は、自己抗原に対して抗体を生成する正常なヒト免疫系が、不全性を克服する。

20

#### 【0143】

典型的な抗体ディスプレイライブラリーは、VH領域とVL領域を含むポリペプチドを提示する。「免疫グロブリン領域（immunoglobulin domain）」は、免疫グロブリン分子の可変または定常領域からの領域を意味する。免疫グロブリン領域は、典型的には、約7つの鎖からなる2つのシートおよび保存ジスルフィド結合を含む（例えば、A. F. Williams and A. N. Barclay (1988) Ann. Rev. Immunol. 6: 381-405を参照のこと）。ディスプレイライブラリーは、Fab断片（例えば2つのポリペプチド鎖を使用して）、または一本鎖Fv（例えば単一ポリペプチド鎖を使用して）として抗体を提示可能である。他のフォーマットもまた使用可能である。

30

#### 【0144】

Fabおよび他のフォーマットの場合のように、提示された抗体は、軽鎖または重鎖の一部として、定常領域を含みうる。1つの実施形態において、各鎖には、例えばFabの場合のように、1つの定常領域が含まれる。他の実施形態においては、さらなる定常領域が提示される。

40

#### 【0145】

抗体ライブラリーは、多くの工程によって構築可能である（例えば、de Haardら(1999) J. Biol. Chem. 274: 18218-30、Hoogenboomら(1998) Immunotechnology 4: 1-20、およびHoogenboomら(2000) Immunol. Today 21: 371-8を参照のこと）。さらに、各工程の要素を、他の工程のものと結びつけることが可能である。この工程は、変異を単一免疫グロブリン領域（例えば、VHまたはVL）内、または多重免疫グロブリン領域内（例えばVHおよびVL）に導入するために使用可能である。変異を、免

50

疫グロブリン可変領域、例えば、1つまたはそれ以上の、重鎖および軽鎖可変領域いずれか、及び/又は両方のそのような領域をしめす、CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3およびFR4の領域内に導入可能である。1つの実施形態において、変異を、該領域のすべての3つのCDR中に導入する。他の好ましい実施形態において、変異を、例えば重鎖可変領域の、CDR1およびCDR2に導入する。任意の組み合わせが、実現可能である。

【0146】

1つの工程で、抗体ライブラリーを、核酸の相当する領域に、CDRsをコードしている多様なオリゴヌクレオチドを挿入することによって構築する。オリゴヌクレオチドは、単量ヌクレオチドまたはトリヌクレオチドを用いて合成可能である。例えば、Knapp 10  
i k r a ( ( 2 0 0 0 ) J . M o l . B i o l . 2 9 6 : 5 7 - 8 6 ) は、トリヌクレオチド合成と、オリゴヌクレオチドを受容するための工学的に改変した制限部位を持つ鋳型を用いて、オリゴヌクレオチドをコードしているCDRを構築するための方法を記述している。

【0147】

他の工程において、動物、例えば齧歯類を、MUC1-Hで免役する。その動物を任意に、抗原でブースト(boost)して、さらに応答を刺激する。ついで脾臓細胞を動物より単離し、VH及び/又はVL領域をコードしている核酸を増幅し、ディスプレイライブラリー中での発現のためにクローン化する。

また他の工程にて、抗体ライブラリーは、ナイーブ(naive)な生殖細胞系列免疫グロブリン遺伝子から増幅した核酸より構築される。増幅した核酸には、VH及び/又はVL領域をコードしている核酸が含まれる。免疫グロブリン-コード核酸の供給源は、以下で記述している。増幅には、例えば、保存定常領域にアニール(anneal)するプライマーでの、PCRまたは他の増幅方法が含まれる。 20

【0148】

免疫グロブリン領域をコードしている核酸は、例えばヒト、霊長類、マウス、ウサギ、ラクダ、または齧歯類の免疫細胞より得ることができる。1つの例において、細胞を、特定の特性で選択する。種々の成熟段階のB細胞を選択可能である。他の例において、B細胞はナイーブである。

【0149】

1つの実施形態において、蛍光細胞分析分離装置(FACS)を使用して、表面結合IgM、IgDまたはIgG分子を発現しているB細胞を分離する。さらに、IgGの異なるアイソタイプを発現しているB細胞を単離可能である。他の好ましい実施形態において、BまたはT細胞を、in vitroにて培養する。細胞を、in vitroにて、支持細胞(feeder cell)とともに培養することによって、またはマイトジェン(mitogen)または他の調節薬剤、例えばCD40に対する抗体、CD40リガンドまたはCD20、酢酸ミリスチン酸ホルポール、細菌リポ多糖類、コンカナバリンA(coccanavalin A)、フィトヘムグルチニン(phytohemagglutinin)またはヤマゴボウ分裂促進因子(pokeweed mitogen)のようなものを添加することによって刺激することが可能である。 40

【0150】

また他の実施形態において、細胞を、免疫学的疾病、例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)、リウマチ様関節炎、脈管炎、シェーグレン症候群、全身性硬化症、または抗リン脂質症候群など、を持つ対象から単離する。対象は、ヒトまたは動物、例えば、ヒト疾患に関する動物モデル、または類似の疾病を持つ動物であり得る。また他の実施形態において、細胞は、ヒト免疫グロブリン座を含む、形質転換非ヒト動物から単離される。

【0151】

1つの好ましい実施形態において、細胞が、体細胞超変異のプログラムを活性化した。細胞を、例えば、抗免疫グロブリン、抗-CD40、および抗-CD38抗体で処理することによって、免疫グロブリン遺伝子の体細胞変異が行われるように刺激可能である(例 50

例えば Bergthorsdottirら (2001) J. Immunol. 166:2228) を参照のこと。他の実施形態において、細胞はナイーブである。

【0152】

免疫グロブリン可変領域をコードしている核酸は、以下の例示的な方法によって、天然のレパートリーから単離可能である。第一に、RNAを免疫細胞より単離する。全長(すなわちキャップ)mRNAsを分離する(例えば、子牛腸ホスファターゼと、非キャップRNAsを分解することによって)。ついでキャップを、タバコ酸ピロホスファターゼによって除去し、逆転写を使用して、cDNAsを産出する。

【0153】

第一(アンチセンス)鎖の逆転写を、任意の好適なプライマーで、任意の様式にて実施可能である。例えば、de Haarら(1999) J. Biol. Chem. 274:18218-30を参照のこと。プライマー結合領域は、例えば、免疫グロブリンの異なるアイソタイプを逆転写するために、異なる免疫グロブリン間で、一定であり得る。プライマー結合領域はまた、免疫グロブリンの特定のアイソタイプに特異的であり得る。典型的に、プライマーは、少なくとも1つのCDRをコードしている配列に対して、3'である領域に関して特異的である。他の実施形態において、ポリ-dTプライマーを使用してよい(そして、これは重鎖遺伝子に対して好ましい可能性がある)。

10

【0154】

合成配列を、逆転写した鎖の3'末端に結合可能である。合成配列は、逆転写の後、PCR増幅の中に、フォワードプライマーの結合に関して、プライマー結合部位として使用可能である。合成配列の使用で、利用可能な多様性を完全に獲得するために、異なるフォワードプライマーのプールを使用することの必要性を未然に防ぎえる。

20

【0155】

ついで、可変領域-コード遺伝子を、例えば1つまたはそれ以上の回数を用いて増幅する。多重回数を用いる場合、忠実度をあげるために、ネスト化(nested)プライマーを使用可能である。ついで増幅した核酸を、ディスプレイライブラリーベクター内にクローン化する。

【0156】

核酸配列を増幅するための任意の方法を、増幅のために使用しうる。多様性を最大化し、しかしバイアス(bias)をかけない方法が好ましい。多様な技術を、核酸増幅のために使用可能である。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR、米国特許第4,683,195号および第4,683,202号、Saikiら(1985) Science 230:1350-1354)は、温度を変化させるサイクルを使用して、核酸合成のラウンドを駆動する。転写に基づく方法は、RNAポリメラーゼによるRNA合成を用い、核酸を増幅する(米国特許第6,066,457号、米国特許第6,132,997号、米国特許第5,716,785号、Sarkarら(1989) Science 244:331-34、Stoflerら(1988) Science 239:491)。NASBA(米国特許第5,130,238号、第5,409,818号および第5,554,517号)は、DNA試料を増幅するために、転写、逆転写およびRnaseHに基づく分解のサイクルを利用する。また他の増幅方法には、ローリングサイクル増幅(RCA、米国特許第5,854,033号および第6,143,495号)および鎖置換増幅(SDA、米国特許第5,455,166号および第5,624,825号)が含まれる。

30

40

【0157】

E. 第二スクリーニング法

標的に結合する候補ディスプレイライブラリーメンバーを選別した後に、それぞれの候補ディスプレイライブラリーメンバーをさらに解析し、例えば、標的に対するその結合特性をさらに特性化する。各候補ディスプレイライブラリーメンバーを、1つまたはそれ以上の第二スクリーニングアッセイにかけることができる。アッセイは、結合特性、触媒特性、生理学的特性(例えば、細胞毒性、腎臓クリアランス、免疫原性)、構造的特性(例えば、安定性、立体配座、オリゴマー化状態)または他の機能的特性に関してであり得る

50

。同様のアッセイを、繰り返し、ただし、条件を変化させて例えば pH、イオンまたは温度感受性を決定して使用可能である。

【0158】

好ましいように、アッセイは、ディスプレイライブラリーメンバーを直接、提示されたポリペプチドをコードしている核酸から産出した組換え体ポリペプチドを、または提示されたペプチドの配列に基づいて合成した合成ペプチドを使用可能である。結合特性に関する例示的なアッセイには、以下が含まれる。

【0159】

1. ELISA

ディスプレイライブラリーによってコードされたポリペプチドをまた、ELISAアッセイを用いて、結合特性に関して選別可能である。例えば、各ポリペプチドを、その底表面を標的、例えば限定量の標的でコートした、マイクロタイタープレートに接触させる。プレートを緩衝液で洗浄し、非特異的結合ポリペプチドを除去する。ついで、プレートに結合したポリペプチドの量を、プレートを、ポリペプチド、例えばポリペプチドのタグまたは定常部分を認識可能な抗体で、プローブすることによって決定する。抗体を、好ましい基質が提供されたときに、比色分析産物を産出する、アルカリホスファターゼのような酵素に連結する。ポリペプチドは、細胞より精製可能であり、例えばフィラメントスバクテリオファージコートへの融合のような、ディスプレイライブラリーフォーマット中でアッセイ可能である。他のELISAアッセイのバージョンにおいて、多様な鎖ライブラリーの各ポリペプチドを、マイクロタイタープレートの異なるウェル (well) の表面を覆うために使用する。ついでELISAを、各ウェルをクエリー (query) するために、定常標的分子を用いて進める。

【0160】

2. ホモジニアス結合アッセイ (Homogeneous Binding Assays)

候補ポリペプチドの標的との結合相互作用を、ホモジニアスアッセイ、すなわち、アッセイのすべての要素を足した後に、さらなる流体操作が必要のないアッセイを使用して解析可能である。例えば、蛍光共鳴エネルギー転送 (FRET) を、ホモジニアスアッセイとして使用可能である (例えば、Lakowiczら、米国特許第5,631,169号、Stavriopoulosら、米国特許第4,868,103号を参照のこと)。第二分子が、第一分子の近くに存在する場合に、その放射蛍光エネルギーが、第二分子 (例えば標的) 上の蛍光団ラベルによって吸収可能であるように、第一分子上の蛍光団ラベル (例えば、画分中で同定された分子) を、選択する。第二分子上の蛍光ラベルは、転送されたエネルギーに吸収される時に、蛍光を発する。ラベル間のエネルギー転送の効率は、分離した分子の距離に関連し、分子間の空間的關係を評価し得る。分子間で結合が起こる状況において、アッセイ内の「アクセプター」分子ラベルの蛍光放射は最大であるべきである。FRETによってモニタリングするために設定された結合事象は、本技術分野でよく公知の、標準の蛍光分析検出方法 (例えばフルオリメーターを使用する) を介して、都合よく測定可能である。第一または第二結合分子の量を滴定することによって、結合曲線を作製し、平衡結合定数を推定可能である。

【0161】

ホモジニアスアッセイの他の例は、アルファスクリーン (Alpha Screen) (パックカード バイオサイエンス (Packard Bioscience), Meriden, Connecticut, USA) である。アルファスクリーンは、2つの標識化ビーズを使用する。1つのビーズが、レーザーによって励起された場合に、シングレット (singlet) 酸素を産出する。もう1つのビーズは、シングレット酸素が、第一ビーズより発散され、これに衝突した場合に、光シグナルを産出する。一方のビーズは、ディスプレイライブラリーメンバーに付着し、他の一方は標的に付着可能である。シグナルは、結合の程度を決定するために測定する。

【0162】

10

20

30

40

50

ホモジニアスアッセイは、候補ポリペプチドが、ディスプレイライブラリー担体、例えばバクテリオファージに付着する間に実施可能である。

【0163】

### 3. 表面プラズモン共鳴 (SPR)

ディスプレイライブラリーから単離した分子と、標的の結合相互作用は、SPRを用いて解析可能である。SPRまたは生物分子相互作用解析 (Biomolecular Interaction Analysis (BIA)) は、任意の反応体を標識すること無しに、リアルタイムで、生物特異的相互作用を検出する。BIAチップの結合表面における質量の変化 (結合事象の指標) は、結果として、表面近くの光の反射指数の変化となる (表面プラズモン共鳴の光学的現象 (SPR))。屈折度の変化は、検出可能なシグナルを産出し、これは、生物学的分子間のリアルタイム反応の指標として測定される。SPRを用いるための方法は、例えば、米国特許第5,641,640号、Raether (1988) Surface Plasmons, Springer Verlag, Sjolander and Urbaniczky (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345、Szaboら (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705で記述されており、また、BIAcore International AB (Uppsala, Sweden) によって提供されるオンラインリソースで記述されている。

10

【0164】

SPRからの情報は、生物分子の標的への結合に関する、 $K_{on}$  および  $K_{off}$  を含む、平衡解離定数 ( $K_d$ ) および速度論パラメータの正確で定量的な測定を提供するために使用可能である。そのようなデータは、異なる生物分子を比較するために使用可能である。例えば、多様な鎖のライブラリーから選択した核酸によってコードされたタンパク質を、標的に対して高い親和性を持つ、または低  $K_{off}$  を持つ個々を同定するために比較可能である。この情報はまた、構造-活性相関 (structure-activity relationships) (SAR) を進展させるために使用可能でもある。例えば、親タンパク質の飽和パーセントの速度論および平衡結合パラメータを、親タンパク質のパラメータと比較可能である。該位置でのバリエーションアミノ酸を、特定の結合パラメータ、例えば高親和性および低  $K_{off}$  と相関があるように同定可能である。この情報は、(例えば相同性モデリング、エネルギー最小化、または結晶学またはNMRによる構造決定を用いて) 構造モデリングと組み合わせることが可能である。結果として、タンパク質とその標的間の物理的相互作用を理解すると、定式化でき、他の設計工程を導くために使用可能となる。

20

30

【0165】

### 4. タンパク質配列

ディスプレイライブラリーから同定したポリペプチドを、固体支持体、例えばビーズまたは配列上に固定可能である。タンパク質配列に関して、それぞれのポリペプチドを、支持体の固有のアドレスに固定化する。典型的には、アドレスは、二次元アドレスである。タンパク質配列を以下に記述する (例えば、「診断 (Diagnostics)」を参照のこと)。

40

【0166】

### 5. 細胞アッセイ

(例えば、ディスプレイライブラリーまたは他の方法によって先に同定された) 候補ポリペプチドライブラリーを、宿主細胞内のライブラリーを形質導入することによって選別可能である。例えば、ライブラリーには、ポリペプチドをコードしている、および例えば、ポリペプチドが細胞内で産出され、細胞より分泌される、または細胞表面に接着するような発現を指向する区画を含む、ベクター核酸配列が含まれる。細胞を、例えば、細胞表現系または細胞仲介活性の変化によって検出可能なように、MUC1-Hに対して結合するポリペプチドに関して選別可能である。例えば、MUC1-Hに結合する抗体の場合、活性は、細胞または補体仲介細胞毒性であり得る。

50

## 【0167】

他の実施形態において、細胞のライブラリーは、細胞配列の形態である。細胞配列は、同様に、任意の適切な検出可能活性に関して選別可能である。

## 【0168】

F. リガンド産出

標準の組換え体核酸法を使用して、MUC1-Hに結合するポリペプチドリガンドを発現可能である。一般的に、ポリペプチドリガンドをコードしている核酸配列を、核酸発現ベクター内にクローン化する。もちろん、タンパク質が多重ポリペプチド鎖を含む場合、各鎖は、発現ベクター、例えば、同一または異なる細胞に発現している、同一または異なるベクター内にクローン化されなければならない。タンパク質が十分小さい、すなわち、タンパク質が50アミノ酸以下のペプチドの場合、タンパク質は、自動化した有機合成方法を用いて合成可能である。抗体を産出するための方法もまた、以下に提供する。

10

## 【0169】

ポリペプチドリガンドの発現に関する発現ベクターには、ポリペプチドリガンドまたはその断片をコードしている部分に加えて、例えば、実施可能に対象の核酸に連結したプロモーターを含む、調節配列が含まれる。多数の好適なベクターおよびプロモーターが、当業者に公知であり、本発明の組換え体構造物を生成するために商業的に入手可能である。以下のベクターが、一例として提供される。細菌：pBs、ファージスクリプト (phagescript)、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a (ストラタジーン (Stratagene)、La Jolla、California、USA)、pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、およびpRIT5 (ファルマシア (Pharmacia)、Uppsala、Sweden)。真核細胞：pWLineo、pSV2cat、pOG44、PXTI、pSG (ストラタジーン) pSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL (ファルマシア)。好ましいライブラリーの1つの好ましいクラスは、ディスプレイライブラリーであり、以下に記述している。

20

## 【0170】

当業者によく公知の方法を、本発明のポリヌクレオチドおよび適した転写/翻訳対照シグナルを含むベクターを構築するために使用可能である。これらの方法には、in vitro組換え体DNA技術、合成技術およびin vivo組換え/遺伝子組み換えが含まれる。例えば、技術は、Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001) および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)) にて記述されている。プロモーター領域を、CAT (クロラムフェニコール トランスフェラーゼ) ベクターまたは他のベクターを用いて、選択可能なマーカーにて、望む遺伝子から選択可能である。2つの適したベクターは、pKK232-8とpCM7である。特定の名前の細菌プロモーターには、lacI、lacZ、T3、T7、gpt、ラムダP、およびtrcが含まれる。真核生物プロモーターには、CMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、前期および後期SV40、レトロウイルス由来LTRs、マウスメタロチオネイン-I (mouse metallothionein-I) および種々の本技術分野で公知の組織特異的プロモーターが含まれる。

30

40

## 【0171】

一般的に、組換え体発現ベクターは、複製起源、および宿主細胞の形質転換を許容する、選択可能なマーカー、例えば、大腸菌アンピシリン抵抗性遺伝子および (URA3、LEU2、HIS3、およびTRP1遺伝子のような) S. cerevisiae) 栄養素要求株マーカー、および下流構造配列の転写を指向するために、大いに発現した遺伝子から由来するプロモーターを含みうる。そのようなプロモーターは、とり

50

わけ3 - ホルホグリセレートキナーゼ ( P G K )、a - 因子、酸ホスファターゼ、またはヒートショックタンパク質などのような、糖分解酵素をコードしているオペロンより誘導可能である。本発明のポリヌクレオチドは、翻訳開始および終了配列、および好ましくは、周辺腔 ( p e r i p l a s m i c s p a c e ) または細胞外培地内での、翻訳されたタンパク質の分泌を指向可能であるリーダー配列において、適切な相 ( p h a s e ) にて組み立てられる。任意に、本発明の核酸は、望む特性、例えば安定性を与え、または発現した組換え体産物の精製を単純化する、N - 末端同定ペプチドを含む融合タンパク質をコード可能である。細菌に関して、有用な発現 - ベクターを、本発明のポリヌクレオチドを、好適な翻訳開始および終了シグナルとともに、任意に、機能プロモーターと実施可能なリーディング相内にて、挿入することによって構築する。ベクターには、ベクターの維持を確かにし、望むのならば、宿主内の増幅を提供するために、1つまたはそれ以上の表現系選択可能マーカーおよび複製開始点を含む。形質転換のための、好適な原核生物宿主には、大腸菌、バチルス サブチリス ( B a c i l l u s s u b t i l i s )、サルモネラ チフィムリウム ( S a l m o n e l l a t y p h i m u r i u m ) およびシュードモナス ( P s e u d o m o n a s )、ストレプトマイセス ( S t r e p t o m y c e s ) およびスタフィロコッカス ( S t a p h y l o c o c c u s ) 属内の多様な種が含まれが、他にもまた、選択の事象として使用可能である。

10

## 【0172】

限定ではないが代表的な例として、細菌に関して有用な発現ベクターは、よく公知のクローニングベクター p B R 3 2 2 ( A T C C 3 7 0 1 7 ) の遺伝的要素を含む、市販で入手可能なプラスミドより由来した選択可能なマーカー、および細菌複製開始点を含みうる。そのような市販のベクターには、例えば p K K 2 2 3 - 3 ( ファルマシア ファインケミカルズ ( P h a r m a c i a F i n e C h e m i c a l s )、U p p s a l a、S w e d e n ) および p G E M 1 ( プロメガ ( P r o m e g a )、M a d i s o n、W i s c o n s i n、U S A ) が含まれる。

20

## 【0173】

本発明はさらに、本発明のベクターを含む宿主細胞を提供し、そこで核酸は、公知の形質転換、トランスフェクション ( t r a n s f e c t i o n ) または感染方法を用いて宿主細胞内に導入されている。例えば、宿主細胞は、多様な鎖から構築されたライブラリーのメンバーを含みうる。宿主細胞は、哺乳類細胞のような真核細胞、酵母細胞のような低級真核宿主細胞でありえ、または宿主細胞は、細菌細胞のような、原核細胞であり得る。組換え構築物の、宿主細胞内への導入は、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E、デキストラン仲介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション ( e l e c t r o p o r a t i o n ) ( D a v i s、L. ら、B a s i c M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y ( 1 9 8 6 ) ) によって達成されうる。

30

## 【0174】

任意の宿主/ベクター系を、本発明の1つまたはそれ以上の宿主要素を同定するために使用可能である。これらには、制限はしないが、HeLa細胞、CV-1細胞、COS細胞、およびSf9細胞のような真核細胞宿主、ならびに大腸菌、およびB. サブチリスのような原核細胞宿主が含まれる。もっとも好ましい細胞は、通常特定のレポーターポリペプチドまたはタンパク質を発現していないか、または低い天然レベルで、レポーターポリペプチドまたはタンパク質を発現する細胞である。

40

## 【0175】

本発明の宿主は、酵母または他の菌類でもあり得る。酵母において、構成または誘導可能プロモーターを含む多くのベクターを使用してよい。概説のために、Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Ed. Ausubel ら、Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience, Ch. 13 (1988)、Grant ら。(1987)「酵母のための発現および分泌ベクター類 ( Expression and Secretion Vectors for Yeast )」、Methods Enzymol. 153

50

: 516 - 544、Glover, DNA Cloning, Vol. II, IRL Press, Wash, D.C., Ch. 3 (1986)、Bitter, Heterologous Gene Expression in Yeast, Methods Enzymol. 152: 673 - 684 (1987)、および The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, Eds. Strathernら, Cold Spring Harbor Press, Vols. I and II (1982)を参照のこと。

【0176】

本発明の宿主はまた、大腸菌のような原核細胞、セラチア マレスカンス (*Serratia marescans*)、パチルス、種々のシュドモナスのようなエンテロバクテリアセス、または他の形質転換、トランスフェクト及び/又は感染可能な原核生物でもあり得る。

10

【0177】

本発明はさらに、本発明のポリペプチドを含むために、遺伝子工学的に改変した宿主細胞を提供する。例えば、そのような宿主細胞は、公知の形質転換、トランスフェクションまたは感染方法を用いて宿主細胞内に導入した、本発明の核酸を含んでよい。本発明はまたさらに、本発明のポリヌクレオチドを発現するように、遺伝子工学的に改変した宿主細胞を提供し、そこで、そのようなポリヌクレオチドは、細胞内でのポリヌクレオチドの発現を駆動する宿主細胞に非相同の調節配列と関連する。

【0178】

宿主細胞は、哺乳類細胞のような、より高次の真核宿主細胞、酵母細胞のような、より低級の真核宿主細胞であってよく、または宿主細胞は、細菌細胞のような原核細胞であってよい。

20

【0179】

宿主細胞への組み換え構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE、デキストラン仲介トランスフェクション、またはエレクトロポレーション (Davis, Letら, (1986) Basic Methods in Molecular Biology) によって達成しうる。本発明の1つのポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、(ORFの場合)単離した断片によってコードされた遺伝子産物を産出するために、従来の様式で使用可能である。

30

【0180】

任意の宿主/ベクター系を、本発明の多様な鎖の1つまたはそれ以上を発現させるために使用可能である。これらには、制限はしないが、HeLa細胞、CV-1細胞、COS細胞、およびSf9細胞のような真核細胞宿主、ならびに大腸菌、およびB. サブチリスのような原核細胞宿主が含まれる。もっとも好ましい細胞は、通常特定のレポーターポリペプチドまたはタンパク質を発現していないか、または低い天然レベルで、レポーターポリペプチドまたはタンパク質を発現する細胞である。成熟タンパク質は、哺乳類細胞、酵母、細菌または他の細胞内で、適切なプロモーターの制御下で発現可能である。細胞を含まない翻訳系もまた、本発明のDNA構築物から由来したRNAsを用いて、そのようなタンパク質を産出するために使用可能である。真核生物および原核生物宿主との使用に関し、好ましいクローニングおよび発現ベクターは、そのすべてが、参考文献にて本明細書に開示されている、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, Laboratory, New York (1989)によって記述されている。

40

【0181】

種々の哺乳類細胞培養系もまた、組換え体タンパク質を発現するために使用可能である。

【0182】

哺乳類発現系の例には、Gluzman (1981) Cell 23: 175 (19

50

81) によって記述されたサル腎臓線維芽細胞、および例えばC127、3T3、CHO、HeLaおよびBHK細胞株のような、互換性ベクターを発現可能な他の細胞株が含まれる。哺乳類発現ベクターは、複製開始点、好適なプロモーターおよび任意の必要なりボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位、転写終了配列および5'連結非転写配列を含む。

#### 【0183】

SV40ウイルスゲノム、例えばSV源から由来したDNA配列、初期プロモーター、エンハンサー、スプライスおよびポリアデニル化部位を、必要な非転写遺伝的部位を提供するために使用して良い。細菌培養液中で産出した組換え体ポリペプチドおよびタンパク質は、通常、細胞沈殿物からの初期抽出、続く1つまたはそれ以上の塩析、水性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィー段階によって単離する。いくつかの実施形態において、鋳型核酸はまた、ポリペプチドタグ、例えばペンタ-またはヘキサ-ヒスチジンをコードしている。ついで、多様な鎖のライブラリーによってコードされた組換え体ポリペプチドを、親和性クロマトグラフィーを用いて精製可能である。

10

#### 【0184】

タンパク質の発現にて使用する細菌細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的分散、または細胞溶解剤の使用を含む、任意の使いやすい方法によって破裂させることが出来る。多くの型の細胞が、タンパク質の発現のための好適な宿主細胞として働く。Scopes (1994) Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York) は、組換え体(および非組換え体)タンパク質を精製するための、多くの一般的な方法を提供している。本方法には、例えばイオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、選択的沈殿、透析、および疎水性相互作用クロマトグラフィーが含まれる。これらの方法は、抗MUC1-Hポリペプチドリガンドに対する、精製方針を考案するために適用可能である。

20

#### 【0185】

哺乳類宿主細胞には、例えば、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巢(CHO)細胞、ヒト腎臓293細胞、ヒト上皮A431細胞、ヒトColo205細胞、3T3細胞、CV-1細胞、他の形質転換した霊長類細胞株、正常二倍体細胞、初代組織のin vitro培養から由来する細胞株、初代移植片、HeLa細胞、マウスL細胞、BHK、HL-60、U937、HaKまたはJurkat細胞が含まれる。

30

#### 【0186】

あるいは、酵母のような低級真核生物、または細菌のような原核生物内でタンパク質を産出することも可能であり得る。潜在的に好適な酵母株には、サッカロマイセスセルビシエ(Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロマイセスポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クワイベロマイセス(Kluyveromyces)株、カンジダ(Candida)、または非相同性タンパク質を発現可能な任意の酵母株が含まれる。潜在的に好適な細菌株には、大腸菌(Escherichia coli)、バシルスサブチリス(Bacillus subtilis)、サルモネラチフムリウム(Salmonella typhimurium)または非相同性タンパク質を発現可能な任意の細菌株が含まれる。タンパク質が、酵母または細菌内で作製される場合、機能的タンパク質を得るために、例えば適切な部位のリン酸化または糖付加によって、ここで産出されたタンパク質を改変することが必要であり得る。このような共有結合は、公知の化学的または酵素的方法を用いて実施されうる。本発明の他の実施形態において、細胞および組織を、誘導可能な制御要素の制御下で、本発明のポリヌクレオチドを含む内生遺伝子を発現するように処理してよく、この場合、内生遺伝子の調節配列が、相同組換えによって置換されうる。本明細書で記述したように、異なる遺伝子または遺伝子工学的改変方法によって合成した新規調節配列から単離した調節配列を用いて、遺伝子の存在する調節領域を置換するために、遺伝子標的化を使用可能である。

40

50

## 【0187】

そのような調節配列は、プロモーター、エンハンサー、足場接着領域、ネガティブ調節要素、転写開始部位、調節タンパク質結合部位または前記配列の組み合わせからなりうる。あるいは、産出されたRNAまたはタンパク質の構造または安定性に影響を与える配列を、ポリアデニル化シグナルを含んで、標的化によって置換、除去、添加、あるいは改変してよい。mRNA安定性要素、スプライス部位、タンパク質のトランスポートまたは分泌特性を増強または改変するためのリーダー配列、またはタンパク質またはRNA分子の機能または安定性を変化、または改善する他の配列。

## 【0188】

## 1. 抗体産出

いくつかの抗体、例えばFabを、細菌細胞、例えば大腸菌細胞内で産出可能である。例えば、Fabが、ディスプレイ実在物とバクテリオファージタンパク質（またはその断片）間の抑制可能終止コドンを含む、ファージディスプレイベクター内の配列によってコードされている場合、ベクター核酸を、終止コドンを抑制できない細菌細胞内にシャッフル（shuffle）可能である。この場合、Fabは遺伝子IIIタンパク質に融合せず、培地中に分泌される。

## 【0189】

抗体はまた、真核生物細胞中で産出可能である。1つの実施形態において、抗体（例えばscFv）は、ピッチア（*Pichia*）（例えば、Powerら（2001）*J. Immunol. Methods*, 251: 123-35を参照のこと）、ハンセウラ（*Hansenula*）またはサッカロマイセス（*Saccharomyces*）中で発現する。

## 【0190】

1つの好ましい実施形態において、抗体を哺乳類細胞中で産出する。クローン抗体またはその抗原結合断片を発現するための好ましい哺乳類宿主細胞には、（例えばKauffman and Sharp（1982）*Mol. Biol.* 159: 601-621）にて記述された、DHFR選択可能なマーカーで使用した、（Urlaub and Hasin（1980）*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216-4220）にて記述された、dhfr<sup>-</sup>CHO細胞、リンパ系細胞株、例えばNS0ミエローマ細胞、およびSP2細胞、COS細胞および形質転換動物、例えば形質転換哺乳類からの細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（Chinese Hamster Ovary（CHO細胞））、が含まれる。例えば、細胞は哺乳動物上皮細胞である。

## 【0191】

多様化免疫グロブリン領域をコードしている核酸配列に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞内のベクターの複製を調節する配列（例えば複製開始点）および選択可能なマーカー遺伝子のような、さらなる配列を含んでよい。選択可能マーカー遺伝子は、その中にベクターが導入される、宿主細胞の選択を可能にする（例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号、および第5,179,017号を参照のこと）。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入される宿主細胞に、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートのような、薬剤への抵抗性を与える。好ましい選択可能なマーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸リダクターゼ（DHFR）遺伝子（メトトレキサート選別/増幅でdhfr<sup>-</sup>宿主細胞内での使用のため）およびneo遺伝子（G418選択のため）が含まれる。

## 【0192】

本発明の抗体、またはその抗原結合部分の組換え体発現に関する例示的な系において、抗体重鎖および抗体軽鎖両方をコードしている組換え体発現ベクターを、リン酸カルシウム仲介トランスフェクションによって、dhfr<sup>-</sup>CHO細胞内に導入する。組換え体発現ベクター内で、抗体重鎖および軽鎖遺伝子は、それぞれ動作可能なように、（例えばCMVエンハンサー/AΔMLPプロモーター調節要素またはSV40エンハンサー/AΔMLPプロモーター調節要素のような、SV40、CMV、アデノウイルスなどから由来

10

20

30

40

50

する)エンハンサー/プロモーター調節要素に連結し、高いレベルの遺伝子の転写が駆動される。組換え体発現ベクターはまた、DHFRを含み、これにより、メトトレキサート選別/増幅を用いて、ベクターにトランスフェクトしたCHO細胞の選別を可能にする。選別したトランスフォーマント宿主細胞を培養し、抗体重鎖および軽鎖の発現が可能になり、原型の抗体が、培養培地より回収される。標準の分子生物学的技術を使用して、組換え体発現ベクターを調製し、宿主細胞をトランスフェクトし、トランスフォーマントに関して選別し、宿主細胞を培養し、培養培地より抗体を回収する。例えば、いくつかの抗体を、Protein AまたはProtein Gでのアフィニティークロマトグラフィーによって単離可能である。

#### 【0193】

Fc領域を含む抗体に関して、抗体産出系で、好ましくはFc領域に糖付加して、抗体が合成される。例えば、IgG分子のFc領域は、CH2領域中のアスパラギン297にて糖付加される。このアスパラギンは、二分岐型(biantennary-type)オリゴサッカライドで改変されるための部位である。この糖付加が、Fcレセプターと補体C1qによって仲介されるエフェクター機能のために要求される(Burton and Woof (1992) Adv. Immunol. 51:1-84; Jeffersら(1998) Immunol. Rev. 163:59-76)。好ましい実施形態において、Fc領域は、好ましくは、アスパラギン297に相当する残基に適切に糖付加する、哺乳類発現系中で産出する。Fc領域はまた、他の真核生物翻訳後修飾を含みうる。

#### 【0194】

抗体はまた、形質転換動物によっても産出可能である。例えば、米国特許第5,849,992号は、形質転換動物の哺乳類腺中に抗体を発現する方法を記述している。トランス遺伝子を、乳特異的プロモーターおよび対照抗体および選別のためのシグナル配列をコードしている核酸を含むように構築する。そのような形質転換哺乳動物のメスによって産出された乳は、分泌されたそれに対象の抗体が含まれる。抗体を、乳より精製し、またはある適用では、直接使用する。

#### 【0195】

##### G. 薬理学的組成物

他の態様において、本発明は、組成物、例えば薬理学的に許容可能な組成物を提供し、これは、抗MUC1-Hリガンド、例えば抗体分子、MUC1-Hに結合することで同定された、または本明細書で記述した、他のポリペプチドまたはペプチドが含まれ、薬理的に許容可能な担体とともに処方される。本明細書で使用するところの、語句「薬理学的組成物(pharmaceutical compositions)」は、in vivo画像化、ならびに治療的組成物のための標識化リガンドを含む。

#### 【0196】

本明細書で使用するところの、「薬理学的に許容可能な担体(pharmaceutically acceptable carrier)」には、任意の、そしてすべての溶媒、分散培地、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、生理学的に適合可能な類似のもの、が含まれる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または末梢投与(例えば注射または注入による)のために好適である。投与経路に依存して、活性化合物、すなわちポリペプチドリガンドを、物質内にて、酸の活性、および化合物を不活性化する他の天然の条件から、化合物を保護するために、その表面を覆って良い。

#### 【0197】

「薬理学的に許容可能な塩(pharmaceutically acceptable salt)」は、親化合物の望む生物学的活性を残しているが、任意の望まない毒性効果を与えない塩を意味する(例えば、Berger, S.M.ら(1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと)。そのような塩の例には、酸添加塩および塩基添加塩が含まれる。酸添加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素、ヨウ化水素、リンなどのような、非毒性無機塩から由来するもの、ならびに、脂肪酸一および二炭

10

20

30

40

50

酸塩、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪および芳香スルホン酸などのような、非毒性有機酸から由来するものが含まれる。塩基添加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのようなアルカリ土類金属から由来するもの、ならびにN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどのような、非毒性有機アミンから由来するものが含まれる。

【0198】

本発明の組成物は、種々の形態であり得る。これらには、例えば、液体溶液（例えば注射可能および注入可能溶液）、分散液または懸濁液、タブレット、ピル、粉末、リポソームおよび座剤のような、液体、半固体、固体投与形態が含まれる。好ましい形態は、意図した投与形態および治療適用に依存する。典型的な好ましい組成物は、ヒトの投与のために抗体とともに使用されるものと同一の組成物のような、注射可能または注入可能溶液の形態である。好ましい投与様式は、非経口（例えば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）である。好ましい実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、静脈内注入または注射によって投与される。他の好ましい実施形態において、抗MUC1-Hリガンドは、筋肉内または皮下注射によって投与される。

10

【0199】

本明細書で使用するところの語句「非経口投与（parenteral administration）」および「非経口で投与（administered parenterally）」は、通常、注射による、経腸および局所投与以外の投与方法を意味し、限定はしないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、水晶体内、眼窩内、心臓内、粘膜内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外、胸骨内注射および注入が含まれる。

20

【0200】

薬理的組成物は、典型的には、製造および保存の条件下で、無菌および安定でなければならぬ。薬理的組成物をまた、投与に関して、規制および工業標準に合うことを保証するために、試験可能である。例えば、調整品内のエンドトキシンレベルを、USP 24/NF 19法に従って、（例えばバイオウィットテーカー（Bio Whittaker）からのキット、例えば感度0.125 EU/mLでのロット#7L3790を用いた）Limulus遊走細胞溶解物アッセイを用いて試験可能である。薬理的組成物の無菌性を、USP 24/NF 19法に従って、チオグリコレート培地を用いて測定可能である。例えば、調整品を使用して、チオグリコレート培地に接種し、35℃にて14またはそれ以上の日数インキュベートする。培地を、微生物の増殖を検出するために、周期的に検査する。

30

【0201】

組成物は、溶液、ミクロエマルジョン、分散液、リポソームまたは高薬物用量に好適な他の順序化された構造として処方可能である。無菌注射可能溶液は、適切な溶媒中の活性化化合物（すなわちリガンド）を、必要な量で、上記で列挙した成分1つまたは組み合わせを含む溶媒中に組み入れ、必要なときに、続いて濾過滅菌することによって調製可能である。一般的に、分散液は、活性化化合物を、塩基性分散培地および以上で列記したものからの必要な他の成分を含む無菌賦形剤内に組み込むことによって調製する。無菌注射可能溶液の調製のための、無菌粉末の場合、調製の好ましい方法は、活性成分およびすでに滅菌濾過したその溶液からの、任意のさらなる望む成分の粉末を産出する、吸引乾燥および凍結乾燥である。溶液の適切な流動性を、例えば、レシチンのようなコーティングの使用によって、分散液である場合は、要求された粒子サイズの維持によって、および界面活性剤の使用によって、維持可能である。組成物中に、吸収を遅らせる薬剤、例えば一ステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによって、注射可能組成物の長期の吸収を実施可能である。

40

【0202】

本発明の抗MUC1-Hポリペプチドリガンドは、多くの適用に関して、好ましい投与

50

経路 / 様式が、静脈内注射または注入であるけれども、本技術分野で公知の種々の方法によって投与可能である。例えば、治療的適用のために、抗MUC1-Hリガンドを、30、20、10、5または1mg / 分以下の速度で、静脈内注入によって投与可能であり、約1 ~ 100 mg / m<sup>2</sup> または7 ~ 25 mg / m<sup>2</sup> の用量に到達する。投与経路および / 様式は、望む結果に依存して変化する。特定の実施形態において、活性化合物を、インプラントおよび微小カプセル伝達系のような放出制御処方のような、化合物を急速な放出から守る担体とともに調製する。エチレンビニル酢酸、ポリ無水物、ポリグリコリン酸、コラーゲン、ポリオルトエステル類、およびポリ酪酸のような、生物分解性、生物適合性ポリマーを、使用可能である。そのような処方の調製のための多くの方法は、特許出願されており、一般的に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。 10

#### 【0203】

ある実施形態において、リガンドは、例えば、不活性希釈液または吸収可能食用担体とともに、経口投与してよい。化合物（および望むのならば他の成分）はまた、硬または軟シェルゼラチンカプセル内に同封、タブレット内に圧縮、または対象の食事に直接含めてもよい。経口治療適用のために、化合物を、賦形剤と組み込み、摂取可能タブレット、パッカルトレット、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハーなどの形態で使用して良い。非経口投与以外によって本発明の化合物を投与するために、その不活性化を予防するために、化合物を物質で覆うか、または化合物を物質とともに投与することが必要であり得る。 20

#### 【0204】

薬理的組成物は、本技術分野で公知の医療用具で投与可能である。例えば、好ましい実施形態において、本発明の薬理的組成物は、米国特許第5,399,163号、第5,383,851号、第5,312,335号、第5,064,413号、第4,941,880号、第4,790,824号または第4,596,556号で開示された器具のような、針を必要としない皮下注射器具で投与可能である。本発明でよく公知のインプラント (implant) およびモジュール (module) の例には、制御速度にて、医薬品を分散するための、埋め込み可能マイクロ-注入ポンプを開示している、米国特許第4,487,603号、皮膚を介して医薬品を投与するための治療器具を開示している、米国特許第4,486,194号、正確な注入速度にて、医薬品を伝達するための、医薬品注入ポンプを開示している、米国特許第4,447,233号、一定の薬物伝達のための、可変フロー埋め込み可能注入器具を開示している、米国特許第4,447,224号、多重チャンパーコンポーネンツを持つ、浸透圧薬物伝送系を開示している、米国特許第4,439,196号、および浸透圧薬物伝送系を開示している、米国特許第4,475,196号が含まれる。もちろん、多くの他のそのようなインプラント、伝送系およびモジュールも公知である。 30

#### 【0205】

ある実施形態において、本発明の化合物を、in vivoにて、正確な分配を保証するために処方可能である。例えば、血液脳関門 (BBB) は多くの高い親水性の化合物を排除する。本発明の治療化合物が、(望むならば) BBBを通過することを保証するために、例えば、リポソーム内に処方可能である。リポソームを製造する方法に関しては、例えば、米国特許第4,522,811号、第5,374,548号および第5,399,331号を参照のこと。リポソームは、特定の細胞または器官に選択的に伝達し、従って、標的化薬物伝達を増強する1つまたはそれ以上の部分を含んで良い (例えば、V. V. Ranade (1989) J. Chin. Pharmacol. 29: 685を参照のこと)。 40

#### 【0206】

用法を、最適な望む応答 (例えば、治療応答) をえるために適合させる。例えば、単一 50

ポーラスを投与してよく、いくつかに分割した用量を、時間をかけて投与してよく、または用量を、治療状況の要件によって示唆されたとき、比例して減少または増加させてよい。投与および用量の均一性を容易にするため、用量ユニット形態にて、非経口組成物を処方することはとくに利点がある。本明細書で使用する、用量ユニット形態は、治療すべき対象に対して、単一用量として好適な物理的に分離したユニットをさし、各ユニットは、望む治療効果を、必要な薬理学的担体と関連して産出するように計算し、先に決定された活性化合物の量を含む。本発明の用量ユニット形態に関する規格は、(a) 活性化合物の固有の特性および達成されるべき特定の治療効果、および(b) 個体における感受性の治療に関する、そのような化合物を化合する技術分野における固有の制限によって指向され、それらに直接依存する。

10

**【0207】**

治療的または予防的に効果的な量の本発明の抗体の、限定はしないが、例示的な範囲は、 $0.1 \sim 20 \text{ mg/kg}$ 、より好ましくは $1 \sim 10 \text{ mg/kg}$ である。抗MUC1-H抗体は、30、20、10、5または $1 \text{ mg/分}$ 以下の速度にて、約 $1 \sim 100 \text{ mg/m}^2$ または約 $5 \sim 30 \text{ mg/m}^2$ の用量に達するように、静脈内注入によって投与可能である。分子量が、抗体より小さなリガンドに関して、適切な量は比例して小さい可能性がある。用量値は、軽減されるべき状態の型および重症度とともに変化しうる。任意の特定の対象に対して、特定の用法が、個体の必要性および投与している、または組成物の投与を管理している人物の専門の判断に従って、長時間調整すべきであること、および本明細書で列記している用量範囲はただ例であり、請求された組成物の目的または実施を制限する意図はないことが、さらに理解されなければならない。

20

**【0208】**

本発明の薬理学的組成物は、「治療的に効果的な量(therapeutically effective amount)」または「予防的に効果的な量(prophylactically effective amount)」の本発明の抗MUC1-Hリガンドを含んで良い。「治療的に効果的な量」は、望む治療結果を達成するための用法、必要な期間における、効果的な量を意味する。組成物の治療的に効果的な量は、疾患状態、個々の年齢、性別および体重のような因子、個々における望む応答を引き出すための、ポリペプチドリガンドの能力に従って変化する。治療的に効果的な量はまた、治療的に有益な効果が、化合物の毒性または有害な効果より上回るものである。「治療的に効果的な量」は、好ましくは、測定可能パラメータ、例えば腫瘍増殖率を、未処理対象と比較して、少なくとも約20%まで、より好ましくは少なくとも約40%まで、またより好ましくは少なくとも約60%まで、またより好ましくは少なくとも約80%まで、阻害する。例えば癌のような、測定可能なパラメータを阻害する化合物の能力は、ヒト腫瘍での効果の予測である、動物モデル系中で評価可能である。あるいは、組成物の特性を、阻害、当業者に公知のアッセイによる*in vitro*での阻害のような、阻害する化合物の能力を試験することによって評価可能である。

30

**【0209】**

「予防的に効果的な量」は、望む予防結果を達成するための用法、および必要な期間における効果的な量を意味する。典型的には、予防用量を、疾患の前、または初期病期で対象にて使用するの、予防的に効果的な量は、治療的に効果的な量よりも小さい可能性がある。

40

**【0210】**

MUC1-Hに結合するポリペプチドリガンド、および使用、例えば治療、予防または診断的使用のための説明書を含むキットもまた、本発明の目的の範囲内である。1つの実施形態において、診断適用のための説明書には、MUC1-Hを、*in vitro*、例えば試料、例えば、癌または腫瘍性疾患を持つ患者からの生検または細胞において、または*in vivo*で検出するための、抗MUC1-Hリガンド(例えば、抗体またはその抗原結合断片、または他のポリペプチドまたはペプチド)の使用が含まれる。他の実施形態において、治療適用のための説明書には、癌または腫瘍性疾患をもつ患者における、提

50

示された用量及び/又は投与様式が含まれる。キットはさらに、1つまたはそれ以上の個々の薬理的調製物中に、必要に応じて処方された、診断または治療剤、例えば本明細書で記述したような診断または治療剤、のような少なくとも1つのさらなる剤、及び/又は1つまたはそれ以上のさらなる抗MUC1-Hリガンドを含みうる。

#### 【0211】

##### H. 治療

MUC1-Hに結合し、本明細書で記述された、及び/又は本明細書で詳述された方法によって同定されたポリペプチドリガンドは、治療的および予防的有用性を持つ。例えば、これらのリガンドを、培養中の細胞、例えば*in vitro*または*ex vivo*で、または対象内、例えば*in vivo*で、癌のような多様な疾病を治療、予防及び/又は診断するために、投与可能である。

10

#### 【0212】

本明細書で使用するときの、語句「治療する(treat)」または「治療(treatment)」は、疾病、疾患の症状または疾病に向かう傾向を、回復する、治癒する、緩和する、軽減する、変える、救済する、改善する、改良するまたは影響を与える目的で、単独での、または第二薬剤との組み合わせでの、抗MUC1-H抗体の適用または投与、または対象、例えば疾病(例えば、本明細書で記述したような疾病)、疾病の症状または疾病に向かいやすい傾向をもつ患者からの、単離組織または細胞、例えば細胞株への、薬剤の適用または投与として定義される。細胞を治療することは、疾病、例えば、本明細書で記述するような疾病(例えば癌性疾病)を仲裁するための、*in vitro*または

20

#### 【0213】

本明細書で示すところの、疾病を処置するために効果的な抗MUC1-Hリガンドの量、または「治療的に効果的な量(therapeutically effective amount)」は、細胞、例えば癌細胞(例えばMUC1-H発現癌細胞)を処置することにおいて、または、そのような治療がない状態で予想されるよりも、本明細書で記述したような疾病を患う対象の、回復、緩和、軽減または改善を引き延ばすことにおいて、対象への単一または複数の用量投与にて、効果的である、リガンドの量を意味する。本明細書で使用するときの、新生物の「増殖を阻害する(inhibiting the growth)」は、その増殖および転移を、ゆっくりにすること、中断すること、引き留めること、停止することを意味し、必ずしも新生物増殖の総削除を示唆していない。

30

#### 【0214】

本明細書で使用するときの、疾病を予防するために効果的な抗MUC1-Hリガンドの量、またはリガンドの「予防的に効果的な量(prophylactically effective amount)」は、疾病、例えば癌の開始または再発の発生を予防するまたは遅延させるのに、対象への単一または複数の用量投与において、効果的である、抗MUC1-Hリガンド、例えば、本明細書で記述したような抗MUC1-H抗体の量を意味する。

40

#### 【0215】

例えば、2つの状態間での定量的な差を記述する、語句「減少する(induce)」、「阻害する(inhibit)」、「増強する(potentiate)」、「上昇させる(elevate)」、「増加させる(increase)」、「減少させる(decrease)」などは、2つの状態の間での、差、例えば統計学的に有意な差を意味する。例えば、「MUC1-H発現過剰増殖細胞の増殖を阻害するのに効果的な量(an amount effective to inhibit the prolifer

50

ation of the MUC1-H-expressing hyperproliferative cells)」は、未処理細胞とは異なる、例えば統計学的に差のある細胞の増殖率を意味する。

【0216】

本明細書で使用するときの、語句「対象 (subject)」は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことが意図される。好ましいヒト動物には、異常細胞増殖または細胞分化によって特徴づけられる疾病を持つヒト患者が含まれる。本発明の語句「非ヒト動物 (non-human animals)」には、すべての脊椎動物、例えば(ニワトリ、両生類、は虫類のような)非哺乳動物および非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタなどのような哺乳動物が含まれる。

【0217】

1つの実施形態において、対象は、ヒト対象である。あるいは、対象は、本発明の抗体が交差反応する、MUC1-H様抗原を発現している哺乳動物であり得る。本発明のポリペプチドリガンドを、(以下でさらに議論する)治療目的のために、ヒト対象に投与可能である。さらに、抗MUC1-Hリガンドを、獣医目的のため、またはヒト疾患の動物モデルとして、リガンドが結合するMUC1-H様抗原を発現している非ヒト哺乳動物(例えば、霊長類、ブタまたはマウス)へ投与可能である。後者に関して、そのような動物モデルは、リガンドの治療効果を評価する(例えば投与の用量および時間経過を試験する)ために有用であり得る。

【0218】

1つの実施形態において、本発明は、細胞(例えば、非癌性細胞、例えば正常、良性または過形成細胞または癌細胞、例えば悪性細胞、例えば固形癌、軟組織腫瘍、または転移巣から得た細胞(例えば、腎臓、尿路上皮、大腸、直腸、肺、乳房または肝臓癌及び/又は転移からえられた細胞))を治療する(例えば削除するまたは殺す)方法を提供する。本発明の方法には、細胞を処置する、例えば削除する、または殺すのに十分な量で、抗MUC1-Hリガンド、例えば本明細書で記述の抗MUC1-H抗体と細胞を接触させる段階が含まれる。

【0219】

目的の方法は、培養中の細胞、例えばin vitroまたはex vivoにて、使用可能である。例えば、癌または転移細胞(例えば腎臓、尿路上皮、大腸、直腸、肺、乳房、卵巣、前立腺または肝臓癌または転移細胞)を、培養培地中で、in vitroにて培養可能であり、接触段階で、培養培地に、抗MUC1-Hリガンドを添加することによって達成可能である。本方法は、in vivo(例えば治療的または予防的)プロトコールの部分として、対象内で存在する細胞(例えば癌または転移細胞)上で実施可能である。in vivo実施形態に関して、接触段階は、対象内で実施され、細胞へのリガンドの結合、および細胞の治療の両方、例えば削除または殺傷を可能にするために効果的な条件下で、対象に抗MUC1-Hリガンドを投与することが含まれる。

【0220】

ほとんどのMUC-Hエピトープは、MUC1の残余非shedエピトープ上に存在し、これはshedの際に細胞表面上に残り、MUC1の膜貫通部分の細胞外N-末端領域であり、MUC1の膜貫通部分の直前に局在している。タンパク質のこの部分は、O型糖鎖結合部位を持たず、予想されるN型糖鎖結合部位を1つ持つ。shed MUC1の分離によって、MUC1の膜貫通部分の新エピトープが、膜結合MUC1分子上には存在せず、MUC1の他のスプライシングバリエーション上にも存在しないように、現れる。いくつかの例において、MUC1-Hエピトープは、MUC1のクリップ形態の成分によって形成される複合体上に存在し、つまりそのようなエピトープは、shed MUC1上に存在せず、従って、これを定義に従ってMUC1-Hエピトープとする。正常細胞における先端部の発現と比較して、腫瘍において、MUC1が先端ではなく発現するので、MUC1-Hは、腫瘍関連抗原として構成可能である。MUC1-Hに対する抗体およびペプチド類は従って、腫瘍特異性および治療的抗体で干渉されうる、血清中にshedされない、MU

10

20

30

40

50

C 1 - Hを示すことが可能である。

【0221】

本方法は、癌を処置するために使用可能である。本明細書で使用するところの語句、「癌(cancer)」、「過剰増殖(hyperproliferative)」、「悪性(malignant)」、および「新生物(neoplastic)」は、相互互換的に使用され、これら細胞の急速な増殖または新生物によって特徴づけられる異常状態または条件に関連する。この語句には、侵襲性の組織学的型または病期にかかわらず、すべての型の癌性増殖または発癌経過、転移組織または悪性形質導入細胞、組織、または器官が含まれる。「病理学的過剰増殖(pathologic hyperproliferative)」細胞は、悪性腫瘍増殖によって特徴づけられる疾患状態において、起こる。

【0222】

語句「新生組織形成(neoplasia)」の一般的な医学的意味は、結果として、正常の増殖対照、例えば新生細胞増殖に対する応答性の欠如としての、「新細胞増殖(new cell growth)」を意味する。「過形成(hyperplasia)」は、異常に速い増殖速度での細胞を意味する。しかしながら、その含まれるものが、異常な細胞増殖速度を経験している細胞を一般的に意味することが明らかであるので、本明細書で使用するところの、語句新生組織形成と過形成は、相互互換的に使用可能である。新生組織形成と過形成は、良性、前悪性または悪性であり得る、「腫瘍(tumors)」が含まれる。

【0223】

癌性疾患の例には、限定はしないが、固形腫瘍、軟組織腫瘍および転移巣が含まれる。固形腫瘍の例には、悪性腫瘍、例えば肺、乳房、リンパ腺、胃腸管(例えば大腸)および泌尿器管(例えば腎臓、尿路上皮細胞)、咽頭、前立腺、卵巣に影響するような、種々の器官の系肉腫、腺癌、癌腫、ならびに、ほとんどの大腸癌、直腸癌、腎臓細胞癌腫、肝臓癌、非小細胞肺癌、小腸癌などのような、悪性腫瘍を含む腺癌があげられる。上記の癌の転移巣もまた、本発明の方法および組成物を用いて、治療または予防可能でもある。

【0224】

該方法は、肺、乳房、リン腺、胃腸管(例えば大腸)、および泌尿器管、前立腺、卵巣、咽頭でのような種々の器官系の悪性腫瘍、ならびに、ほとんどの癌、腎臓細胞癌腫、前立腺癌及び/又は睾丸腫瘍、非小細胞肺癌、小腸癌および食道癌のような悪性腫瘍を含む腺癌を治療するのに有用であり得る。治療可能な固形腫瘍の例には、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、上皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管上皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂肪腺腫癌、乳頭状癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髓様癌、気管支原性癌、腎臓細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎児性癌、ウイルス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫が含まれる。

【0225】

語句「癌腫(carcinoma)」は、呼吸器系癌腫、胃腸管系癌腫、泌尿器生殖器系癌腫、精巣腫瘍、乳癌腫、前立腺癌腫、内分泌系癌腫、黒色腫を含む、上皮または内分泌組織の悪性腫瘍を意味することが当業者によって認識される。癌腫の例には、子宮頸部、肺、前立腺、乳房、頭部頸部、大腸および卵巣の組織から形成されるものが含まれる。本語句はまた、例えば、癌性および肉腫性組織からなる、悪性腫瘍を含む、癌肉腫も含む。「癌肉腫(adenocarcinoma)」は、腺組織から由来する癌腫、または見分けのつく腺構造からの腫瘍組織を意味する。

【0226】

語句「肉腫(sarcoma)」は、間葉細胞由来の悪性腫瘍を意味することが当業者

によって認識される。

【0227】

該方法はまた、例えば脊髄、リンパまたは赤血球系統、またはそれらの前駆細胞から出来る、造血起源の過剰増殖/新生組織形成細胞の分化を阻害するために使用可能である。例えば、本発明は、急性プロ骨髄性白血病 (APML)、急性骨髄性白血病 (AML) および慢性骨髄性白血病 (CML) (Vaickus, L. (1991) Crit Rev Oncol / Hemotol. 11: 267-97にて掲載された) を限定しないが含む、種々の骨髄疾病の治療を含む。該方法によって治療されうるリンパ性悪性腫瘍には、B-系統 ALL および T-系統 ALL を含む、急性リンパ性白血病 (ALL)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、前リンパ球性白血病 (PLL)、ヘアリー細胞白血病 (HLL) およびヴァルデンストレームマクログロブリン血症 (WM) が、限定はしないが含まれる。本発明の治療方法によって意図される、悪性リンパ腫のさらなる形態としては、限定はしないが、非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma) およびその変異型、末梢 T 細胞リンパ腫、成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL)、皮膚 T 細胞リンパ腫 (CTCL)、巨大顆粒リンパ球性白血病 (LGF) およびホジキン疾患があげられる。

10

【0228】

抗 MUC1-H リガンドを投与するための方法は、「薬理的組成物 (Pharmaceutical Compositions)」にて記述している。使用する分子の好適な用量は、対象の年齢および体重、および使用する特定の薬剤に依存しうる。リガンドは、例えば天然または病原性薬剤と MUC1-H 間の、望まない相互作用を阻害、減少させるために、競合剤として使用可能である。

20

【0229】

1つの実施形態において、抗 MUC1-H リガンドを、癌性細胞、および正常、良性過形成および癌性細胞を、in vivoにて、殺すまたは削除するために使用する。リガンドは、それ自身で、または薬剤、例えば細胞毒性薬剤、放射性核種と共役させて使用可能である。この方法には、リガンドのみ、または細胞毒性薬剤に接着させて、そのような治療を必要としている対象に投与することが含まれる。

【0230】

語句「細胞毒性薬剤 (cytotoxic agent)」および「細胞成長抑制剤 (cytostatic agent)」および「抗腫瘍剤 (anti-tumor agent)」は、本明細書で相互互換的に使用され、過剰増殖細胞、例えば異常な癌細胞の、成長または増幅を阻害する (例えば細胞成長抑制剤)、または殺傷を誘導する特性を持つ薬剤を意味する。癌治療実施形態において、語句「細胞毒性薬剤」は、語句「抗癌 (anti-cancer)」または「抗腫瘍 (anti-tumor)」と相互互換的に使用され、新生、とりわけ固形腫瘍、軟組織腫瘍または転移巣の発達または進展を阻害する薬剤を意味する。

30

【0231】

抗癌剤の非限定例には、例えば、抗微小管剤、トポイソメラーゼ阻害剤、代謝拮抗物質、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、挿入剤、シグナル伝達経路を干渉可能な薬剤、アポトーシスを促進する薬剤、放射、および (裸の抗体、免疫毒素および放射共役物を含む) 他の腫瘍関連抗原に対する抗体が含まれる。特定の型の抗癌剤の例を、以下のように詳細に提供する。抗チューブリン/抗微小管、例えばパクリタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ピンオレルピン、タキソテア; トポイソメラーゼ I 阻害剤、例えばトポテカン、カンプトテシン、ドキシソルピシン、エトポシド、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシン、テニポシド、アムサクリン、エピルピシン、メルバロン (merbarone)、塩酸ピロキサントロン; 代謝拮抗物質、例えば 5-フルオロウラシル (5-FU)、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、リン酸フルダラビン、シタラビン/Ara-C、トリメトトレキサート、ジェムシタピン、アクチビン、アラノシン (alanosine)、ピラゾフリン (pyrazofurin)、

40

50

N - ホスホルアセチル - L - アスパラギン酸 ( N - P h o s p h o r a c e t y l - L - A s p a r a t e ) = P A K A、ペントスタチン、5 - アザシチジン、5 - アザ 2' - デオキシシチジン、アラ - A、クラドリピン、5 - フルオロウリジン、F U D R、チアゾフリン ( t i a z o f u r i n )、N - [ 5 - [ N - ( 3 , 4 - ジヒドロ - 2 - メチル - 4 - オキソキナゾリン - 6 - イルメチル ) - N - メチルアミノ ] - 2 - テノイル ] - L - グルタミン酸 ; アルキル化剤、例えばシスプラチン、カルボプラチン、マイトマイシン C、B C N U = カルムスチン、メルファラン、チオテパ、ブスルファン、クロラムブシル、プリカマイシン、ダカルバジン、リン酸イホスファミド、シクロホスファミド、窒素マスタード、ウラシルマスタード、ピポプロマン、4 - イポメアノール ( 4 - i p o m e a n o l ) ; 他の活性機構を介して働く薬剤、例えばジヒドロレンペロン ( d i h y d r o l e n p e r o n e )、スピロムスチン ( s p i r o m u s t i n e )、およびデシペプチド ( d e s i p e p t i d e ) ; インターフェロンのような、例えば抗腫瘍効果を增强するための、生物学的応答改変剤 ; アクチノマイシン D のようなアポトーシス薬剤、および抗ホルモン、例えばタモキシフェンのような抗エストロゲン、または例えば、4' - シアノ - 3 - ( 4 - フルオロフェニルスルホニル ) - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 3' - ( トリフルオロメチル ) プロピオンアニリドのような抗アンドロゲン。

#### 【 0 2 3 2 】

抗 M U C 1 - H リガンドは、正常上皮細胞を認識するので、リガンドが結合するような細胞は破壊される。あるいは、リガンドは、癌性細胞の周辺の細胞に結合し、それらを殺し、従って、栄養、増殖シグナルなどのために、周辺細胞に依存している可能性のある、癌性細胞を間接的に攻撃する。従って、抗 M U C 1 - H リガンド ( 例えば細胞毒性で改変したものは、( 癌性細胞それ自身を含む ) 癌性組織中の細胞を選択的に殺すか、または削除する。

#### 【 0 2 3 3 】

リガンドは、治療薬剤、放射線を放射する化合物、植物、真菌または細菌由来の分子、生物学的タンパク質およびこれらの混合物を含む、種々の細胞毒性薬剤を伝達するために使用しうる。細胞毒性薬剤は、例えば、本明細書で記述したような、短範囲、高エネルギー - 放射体を含む、短範囲放射線放射体のような、細胞内で活性している細胞毒性薬剤であり得る。

#### 【 0 2 3 4 】

酵素的に活性な毒素またはその断片の例は、ジフテリア毒素 A 断片、ジフテリア毒素の非結合活性断片、( シュードモナス アエルギノーザ ( P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a ) からの ) エキソトキシン A、リシン A 鎖、アプリン A 鎖、モデシン A 鎖、- サクリン、特定のアレウリテス ホルジ ( A l e u r i t e s f o r d i i ) タンパク質、特定のジアンチンタンパク質 ( D i a n t h i n p r o t e i n )、フィトラッカ アメリカーナ ( P h y t o l a c c a a m e r i c a n a ) タンパク質 ( P A P、P A P I I およ P A P - S )、モロジカ チャランチア ( M o r o d i c a c h a r a n t i a ) 阻害剤、クルシン、クロチン、サポナリア オフィチナリス ( S a p o n a r i a o f f i c i n a l i s ) 阻害剤、ゲロニン、ミトギリル ( m i t o g i l l i n )、レストリクトシン ( r e s t r i c t o c i n )、フェノマイシン ( p h e n o m y c i n )、およびエノマイシン ( e n o m y c i n ) である。免疫毒性の酵素的に活性なポリペプチドを調製するための手順は、そのすべてが参考文献によって本明細書にて組み込まれている、国際特許第 W O 8 4 / 0 3 5 0 8 号、第 W O 8 5 / 0 3 5 0 8 号にて、および以下の付随する実施例にて記述されている。抗体に共役可能な細胞毒性部分の例には、アドリアマイシン ( a d r i a m y c i n )、クロラムブシル ( c h l o r a m b u c i l )、ダウノマイシン ( d a u n o m y c i n )、メトトレキサート ( m e t h o t r e x a t e )、ネオカルジノスタチン ( n e o c a r z i n o s t a t i n )、およびプラチナ ( p l a t i n u m ) が含まれる。

#### 【 0 2 3 5 】

ポリペプチド毒素の場合、組換え体核酸技術を、リガンド ( またはそのポリペプチド要

素)および細胞毒素(またはそのポリペプチド要素)を、転写融合物としてコードしている核酸を構築するために使用可能である。ついで組換え体核酸を、例えば細胞内で発現させ、コードされた融合ポリペプチドを単離する。

#### 【0236】

ポリペプチドリガンド(例えば抗体)を、細胞毒素薬剤と共役するための手順は、すでに記述されてきた。クロラムブシルを、抗体と共役するための手順は、そのすべてが、参考文献によって本明細書に組み込まれている、Flechner(1973)European Journal of Cancer 9:741-745、Ghoseら(1972)British Medical Journal 3:495-499、およびSzeckerら(1972)Neoplasma, 19:211-215によって記述されている。10  
ダウノマイシンとアドリマイシンを抗体に共役させるための手順は、参考文献によって本明細書に組み込まれている、Hurwitz, E.ら(1975)Cancer Research, 35:1175-1181およびArnouら(1982)Cancer Surveys, 1:429-449にて記述されている。抗体-リシン共役物を調製するための手順は、そのすべてが参考文献によって本明細書に記述されている、米国特許第4,414,148号、およびOsawa, T.ら(1982)Cancer Surveys 1:373-388およびそこで引用された参考文献によって記述されている。カップリングしている手順はまた、そのすべてが参考文献によって組み込まれている、欧州特許出願第86309516.2号にて記述されている。

#### 【0237】

正常、良性過形成または癌性細胞を殺すまたは削除するために、第一ポリペプチドリガンドを、プロドラッグ活性剤に極めて近くにある場合にのみ活性化されるプロドラッグと共役させる。プロドラッグ活性剤を、第二ポリペプチドリガンド、好ましくは、標的分子上の非競合結合部位に結合するものに共役させる。2つのポリペプチドリガンドが、競合または非競合結合部位に結合するかどうか、は、従来の競合結合アッセイによって決定可能である。本発明の実施における使用に関する好適な薬物-プロドラッグ対は、Blakelyら(1996)Cancer Research 56:3287-3292にて記述されている。

#### 【0238】

あるいは、抗MUC1-Hリガンドは、抗エネルギー放射線放射体、例えば、腫瘍部位に局在する場合に、種々の細胞直径の殺傷となる、 $^{131}\text{I}$ -放射体のような放射性核種と結合可能である。例えば、S.E.Order、「癌治療における放射標識抗体の治療的使用の、解析、結果および将来の予想(Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy)」、Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W.Baldwinら(eds.), pp 303-316(Academic Press 1985を参照のこと)。他の好適な放射性核種には、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{213}\text{Bi}$ および $^{211}\text{At}$ のような放射体、 $^{186}\text{Re}$ および $^{90}\text{Y}$ のような放射体が含まれる。さらに、 $^{177}\text{Lu}$ もまた、画像化および細胞毒性薬剤両方として使用しうる。30

#### 【0239】

$^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ および $^{177}\text{Lu}$ にて標識化した抗体を用いた放射免疫治療(RIT)は、極めて熱心な臨床試験の状況にある。これらの3つの核種の物理学的特性に有意な差があり、結果として、放射性核種の選択は、腫瘍への最大放射容量を伝達するために、非常に重要である。 $^{90}\text{Y}$ のより高いベータエネルギー粒子が、大きな腫瘍に対して効果的である可能性がある。 $^{131}\text{I}$ の比較的低いエネルギー粒子が、理想的であるが、in vivoにて、放射ヨウ化分子の脱ハロゲン化が、抗体の内在化に対して主な不利点である。一方、 $^{177}\text{Lu}$ は、ただ0.2~0.3mm範囲の、低エネルギーベータ粒子を持ち、 $^{90}\text{Y}$ と比較して、骨髄に対して、非常に低い放射容量を伝達する。さらに、よ30

り低い物理的半減期 ( $^{90}\text{Y}$ と比較して)のため、腫瘍滞留時間はより高い。結果として、 $^{177}\text{Lu}$ 標識化薬剤のより高い活性(高いmCi量)を、骨髄に対して比較的低い放射容量で投与可能である。種々の癌の治療において、 $^{177}\text{Lu}$ 標識化抗体の使用を研究している、種々の臨床研究が存在する。(Mulligan, T.ら(1995) Clin. Cancer Res. 1:1447-1454、Meredith, R. F.ら(1996) J. Nucl. Med. 37:1491-1496、Alvarez, R. D.ら(1997) Gynecologic Oncology 65:94-101)

抗MUC1-Hリガンドは、通常の補体依存性細胞障害(CDC)または抗体依存性細胞障害(ADCC)を介して抗原提示細胞を排除するために、直接*in vivo*で用いてよい。本発明のポリペプチドリガンドには、IgG1、IgG2、IgG3からのFc部分、または補体と結合したIgMの相当する部分などのエフェクター領域に結合する補体が含まれてよい。ある実施形態では、標的細胞集団を、*ex vivo*において本発明の結合剤、および適切なエフェクター細胞で処理する。この処理は補体または補体を含む血清を添加することにより補足してよい。さらに、補体タンパク質の結合により、本発明のポリペプチドリガンドで被覆した標的細胞の食作用を向上させることができる。他の実施形態標的では、補体結合エフェクター領域を持つポリペプチドリガンドで被覆した細胞を補体により溶解させる。

#### 【0240】

また、本発明は、抗MUC1-Hリガンドを予防的に用いることに関与する殺菌または除去手段も包括する。例えば、これらの物質を、癌の発達または進行を防ぐ、または遅らせるために用いてよい。

#### 【0241】

癌の治療のために本発明の治療的手段を利用することには多くの利点がある。ポリペプチドリガンドはMUC1-Hを特異的に認識するため、その他の組織は残され、高濃度の薬剤が直接、治療を必要とする部位に行き渡る。本発明に従った治療は、臨床的なパラメーターにより効果的に測定することができる。あるいは、これらのパラメーターはそのような治療が採用されるべきときに指し示すために用いてよい。

#### 【0242】

本発明の抗MUC1-Hリガンドは、癌治療におけるひとつまたはそれ以上の現存する療法と組み合わせ用いてよく、その療法としては手術、放射線療法、および化学療法があげられるが、それらに限定されるものではない。

#### 【0243】

##### 1. 診断への利用

MUC1-Hに結合するポリペプチドリガンドおよび本明細書に描写した及び/又は本明細書に詳述した方法類により同定されるポリペプチドリガンドは、*in vitro*および*in vivo*で診断的、治療的、および予防的に利用可能である。

#### 【0244】

ある態様では、本発明により*in vitro*(例えば、組織、例えば癌にかかった組織の生検のような生物学的試料)または*in vivo*(例えば、対象の*in vivo*画像化)でMUC1-Hの存在を検出する診断手法が得られる。

#### 【0245】

本手法には、(i)試料と抗MUC1-Hリガンドの接触、(ii)抗MUC1-Hリガンドと試料の複合体構造の検出が含有される。本手法にはまた、参照試料(例えば対照試料)とリガンドの接触、および参照試料と同様にリガンドと試料の複合体構造の広がり測定も含有されてよい。対照試料または対照患者に関連した試料、または患者における複合体構造における変化、例えば統計学的に有意な変化は、試料中のMUC1-Hの存在により示される。

#### 【0246】

他の手法には、(i)患者への抗MUC1-Hリガンドの投与、および(ii)抗MUC1-Hリガンドと患者との複合体構造の検出が含有される。この検出には複合体構造の

10

20

30

40

50

局在または時間を決定することが含まれる。

【0247】

抗MUC1-Hリガンドを検出可能な物質により直接または間接的に標識することにより、結合した、または結合していない抗体の検出を容易にすることができる。適切な検出可能物質としては、様々な酵素、置換基、蛍光物質、発光物質、および放射線物質があげられる。

【0248】

抗MUC1-HリガンドおよびMUC1-Hの複合体構造は、MUC1-Hに結合したリガンドか、または結合していないリガンドのどちらかを測定または明視化することにより検出することができる。従来は検出アッセイ、例えば酵素免疫測定法(ELISA)、放射性免疫測定法(RIA)または組織免疫組織化学を利用してよい。抗MUC1-Hリガンドの標識に加え、MUC1-Hの存在についても検出可能な物質で標識した対照と標識していない抗MUC1-Hリガンドを用いた競合免疫検定を試料内で行なうとよい。このアッセイの1つの例では、生物学的試料、標識した対照、およびMUC1-H結合剤を混合して、標識していないリガンドに結合した標識対照の数を測定する。試料内のMUC1-Hの数は、MUC1-H結合剤に結合した標識対照の数に反比例する。

【0249】

蛍光体および発色団で標識したポリペプチドリガンドを調製することができる。抗体およびその他のタンパク質は、波長約310nmまでの光を吸収するので、蛍光部位としては実質波長約310nm以上、好ましくは400nm以上の吸収するものを選択する必要がある。様々な適切な蛍光体および発色団がStryer(1968)Science 162:526およびBrand, L.ら(1972)Annual Review of Biochemistry 41:843~868に記載されている。ポリペプチドリガンドは、米国特許第3,940,475号、第4,289,747号、および第4,376,110号にて開示されたような従来の手順によって、蛍光発色団によって標識化可能である。以上で記述した多くの望む特性を持つ蛍光の1つの手段は、キサントニン色素(xanthene dyes)であり、フルオレセイン(fluoresceins)とローダミン(rhodamines)が含まれる。他の蛍光化合物は、ナフチルアミン(naphthylamines)である。蛍光団または発色団でいったん標識したならば、ポリペプチドリガンドを、例えば、(共焦点または顕微鏡のような)蛍光顕微鏡を用いて、試料中のMUC1-Hの存在または局在化を検出するために使用可能である。

【0250】

1. 組織学的解析

免疫組織化学を、本明細書で記述したポリペプチドリガンドを用いて実施可能である。例えば、抗体の場合、抗体を、(精製またはエピトープタグのような)標識でとともに合成可能であり、または例えば、標識または標識結合基と共役することによって、検出標識可能である。例えば、キレーターを抗体に結合可能である。ついで抗体を、組織学的調製物、例えば、顕微鏡スライド上での、組織の固定切片に接触させる。結合のために培養した後、調製物を洗浄して、結合しない抗体を除去する。ついで調製物を、例えば、顕微鏡を用いて解析して、調製物に抗体が結合したかを同定する。

【0251】

もちろん、抗体(または他のポリペプチドまたはペプチド)を、結合時に非標識化可能である。結合および洗浄の後、検出可能にするために、抗体を標識する。

【0252】

2. タンパク質配列

抗MUC1-Hリガンドをまた、タンパク質配列上に固定化可能である。タンパク質配列は、診断ツール、例えば、(単離細胞、血液、血清、生検などのような)医学的試料を選別するために、使用可能である。もちろん、タンパク質配列はまた、他のリガンド、例えばMUC1-Hに結合するもの、を含むことが可能である。

【0253】

10

20

30

40

50

ポリペプチド配列を産出する方法は、例えば、De Wildtら(2000) Nature Biotech. 18:989-994、Luekingら(1999) Anal. Biochem. 270:103-111、Ge(2000) Nuc. Acids Res. 28:e3、MacBeath and Schreiber(2000) Science 289:1760-1763、国際特許第01/40803号および第99/51773A1号にて記述されている。配列のためのポリペプチドは、例えば市販されている自動化機械、例えばジェネティック マイクロシステムズ(Genetic Microsystems)およびアフィメトリックス(Affymetrix)(Santa Clara, California, USA)またはバイオロボティクス(BioRobotics)(Cambridge, UK)からのものを用いて、高速でスポット可能である。配列基質は、例えば、ニトロセルロース、プラスチック、ガラス、例えば表面改変ガラスであり得る。配列はまた、多孔性マトリックス、例えばアクリルアミド、アガロースまたは他のポリマーを含みうる。

#### 【0254】

例えば、配列は、例えば、上記De Wildtにて記述されたような、抗体の配列であり得る。ポリペプチドリガンドを産出する細胞を、配列フォーマットで、フィルター上で増殖可能である。ポリペプチド産出を誘導し、発現したポリペプチドを、細胞の局所にてフィルターに固定化する。

#### 【0255】

タンパク質配列を、多様性鎖ライブラリーからの、各固定化ポリペプチドへの標的の結合程度を決定するために、標識化標的と接触可能である。標的が標識化されていない場合、サンドイッチ方法を、例えば、標識プローブを用いて、使用して、未標識化標的の結合を検出可能である。

#### 【0256】

配列の各アドレスでの結合の程度に関する情報は、例えばコンピュータデータベース内で、プロファイルとして保存可能である。タンパク質配列を、複製で産出可能であり、例えば標的と非標的の結合プロファイルを比較するために使用可能である。従って、タンパク質配列を、1つまたはそれ以上の分子に関連して、望む結合特性を持つ多様性鎖ライブラリーの個々のメンバーを同定するために使用可能である。

#### 【0257】

### 3. FACS (蛍光細胞分析分離装置 (Fluorescent Activated Cell Sorting))

抗MUC1-Hリガンドを、細胞、例えば試料(例えば患者試料)中の細胞を標識するために使用可能である。リガンドはまた、蛍光化合物に結合する(または結合可能である)。ついで細胞を、蛍光細胞分析分離装置(例えば、ベクトン ディッキンソン イムノサイトメトリー システムズ(Becton Dickinson Immunocytometry Systems)、San Jose, California, USA)から入手可能な分離装置を用いて、また、米国特許第5,627,037号、第5,030,002号、および第5,137,809号も参照のこと)を用いて分離可能である。分離装置を通った細胞として、レーザー光線が、蛍光化合物を励起し、一方、検出器が、通過した細胞を計数し、蛍光を検出することによって、蛍光化合物が、細胞に結合しているかどうかを決定する。各細胞に結合した標識の量を、定量し、解析して、試料を特徴づけることが出来る。

#### 【0258】

分離装置はまた、細胞を屈折させ、リガンドに結合しなかった細胞から、リガンドに結合した細胞を分離可能である。分離した細胞を培養し、及び/又は特性化可能である。

#### 【0259】

### 4. In vivoでの画像化

別の実施形態においては、本発明により、MUC1-Hを発現した癌にかかった組織の存在を、in vivoで検出する手法が得られる。その手法には(i)対象(例えば、

癌または過形成疾患にかかった患者)への、検出可能なマーカーに結合させた抗MUC1-H抗体の投与、(ii)対象に対し、MUC1-Hを発現した組織または細胞に対する前述の検出可能なマーカーを検出する方法を行なうことが含有される。例えば、NMRまたはその他の断層撮影法などにより患者の画像化を行なう。

#### 【0260】

本発明に従った診断的画像化に有用な標識の例としては、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{3}\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ および $^{188}\text{Rh}$ などの放射線標識、フルオロセイン(fluorescein)、ローダミン(rhodamine)などの蛍光体標識、核磁気共鳴活性標識、陽電子放射断層撮影("PET")スキャナーで検出できるような陽電子放射同位体、ルシフェリンなどの化学発光体、および過酸化酸素またはリン酸などの酵素的標識などがあげられる。狭い範囲の検出プローブにより検出可能な同位体などの、狭い範囲の放射線放射体も利用してよい。ポリペプチドリガンドは公知の技術によりそれらの試薬で標識してよい。例えば、抗体の放射線標識技術に関する、Wensel and Meares (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York および D. Colcherら (1986) Methods Enzymol. 121: 802-816を参照のこと。

10

#### 【0261】

本発明の放射線標識リガンドはまた、in vitroの診断試験にも利用してよい。同位体標識したリガンドの特異的な活性は半減期、放射性のある標識の同位体の精度、および標識がどのように抗体に組み込まれているか、に依存する。

20

#### 【0262】

ポリペプチドを放射性同位体(例えば $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{131}\text{I}$ )で標識する手法は公知である。例えば、トリチウム標識の手法は米国特許第4,302,438号に記載されている。ヨウ素標識、トリチウム標識、および $^{35}\text{S}$ 標識の手法は例えば、マウスのモノクローナル抗体に適合させたものでは、例えば Goding, J. W. (Monoclonal Antibodies: Principles And Practice: Production And Application Of Monoclonal Antibodies In Cell Biology, Biochemistry, And Immunology 2nd ed., London, Orlando, Academic Press (1986) polypeptide. 124-126) およびそこに引用されている参考文献に記載されている。抗体などのポリペプチドを標識するその他の手法は、Hunter and Greenwood (1962) Nature 144: 945、Davidら (1974) Biochemistry 13: 1014-1021、および米国特許第3,867,517号および第4,376,110号に記載されている。画像化において有用な放射線標識元素としては、例えば、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{111}\text{In}$  および  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  があげられる。抗体をヨウ素標識する手法は Greenwood, F.ら (1963) Biochem. J. 89: 114-123; Marchalonis, J. (1969) Biochem. J. 113: 299-305; および Morrison, M.ら (1971) Immunochemistry 8: 289-297に記載されている。 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識の手法は、Rhodes, B.ら in Burchiel, S.ら (eds.), Tumor Imaging: The Radioimmunochemical Detection of Cancer, New York: Masson 111-123 (1982) およびここで引用されている参考文献に記載されている。抗体を $^{111}\text{In}$ 標識する適切な手法は Hnatowich, D. J.ら (1983) J. Immun. Methods 65: 147-157、Hnatowich, D.ら (1984) J. Applied Radiation 35: 554-557、および Buckley, R. G.ら (1984) F. E. B. S. Lett. 166: 202-204に記載されている。

30

40

#### 【0263】

50

放射線標識したリガンドの場合、患者に投与したリガンドは、リガンドが再反応する抗原を持つ腫瘍に局在化し、ガンマカメラまたは放射断層撮影機法などを用いた放射性核種スキャンニングなどの公知の技術により検出または“画像化”される。例えば、A. R. B. Radwellら「Developments in Antibody Imaging」, Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R. W. Baldwinら, (eds.), polypeptide. 65-85, Academic Press (1985)を参照のこと。あるいは、ブルックヘブン国立研究所あるPet VIのような陽電子放射断層撮影スキャナーも、放射線放射陽電子（例えば $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、および $^{13}\text{N}$ ）の検出に用いてよい。

10

## 【0264】

## 5. MRI対照剤

磁気共鳴画像(MRI)ではNMRを利用して生体の内部造形を明視化するが、これは予測、診断、治療、および手術に有効に活用できる。MRIは明白な利益のために放射性トレーサー混合物を用いずに利用できる。MRI技術のいくつかは公開された欧州特許出願EPA 0 502 814号に要約されている。一般的に、異なる環境におけるプロトンの定数T1およびT2の緩和時間に関する違いを利用して画像を得る。しかしながら、これらの違いから、鮮明な、高度に分析された画像を得るには不十分である。

## 【0265】

これらの緩和時間定数の違いは対照剤により増大させることができる。そのような対照剤の例としては、多くの磁性剤、常磁性剤(最初にT1を変更する)および強磁性剤または超常磁性剤(最初にT2反応を変更する)があげられる。いくつかの常磁性物質(例えば $\text{Fe}^{+3}$ 、 $\text{Mn}^{+2}$ 、 $\text{Gd}^{+3}$ )をつけるために(および毒性を弱めるために)キレート団(例えばEDTA、DTPAおよびNTAキレート)をMUC1-用いてよい。その他の薬剤は例えば直径約10nmから10 $\mu\text{m}$ 以下の粒子の状態であってよい。粒子には強磁性、反強磁性、または超強磁性であってよい。粒子としては、例えば、磁鉄鉱( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )、 $\text{Fe}_2\text{O}_3$ 、フェライト、および遷移元素のその他の磁性鉱物化合物があげられる。磁性粒子にはひとつまたはそれ以上の磁性結晶が、非磁性物質と一緒に、および非磁性物質なしで含まれてよい。非磁性物質としては、セファロース、デキストラン、デキストリン、デンプンなどの合成または天然ポリマーであってよい。

20

30

## 【0266】

抗MUC1-Hリガンドはまた、NMR活性 $^{19}\text{F}$ 原子、または多数のそのような原子の大部分を含む指示基で標識してもよい。それは(i)実質自然に豊富な全てのフッ素原子は $^{19}\text{F}$ 同位体であり、従って実質全てのフッ素を含む化合物はすべてNMR活性である、(ii)無水トリフルオロ酢酸のような化学的に活性な多重フッ化化合物の多くは比較的lowコストで市販に入手可能であること、および(iii)多くのフッ化化合物は、過フッ素ポリエーテルがヘモグロビン交換として酸素を運ぶために利用されることのように、ヒトにおける利用が医学的に許容可能であるとわかっていることからである。前述の時間インキュベートした後、Pykett(1982)Scientific American 246:78-88に記載のもののひとつのように装置を用いて全身MRIを行ない、癌組織の位置確認および画像化する。

40

## 【0267】

MUC1-Hに結合するポリペプチドリガンドを含むキット、および診断への利用、例えば抗MUC1-Hリガンド(例えば、抗体または抗原結合断片自体、またはその他のポリペプチドまたはペプチド)を用いて、例えば癌または過形成疾患にかかっている患者由来の生検または細胞の試料についてin vitroで、または、対象を画像化することによりin vivoで、MUC1-Hを検出することに関する使用説明書についても、本発明の範囲に含まれる。本キットにはさらに、標識または付加的な診断薬などの少なくともひとつの付加的な試薬が含まれてよい。in vivoでの利用では、リガンドは薬理的組成で考案されてよい。

50

## 【0268】

下記の発明について下記の例によりさらに説明するが、それらの実施例は本発明をさらに限定するものであると解釈されるべきではない。すべての引例の内容は、係属中の特許明細書および公開された特許であり、本明細書を通して引用されているが、ここで明確にその全体が参照として本明細書中に組み込まれる。

## 【0269】

本発明を特にその好ましい実施形態に関して示し、記載する一方で、形態や詳細における様々な変化が、付記した特許請求の範囲を包含する本発明の範囲から逸脱することなく、ここになされることを、当業者は理解するであろう。

## 【図面の簡単な説明】

10

## 【0270】

【図1】図1は、MUC1アミノ酸配列（配列番号：1）を表している。MUC1-H（「Stubble」）配列（配列番号：2）は、アミノ酸318～382であり、別の開裂部位によって形成された、別のStubbleタンパク質（配列番号：3）は、全長MUC1タンパク質のアミノ酸331～382より広がる（配列番号：1）。

【図2】図2は、MUC1/XおよびMUC1/X/altアミノ酸配列（それぞれ、配列番号：4および配列番号：5）を表している。

【図3】図3は、MUC1/YおよびMUC1/Y/altアミノ酸配列（それぞれ、配列番号：6および配列番号：7）を表している。

【図4】図4は、MUC1/VおよびMUC1/V/alt（それぞれ、配列番号：8および配列番号：9）を表している。

20

## 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Dyax Corp.  
 <120> Antibodies Specific for Mucin Polypeptide  
 <130> 2403/2001  
 <140> 60/374,432  
 <141> 2002-04-22  
 <160> 9  
 <170> PatentIn version 3.1  
 <210> 1  
 <211> 475  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

10

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr  
 1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly  
 20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser  
 35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His  
 50 55 60

20

Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu  
 65 70 75 80

Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln  
 85 90 95

Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr  
 100 105 110

Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro  
 115 120 125

30

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr  
 130 135 140

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser  
 145 150 155 160

Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Ala Pro Pro Val His  
 165 170 175

40

Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu  
 180 185 190  
 Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys  
 195 200 205  
 Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr  
 210 215 220  
 Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser  
 225 230 235 240  
 Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu  
 245 250 255  
 Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu  
 260 265 270  
 Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu  
 275 280 285  
 Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly  
 290 295 300  
 Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val  
 305 310 315 320  
 Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp  
 325 330 335  
 Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr  
 340 345 350  
 Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe  
 355 360 365  
 Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu  
 370 375 380  
 Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile  
 405 410 415

10

20

30

40

Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr  
 420 425 430  
 His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro  
 435 440 445  
 Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr  
 450 455 460  
 Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu  
 465 470 475

10

<210> 2  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn  
 1 5 10 15  
 Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala  
 20 25 30

20

Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro  
 35 40 45  
 Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile  
 50 55 60

Ala  
 65

<210> 3  
 <211> 52  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

30

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 Val Pro Gly  
 35 40 45

40

Trp Gly Ile Ala

50

<210> 4  
 <211> 273  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr

1 5 10 15

Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly

20 25 30

Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser

35 40 45

Thr Glu Lys Asn Ala Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe Leu Ser

50 55 60

Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser

65 70 75 80

Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu

85 90 95

Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe

100 105 110

Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly

115 120 125

Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr

130 135 140

Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser

145 150 155 160

Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly

165 170 175

Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala

180 185 190

Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn

10

20

30

40







20 25 30  
 Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala  
 35 40 45  
 Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala Phe Asn  
 50 55 60  
 Ser Ser Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu  
 85 90 95  
 Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu  
 100 105 110  
 Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr  
 115 120 125  
 Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr  
 130 135 140  
 Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val  
 165 170 175  
 Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val  
 180 185 190  
 Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala  
 195 200 205  
 Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His  
 210 215 220  
 Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys  
 225 230 235 240  
 Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala  
 245 250 255  
 Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

10

20

30

40

260

<210> 8  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 8

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr  
 1                   5                   10                   15  
 Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly  
                   20                   25                   30  
 Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Thr  
                   35                   40                   45  
 Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln  
                   50                   55                   60  
 Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr  
                   85                   90                   95  
 Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu  
                   100                   105                   110  
 Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp  
                   115                   120                   125  
 Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp  
                   130                   135                   140  
 Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile  
 145                   150                   155                   160  
 Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr  
                   165                   170                   175  
 Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser  
                   180                   185                   190  
 Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser  
                   195                   200                   205

10

20

30

40

Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser  
 210 215 220  
 Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu  
 225 230 235 240  
 <210> 9  
 <211> 249  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr  
 1 5 10 15

10

Val Leu Thr Ala Thr Thr Ala Pro Lys Pro Ala Thr Val Val Thr Gly  
 20 25 30

Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala  
 35 40 45

Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln  
 50 55 60

20

Arg Asp Ile Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe  
 65 70 75 80

Leu Gly Leu Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln  
 85 90 95

Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu  
 100 105 110

Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu  
 115 120 125

30

Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala  
 130 135 140

Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu  
 145 150 155 160

Val Cys Val Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala  
 165 170 175

Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro

40

180 185 190

Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr

195 200 205

His Gly Arg Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu

210 215 220

Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro

225 230 235 240

Ala Val Ala Ala Thr Ser Ala Asn Leu

245

10

【 図 1 】

MUC1/X, Y --->|  
MUC1/Y --->|

1 mtpgtqgpeff lllllltvltv vtgshasst pgeketssat grasvpsiste knalvtmssv  
61 lssahpgsgs sttggdvtl apatcpasgs aatwgqdvts vpytrpalgs ttpbahdvts  
121 apcnkppags tappahqvts apatcpasgs tappahqvts tappahqvts tappahqvts  
181 agsagsaas tlvnnersar attpaskst pfsinephad tpttlashst ktdeassthhs  
241 tvppttsenn stseqilstgv sffflsflshis nlqfmslsled psllcdyygdlq rdiseinflqi  
|<--- MUC1-H Stubble (配列番号: 2) ----->  
|<--- MUC1-H Stubble (配列番号: 2) ----->  
301 ykaggtlglis niktfglsav vqtltafregl tinvhdvteq fngykteaas rynltisdvts  
各 Stubble の末端 -->|<--- 糖鎖  
細胞外領域  
361 vsavpfpesa gsgagvpgwg iaillvlycvl valaiyvliia lavlccorrlkn ysgldifpar  
細胞内領域の末端 -->|  
421 dtyhmsypp tythtgyrpp psstdrspyv kvsagnggss lsympavaa tsanl (配列番号: 1)  
全長MUC1 : アミノ酸 1-475 (配列番号: 1)  
1-382  
細胞外領域 : アミノ酸 383-403  
糖鎖領域 : アミノ酸 404-475  
MUC1-H (a.k.a. "Stubble") : アミノ酸 318-382 (配列番号: 2)  
細胞内領域 ("細胞質テール") : アミノ酸 404-475  
MUC1/X: アミノ酸 1-53 + 256-475 (配列番号: 4)  
MUC1/Y: アミノ酸 1-53 + 274-475 (配列番号: 6)  
MUC1/V: アミノ酸 1-47 + 283-475 (配列番号: 8)

Fig. 1

【 図 2 】

MUC1/X:  
1 mtpgtqgpeff lllllltvltv vtgshasst pgeketssat grasvpsiste knalvtmssv  
61 flfshismld qfnssledpa tdyqelqrld isemflglvkh gggflglani kftrpgsvvvg  
121 ltlafregti nvhdvteqfn qy'teasry nltisdvts dypfzsaqs gsgvpgwgia  
181 llvlvcvlva laivyliala vccqrknvg q'ldifparct d'ymsepyty hthgryvpps  
241 stdrspyekv ssgnggssls ytnpavaats anl (SEQ ID NO:4)

MUC1/X/ALT:  
1 mtpgtqgpeff lllllltvltv tappahqvts vtgshasst pgeketssat grasvpsiste  
61 naltstgvseff flfshismld fmslsledpat dyqelqrld semflglvkh gggflglanik  
121 ftrpgsvvvg ltlafregtin vhdvteqfng ykteasryn lltisdvtsd vpfzsaqs  
181 gsgvpgwgial vlvcvlval aivylialav cqrknvgq ldifparcty hmssepytyh  
241 thgryvppes tdrspyekve agnggsslsy tnpavaats nl (SEQ ID NO:5)

Fig. 2

【 3 】

**MOCL/Y:**  
 1 mtpqtsppff lllllltlv vtsgghasat pggketaat qrasvpatdy knafnsled  
 61 pstdygeqg rdisemfqi ykqgfglqs nkkirpsvv vqitlarfeg tinvhdvetq  
 121 fngykteaas kynltisdvz vedvpifsa qsgavpvgg lallvlcvl valaivylia  
 181 lavqzerkn yqqlaifpar dtyhmscyp tythgrvyp psetdrspye kvsgnggss  
 241 lsvnpavaa tsanl (SEQ ID NO:6)

**MOCL/V/ALT:**  
 1 mtpqtsppff lllllltlv ttaqpatvv tsgghasatp ggeketaatq rsvvpatdy  
 61 nafnsledp stdygeqqr disemfqi ykqgfglqs nkkirpsvv vqitlarfeg  
 121 invhdvetq ngykteaar ynltisdvz sdvpifsaq sgavpvggi allvlcvlv  
 181 alaivylial avccrrkny gqldifpard tyhmscyp tythgrvyp sstdrspyek  
 241 vsngngssal svnpavaat sanl (SEQ ID NO:7)

Fig. 3

【 4 】

**MOCL/V:**  
 1 mtpqtsppff lllllltlv vtsgghasat pggketaat qrasvpatdy yqelqrdis  
 61 mllqykqgg figlsmkfr pgsvvqltl afregrinv avetqfngyk teasrynl  
 121 isdvsdcvp pfaqsqag vpwgiallv lvcvlvala ylialavcq crknyggld  
 181 ifpardtyhp mesytytht gryvpsatd rpykvaag nggssalvch pavaatsanl  
 (SEQ ID NO:8)

**MOCL/V/ALT:**  
 1 mtpqtsppff lllllltlv ttaqpatvv tsgghasatp ggeketaatq rsvvpatdy  
 61 qelqrdisem flqykqggf lqlsmkfrp gsvvqltla fregtinvd vetqfngykt  
 121 eaesrynlk sdvsdcvpp pfaqsqagv pfwgiallv vcvlvalaiv ylialavcq  
 181 rrknyggldi fpardtyhpm seytytht gryvpsatd rpykvaag nggssalvch  
 241 avataanl (SEQ ID NO:9)

Fig. 4

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |  | International application No.<br>PCT/US03/11808                   |  |  |
|--|--|---|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |  |   |  |  |
| IPC(7) : G01N 33/53; C07K 16/00<br>US CL : 435/7.1, 7.2, 7.23; 530/350, 324, 387.1, 387.7, 387.9, 388.15, 388.8, 388.85, 389.1, 389.7, 391.1<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |   |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |   |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/7.1, 7.2, 7.23; 530/350, 324, 387.1, 387.7, 387.9, 388.15, 388.8, 388.85, 389.1, 389.7, 391.1  |  |   |  |  |
| 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 practicable, search terms used)<br>Please See Continuation Sheet  |  |   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |   |  |  |
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |  |  |
| A  | WO 01/18035 A2 (TRANSGENE, S.A.) 15 March 2001 (15.03.2001).   | 1-24  |  |  |
| A  | WO 96/03502 A2 (RAMOT UNIVERSITY AUTHORITY FOR APPLIED RESEARCH AND INDUSTRIAL DEVELOPMENT LTD.) 08 February 1996 (08.02.1996).  | 1-24  |  |  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.  |  |   |  |  |
| * Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">               "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>               "E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br/>               "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)<br/>               "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>               "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed             </td> <td style="width: 50%;">               "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<br/>               "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<br/>               "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<br/>               "&amp;" document member of the same patent family             </td> </tr> </table> |  |   | "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |   |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>12 September 2003 (12.09.2003)  |  | Date of mailing of the international search report<br>17 OCT 2003 |  |  |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US<br>Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450<br>Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. (703)305-3230   |  | Authorized officer<br>Sheela J Huff<br>Telephone No. 703-308-1235 |  |  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US03/11808

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**  
WEST, STN  
search terms: non-shed, muc1, mucin. shed, antibod\$

## フロントページの続き

| (51) Int.Cl.                   | F I           | テーマコード(参考) |
|--------------------------------|---------------|------------|
| <b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b> | C 0 7 K 2/00  |            |
| <b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/15 | Z          |
| <b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/50 | Z          |
| <b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b> | G 0 1 N 33/53 | V          |
| <b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b> | C 1 2 N 15/00 | A          |
|                                | C 1 2 P 21/08 |            |

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, 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, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ヘンデリクス、 マリア ポーリナ ゴデリーブ  
ベルギー国 ハッセルト ビー - 3 5 0 0 ウジンガードストラート 2 5 / 4

(72) 発明者 エッジ、 アルバート エス . ビー .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 4 5 9 ニュートン ホーマー ストリート 2 0 8

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA36 DA37 DA44 FB03 FB07  
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA02 DA02 DA06 DA12 EA03 EA04  
GA11 HA03 HA14 HA15  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA06 CA10 CA19 CC24 CE12 DA01 DA13  
4C085 AA14 AA15 AA25 AA26 AA27 BB01 BB11 CC02 CC07 CC08  
CC21 CC31 DD23 DD62 DD63 EE01  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA50 CA40 DA76 EA28 EA50  
FA74 GA26

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 粘蛋白多肽特异性抗体   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2006504630A</a>  | 公开(公告)日 | 2006-02-09 |
| 申请号            | JP2003586171   | 申请日     | 2003-04-16 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 戴埃克斯有限公司   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 模具斧公司  |         |            |
| [标]发明人         | ホーゲンブームヘンドリカスアールジェイエム<br>ヘンデリクスマリアポーリナゴデリーブ<br>エッジアルバートエスピー  |         |            |
| 发明人            | ホーゲンブーム、ヘンドリカスアールジェイエム、<br>ヘンデリクス、マリアポーリナゴデリーブ<br>エッジ、アルバートエスピー  |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/18 A61K39/395 A61P35/00 A61P35/04 C07K2/00 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08 C07K16/28 C07K16/30  |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/3092 C07K16/18 C07K16/2896  |         |            |
| FI分类号          | C07K16/18.ZNA A61K39/395.C A61K39/395.L A61P35/00 A61P35/04 C07K2/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.V C12N15/00.A C12P21/08   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA44 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA06 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4C085/AA14 4C085/AA15 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA50 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26 |         |            |
| 代理人(译)         | 三好秀<br>伊藤雅一  |         |            |
| 优先权            | 60/374432 2002-04-22 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

本文描述了在切割MUC1蛋白后保留在细胞表面上的MUC1细胞外片段上存在的MUC-H表位特异性的抗体和肽配体。

MUC1/A:

1 - mngtqepif illlllvtr vtgqghast pqqekek al vsvrpseta kmlatqvst  
61 flslflslml cfnslceqs tcyqelord lsenflqlyk gqfllglsni krfpqsavc  
121 lrlatraqtl avdvercfn qydeasry nllidvsvs dypfqsage carypyqla  
181 llvlvclva laryllla vqprknyg qlrlfscadt pbnseynly nchryvqps  
241 stdspsveiv sspggs.s ympanats all (SEQ ID NO:4)

MUC1/A/A1:

1 - mngtqepif illlllvtr vepkqatv tngghastp gqkqctatq rsvqsrak  
61 nslstgnstf f.sflslmlq flsalcpsst cyqelqrtd scmlqlyk qyflglsnik  
121 fipqsavvql klalaeqlta vldvretgqg yreaatyn llidshvsc vpfqsagq  
181 scvpyqlal vlvclva slvylia av cqrknyg qlrlfscady nbnseynly  
241 tcrvpyqs tdsvekva agngesley rrpavatsa al (SEQ ID NO:5)

Fig. 2

