

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-530039

(P2023-530039A)

(43)公表日 令和5年7月12日(2023.7.12)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 B 0 6 5
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/04 (2006.01)	A 6 1 P	35/04		4 H 0 4 5
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全166頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-519161(P2023-519161)	(71)出願人	507081094 ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ レーション
(86)(22)出願日	令和3年6月8日(2021.6.8)		
(85)翻訳文提出日	令和5年2月7日(2023.2.7)		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/036500		米国, エムエー 0 2 4 5 1, ウォルサ ム, 4 0 ベアー ヒル ロード
(87)国際公開番号	WO2021/252551	(74)代理人	110003797 弁理士法人清原国際特許事務所
(87)国際公開日	令和3年12月16日(2021.12.16)		
(31)優先権主張番号	63/036,288	(72)発明者	バムダッド, シンシア アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 - 1 0 0 2 マサチューセッツ州 ウォルサム ベアー ・ヒル・ロード 4 0
(32)優先日	令和2年6月8日(2020.6.8)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	スマッジ, ブノワ アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 - 1 0 0 2 マサチューセッツ州 ウォルサム ベアー ・ヒル・ロード 4 0
(31)優先権主張番号	63/044,670		
(32)優先日	令和2年6月26日(2020.6.26)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/046,852		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗NME抗体および癌または癌転移の治療方法

(57)【要約】

本出願は、抗NME抗体、および疾患の治療または予防におけるそれらの使用を開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 145 または配列番号 169 の NME7 B3 ペプチドに結合する NME7 特異的抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

モノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

二価、一価、Fab、または単鎖可変フラグメント抗体 (scFv) である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

抗体薬物コンジュゲートに連結される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

薬物が毒素またはプロトキシンに連結される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体をコードする単離された核酸。

【請求項 7】

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体を発現する単離されたハイブリドーマ。

【請求項 8】

NME7_{AB} または NME7-X1 に特異的に結合するが、NME1 には特異的に結合しない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

NME7_{AB} と MUC1* 細胞外ドメインの間または NME7-X1 と MUC1* 細胞外ドメインの間の相互作用を分断する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 10】

NME7_{AB} と PSMGFR の間または NME7-X1 と PSMGFR の間の結合を分断する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

NME7_{AB} と N-10 の間または NME7-X1 と N-10 の間の結合を分断する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 12】

NME7_{AB} と MUC1* 細胞外ドメインの間または NME7-X1 と MUC1* 細胞外ドメインの間の相互作用を分断しない、請求項 1 に記載の抗体であって、前記 NME7_{AB} または NME7-X1 が、前記 N-10 ペプチド (配列番号 170) に結合するが C-10 ペプチド (配列番号 171) には結合しない、抗体。

【請求項 13】

前記抗体が、5A1、4A3、4P3 または 5D4 である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 14】

重鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、
CDR1 領域中の YTF TNYGMN (配列番号 439)、
CDR2 領域中の WINTY TGEPT YVDDFKG (配列番号 440)、および
CDR3 領域中の LRGI R PGL AY (配列番号 441) を含むアミノ酸配列、なら
びに、

軽鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、
CDR1 領域中の SASSSVSYMN (配列番号 444)、
CDR2 領域中の GISNLAS (配列番号 445)、および
CDR3 領域中の QQRSSYPPT (配列番号 446) を含むアミノ酸配列
を含む、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 15】

重鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、
CDR1 領域中の NTFTEYTMH (配列番号 388)、

10

20

30

40

50

C D R 2 領域中の G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 3 8 9)、および
C D R 3 領域中の R Y Y H S L Y V F Y F D Y (配列番号 3 9 0) を含むアミノ酸配列、
ならびに

軽鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、

C D R 1 領域中の S A S Q G I S N Y L N (配列番号 3 9 3)、
C D R 2 領域中の Y T S S L H S (配列番号 3 9 4)、および
C D R 3 領域中の Q Q Y S K L P Y T (配列番号 3 9 5) を含むアミノ酸配列
を含む、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

重鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、

C D R 1 領域中の N T F T E Y T M H (配列番号 4 2 9)
C D R 2 領域中の G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 4 3 0)、および
C D R 3 領域中の R Y Y H S T Y V F Y F D S (配列番号 4 3 1) を含むアミノ酸配列、
ならびに

軽鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、

C D R 1 領域中の S A S Q G I S N Y L N (配列番号 4 3 4)、
C D R 2 領域中の Y T S S L H S (配列番号 4 3 5)、および
C D R 3 領域中の Q Q Y S K L P Y T (配列番号 4 3 6) を含むアミノ酸配列
を含む、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

重鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、

C D R 1 領域中の N T F T E Y T M H (配列番号 3 8 8)、
C D R 2 領域中の G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 3 8 9)、および
C D R 3 領域中の R Y Y H S L Y V F Y F D Y (配列番号 3 9 0) を含むアミノ酸配列、
ならびに

軽鎖可変領域中のアミノ酸配列であって、

C D R 1 領域中の I T S T D I D D M N (配列番号)、
C D R 2 領域中の E G N T L R P (配列番号)、および
C D R 3 領域中の L Q S D N L P L T (配列番号) を含むアミノ酸配列
を含む、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

ヒト抗体、ヒト化抗体または操作された抗体模倣物である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

非ヒトである、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

マウスまたはラクダ類である、請求項 1 9 に記載の抗体。

【請求項 2 1】

癌の予防または治療のために患者に投与する方法であって、請求項 1 ~ 1 7 に記載の抗体を含む組成物を前記患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 2 2】

患者において癌転移を予防するまたは治療するための方法であって、請求項 1 ~ 1 7 に記載の抗体を含む組成物を前記患者に投与する工程を含む、方法。

【請求項 2 3】

癌または癌転移を診断するための方法であって、患者検体および正常検体を請求項 1 ~ 1 7 に記載の抗体と接触させる工程、および両方の検体から得られた結果を比較する工程を含み、前記患者検体中の前記抗体に対する陽性結合の存在が、前記患者における癌または癌転移の存在を示す、方法。

【請求項 2 4】

前記抗体が、請求項 1 2 に定める通りである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

10

20

30

40

50

前記抗体が、イメージング剤に連結される、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 26】

前記患者検体が、術中を含む、インビトロ、インビボでの、血液、体液、組織、循環細胞である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 27】

抗 N M E 7_{A B} 抗体またはそのフラグメントを発現するように操作されている細胞。

【請求項 28】

前記細胞が免疫細胞である、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 29】

前記免疫細胞が T 細胞または N K 細胞である、請求項 27 に記載の細胞。 10

【請求項 30】

前記細胞が幹細胞または前駆細胞である、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 31】

前記幹細胞または前駆細胞が、その後分化して T 細胞になる、請求項 30 に記載の細胞。

【請求項 32】

腫瘍関連抗原を認識するキメラ抗原受容体 (C A R) を含む、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 33】

抗 N M E 7 抗体の発現が誘導性である、請求項 27 に記載の細胞。 20

【請求項 34】

抗 N M E 7_{A B} 抗体をコードする核酸が、 F o x p 3 エンハンサーまたはプロモーター中に挿入される、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 35】

抗 N M E 7_{A B} 抗体が、 N F A T 誘導系中に存在する、請求項 27 に記載の細胞。

【請求項 36】

N F A T c 1 応答エレメントが、 F o x p 3 エンハンサーまたはプロモーター領域中に挿入される抗体配列の上流に挿入される、請求項 35 に記載の細胞。

【請求項 37】

前記抗 N M E 7_{A B} 抗体またはそのフラグメントが、 N M E 7_{B 3} ペプチドに結合するか、あるいは M U C 1^{*} 細胞外ドメインの P S M G F R ペプチドへの N M E 7_{A B} または N M E 7 - X 1 の結合を分断する、請求項 27 に記載の細胞。 30

【請求項 38】

腫瘍関連抗原および抗 N M E 7 抗体を認識する C A R を発現する、請求項 28 に記載の免疫細胞。

【請求項 39】

前記腫瘍関連抗原が M U C 1^{*} である、請求項 38 に記載の免疫細胞。

【請求項 40】

免疫原性誘発部分として図 6 ~ 図 9 に列挙した N M E 7_{A B} 由来の 1 つ以上のペプチドまたはそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、95%、97% の配列同一性を有するペプチドを含む組成物を含む抗癌ワクチン。 40

【請求項 41】

前記ペプチドが、配列番号 141 ~ 145 のペプチドまたはそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、95%、97% の配列同一性を有するペプチドである、請求項 40 に記載の抗癌ワクチン。

【請求項 42】

前記ペプチドが、配列番号 145 のペプチドまたはそれに対して少なくとも 80%、85%、90%、95%、97% の配列同一性を有するペプチドである、請求項 41 に記載の抗癌ワクチン。

【請求項 43】

請求項 1 ~ 17 に記載の抗体を含む B i T E。

【請求項 44】

N M E 7 B 3 ペプチド中のシステイン残基が、ジスルフィド結合を回避するように変異される、抗 N M E 7 A B 抗体を生成する方法。

【請求項 45】

細胞を N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 と共に培養する工程を含む、増強された転移能を有する細胞を生成する方法。

【請求項 46】

N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 を発現するように操作された細胞。

【請求項 47】

N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 を発現するトランスジェニック動物。

【請求項 48】

前記 N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 が、ヒトの N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 である、請求項 47 に記載のトランスジェニック動物。

【請求項 49】

前記 N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 の発現が誘導性である、請求項 48 に記載のトランスジェニック動物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、N M E タンパク質、N M E タンパク質に由来するペプチド、それらのペプチドから生成された抗体または上記ペプチドへの結合能力により選択された抗体もしくは抗体フラグメントに関する。本発明は、患者における N M E の発現に関連した疾患の治療または予防にも関する。

【0002】

2. 背景技術および現状技術

N D P K (ヌクレオシド二リン酸プロテインキナーゼ) タンパク質は、それらがすべて N D P K ドメインを含んでいるので、一緒にまとめられたタンパク質ファミリーである。以前には N M 2 3 タンパク質と呼ばれた、最初に発見された N M E タンパク質は、N M 2 3 - H 1 および N M 2 3 - H 2 であった。数十年間にわたり、それらが造血細胞の分化を誘導するかあるいは分化を妨げるかどうかは明らかでなかった。本発明者らは先に、N M 2 3 - H 1 は、二量体であるとき、M U C 1 * 成長因子受容体に結合し、分化を妨げるが、より高濃度 N M 2 3 - H 1 では、六量体になり、これは M U C 1 * に結合せず、分化を誘導することを見出した。N M 2 3 は、それがある種の非常に侵襲性の強い癌で過剰発現されることが見いだされた時、転移サプレッサーと呼ばれていた。本発明者は以前に、N M 2 3 - H 1 二量体は、癌の大部分で過剰発現される M U C 1 * 成長因子受容体の細胞外ドメインに結合し、それを二量体化させ、このような結合が癌細胞の増殖を促進することを明らかにした。逆に、より高濃度では、N M 2 3 は、M U C 1 * に結合せず腫瘍形成を促進しない、四量体および六量体を形成する。今日まで、それらの機能は解明されていないが、ごく最近、より多くの N M E ファミリータンパク質 (N M E 1 ~ 10) が発見された。N M E 7 は新しく発見された N M E ファミリータンパク質であるが、その N D P K ドメインは、他の N M E ファミリーメンバーと異なり、酵素活性を持っていない。N M E 7 は、成人の組織で全く発現されないか、あるいは非常に低レベルで発現される。

【発明の概要】

【0003】

本発明は、N M E ファミリーメンバーに対して生成された抗体を対象に投与することを含む、患者の癌を治療または予防する方法に関する。N M E ファミリーは、N M E 7 ファミリーであり得る。抗体は、N M E 7 に結合し得る。抗体は、N M E 7 A B または N M E 7 A B 様タンパク質に結合し得る。抗体は、N M E 7 - X 1 に結合し得る。抗体は、N M

10

20

30

40

50

E7とその同族結合パートナー間の結合を阻害し得る。同族結合パートナーはMUC1*であり得る。同族結合パートナーは、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFR部分であり得る。一態様では、抗体は、図6~9(配列番号88~145)に、列挙されたものから選択されるペプチドへの結合能力により生成または選択され得る。好ましくは、ペプチドは、図9(配列番号141~145)に列挙されたものから選択され得る。

【0004】

ペプチドは、図6~9(配列番号88~145)に列挙されたペプチドに高度に相同である、またはそれに対し、N末端またはC末端で、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個、最大で3個、最大で2個または最大で1個のアミノ酸残基が付加または削除されたものであり得る。一態様では、抗体は、NME1に対してではなく、NME7_A_BまたはNME7-X1へ結合する能力のため選択され得る。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二価、一価、二重特異性、可変ドメインを含む抗体フラグメント、または抗体模倣物であり得る。抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。抗体は、単鎖s c F vであり得る。

10

【0005】

別の態様では、本発明は、NME7_A_B領域に高度に相同なまたは同一のペプチドを、対象に投与することを含む、対象の癌を治療または予防する方法に関する。ペプチドは、図6に列挙されたペプチドの1個または複数に少なくとも80%相同であり得る。ペプチドは、図7に列挙されたペプチドの1個または複数に少なくとも80%相同であり得る。ペプチドは、図8に列挙されたペプチドの1個または複数に少なくとも80%相同であり得る。ペプチドは、図9に列挙されたペプチドの1個または複数に少なくとも80%相同であり得る。ペプチドは、図6~9(配列番号88~145)に列挙されたペプチドから選択され得る。ペプチドは、図9(配列番号141~145)に列挙されたものから選択され得る。または、ペプチドは、図6~9(配列番号88~145)に列挙されたペプチドに高度に相同である、またはそれに対しN末端またはC末端で、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個、最大で3個、最大で2個または最大で1個のアミノ酸残基が、付加または削除されたものであり得る。ペプチドは、スパーサーまたはリンカーを介して、別のペプチドに接続され得る。

20

【0006】

別の態様では、本発明は、癌の治療または予防のための、キメラ抗原受容体(CAR)に関し、CARの標的細胞外部分は、少なくともNMEファミリーのメンバーのペプチドフラグメントを含む。NMEファミリーは、NME7ファミリーであり得る。NME7ファミリーのメンバーは、NME7であり得る。または、NME7ファミリーのメンバーは、NME7_A_BまたはNME7_A_B様タンパク質であり得る。NME7ファミリーのメンバーはまた、NME7-X1であり得る。CARの標的細胞外部分は、図6~9(配列番号88~145)に列挙された複数のペプチドの1個のペプチドを含み得る。ペプチドは、図9(配列番号141~145)に列挙されたものから選択され得る。ペプチドは、図6~9(配列番号88~145)に列挙されたペプチドに、高度に相同である、またはそれに対しN末端またはC末端で、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個、最大で3個、最大で2個、または最大で1個のアミノ酸残基が付加または削除された、ペプチドを含み得る。ペプチドは、スパーサーまたはリンカーを介して、別のペプチドに接続され得る。

30

40

【0007】

さらに別の態様では、本発明は、請求項3に記載のキメラ抗原受容体を免疫系細胞中に操作すること、およびそれを必要とする対象に細胞を投与することを含む、癌または癌転移を治療または予防する方法に関する。

【0008】

別の態様では、本発明は、癌の治療または予防用の、キメラ抗原受容体(CAR)に関し、キメラ抗原受容体の標的細胞外部分は、NME7_A_B、NME7_A_B様タンパク質またはNME7-X1に結合する抗体の一部を含む。抗体の一部は、単鎖s c F vであり得

50

るか、またはヒトまたはヒト化抗体の一部であり得る。

【0009】

さらに別の態様では、本発明は、NMEファミリーのメンバーのペプチドフラグメントでヒトを免疫化することを含む、癌または転移性癌に対するヒトのワクチン接種方法に関する。NMEファミリーは、NME7ファミリーであり得る。NME7ファミリーのメンバーは、NME7またはNME7bであり得る。NME7ファミリーのメンバーは、NME7_{AB}またはNME7_{AB}様タンパク質であり得る。NME7ファミリーは、NME7-X1であり得る。免疫化ペプチドは、図6~9(配列番号88~145)に列挙された複数のペプチドからの1個のペプチドであり得る。好ましくは、ペプチドは、図9(配列番号141~145)に列挙されたものから選択され得る。免疫化ペプチドは、図6~9(配列番号88~145)に列挙されたペプチドに高度に相同である、またはそれに対しN末端またはC末端で、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個、最大で3個、最大で2個、または最大で1個のアミノ酸残基が付加または削除されたペプチドを含み得る。免疫化ペプチドは、スペーサーまたはリンカーによって別のペプチドに接続される。

10

【0010】

また別の態様では、本発明は、NME7、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質あるいはNME7-X1の発現を抑制する核酸を対象に投与することを含む、対象において癌を治療または予防する方法に関する。核酸は、NME7、NME7_{AB}様タンパク質あるいはNME7-X1の発現を抑える、アンティセンス核酸であり得る。核酸は、NME7、NME7_{AB}様タンパク質またはNME7-X1の発現を抑制する、抑制性RNA、siRNA、RNAiまたはshRNAであり得る。

20

【0011】

別の態様では、本発明は、NME7、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質またはNME7-X1の発現を抑制するように遺伝子編集された核酸を対象に投与することを含む、対象において癌を治療または予防する方法に関する。NME7、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質、またはNME7-X1の発現を抑制する、遺伝的に編集された核酸は、患者にその後投与され得る細胞に挿入され得る。NME7、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質、またはNME7-X1の発現を抑制する、遺伝的に編集された核酸は、ウイルスベクターを使用して、細胞に挿入され得る。ウイルスベクターは、レンチウイルス系であり得る。

30

【0012】

別の態様では、本発明は、NME7_{AB}、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質、またはNME7-X1、2iもしくは5iと上記細胞を接触させることを含む癌細胞を増殖する方法に関する。方法は、NME7_{AB}、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質またはNME7-X1、2iもしくは5iを含む培地中で細胞を培養すること、あるいはヒトNME7_{AB}、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質、またはNME7-X1を発現する、またはNME7_{AB}、NME7b、NME7_{AB}様タンパク質もしくはNME7-X1が投与される、動物で細胞を増殖させること、を含む。癌細胞は、乳、前立腺、卵巣、結腸直腸、膵臓、肝臓、黒色腫または脳の癌細胞であり得る。薬物候補は、細胞で試験され得る。薬物の有効性は、薬物なしの対照に対し癌増殖を比較すること、または薬物なしの対照に対し転移マーカーまたは幹細胞マーカーの発現レベルを比較すること、または薬物なしの対照に比べての低細胞コピー数から動物で腫瘍を形成する得られた細胞の能力を比較すること、および癌または転移の治療のための候補薬の有効性を決定することにより、評価され得る。細胞は、癌の治療のために評価される患者から得られ、かつその患者に有効であると思われる薬物は、上記の方法を使った結果を基準にして選択される。細胞は、癌の治療のために評価される患者から得られないが、しかし、その患者に有効と思われる薬物は、上に記述された方法を使用した結果に基づいて選択される。

40

【0013】

別の態様では、本発明は、NMEの配列に由来する配列を有するペプチドまたはペプチ

50

ドミミックからの抗体または抗体様分子を生成する方法に関する。NMEは、NME7であり得る。ペプチドは、抗体、または抗体様分子を生成するために免疫原として使用され得る。ペプチドは、抗NME7抗体を生成するために動物に投与され得る。ペプチドは、抗NME7抗体を生成するためにヒトに投与され得る。ペプチドは、図6～9（配列番号88～145）に列挙された配列を有し得る。好ましくは、ペプチドは、図9（配列番号141～145）に列挙されたものから選択され得る。ペプチドは、図6～9（配列番号88～145）に列挙されたペプチドに、高度に相同である、またはそれに対しN末端またはC末端で、最大で7個、最大で6個、最大で5個、最大で4個、最大で3個、最大で2個、または最大で1個のアミノ酸残基が付加または削除されたペプチドを含み得る。

【0014】

10

別の態様では、本発明は、癌の存在または癌の進行を検出する方法に関し、次のステップを含む：

- 1) 癌を有するまたは癌を発症するおそれがある患者から試料を得るステップ；
- 2) NME7ファミリーのメンバーのレベルまたはNME7ファミリーのメンバーをコードする核酸のレベルを検出または測定できるアッセイにその試料を供するステップ；
- 3) 試験試料中のNME7ファミリーの測定されたメンバー、またはNME7ファミリーのメンバーをコードする核酸のレベルを、対照患者または対照細胞でのレベルと比較するステップ；
- 4) NME7ファミリーのメンバー、またはNME7ファミリーのメンバーをコードする核酸のレベルが、対照に比べ上昇していることを決定するステップ；および
- 5) 試験試料のドナーが、癌に罹患している、またはそれに対し試験物が比較される対照が癌であると以前に診断されたドナーからのものである場合は癌が進行していると結論を下すステップ。この方法では、循環系での、または組織でのNME7ファミリーのメンバーの検出は、患者における癌の指標であり得る。NME7ファミリーのメンバーは、NME7、NME7b、NME7-X1、またはNME7_{AB}様タンパク質であり得る。

20

【0015】

さらに別の態様では、本発明は、患者においてNME7ファミリーのメンバーまたはMUC1*の存在を検出するステップ；および、NME7ファミリーのメンバーまたはMUC1*発現を示す患者に抗NME7または抗MUC1*抗体もしくは複数抗体を投与するステップを含む方法に関する。NME7ファミリーのメンバーは、NME7、NME7b、NME7-X1、またはNME7_{AB}様タンパク質であり得る。

30

【0016】

さらに別の態様では、本発明は、以下を含む、癌を治療するまたは予防するための方法に関する：

- 1) 癌を有する、または癌を発症するおそれのある、または転移性癌を発症するおそれのある、患者から試料を得るステップ；
- 2) NME7ファミリーのメンバーまたはNME7ファミリーのメンバーをコードする核酸の量を測定するステップであって、測定されたレベルは、対照試料で測定されたものに対し優位に高い、ステップ；
- 3) 患者が、癌に有するかまたはよりより高悪性度の癌または転移性の癌を進展させたことを決定するステップ；
- 4) NME7ファミリーのメンバーの発現を抑える、NME7の切断を抑制する、またはその標的へのNME7結合を抑制する、有効量の治療薬を患者に投与するステップ。

40

NME7ファミリーのメンバーの標的は、MUC1*であり得る。NME7ファミリーのメンバーの標的は、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFR部分であり得る。NME7ファミリーのメンバーは、NME7、NME7b、NME7-X1、またはNME7_{AB}様タンパク質であり得る。

【0017】

癌に関する上記方法のいずれかにおいて、癌は、乳、前立腺、卵巣、結腸直腸、膵臓、肝臓、黒色腫または脳腫瘍の癌を含んでよい。

50

【 0 0 1 8 】

一態様では、本発明は、配列番号 1 4 5 または配列番号 1 6 9 の N M E 7 B 3 ペプチドに結合する N M E 7 特異的抗体またはそのフラグメントに関する。抗体は、モノクローナル抗体または二価、一価、F a b、もしくは単鎖可変フラグメントであり得る。抗体は、抗体薬物複合体に連結され得る。薬物は、毒素またはプロトキシニンに連結され得る。

【 0 0 1 9 】

本発明はまた、抗体をコードする単離核酸に関する。

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、上述のモノクローナル抗体を発現する単離されたハイブリドーマに関する。抗体は、N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 に特異的に結合し得るが、N M E 1 には特異的に結合しない。抗体は、N M E 7 A B と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の相互作用、または N M E 7 - X 1 と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の相互作用を分断し得る。または、抗体は、N M E 7 A B と P S M G F R の間の結合、または N M E 7 - X 1 と P S M G F R の間の結合を分断し得る。さらに、抗体は、N M E 7 A B と N - 1 0 の間の結合、または N M E 7 - X 1 と N - 1 0 の間の結合を分断し得る。

10

【 0 0 2 1 】

別の態様では、抗体は、N M E 7 A B と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の相互作用、または N M E 7 - X 1 と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の相互作用を分断しない場合がある。N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 は、N - 1 0 ペプチド（配列番号 1 7 0 ）に結合し得るが、C - 1 0 ペプチド（配列番号 1 7 1 ）には結合しない。特に、抗体は、5 A 1、4 A 3、5 D 4、または 4 P 3 であり得る。

20

【 0 0 2 2 】

抗体は、下記を含む重鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の Y T F T N Y G M N （配列番号 4 3 9 ）；

C D R 2 領域中の W I N T Y T G E P T Y V D D F K G （配列番号 4 4 0 ）；

C D R 3 領域中の L R G I R P G P L A Y （配列番号 4 4 1 ）；および

下記を含む軽鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の S A S S S V S Y M N （配列番号 4 4 4 ）；

C D R 2 領域中の G I S N L A S （配列番号 4 4 5 ）；

C D R 3 領域中の Q Q R S S Y P P T （配列番号 4 4 6 ）

30

を含み得る。

【 0 0 2 3 】

別の態様では、抗体は、下記を含む重鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の N T F T E Y T M H （配列番号 4 2 9 ）；

C D R 2 領域中の G F N P N N G V T N Y N Q K F K G （配列番号 4 3 0 ）；

C D R 3 領域中の R Y Y H S T Y V F Y F D S （配列番号 4 3 1 ）；および

下記を含む軽鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の S A S Q G I S N Y L N （配列番号 4 3 4 ）；

C D R 2 領域中の Y T S S L H S （配列番号 4 3 5 ）；

C D R 3 領域中の Q Q Y S K L P Y T （配列番号 4 3 6 ）

40

を含み得る。

【 0 0 2 4 】

このような上記の抗体の例は 5 D 4 である。

【 0 0 2 5 】

別の態様では、抗体は、下記を含む重鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の N T F T E Y T M H （配列番号 3 8 8 ）；

C D R 2 領域中の G F N P N N G V T N Y N Q K F K G （配列番号 3 8 9 ）；および

C D R 3 領域中の R Y Y H S L Y V F Y F D Y （配列番号 3 9 0 ）；ならびに

下記を含む軽鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の S A S Q G I S N Y L N （配列番号 3 9 3 ）；

50

C D R 2 領域中の Y T S S L H S (配列番号 3 9 4) ; および
C D R 3 領域中の Q Q Y S K L P Y T (配列番号 3 9 5)

を含み得る。

【 0 0 2 6 】

別の態様では、抗体は、下記を含む重鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の N T F T E Y T M H (配列番号 3 8 8) ;

C D R 2 領域中の G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 3 8 9) ; および

C D R 3 領域中の R Y Y H S L Y V F Y F D Y (配列番号 3 9 0) ; ならびに

下記を含む軽鎖可変領域中のアミノ酸配列：

C D R 1 領域中の I T S T D I D D D M N (配列番号) ;

C D R 2 領域中の E G N T L R P (配列番号) ;

C D R 3 領域中の L Q S D N L P L T (配列番号)

を含み得る。

【 0 0 2 7 】

このような上記の抗体の例は 4 P 3 である。

【 0 0 2 8 】

抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体または操作された抗体模倣物であり得る。

抗体は、非ヒト抗体、例えば、マウスのまたはラクダ類の抗体であり得る。

【 0 0 2 9 】

本発明はまた、癌の予防または治療のために、患者に投与する方法に関し、方法は、上記抗体を含む組成物を患者に投与することを含む。

【 0 0 3 0 】

本発明はまた、患者における癌転移を予防または治療するための方法に関し、方法は、上記抗体を含む組成物を患者に投与することを含む。

【 0 0 3 1 】

本発明はまた、癌または癌転移を診断する方法に関し、方法は、患者検体および正常検体を上記抗体と接触させること、および両方の検体から得られた結果を比較することを含み、患者検体中の抗体に対する陽性結合の存在は、患者における癌または癌転移の存在を示す。抗体は、イメージング剤に連結され得る。患者検体は、術中を含むインビトロ、インビボでの、血液、体液、組織、循環細胞であり得る。

【 0 0 3 2 】

本発明はまた、抗 N M E 7 _{A B} 抗体またはそのフラグメントを発現するように操作される細胞に関する。細胞は、T細胞またはNK細胞などの免疫細胞、または幹細胞もしくは前駆細胞、好ましくは、その後分化してT細胞になる幹細胞もしくは前駆細胞であり得る。

【 0 0 3 3 】

細胞は、腫瘍関連抗原を認識するキメラ抗原受容体 (C A R) を含み得る。抗 N M E 7 抗体の発現は、誘導性であり得る。抗 N M E 7 _{A B} 抗体をコードする核酸は、F o x p 3 エンハンサーまたはプロモーター中に挿入され得る。抗 N M E 7 _{A B} 抗体は、N F A T 誘導系中に存在し得る。N F A T c 1 応答エレメントは、エンハンサーまたはプロモーター領域中に挿入される抗体配列の上流に挿入され得る。

【 0 0 3 4 】

抗 N M E 7 _{A B} 抗体またはそのフラグメントは、N M E 7 _{B 3} ペプチドに結合し得るか、または N M E 7 _{A B} または N M E 7 - X 1 の、M U C 1 * 細胞外ドメインの P S M G F R への結合を分断し得る。

【 0 0 3 5 】

C A R は、腫瘍関連抗原および抗 N M E 7 抗体を認識し得る。腫瘍関連抗原は、M U C 1 * であり得る。

【 0 0 3 6 】

本発明はまた、免疫原性誘発部分として図 6 ~ 図 9 に列挙した N M E 7 _{A B} 由来の 1 個

または複数のペプチド、または、それに対し少なくとも80%、85%、90%、95%、97%の配列同一性を有するペプチドを含む組成物を含む抗癌ワクチンに関する。ペプチドは、配列番号141~145のペプチド、またはそれに対し少なくとも80%、85%、90%、95%、97%の配列同一性を有するペプチドであり得る。ペプチドは、配列番号145、またはそれに対し80%、85%、90%、95%、97%の配列同一性を有するペプチドであり得る。

【0037】

別の態様では、本発明は、上記抗体を含むBiTEに関する。

【0038】

さらに別の態様では、本発明は、抗NME7_{AB}抗体を生成する方法に関し、NME7 B3ペプチドのシステイン残基は、ジスルフィド結合を回避するように変異される。

10

【0039】

さらに別の態様では、本発明は、細胞をNME7_{AB}またはNME7-X1と培養することを含む、高められた転移能を有する細胞を生成する方法に関する。

【0040】

本発明はまた、NME7_{AB}またはNME7-X1を発現するように操作される細胞、NME7_{AB}またはNME7-X1を発現する遺伝子導入動物に関し、NME7_{AB}またはNME7-X1は、ヒトであり得、またNME7_{AB}またはNME7-X1の発現は、誘導性であり得る。

【0041】

本特許または出願ファイルは、少なくとも1つのカラー図面を含む。カラー図面を備える、本特許または特許出願公開のコピーは、要請があれば、必要な手数料を支払うことにより、特許庁により提供される。

20

本発明は、以下で与えられる詳細な説明、および例示の目的のみのために与えられる添付図面からより完全に理解され得るが、これは本発明を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図1】NME7_{AB}がMUC1*細胞外ドメインペプチドを二量化させることを示すELISAサンドイッチアッセイによるHRPシグナルのグラフを示す。

【図2】従来の培地またはNME7含有培地中での培養の後のT47D癌細胞についての幹細胞マーカーおよび癌幹細胞マーカーの遺伝子発現のRT-PCR測定グラフを示す。非付着性（浮遊物）になった細胞は、付着のまま残っているものと分離して分析された。

30

【図3】DU145前立腺癌細胞についての様々な幹および推定癌幹細胞マーカーの遺伝子発現のRT-PCR測定グラフである。細胞は、従来の培地、またはNME1二量体（「NM23」）またはNME7（NME7_{AB}）を含む培地のいずれかで培養された。継代2により、細胞が付着のまま残ったので、Rhoキナーゼ阻害剤は使用しなかった。

【図4】よりナイーブ状態に幹細胞を戻すことが以前に示された2i阻害剤（GSK3ベータおよびMEK阻害剤）はまた、NME7_{AB}ほどではないが、より転移性状態へ癌細胞を誘導するというを示す、転移マーカーおよび多能性幹細胞マーカーのRT-PCR測定のグラフである。

40

【図5】ヒトNME1と、ヒトNME7-Aまたは-Bドメイン間の配列アラインメントである。

【図6】NME1に対する低い配列同一性を有しかつ癌の治療または予防のための治療抗NME7抗体を生成するそれらの能力のため選択されたヒトNME7由来の免疫原性ペプチドを列挙する。

【図7】構造健全性にとってまたはMUC1*への結合性にとって重要であり得、癌の治療または予防のための治療抗NME7抗体を生成するそれらの能力のため選択されたヒトNME7由来の免疫原性ペプチドを列挙する。

【図8】構造健全性にとってまたはMUC1*への結合性にとって重要であり得、癌の治療または予防のための治療抗NME7抗体を生成するそれらの能力のため選択されたヒト

50

N M E 1 由来の免疫原性ペプチドを列挙する。

【図 9】N M E 1 へのそれらの低い配列同一性のためおよび癌と結びつけられてきたバクテリアN M E 1 タンパク質へのそれらの相同性のため選択されたヒトN M E 7 由来の免疫原性ペプチドを列挙する。これらのペプチドは、癌の治療または予防のための治療抗N M E 7 抗体を生成するそれらの能力のため、より好ましい。この図で示されるペプチドは、C 末端で共有結合された追加のシステインを含む。

【図 10】N M E 7 - A B (図 10 A) またはN M E 1 (図 10 B) をプレートに吸着させ、N M E 7 ペプチドA 1、A 2、B 1、B 2 およびB 3 により生成された抗N M E 7 抗体を、N M E 7 に結合するがN M E 1 にはしないそれらの能力に関して試験した、E L I S A アッセイのグラフを示す。C 20 は、抗N M E 1 抗体である。

10

【図 11】生成された抗N M E 7 抗体を、表面に固定されたM U C 1 * ペプチドに対するN M E 7 - A B の結合を抑制するが、N M E 1 の結合を抑制しないそれらの能力に関して試験した、E L I S A アッセイのグラフを示す。

【図 12】乳癌細胞を、抗体を生成するか選択するために使用されたN M E 7 に由来するN M E 7 抗体または短鎖ペプチドの存在または非存在下で増殖した、癌細胞増殖実験のグラフを示す。さらに、N M E 7 A B ペプチドほぼ全体である、アミノ酸100 ~ 376 による免疫化により生成された抗体は、癌細胞増殖を抑制することが示された。

【図 13】乳癌細胞を、抗体を生成するか選択するために使用されたN M E 7 抗体またはN M E 7 に由来する短鎖ペプチドの組み合わせの存在または非存在下で増殖した、癌細胞増殖実験のグラフを示す。両方の抗体は、それらの免疫化N M E 7 A B ペプチドと同様に癌細胞の増殖を抑制した。

20

【図 14】癌細胞が、その両方がより転移性の状態へ癌細胞を形質転換できる、N M E 7 - A B または2 i 阻害剤中で、およびN M E 7 由来ペプチドA 1、A 2、B 1、B 2 とB 3 の存在または非存在下で増殖された場合の科学者による観察結果の表である。N M E 7 - A B ペプチドは、付着性癌細胞の浮遊細胞への移行を抑制し、R T - P C R 測定は、転移マーカー、特にC X C R 4 の発現を増加させたことを示す。

【図 15 A】癌細胞をより転移性状態に形質転換するそれぞれN M E 7 - A B または2 i 阻害剤中で増殖された、T 47D 乳癌細胞中のC X C R 4 および他の転移マーカーの発現のR T - P C R 測定のグラフ、および転移性形質転換に対する抗N M E 7 抗体の抑制効果を示す。図 15 A は、抗N M E 7 抗体の存在下または非存在下でN M E 7 A B または2 i 中で増殖されたT 47D 癌細胞のC X C R 4 発現のP C R グラフである。

30

【図 15 B】癌細胞をより転移性状態に形質転換するそれぞれN M E 7 - A B または2 i 阻害剤中で増殖された、T 47D 乳癌細胞中のC X C R 4 および他の転移マーカーの発現のR T - P C R 測定のグラフ、および転移性形質転換に対する抗N M E 7 抗体の抑制効果を示す。図 15 B は、N M E 7 A B 免疫化ペプチドの存在下にて、2 i 阻害剤中で72 時間または144 時間増殖された、T 47D 乳癌細胞中のC X C R 4、C H D 1 およびS O X 2 発現のR T - P C R 測定のグラフであり、それらのペプチドはそれ自体、転移性形質転換に対し抑制性であることを示す。図 15 A の抑制性コンボ2 および3 において使用されたペプチドA 1、A 2 およびB 1 は、ペプチドとして抑制性でもある。ペプチドB 3 は、最も抑制性であり、図 15 A で試験された最も抑制性抗体であった、抗体61 用の免疫化ペプチドである。

40

【図 15 C】癌細胞をより転移性状態に形質転換するそれぞれN M E 7 - A B または2 i 阻害剤中で増殖された、T 47D 乳癌細胞中のC X C R 4 および他の転移マーカーの発現のR T - P C R 測定のグラフ、および転移性形質転換に対する抗N M E 7 抗体の抑制効果を示す。図 15 C は、図 15 B のY 軸を拡大したグラフである。

【図 16】対照のハウスキーピング遺伝子およびC X C R 4 発現の閾値サイクル数、ならびに図 31 のC X C R 4 のR T - P C R 測定に使用した試料中の記録されたR N A レベルの表を示す。

【図 17】一連のヒト幹細胞および癌細胞におけるN M E 7 - X 1 の発現のR T - P C R 測定のグラフを示す。

50

【図18】一連のヒト幹細胞および癌細胞におけるNME7、NME7a、NME7bおよびNME7-X1の発現のRT-PCR測定グラフを示す。NME7aは完全長NME7であり、NME7bはDM10ドメインのほんの一部を欠失し、NME7-X1は、DM10ドメインの全ておよび第1のNDPK AドメインのN末端のほんの一部を欠失している。NME7と標識されたバーは、NME7aとNME7bの両方を検出するプライマーが使用されたことを意味する。

【図19-1】NME7由来ペプチドによる免疫化により生成された抗体を使用して、様々な癌細胞株がNME7種の発現について検出される、ウエスタンブロットの写真を示す。図19Aは、A1ペプチドに結合する抗体52を、一連の細胞の完全長NME7、NME7_{AB}、またはNME7-X1の存在を検出するために使用する、ウエスタンブロットを示す。図19Bは、B1ペプチドに結合する抗体56を、一連の細胞の完全長NME7、NME7_{AB}、またはNME7-X1の存在を検出するために使用する、ウエスタンブロットを示す。図19Cは、B3ペプチドに結合する抗体61を、一連の細胞の完全長NME7、NME7_{AB}、またはNME7-X1の存在を検出するために使用する、ウエスタンブロットを示す。

【図19-2】NME7由来ペプチドによる免疫化により生成された抗体を使用して、様々な癌細胞株がNME7種の発現について検出される、ウエスタンブロットの写真を示す。図19Dは、NME7 AおよびBの両方に対して産生された、市販のポリクローナル抗体H278を、一連の細胞の完全長NME7の存在を検出するために使用する、ウエスタンブロットを示す。図が示すように、抗体H278もNME1を認識する。図19Eは、市販の抗NME7抗体B9についてウェブサイト上で発表されたゲルを示し、それが、完全長NME7の見掛けの分子量を有する種に結合することを示す。図19Fは、抗NME7抗体B9を、NME1のみを充填したゲルを検出するために使用した、ウエスタンブロットを示す。図で見られるように、抗体B9は、NME1ならびに完全長NME7を認識する。これは意外ではなく、なぜなら抗体H278と同様に、B9は、NME7のAおよびBドメインの両方に対して産生され、NME1のAドメインはNME7_{AB}のAドメインに高度に相同だからである。

【図20-1】標準培地と比較して、NME7_{AB}含有無血清培地で培養された後の癌細胞中の転移マーカーのRT-PCR測定グラフを示す。図20Aは、MUC1-陽性卵巣癌細胞株である、SK-OV3が、転移マーカーCXCR4、CDH1別名E-カドヘリン、SOX2およびNME7-X1の発現を増大させたことを示す。図20Bは、MUC1-陰性卵巣癌細胞株である、OV-90が、転移マーカーCXCR4およびNME7-X1の発現を増大させたことを示す。

【図20-2】標準培地と比較して、NME7_{AB}含有無血清培地で培養された後の癌細胞中の転移マーカーのRT-PCR測定グラフを示す。図20Cは、最小のレベルのMUC1を発現する乳癌細胞株であるMDA-MBが、転移マーカーCDH1別名E-カドヘリンおよびSOX2の発現を増大させたことを示す。

【図21-1】分析した癌細胞株のウエスタンブロットの写真および説明を示す。図21Aおよび21Bのウエスタンブロットの場合、全ての癌試料は、それらが40 μg/mLの濃度でゲルに充填されるように正規化された。図21Aでは、抗タンデムリピートモノクローナル抗体VU4H5を使用して、様々な癌細胞株における完全長MUC1の発現が検出される。図21Bでは、様々な癌細胞株が、ポリクローナル抗PSMGFR抗体を使用して、切断型MUC1*の発現について検出される。図21Cは、分析した癌細胞株の説明である。

【図21-2】分析した癌細胞株のウエスタンブロットの写真および説明を示す。図21Dは、HER2の発現レベルは変わらなかったが、MUC1*の発現は、細胞がハーセプチンに対する抵抗性を獲得するに伴い、劇的に増加したことを示す。図21Eは、抗MUC1* Fabの存在または非存在下でハーセプチンによる治療に应答した、薬剤抵抗性転移性細胞と比較した、親BT474細胞の増殖のグラフを示す。図で見られるように、BT474親細胞は、細胞増殖においてハーセプチン濃度依存性の低減を示し、一方、2

10

20

30

40

50

種のハーセプチン抵抗性細胞株である、BTRes1およびBTRes2は、ハーセプチンによる治療に应答する癌細胞増殖における低減を示さない。しかし、抗MUC1* Fabで治療した場合、抵抗性細胞株は、癌細胞増殖においてハーセプチン濃度依存性の低減を示す。図21Fは、抗MUC1* Fabの存在または非存在下でタキソールによる治療に应答した、薬剤抵抗性BTRes1と比較した、親BT474細胞のパーセント細胞死のグラフを示す。

【図22】共免疫沈降実験のウエスタンブロットの写真を示す。T47D乳癌細胞抽出物を、MUC1の細胞質側末端に対する抗体、Ab-5、または対照抗体、IgGとインキュベートし、共免疫沈降させた。ゲルを、2種の異なる市販の抗NME7抗体B9(図22A)およびCF7(図22B)でブロットした。両方のゲルは、約33kDaと約30kDaで特有のNME7バンドを示す。ゲルを、ストリップし、MUC1*の細胞外ドメインに対する抗体、抗PSMGFR(図22C)および(図22D)で再検出した。これは、NME7種およびMUC1*が、相互作用することを示す。組換えNME7-A Bおよび組換えNME7-X1をともに混合し、ゲル上で展開させ、その後、抗NME7抗体で検出した。乳癌細胞において自然発生しかつMUC1*と相互作用する、2種の特有のNME7種が、NME7-A B様種およびNME7-X1(図22E)であることを示す。

【図23】共免疫沈降実験のウエスタンブロットの写真を示す。ヒト誘導多能性幹細胞、iPS7細胞、または胚性幹細胞、HES3細胞抽出物を、MUC1の細胞質側末端に対する抗体、Ab-5、または対照抗体、IgGとインキュベートし、共免疫沈降させた。ゲルを、市販の抗NME7抗体B9(図23A)でブロットした。両方の細胞型は、約33kDaと約30kDaで特有のNME7バンドを示す。ゲルを、ストリップし、MUC1*の細胞外ドメインに対する抗体、抗PSMGFR(図23B)で再検出した。これは、NME7種およびMUC1*が相互作用することを示す。組換えNME7-A Bおよび組換えNME7-X1を混合し、ゲル上で展開させ、その後、抗NME7抗体で検出した。乳癌細胞において自然発生しかつMUC1*と相互作用する、2種の特有のNME7種が、NME7-A B様種およびNME7-X1(図23C)であることを示す。

【図24】新規抗NME7抗体をNME7-A Bに結合するそれらの能力についてアッセイするELISA実験のグラフを示す。NME7-A Bは、MUC1*の細胞外ドメインに結合することが知られている。マルチウェルプレートの表面を、組換えNME7-A Bでコートした。抗NME7-A B抗体を別に、ウェルに添加した。標準的洗浄を行い、HRP標識二次抗体を加えることにより可視化した。図から分かるように、10種の抗NME7抗体の内の7種がNME7-A Bに強く結合した。

【図25】新規抗NME7抗体をNME1に結合する能力、または好ましくは結合できないそれらの特性についてアッセイするELISA実験のグラフを示す。マルチウェルプレートの表面を、組換えNME1-S120G二量体でコートした。これは、MUC1*細胞外ドメインに結合することが知られている。抗NME7-A B抗体を別に、ウェルに添加した。標準的洗浄を行い、HRP標識二次抗体を加えることにより可視化した。図から分かるように、1種の抗体のみが、NME1に対する、ほんの最小限の結合を示した。

【図26】ELISA競合的阻害アッセイのグラフを示す。NME7-A B/抗NME7抗体複合体を作製後、MUC1*細胞外ドメインペプチド、PSMGFRでコートしたマルチウェルプレートに加えた。NME7-A Bは、それぞれMUC1*細胞外ドメインに結合できる2つの疑似的同一ドメインAおよびBを有することを想起されたい。Bドメイン中にあるNME7 B3ペプチドに結合する抗体は、NME7 Aドメインに結合しない。従って、NME7-A B/MUC1*相互作用の部分的な抑制のみが予測される。

【図27】ELISA置換アッセイのグラフを示す。NME7-A Bを最初に、プレート上の表面固定化MUC1*細胞外ドメインペプチドに結合し、その後、抗NME7抗体の添加により分断した。

【図28】ELISA置換アッセイのグラフを示す。この場合、マルチウェルプレートを、短縮MUC1*ペプチド、N-10(PSMGFR配列の10個のN末端アミノ酸欠失

10

20

30

40

50

を有する)でコートした。NME7-ABは、N-10ペプチドに結合することが知られている。NME7-ABを、プレート上の表面固定化N-10ペプチドに結合し、その後、抗NME7抗体の添加により分断した。

【図29】それらの通常の推奨培地、RPMI、成長因子として4nM(最適値)または8nMのNME7-ABのみを含む無血清培地、または成長因子として8nMのNME1S120G二量体のみを含む無血清培地のいずれかで培養したT47D乳癌細胞の試料中に存在するRNAの量のグラフを示す。NME1はホモダイマーであり、NME7-ABは2つの疑似的同一ドメインからなるモノマーであるので、8nMのNME1は、4nMのNME7-ABのモル当量である。癌細胞を、抗NME7 B3抗体の存在または非存在下で培養した。この実験では、浮遊細胞を、付着細胞から分離し、別々に分析した。有意なデータは、浮遊細胞は癌幹細胞であることを示す。試料中のRNAの量の増大または減少は、所与の集団中のそれぞれ、増大したまたは減少した細胞の数を示している。

10

【図30】それらの通常の推奨培地、RPMI、成長因子として4nM(最適値)または8nMのNME7-ABのみを含む無血清培地、または成長因子として8nMのNME1S120G二量体のみを含む無血清培地のいずれかで培養したT47D乳癌細胞中の転移マーカーCXCR4のPCR測定の結果を示す。NME1はホモダイマーであり、NME7-ABは2つの疑似的同一ドメインからなるモノマーであるので、8nMのNME1は、4nMのNME7-ABのモル当量である。癌細胞を、抗NME7 B3抗体の存在または非存在下で培養した。この実験では、浮遊細胞を、付着細胞から分離し、別々に分析した。有意なデータは、浮遊細胞は癌幹細胞であることを示す。図から分かるように、NME7-AB培地中での増殖は、浮遊物細胞集団中のCXCR4を増大させ、抗NME7 B3抗体は発現が低減し、抗NME7抗体が癌幹細胞の生成を低減させたことを示す。

20

【図31】それらの通常の推奨培地、RPMI、成長因子として4nM(最適値)または8nMのNME7-ABのみを含む無血清培地、または成長因子として8nMのNME1S120G二量体のみを含む無血清培地のいずれかで培養したT47D乳癌細胞中の幹細胞マーカーおよび転移マーカーのPCR測定の結果を示す。NME1はホモダイマーであり、NME7-ABは2つの疑似的同一ドメインからなるモノマーであるので、8nMのNME1は、4nMのNME7-ABのモル当量である。癌細胞を、抗NME7 B3抗体の存在または非存在下で培養した。この実験では、浮遊細胞を、付着細胞から分離し、別々に分析した。有意なデータは、浮遊細胞は癌幹細胞であることを示す。図から分かるように、NME7-AB培地中での増殖は、浮遊物細胞集団中のSOX2発現を増大させ、抗NME7 B3抗体は発現が低減し、抗NME7抗体が癌幹細胞の生成を低減させたことを示す。

30

【図32】それらの通常の推奨培地、RPMI、成長因子として4nM(最適値)または8nMのNME7-ABのみを含む無血清培地、または成長因子として8nMのNME1S120G二量体のみを含む無血清培地のいずれかで培養したT47D乳癌細胞中の幹細胞マーカーおよび転移性の成長因子受容体MUC1のPCR測定の結果を示す。NME1はホモダイマーであり、NME7-ABは2つの疑似的同一ドメインからなるモノマーであるので、8nMのNME1は、4nMのNME7-ABのモル当量である。癌細胞を、抗NME7 B3抗体の存在または非存在下で培養した。この実験では、浮遊細胞を、付着細胞から分離し、別々に分析した。有意なデータは、浮遊細胞は癌幹細胞であることを示す。図から分かるように、NME7-AB培地中での増殖は、浮遊物細胞集団中のMUC1発現を増大させ、抗NME7 B3抗体は発現が低減し、抗NME7抗体が癌幹細胞の生成を低減させたことを示す。

40

【図33】免疫機能が低下したnu/nuマウスの癌細胞の尾静脈注入後6日目のIVIS写真を示す。図33Aは、500,000個のT47D-wt乳癌細胞を注入したマウスのIVIS写真を示す。図33Bは、最少培地中のNME7-AB中で10日間増殖させたT47D乳癌細胞の10,000個を注入したマウスのIVIS写真を示す。浮遊細胞を集めた。これらの浮遊細胞を、本明細書では、癌幹細胞、CSCと呼ぶ。図から分かるように、野生型癌細胞を注入されたマウスは、転移の徴候を示さない。しかし、50倍

50

少ない細胞であるが、癌幹細胞を注入したマウスは、注入した癌細胞が明確に転移性を示す。

【図34】免疫機能が低下した *nu/nu* マウスの癌細胞の尾静脈注入後10日目の I V I S 写真を示す。図34Aは、500,000個の T47D-wt 乳癌細胞を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図34Bは、10,000個の T47D-CSC (癌幹細胞) を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図34Cは、10,000個の T47D-CSC (癌幹細胞) を注入し、7日目に抗 NME7 抗体を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図34Dは、放出光子の I V I S 測定の手書きの記録を示す。図から分かるように、治療のために選択されたマウスは、同等の T47D-CSC マウスよりも転移性が高い。第1の抗体の注入の効力は、6日目の遊離 NME7-A B の注入により遮断された可能性がある。500,000個の T47D-wt 細胞を注入された対照マウスは、バックグラウンドまたは生存癌細胞であり得る幾分弱い光子放出を示す。

10

【図35】免疫機能が低下した *nu/nu* マウスの癌細胞の尾静脈注入後12日目の I V I S 写真を示す。図35Aは、500,000個の T47D-wt 乳癌細胞を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図35Bは、10,000個の T47D-CSC (癌幹細胞) を注入し、抗 NME7 抗体で治療されず、I V I S 写真の取得前に、過剰腫瘍量により死亡したマウスを示す。図35Cは、10,000個の T47D-CSC (癌幹細胞) を注入し、7日目と10日目に抗 NME7 抗体を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図から分かるように、抗 NME7 抗体で治療したマウスは、癌転移を消し去っている。500,000個の T47D-wt 細胞を注入された対照マウスは、より少ない放出を示し、より少ない癌細胞を示しているか、またはバックグラウンドであり得る。

20

【図36】免疫機能が低下した *nu/nu* マウスの癌細胞の尾静脈注入後14日目の I V I S 写真を示す。図36Aは、500,000個の T47D-wt 乳癌細胞を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図36Bは、10,000個の T47D-CSC (癌幹細胞) を注入し、7日目、10日目、および12日目に抗 NME7 抗体を注入したマウスの I V I S 写真を示す。図から分かるように、抗 NME7 抗体で治療したマウスは、癌転移をほぼ完全に含まない。500,000個の T47D-wt 細胞を注入された対照マウスは、光子の放出を示さない。

【図37】免疫機能が低下した *nu/nu* マウスの癌細胞の尾静脈注入後6~26日目の I V I S 写真の経時変化を示す。図37A、37C、37E、37G、37I、37K、37Mおよび37Oは、0日目に、500,000個の T47D-wt 細胞を尾静脈に注入したマウスの I V I S 写真を示す。図37B、37D、37F、37H、37J、37L、37Nおよび37Pは、0日目に、10,000個の T47D 癌幹細胞を尾静脈に注入し、これに、7日目~17日目に抗 NME7 抗体を投与し、そこで治療を中断し、その後、21日目に再開したマウスの I V I S 写真を示す。図37Q、37R、37S、37T、および37Uは、抗 NME7 抗体治療が中断された17日目~、26日目までの抗体治療が再開された21日目の、治療マウスの拡大 I V I S 写真を示す。図37Vは、I V I S 測定値のスケールバーを示す。この経時変化から分かるように、NME7 中で増殖された癌細胞は、容易に転移し、このような転移は、NME7 に結合する抗体での治療により、効果的に治療、予防または回復され得る。

30

40

【図38】免疫機能が低下した *nu/nu* マウスの500,000個の T47D 野生型乳癌細胞または10,000個の T47D 癌幹細胞の尾静脈注入後6~19日目の I V I S 写真の経時変化を示す。図38Aは、尾静脈 (i.v.) に注入されたマウスを示す。図38Bは、腹腔内 (i.p.) に注入されたマウスを示す。図38Cは、皮下 (s.c.) に注入されたマウスを示す。

【図39】B3ペプチドに結合する抗 NME7 抗体で染色したヒト肺組織検体を示す。この図は、正常組織での NME7 発現の欠如、腫瘍悪性度に伴う NME7 の増大する発現および転移の増加を示す。

【図40】B3ペプチドに結合する抗 NME7 抗体で染色したヒト小腸組織検体を示す。この図は、正常組織での NME7 発現の欠如、腫瘍悪性度に伴う NME7 の増大する発現

50

および転移の増加を示す。

【図 4 1】B 3 ペプチドに結合する抗 N M E 7 抗体で染色したヒト結腸組織検体を示す。この図は、正常組織での N M E 7 発現の欠如、腫瘍悪性度に伴う N M E 7 の増大する発現および転移の増加を示す。

【図 4 2】10,000 個のルシフェラーゼ陽性 T 4 7 D 転移性乳癌幹細胞を尾静脈に注入され、抗 N M E 7_{AB} 抗体 4 A 3 (8 F 9 A 4 A 3 としても知られる) で治療された、それぞれ体重約 20 g の雌 n u / n u マウスの写真を示す。癌細胞を画像化するために、ルシフェラーゼ基質のルシフェリンが、I V I S 測定器中で撮影の 10 分前に腹腔内注入される。図 4 2 A ~ 4 2 C は、下向きの動物の I V I S 写真を示す。図 4 2 D ~ 4 2 F は、上向きの動物の I V I S 写真を示す。図 4 2 A および 4 2 D は、リン酸緩衝食塩水を注入された対照動物を示す。図 4 2 B および 4 2 E は、動物が転移性癌細胞の注入の 24 時間前に抗 N M E 7_{AB} 抗体 4 A 3 を注入され、その後、ほぼ 1 日おきに、22 日間にわたり合計 12 回の抗体注入をされた、予防モデルを示す。図 4 2 C および 4 2 F は、動物が転移性癌細胞の注入の 24 時間後に抗 N M E 7_{AB} 抗体 4 A 3 を注入され、その後、ほぼ 1 日おきに、20 日間にわたり合計 11 回の抗体注入をされた、回復モデルを示す。

【図 4 3】10,000 個のルシフェラーゼ陽性 T 4 7 D 転移性乳癌幹細胞を尾静脈に注入され、抗 N M E 7_{AB} 抗体 5 A 1 (8 F 9 A 5 A 1 としても知られる)、または 5 D 4 (5 F 3 A 5 D 4 としても知られる) で治療された、それぞれ体重約 20 g の雌 n u / n u マウスの写真を示す。癌細胞を画像化するために、ルシフェラーゼ基質のルシフェリンが、I V I S 測定器中で撮影の 10 分前に腹腔内注入される。図 4 3 A ~ 4 3 C は、下向きの動物の I V I S 写真を示す。図 4 3 D ~ 4 3 F は、上向きの動物の I V I S 写真を示す。図 4 3 A および 4 3 D は、リン酸緩衝食塩水を注入された対照動物を示す。図 4 3 B および 4 3 E、4 3 C および 4 3 F は、動物が転移性癌細胞の注入の 24 時間前に抗 N M E 7_{AB} 抗体を注入され、その後、ほぼ 1 日おきに、22 日間にわたり合計 12 回の抗体注入をされた、予防モデルを示す。画像を、27 日目に取得した。

【図 4 4】0 日目に、32 n M の最終濃度に N M E 7_{AB} と混合された 10,000 個のルシフェラーゼ陽性 T 4 7 D 転移性乳癌幹細胞を尾静脈に注入された雌 n u / n u マウスの写真を示す。1 日目および 2 日目に、動物の尾静脈にさらに 32 n M の N M E 7_{AB} を注入し、これは転移の増加を示した。これは、既発症転移の回復を実証するための系である。7 日目に、動物を、個別の抗 N M E 7_{AB} 抗体：8 F 9 A 5 A 1、8 F 9 A 4 A 3、または 5 F 3 A 5 D 4 で治療した。図 4 4 A は、リン酸緩衝食塩水を注入された対照動物を示す。図 4 4 B は、抗 N M E 7_{AB} モノクローナル抗体 8 F 9 A 5 A 1 (5 A 1 としても知られる) で治療した動物を示す。図 4 4 C は、抗 N M E 7_{AB} モノクローナル抗体 8 F 9 A 4 A 3 (4 A 3 としても知られる) で治療した動物を示す。図 4 4 D は、抗 N M E 7_{AB} モノクローナル抗体 5 F 3 A 5 D 4 (5 D 4 としても知られる) で治療した動物を示す。緑矢印は、示した期間にわたる抵抗抗体投与量 (5 ~ 7 m g / k g) を示し、赤矢印は、高投与量 (15 m g / k g) を示す。図から分かるように、抗 N M E 7_{AB} 抗体で治療した動物は、抗体で治療される予定の群中の多くの動物が治療前により多くの転移を有している場合でも、対照動物より少ない転移を有する。抗 N M E 7_{AB} 抗体のより高い濃度は、低い濃度より効果的である。例えば 11 日目 ~ 17 日目の間、動物を高用量で治療し、治療された動物のほとんどは、約 17 日目までに転移を排除した。しかし、1 種の低用量の抗体は、転移再発を生じた。動物は、32 日目までに高用量治療に再度応答した。

【図 4 5】0 日目に、32 n M の最終濃度に N M E 7_{AB} と混合された後、マトリゲルと 1 : 1 v o l : v o l で混合された、10,000 個のルシフェラーゼ陽性 T 4 7 D 転移性乳癌幹細胞を右脇腹に皮下注入された雌 n u / n u マウスの写真を示す。腫瘍生着を、0 日目 ~ 6 日目に進行させた。動物をその後、抗 N M E 7_{AB} 抗体の尾静脈注入により i . v . 治療した。対照動物に P B S を注入した。図 4 5 A は、対照動物の I V I S 写真を示す。図 4 5 B は、抗 N M E 7_{AB} 抗体 5 A 1、4 A 3 および 5 D 4 の合計濃度 15 m g / k g のカクテルを尾静脈に注入した動物の I V I S 写真を示す。抗体または P B S を、7 日目 ~ 18 日目の間に 4 回投与した。図から分かるように、抗 N M E 7_{AB} 抗体で治

10

20

30

40

50

療したマウスは、対照群より少ない転移を示す。治療群中で、5匹の動物中の2匹が、対照群中の腫瘍より大きい原発性腫瘍を有する。これは、おそらく、抗NME7_{AB}抗体が癌細胞の拡散を妨げ、そのため、それらは原発腫瘍中に濃縮されて残ったためと思われる。この実験で、PCR分析は、NME7_{AB}を含む培養物中で11日後、T47D乳癌細胞が、CXCR4を109倍、OCT4を2倍、NANOGを3.5倍およびMUC1を2.7倍、上方制御させたことを示した。

【図46】0日目に、32nMの最終濃度にNME7_{AB}と混合された後、マトリゲルと1:1 vol:volで混合された、10,000個のルシフェラーゼ陽性T47D転移性乳癌幹細胞を右脇腹に皮下注入された雌nu/nuマウスの写真を示す。腫瘍生着を、0日目~6日目に進行させた。動物をその後、抗NME7_{AB}抗体の尾静脈注入によりi.v.治療した。対照動物にPBSを注入した。38日目に、動物を殺し、肝臓を採取した後、IVISで分析して肝臓に転移した癌細胞を検出した。図46Aおよび46Bは、PBSのみを注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46Cおよび46Dは、抗NME7_{AB}抗体5A1を注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46Eおよび46Fは、抗NME7_{AB}抗体4A3を注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46Gおよび46Hは、抗NME7_{AB}抗体5D4を注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46A、46C、46E、および46Gは、治療前7日目に取得したIVIS写真である。図46B、46D、46F、および46Hは、抗NME7_{AB}抗体治療またはモック治療後31日目に取得したIVIS写真である。図から分かるように、PBS対照群中の動物は、全身IVIS写真で転移を示し(青色ドット)、一方、抗NME7_{AB}抗体で治療した動物は、転移を示さない。図46I~46Pは、殺後の動物から採取した肝臓および肺の写真およびIVIS写真を示す。図46I、46K、46M、および46Oは、通常の写真である。図46J、46L、46N、および46Pは、IVIS写真であり、そこに転移した癌細胞を明らかにする。図から分かるように、抗NME7_{AB}抗体は肝臓への転移を大きく抑制した。肝臓は、乳癌転移の原発性部位である。図46Qは、対照動物とそれに対する治療動物から採取された肝臓において、放出され、IVIS測定器によりカウントされた測定光子の棒グラフである。

【図47】種々の癌細胞株がNME7_{AB}の存在を検出するために染色される免疫蛍光実験の写真を示す。図47Aは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したT47D乳癌細胞を示す。図47Bは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したZR-75-1乳癌細胞(1500sとしても知られる)を示す。図47Cは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したH1975非小細胞肺癌細胞を示す。図47Dは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したH292非小細胞肺癌細胞を示す。図47Eは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したHPAFII膵臓癌細胞を示す。図47Fは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したDU145前立腺癌細胞を示す。図から分かるように、本発明者らが試験した全ての癌細胞株は、NME7_{AB}に対する強力な膜性染色を示す。これらの実験で使用したモノクローナル抗体は、5D4であった。並行して、NME7_{AB}抗体5A1および4A3を使って同じ細胞株を染色し、同じ結果を得た。

【図48】種々のヒト肺癌細胞株がNME7_{AB}の存在を検出するために染色される免疫蛍光実験の写真を示す。図48A~48Cは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色した、腺癌であるH1975非小細胞肺癌細胞を示す。図48Aは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイである。図48Bは、抗NME7_{AB}染色のみを示す。図48Cは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイの拡大図である。図48D~48Fは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色した、肺粘表皮癌であるH292非小細胞肺癌細胞を示す。図48Dは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイである。図48Eは、抗NME7_{AB}染色のみを示す。図48Fは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイの拡大図である。図48G~48Iは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色した、転移性気管支肺胞上皮癌であるH358非小細胞肺癌細胞を示す。図48Gは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイ

である。図 4 8 H は、抗 N M E 7_{A B} 染色のみを示す。図 4 8 I は、D A P I および抗 N M E 7_{A B} 染色のオーバーレイの拡大図である。

【図 4 9 - 1】N M E 7_{A B} 中で培養の前後での癌細胞株：乳癌 T 4 7 D、肺 H 1 9 7 5、肺 H 3 5 8 および膵臓 H P A F I I の P C R グラフを示す。図 4 9 A は、測定された乳癌転移マーカー C X C R 4 である。図 4 9 B は、測定された幹細胞マーカー O C T 4 である。図 4 9 C は、測定された転移マーカー A L D H 1 である。図 4 9 D は、測定された幹細胞マーカー S O X 2 である。図 4 9 E は、測定された幹細胞マーカー N A N O G である。図 4 9 F は、測定された転移マーカー C D H 1 (E - カドヘリンとしても知られる) である。癌幹細胞を注入された動物は、N M E 7_{A B} 増殖浮遊細胞を注入された動物である。図から分かるように、転移マーカー、幹細胞マーカー、または上皮間葉転換 (E M T) のマーカーは、N M E 7_{A B} 中の培養後に増大しており、より高い転移性状態への転換を示している。

10

【図 4 9 - 2】N M E 7_{A B} 中で培養の前後での癌細胞株：乳癌 T 4 7 D、肺 H 1 9 7 5、肺 H 3 5 8 および膵臓 H P A F I I の P C R グラフを示す。図 4 9 G は、測定された転移マーカー C D 1 3 3 である。図 4 9 H は、測定された幹細胞マーカー Z E B 2 である。図 4 9 I は、測定された幹、癌および転移マーカー M U C 1 である。浮遊細胞 (腫瘍スフェアとしても知られる) は、独立に足場を増殖できるようになり、付着細胞より増加される転移マーカーを示す。癌幹細胞を注入された動物は、N M E 7_{A B} 増殖浮遊細胞を注入された動物である。図から分かるように、転移マーカー、幹細胞マーカー、または上皮間葉転換 (E M T) のマーカーは、N M E 7_{A B} 中の培養後に増大しており、より高い転移性状態への転換を示している。

20

【図 5 0】N M E 7_{A B} を含む培養物中で 1 0 日後、N C I - H 3 5 8 親細胞または N C I - H 3 5 8 細胞であった、1 0 , 0 0 0 個の癌細胞を尾静脈に注入した N S G マウスの I V I S 写真を示す。図 5 0 A および 5 0 C は、N M E 7_{A B} 中で 1 0 日間増殖された N C I - H 3 5 8 肺癌細胞を注入されたマウスの I V I S 写真を示す。図 5 0 B および 5 0 D は、親 N C I - H 3 5 8 細胞を注入されたマウスの I V I S 写真を示す。図 5 0 A および 5 0 B は、下向きで画像取得されるマウスの I V I S 写真を示す。図 5 0 C および 5 0 D は、上向きで画像取得されるマウスの I V I S 写真を示す。図から分かるように、N M E 7_{A B} 増殖細胞は、転移能を大きく高めた。

【図 5 1】二量体 N M 2 3 - H 1 (N M E 1 としても知られる)、または N M E 7_{A B} 中の培養における 2 または 3 継代の前後の M U C 1 陰性前立腺癌株 P C 3 の P C R グラフを示す。グラフは、幹細胞、癌細胞マーカーならびに転移マーカーの倍数差異を示す。図から分かるように、N M E 1 または N M E 7_{A B} 中の反復培養は、幹、癌および転移マーカーの上方制御を誘導するが、また、M U C 1 の発現を 5 ~ 8 倍上方制御する。

30

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 3】

定義

本出願では、「a」および「an」は、単一および複数の目的物の両方を指すために使用される。

【0 0 4 4】

本明細書で使用される場合、「約 (a b o u t)」、または「本質的に (s u b s t a n t i a l l y)」は一般的に、正確な数字に限定されることからの余地を与える。例えば、ポリペプチド配列の長さの内容で使用される場合、「約」、または「本質的に」は、ポリペプチドがアミノ酸の記述された数に限定されないことを示す。N 末端または C 末端から付加または除去された少数のアミノ酸は、その結合活性などの機能的活性が存在する限り、含まれ得る。

40

【0 0 4 5】

本明細書で使用される場合、1 種または複数のさらなる治療薬との「組み合わせた」投与は、任意の順による同時の (協力的) 投与および連続した投与を含む。

【0 0 4 6】

50

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」および「複数アミノ酸」は全て、天然起源のL-アミノ酸を指す。この定義は、ノルロイシン、オルニチンおよびホモシステインを含むことを意図する。

【0047】

本明細書で使用される場合、一般に、用語「アミノ酸配列バリエーション」は、参照（例えば、天然配列）ポリペプチドと比較して、それらのアミノ酸配列に、いくつかの差異を有する分子を指す。アミノ酸変化は、天然アミノ酸配列における、置換、挿入、欠失、またはこのような変化の任意の所望の組み合わせであり得る。

【0048】

置換バリエーションは、天然配列における少なくとも1個のアミノ酸残基が除去され、同じ位置にその代わりに挿入された異なるアミノ酸を有するものである。置換は、分子中の1個のみのアミノ酸が置換される単一置換であってもよく、または、その同じ分子で、2個以上のアミノ酸が置換される複数置換であってもよい。

10

【0049】

配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性の（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含む。極性が中性のアミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンを含む。正に帯電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。負に帯電した（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸とグルタミン酸を含む。同じまたは類似の生物活性を示すタンパク質またはフラグメントまたはそれらの誘導体、および翻訳中にまたは翻訳後に、例えば、グリコシル化、タンパク質切断、抗体分子または他の細胞リガンドへの結合などによって、異なって修飾される誘導体もまた、本発明の範囲内に含まれる。

20

【0050】

挿入バリエーションは、天然アミノ酸配列中の特定の位置であるアミノ酸に直接隣接して挿入された1個または複数のアミノ酸を有するものである。あるアミノ酸に直接隣接して、とは、そのアミノ酸の-COOHまたは-NH₂官能基のいずれかに接続されることを意味する。

【0051】

欠失バリエーションは、天然アミノ酸配列中の1個または複数のアミノ酸が除去されたものである。通常、欠失バリエーションは、分子の特定の領域で、1個または2個のアミノ酸欠失を有する。

30

【0052】

本明細書で使用される場合、「フラグメント」または「機能的な誘導体」は、本発明のポリペプチドの生物学的に活性なアミノ酸配列バリエーションおよびフラグメントを指し、ならびに、有機的な誘導体化剤との反応によって得られる誘導体、翻訳後修飾、非タンパク質のポリマーを含む誘導体、およびイムノアドヘシンを含む、共有結合性修飾を指す。

【0053】

本明細書で使用される場合、「担体」は、薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤を含み、それらは使用される投与量と濃度で、それに曝露された細胞または哺乳動物に無毒である。多くの場合、薬学的に許容可能な担体は、pH緩衝水溶液である。薬学的に許容可能な担体の例としては、限定されないが、リン酸塩、クエン酸および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量（約10個未満の残基）ポリペプチド；血清、アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性重合体；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；単糖類、二糖類、およびブドウ糖、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；および/またはTWEEN（登録商標）、ポリエチレングリコール（PEG）およびPLURONICS（登録商

40

50

標)などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

【0054】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な担体および/または希釈剤」は、いずれかのおよび全ての溶剤、分散媒体、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。医薬活性物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当該技術分野において既知である。いずれかの従来媒体または薬剤が活性成分と不適合である場合を除いて、治療組成物中でのこれらの使用が意図される。補足的活性成分もまた、組成物に組み入れることができる。

【0055】

投与のしやすさおよび投与量の均一性のために、投与単位剤形で非経口組成物を製剤化することは特に有利である。本明細書で使用する場合、投与単位剤形は、治療すべき対象にとって単位投与量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位が、必要な医薬担体に組み込まれた所望の治療効果を生み出すように計算された、所定の量の活性物質を含有する。本発明の投与単位剤形のための仕様は、(a)活性物質の特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)身体健康が害されている病的状態がある生体における疾患の治療用の活性物質などの調剤技術分野での固有の制限、によって規定され、またそれに直接依存する。

10

【0056】

主要な活性成分は、投与単位剤形での適切な薬学的に許容可能な担体と共に、有効な量で、便利で効果的な投与のために調剤される。単位剤形は、例えば、 $0.5 \mu\text{g} \sim$ 約 2000mg の範囲の量の主要な活性成分を含む。割合で表すと、活性化化合物は通常、担体中に約 $0.5 \mu\text{g} / \text{ml} \sim$ で存在する。補足的有効成分を含む組成の場合、投与量は、成分の投与の常用量および方法を参照することによって決定される。

20

【0057】

本明細書で使用される場合、「ベクター」「ポリヌクレオチドベクター」「構築物」および「ポリヌクレオチド構築物」は、同じ意味で使用される。本発明のポリヌクレオチドベクターは、いくつかの形態のいずれかであってよく、これらは、限定されないが、RNA、DNA、レトロウイルスコート中にカプセル化されたRNA、アデノウイルスコートでカプセル化されたDNA、別のウイルスまたはウイルス様形態(単純疱疹など、およびポリアミドなどのアデノ構造)で包まれたDNAを含む。

30

【0058】

合、「宿主細胞」は、本発明のベクターのレシピエントであり得るまたはレシピエントであった、個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、子孫は、天然によるか、偶発的か、計画的変異および/または変化により、オリジナルの親細胞に対し必ずしも、完全に同一である(形態学的に、または全DNA相補体において)必要はない。

【0059】

本明細書で使用される場合、「対象」は、脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。

【0060】

本明細書で使用される場合、治療目的のための「哺乳動物」は、哺乳動物に分類される任意の動物を指し、ヒト、家畜、および動物園動物、スポーツ動物またはペット動物、犬、猫、牛、馬、羊、ブタなどを含む。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

40

【0061】

本明細書で使用される場合、「治療」は、有益なまたは所望の臨床の結果を得るための手法である。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床の結果は、限定されないが、検出可能または検出不能に関わらず、症状の緩和、疾患の程度の減少、疾患の安定した(すなわち、悪化しない)状態、疾患進行の遅延または緩徐化、疾患状態の改善、または緩和、および寛解(部分的でも、または全体的でも)を含む。「治療」はまた、治療を受けない場合に予測される生存と比較して生存を延長することを意味し得る。「治療」は、

50

治療処置および予防または防止処置の両方を指す。治療を必要とするヒトは、障害を既に罹患しているヒト、ならびに障害が予防されるべきヒトを含む。疾患を「緩和する」ことは、疾病状態の程度および/または望ましくない臨床症状が、減少すること、および/または、治療のない状況と比較して、進行の経時変化が遅くなるか延長されることを意味する。

【0062】

本明細書で使用される場合、「A1」ペプチド、「A2」ペプチド、「B1」ペプチド、「B2」ペプチドおよび「B3」ペプチドは、ヒトNME7_{AB}に結合するが、ヒトNME1には結合しない（または著しく弱くしか結合しない）抗体を生成または選択するために使用されるNME7から誘導されたペプチドを指す。これらの抗体を生成するために使用されるペプチドは、NME7_{AB}およびNME7-X1の両方に共通で、下記のように定められる。

10

A1は、NME7Aペプチド1（Aドメイン）である：MLSRKEALDFHVDHQ S（配列番号141）

A2は、NME7Aペプチド2（Aドメイン）である：SGVARTDASES（配列番号142）

B1は、NME7Bペプチド1（Bドメイン）である：DAGFEISAMQMFMNMDRVNVE（配列番号143）

B2は、NME7Bペプチド2（Bドメイン）である：EVYKGVVTEYHDMVTE（配列番号144）

20

B3は、NME7Bペプチド3（Bドメイン）である：AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF（配列番号145）

さらに、明確にするために、NME7A（大文字「A」を有する）は、NME7のサブユニットA部分を指す。NME7a（小文字「a」を有する）は、本願で別記される完全長NME7を指す。および、NME7B（大文字「B」を有する）は、NME7のサブユニットB部分を指す。NME7b（小文字「b」を有する）は、DM10領域が部分的に欠けている、NME7種を指し、これは本願で別記される。

【0063】

本明細書で使用される場合、用語「抗体様」は、それが抗体の部分を含んでいるが、天然で自然に生じる抗体ではない抗体の部分を含むように操作され得る分子を意味する。例として、限定されないが、CAR（キメラ抗原受容体）T細胞技術およびYlanthia（登録商標）技術を含む。CAR技術は、身体の免疫系が特定の標的タンパク質、または細胞を攻撃するように向けられるように、T細胞の一部に融合された抗体エピトープを使用する。Ylanthia（登録商標）技術は、標的タンパク質由来のペプチドエピトープに結合するようにスクリーニングされる、合成ヒトfabのコレクションである「抗体様」ライブラリーからなる。選択されたFab領域は次に、それらが抗体に似るように、スキャホールドまたはフレームワーク中に操作され得る。

30

【0064】

本明細書で使用される場合、「NMEファミリータンパク質を抑制するための薬剤の有効量」は、NMEファミリータンパク質とその同族受容体の間の活性化相互作用を妨げる際の薬剤の有効量を指す。

40

【0065】

本明細書で使用される場合、「NME由来フラグメント」は、NMEのフラグメントまたはNMEのフラグメントであるペプチド配列に高度に相同であるペプチド配列を指す。

【0066】

本明細書で使用される場合、「MUC1*」細胞外ドメインは主として、PSMGFR配列（GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA（配列番号6））により定義される。MUC1切断の正確な部位はそれを切り取る酵素に依存し、その切断酵素が細胞型、組織タイプまたは細胞の進化での時間に依存して変化するので、MUC1*細胞外ドメインの正確な配列は、N末端で変わり得

50

る。

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用される場合、用語「 P S M G F R 」は、以下のように定められる、 M U C 1 成長因子受容体の一次配列の頭字語である； G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A (配列番号 6)。この点で、「 N - 1 0 P S M G F R 」、もしくは単に「 N - 1 0 」、 「 N - 1 5 P S M G F R 」、もしくは単に「 N - 1 5 」または「 N - 2 0 P S M G F R 」、もしくは単に「 N - 2 0 」などの「 N - 数値」は、 P S M G F R の N 末端で欠失されたアミノ酸残基の数を指す。同様に、「 C - 1 0 P S M G F R 」、もしくは単に「 C - 1 0 」、 「 C - 1 5 P S M G F R 」、もしくは単に「 C - 2 0 P S M G F R 」、もしくは単に「 C - 2 0 」などの「 C - 数値」は、 P S M G F R の C 末端で欠失されたアミノ酸残基の数を指す。欠失および付加の混合物も可能である。例えば、 N + 2 0 / C - 2 7 は、 P S M G F R の N 末端で 2 0 個のアミノ酸が付加され、 C 末端から 2 7 個のアミノ酸が欠失した、野性型 M U C 1 * のペプチドフラグメントを指す。

10

【 0 0 6 8 】

本明細書で使用される場合、「 M U C 1 * の細胞外ドメイン」は、タンデムリピートドメインが欠けている M U C 1 タンパク質の細胞外の部分を指す。ほとんどの場合、 M U C 1 * は、切断産物であり、その M U C 1 * 部分は、タンデムリピート、膜貫通ドメインおよび細胞質側末端が欠けている短い細胞外ドメインからなる。 M U C 1 の切断の正確な位置は知られておらず、それは恐らくそれが 2 種以上の酵素によって切断できるように見えるからである。 M U C 1 * の細胞外ドメインは、ほとんどの P S M G F R 配列を含むが、追加の 1 0 ~ 2 0 個の N 末端アミノ酸を有してもよい。

20

【 0 0 6 9 】

本明細書で使用される場合、「高い相同性」は、任意の 2 個のポリペプチド間の指定されたオーバーラップ領域において、少なくとも 3 0 %、 3 5 %、 4 0 %、 4 5 %、 5 0 %、 5 5 %、 6 0 %、 6 5 %、 7 0 %、 7 5 %、 8 0 %、 8 5 %、 9 0 %、 9 5 %、または 9 7 % の同一性であると考えられる。

【 0 0 7 0 】

本明細書で使用される場合、 1 - 1 0 と番号付けられた「 N M E ファミリータンパク質」、または「 N M E ファミリーメンバータンパク質」は、それら全てが、少なくとも 1 つの N D P K (ヌクレオチド二リン酸ナーゼ)ドメインを有するので、一緒にグルーブ化されたタンパク質である。いくつかの事例では、 N D P K ドメインは、 A D P への A T P の転換を触媒できるという観点では機能的ではない。 N M E タンパク質は以前には、 H 1 および H 2 として番号付けされた N M 2 3 タンパク質として知られていた。最近、 1 0 個もの N M E ファミリーが特定された。本明細書では、 N M 2 3 と N M E という用語は、相互交換可能である。本明細書では、用語 N M E 1、 N M E 2、 N M E 5、 N M E 6、 N M E 7、 N M E 8 および N M E 9 は、天然タンパク質ならびに N M E バリエーションの意味で使用される。いくつかの事例では、これらのバリエーションは、より可溶性であり、大腸菌においてよりよく発現し、または天然配列タンパク質より可溶性である。例えば、本明細書で使用される N M E 7 は、バリエーションが、大腸菌中での可溶性、適切に折り畳まれたタンパク質の高収率発現を可能にするので、優れた商用適用可能性を有する N M E 7 A B などの、天然タンパク質、またはバリエーションを意味する場合がある。 N M E 7 A B は、主として N M E 7 A および B ドメインから成るが、天然タンパク質の N 末端にある D M 1 0 ドメイン (配列番号 3 9) のほとんどを欠く。本明細書において言及される場合、「 N M E 1 」は、「 N M 2 3 - H 1 」と交換可能である。本発明は、 N M E タンパク質の正確な配列により限定されないことも意図される。 N M 2 3 - S 1 2 0 G と呼ばれる変異体 N M E 1 - S 1 2 0 G は、本願の全体にわたって同じ意味で用いられる。 S 1 2 0 G 変異体および P 9 6 S 変異体は、二量体形成に対するそれらの指向性のために好ましいが、本明細書においては、 N M 2 3 二量体、 N M E 1 二量体または二量体型 N M E 1 または二量体型 N M 2 3 と呼ばれる。

30

40

50

【0071】

NME7は、本明細書において言及される場合、約42kDaの分子量を有する天然NME7を意味することが意図される。

【0072】

「NME7のファミリー」は、完全長NME7、ならびに天然起源または人工的に作られた分子量約30kDa、33kDaを有する切断型、または約25kDaの分子量を有する切断型；NME7b、NME7-X1、NME7_{AB}、または組換えNME7タンパク質などの配列番号82もしくは147で表されるNME7のNME7アミノ酸1~91であるDM10リーダー配列（配列番号162）の欠失または部分欠失バリエーション；またはその配列が効率的な発現を可能にする様に改変され得るバリエーションまたは収量、溶解度、または、NME7をより効果的にするまたはより商業的に有望にする他の特性を高めるバリエーションも指す。「NME7のファミリー」はまた、「NME7_{AB}様」タンパク質を含んでもよく、これは、癌細胞で発現される30~33kDaの範囲のタンパク質である。

10

【0073】

本明細書で使用される場合、「ナイーブな状態で幹細胞を維持する、またはプライミングされた幹細胞をナイーブな状態へ戻す、薬剤」は、幹細胞を、胚の内部細胞集団の細胞に似ている、ナイーブな状態に、単独でまたは組み合わせて維持する、タンパク質、小分子、または核酸を指す。例としては、限定されないが、ヒトNME1二量体、細菌性、真菌性、酵母性、ウィルス性または寄生性NMEタンパク質であって、ヒトNMEタンパク質、特にNME1、NME7、NME7-X1、NME7_{AB}、NME6に対し高い配列同一性を有するもの、2i (Silva J et al, 2008; Hanna et al, 2010)、5i (Theunissen TW et al, 2014); MB D3、CHD4 (Rais Y1 et al, 2013)、BRD4またはJMJD6 (Liu W et al, 2013)の発現を抑えるsiRNAなどの核酸、が挙げられる。

20

【0074】

本明細書で用いられる用語「NME7_{AB}」、「NME7_{AB}」および「MNE-AB」は、同じ意味で用いられる。

【0075】

本明細書で使用される場合、「多分化能を促進する薬剤」または、「幹様または癌様の状態へ体細胞を戻す薬剤」は、タンパク質、小分子、または核酸を指し、それらは単独でまたは組み合わせて、遺伝子シグネチャーが幹細胞または癌細胞により厳密に似ているものになるように、特定の遺伝子の発現を誘導または抑制する。例としては、限定されないが、NME1二量体、NME7、NME7-X1、NME7_{AB}、2i、5i; MB D3またはCHD4またはBRD4またはJMJD6の発現を抑えるsiRNAなどの核酸；ヒトNME1、NME2、NME5、NME6、NME7、NME8またはNME9に高い配列同一性を有し、好ましくはNDPKドメインを含む領域と高い配列同一性がある微生物NMEタンパク質が挙げられる。

30

【0076】

本明細書で使用される場合、「小分子」と呼ばれる薬剤に関して、それは、50Daと2000Daの間、より好ましくは150Daと1000Daの間、さらにより好ましくは200Daと750Daの間の分子量を有する合成化学分子または化学をベースにした分子であり得る。

40

【0077】

本明細書で使用される場合、「天然物」と呼ばれている薬剤に関して、当該分子が天然で存在する限り、それは、化学的分子、または生物学的分子であり得る。

【0078】

本明細書で使用される場合、FGF、FGF-2またはbFGFは、繊維芽細胞成長因子を指す (Xu RH et al, 2005; Xu C et al, 2005)。

50

【 0 0 7 9 】

本明細書で使用される場合、「R h o 関連キナーゼ阻害剤」は、小分子、ペプチドまたはタンパク質であり得る (R a t h N , e t a l , 2 0 1 2) 。 R h o キナーゼ阻害剤は、ここおよび他の箇所で、R O C i が R O C K i 、または R i と短縮表現される。特定の R h o キナーゼ阻害剤の使用は、例示であると意図され、任意の他の R h o キナーゼ阻害剤で置換できる。

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用される場合、用語、「癌幹細胞」、または「腫瘍開始細胞」は、より転移性状態またはより侵襲性の強い癌と関連がある遺伝子のレベルを発現する癌細胞を指す。「癌幹細胞」、または「腫瘍開始細胞」はまた、動物へ移植された場合に、極めて少ない細胞で、腫瘍を生じさせ得る癌細胞を指す。癌幹細胞および腫瘍開始細胞は多くの場合、化学療法薬に抵抗性である。

10

【 0 0 8 1 】

本明細書で使用される場合、用語「幹/癌」、「癌様」、「幹様」は、細胞が、幹細胞または癌細胞の特性を得ているまたは幹細胞、癌細胞、または癌幹細胞の遺伝子発現特性の重要な要素を共有する状態であることを指す。幹様細胞は、多分化能遺伝子の増加する発現などの、より成熟度の低い状態への誘導を受けている体細胞であり得る。幹様細胞はまた、ある程度の脱分化を受けたか、それらが終末分化に変化できる準安定状態にある細胞を指す。癌様細胞は、足場非依存的に成長できるかまたは動物において腫瘍を生じさせることができるような、まだ完全には特徴づけられていない癌細胞であるが癌細胞の形態と特性を示す癌細胞であり得る。

20

【 0 0 8 2 】

本明細書で使用される場合、異なる長さの「スペーサー」、または「リンカー」は、ペプチド中どこにでも組み込むことができる。スペーサー結合は通常、アミド結合を介するが、他の官能基も可能である。

【 0 0 8 3 】

N M E 、 N M E 7 および N M E 7 のタンパク質ファミリー

本発明者らは、N M E 7 および N M E 7 - X 1 が、初期ヒト幹細胞、およびさらにほとんどの癌細胞で高度に発現されることを見出した (図 1 7 、 図 1 8 、 図 1 9 A ~ 図 1 9 F 、 図 2 2 、 図 2 3 、 図 3 9 、 図 4 0 、 図 4 1 、 図 4 7 、 図 4 8) 。 図 1 7 は、一連のヒト幹細胞および癌細胞における N M E 7 - X 1 の発現の R T - P C R 測定のグラフを示す。図 1 8 は、一連のヒト幹細胞および癌細胞における N M E 7 、 N M E 7 a 、 N M E 7 b および N M E 7 - X 1 の発現の R T - P C R 測定のグラフを示す。N M E 7 a は完全長 N M E 7 であり、N M E 7 b は D M 1 0 ドメインのほんの一部を欠失し、N M E 7 - X 1 は、D M 1 0 ドメインの全ておよび第 1 の N D P K A ドメインの N 末端のほんの一部を欠失している。N M E 7 と標識されたバーは、N M E 7 a と N M E 7 b の両方を検出するプライマーが使用されたことを意味する。図 1 9 A ~ 1 9 F は、N M E 7 由来短鎖ペプチドによる免疫化により生成された抗体を使用して、様々な癌細胞株における N M E 7 種の発現が検出される、ウエスタンブロットの写真を示す。図 1 9 A は、N M E 7 由来ペプチド A 1 に結合する本発明の抗体 # 5 2 を使って検出したウエスタンブロットを示す。図 1 9 B は、N M E 7 由来ペプチド B 1 に結合する本発明の抗体 # 5 6 を使って検出したウエスタンブロットを示す。図 1 9 C は、N M E 7 由来ペプチド B 3 に結合する本発明の抗体 # 6 1 を使って検出したウエスタンブロットを示す。図 2 2 A ~ 2 2 E は、共免疫沈降実験のウエスタンブロットの写真を示す。T 4 7 D 乳癌細胞抽出物を、M U C 1 の細胞質側末端に対する抗体、A b - 5、または対照抗体、I g G と共にインキュベートし、共免疫沈降させた。ゲルを、2 種の異なる市販の抗 N M E 7 抗体 B 9 (図 2 2 A) および C F 7 (図 2 2 B) でプロットした。両方のゲルは、約 3 3 k D a と約 3 0 k D a で特有の N M E 7 バンドを示す。ゲルを、ストリップし、M U C 1 * の細胞外ドメインに対する抗体、抗 P S M G F R ((図 2 2 C) および (図 2 2 D)) で再検出した。これは N M E 7 種および M U C 1 * が、相互作用することを示す。組換え N M E 7 A B および組換え N M E 7

30

40

50

- X 1 を、ともに混合し、ゲル上で展開させ、その後、抗 N M E 7 抗体で検出した。乳癌細胞において自然発生し、かつ M U C 1 * と相互作用する 2 種の特有の N M E 7 種が、N M E 7 A B 様種および N M E 7 - X 1 (図 2 2 E) であることを示す。図 2 3 A ~ 2 3 C は、共免疫沈降実験のウエスタンブロットの写真を示す。ヒト誘導多能性幹細胞、i P S 7 細胞、または胚性幹細胞、H E S 3 細胞抽出物を、M U C 1 の細胞質側末端に対する抗体、A b - 5、または対照抗体、I g G とインキュベートし、共免疫沈降させた。ゲルを、市販の抗 N M E 7 抗体 B 9 (図 2 3 A) でブロットした。両方の細胞型は、約 3 3 k D a と約 3 0 k D a で特有の N M E 7 バンドを示す。ゲルを、ストリップし、M U C 1 * の細胞外ドメインに対する抗体、抗 P S M G F R (図 2 3 B) で再検出した。これは、N M E 7 種および M U C 1 * が相互作用することを示す。組換え N M E 7 - A B および組換え N M E 7 - X 1 を共に混合し、ゲル上で展開させ、その後、抗 N M E 7 抗体で検出した。乳癌細胞において自然発生し、かつ M U C 1 * と相互作用する 2 種の特有の N M E 7 種が、N M E 7 - A B 様種および N M E 7 - X 1 であることを示す (図 2 3 C) 。図 3 9 A ~ 3 9 C は、B 3 ペプチドに結合する抗 N M E 7 抗体で染色したヒト肺組織検体を示す。この図は、正常組織での N M E 7 発現の欠如、腫瘍悪性度に伴う N M E 7 の増大する発現および転移の増加を示す。図 4 0 A ~ 4 0 C は、B 3 ペプチドに結合する抗 N M E 7 抗体で染色したヒト小腸組織検体を示す。この図は、正常組織での N M E 7 発現の欠如、腫瘍悪性度に伴う N M E 7 の増大する発現および転移の増加を示す。図 4 1 A ~ 4 1 D は、B 3 ペプチドに結合する抗 N M E 7 抗体で染色したヒト結腸組織検体を示す。この図は、正常組織での N M E 7 発現の欠如、腫瘍悪性度に伴う N M E 7 の増大する発現および転移の増加を示す。図 4 7 および図 4 8 は、N M E 7 が、様々な癌細胞株により分泌され、それらの癌細胞株の細胞外受容体に結合することを示す免疫蛍光写真を示す。

【 0 0 8 4 】

さらに、本発明者らは、N M 2 3 - H 1 のように、N M E 7 が、幹細胞と癌細胞の両方で、M U C 1 * 成長因子受容体に結合し、二量化させることを実証した。図 5 は、N M E 1 および N M E 7 A および B ドメインの配列アラインメントを示す。

【 0 0 8 5 】

本発明者は、N M E 7 が、非常に初期の胚性幹細胞で発現される N M E 1 (N M 2 3 - H 1) の原始的な型であることを最近見出した。N M E 7 は、成人の組織で、全く発現されないか、または非常に低レベルで発現される。しかしながら、本発明者らは、N M E 7 が、癌細胞と組織において高レベルで、および転移性癌細胞および組織でさらに高レベルで発現されることを見出した。N M E 7 の切断された型は、それが細胞外の受容体に結合し、活性化することを可能にする、分泌型であり得る。本発明者らは、完全長 N M E 7、M W 4 2 k D a、ならびに、約 3 3 k D a および 3 0 k D a の N M E 7 種を検出した。3 3 k D a と 3 0 k D a の種は、癌細胞から分泌される。ウエスタンブロットは、細胞溶解物中で完全長 N M E 7 を検出するが、それらの条件培地中で、より小さな 3 0 ~ 3 3 k D a の N M E 7 種を検出する。N M E 7 を認識する抗体、または D M 1 0 ドメインのみを認識する抗体のいずれかで検出されたウエスタンブロットは、条件培地へ分泌されるより低分子量 N M E 7 種が D M 1 0 ドメインを欠いていることを示す。これらのデータは、天然起源の N M E 7 種が、それらとほぼ同じ分子量を有するとして、我らが生成した組換え N M E 7 A B に匹敵するという考えと一致し、両方は分泌され、両方とも細胞内にタンパク質を維持し得る D M 1 0 ドメインの 9 1 個のアミノ酸を欠いている。

【 0 0 8 6 】

本発明者らは、新しい N M E 7 アイソフォーム、N M E 7 - X 1、を発見し、さらに、それが幹細胞および癌細胞で過剰発現され、特に前立腺癌で過剰発現されることを見出した (図 1 7、図 1 8、図 1 9、および図 2 2) 。N M E 7 - X 1、分子量約 3 0 k D a、は、N M E 7 アミノ酸 1 2 5 ~ 3 7 6 を含み、一方、本発明者らが生成した組換え N M E 7 A B、分子量約 3 3 k D a、はアミノ酸 9 2 ~ 3 7 6 にわたり、したがって、3 3 個多い N 末端アミノ酸を含む。N M E 7 b は、アミノ酸 3 7 ~ 3 7 6 にわたり、かつ D M 1 0 ドメインの 3 7 個のアミノ酸のみが欠け、また前立腺癌で過剰発現される (図 1 8) 。本

発明者らは、ヒト組換え NME7 - X1 を生成し、これが切断産物または選択的アイソフォームである天然起源の「NME7_{AB} 様」タンパク質と思われる天然起源の約 33 kDa の NME7 種より少し小さい分子量の癌細胞中の分泌 30 kDa の NME7 種であることを示す。

【0087】

本発明者らは、一連の癌細胞株を試験し、それらが NME7_{AB} 様タンパク質などの NME7_{AB}、または NME7 - X1 などの選択的アイソフォームに類似の、切断され得る低分子量種および NME7 をハイレベルで発現することを見出した。

【0088】

NM23 - H1 (別名 NME1) は二量体でなければならないのに反して、NME7 は、MUC1* 細胞外ドメインに対し 2 つの結合領域を有するモノマーである。本発明者らは、DM10 ドメインを欠く組換えヒト NME7 を生成し、それを NME7_{AB} と呼ぶ。サンドイッチ ELISA 結合アッセイは、組換え NME7_{AB} が、MUC1* 細胞外ドメインが PSMGFR 配列のほとんどまたは全てを含む 2 個の PSMGFR ペプチドに同時に結合することを示す (図 1)。ナノ粒子結合アッセイでは、NME7 は、MUC1* 細胞外ドメインの PSMGFR 部分に結合でき、それを二量化させることができるとも示された。

10

【0089】

NME7 を無力化するか、その結合パートナーとの相互作用を遮断するか、その発現を抑制する薬剤は、有力な抗癌治療薬である。このような薬剤は、抗体、小分子、または核酸であり得る。それらは、直接 NME7 に対し、NME7 発現を制御する分子に対し、または癌を促進する型へ NME7 を切断する酵素に対し作用し得る。

20

【0090】

本発明者らは、NM23 - H1 二量体のように、組換え NME7_{AB} モノマーが、他の成長因子、サイトカイン、または血清の非存在下で、多能性のヒト幹細胞増殖を完全に支援できることを見出した。NME7 と、本質的に PSMGFR 配列を含む MUC1* 細胞外ドメインの間の相互作用を競合的に抑制することは、幹細胞の分化を誘導し、幹細胞増殖を促進および分化を阻害するのは NME7 と MUC1* の相互作用であることを示す。

【0091】

次に、本発明者らは、さらに、NME7_{AB} 単独が、ヒト癌細胞増殖を完全に支援できることを示した。NME7_{AB} は、通常の癌細胞増殖培地に加えられる場合、癌細胞増殖を刺激し、特に MUC1 - 陽性および MUC1* - 陽性の癌細胞の増殖を刺激した。MUC1* と NME7 の相互作用の抑制は、癌細胞増殖を抑制した。抗 MUC1* Fab による MUC1* 成長因子受容体の遮断は強力に、癌細胞増殖を抑制した。同様に、NME7 に結合する抗体は、癌細胞増殖を抑制した。抗 NME7 抗体による癌増殖抑制の一例では、ポリクローナル抗体を、アミノ酸 100 ~ 376 の範囲の NME7 の部分で動物を免疫することから生成した (図 12 および図 13)。しかしながら、本発明者らは、NME7_{AB} からの、または NME7 - X1 からのより短いペプチドで免疫にすることから生成された抗体もまた、癌増殖を抑制することを見出した。特に、それらは、MUC1 と MUC1* - 陽性癌の増殖を抑制する。本発明の抗 NME7 抗体は、原発腫瘍から移動し、転移する腫瘍スフェアを形成できる非付着性「浮遊」細胞の形成を抑制した (図 14、図 16、図 29)。本発明の抗 NME7 抗体は、現在では転移に特徴的であるとも考えられている、転移および幹細胞マーカーの上方制御を抑制した (図 15、図 30、図 31、図 32)。

30

40

【0092】

NME7 は癌転移を引き起こす

本発明者は、NME7_{AB} を含む最小培地での癌細胞の培養は、より転移性の状態に形質転換される様々な癌細胞を誘導することを見出した。この誘導された転移性の状態の証拠は、付着細胞増殖から非付着性細胞、別名「浮遊」細胞増殖への変化を含み、特に浮遊細胞で上方制御された特定の転移マーカーの上方制御を伴う。NME7_{AB} 中での

50

培養の後に上方制御されるこれらの転移マーカーとしては、限定されないが、CXCR4、CHD1：別名E-カドヘリン、MUC1、ALDH1、CD44、およびOCT4、SOX2、NANOG、KLF2/4、FOXA2、TBX3、ZEB2およびc-Mycなどの多能性幹細胞マーカーが挙げられる(図2、図3、図20、図49、図51)。NME7_{AB}中で培養された癌細胞は、試験動物へ異種移植された場合、90%を越える、極めて高い生着率を有する。さらに、非常に少ない数の移植癌細胞が、試験動物で腫瘍を形成し、これは、NME7_{AB}が転移性癌細胞として知られている、癌幹細胞にそれらを形質転換させたという証拠である。NME7_{AB}中で培養し、エストロゲン放出ペレット含有NOD/SCID/GAMMAマウス中へ注入した癌細胞は動物中で、通常の培地中で増殖された親細胞に比べて、少数の細胞から転移した(図33~図38)。癌細胞は、NME7切断産物またはNME7_{AB}と本質的に等価な選択的アイソフォームを作製するので、本明細書で記述された方法は、NME7_{AB}の使用に限定されず、他のNME7種も同様に機能し得る。例えば、本発明者らは、別のNME7アイソフォーム、NME7-X1、が癌細胞によって発現されることを見出した。それは、X1アイソフォームがN末端から33個のアミノ酸を欠失しているということを除いて、本発明者らの組換えNME7_{AB}と同一である。NME7-X1は、NME7_{AB}のように機能することが予測される。「NME7_{AB}様」タンパク質も、約33Da種であるとして癌細胞において検出された。

10

【0093】

本発明者らは、本発明者らの前の仕事で、NME7_{AB}単独が、ヒト幹細胞を、以前のナイーブな状態へ戻すことができることを示した。本発明者らは、よりナイーブな状態に幹細胞を戻す他の試薬の存在下での癌細胞の培養が、癌細胞をより転移性状態に形質転換させることを見出した。本発明者らは、NME7_{AB}(図2)、またはNME1二量体(図3)、または「2i」阻害剤(図4)中での癌細胞の培養が、それぞれ、通常のカンサ細胞を、癌幹細胞「CSC」または腫瘍開始細胞「TIC」と呼ばれる、転移性癌細胞に形質転換できることを実証した。しかし、NME7_{AB}は、癌細胞を、2iより良好であったNM23-H1としても知られるNME1より高い転移性状態に入るように誘導した。

20

【0094】

2iは、研究者が、ヒト幹細胞をよりナイーブな状態に戻すことを見つけた、2種の生化学的阻害剤に与えられた名前である。2iは、MEKおよびGSK3ベータ阻害剤、PD0325901およびCHIR99021であり、これらは、各々約1mMおよび3mMの最終濃度で培地に加えられる。NME7_{AB}およびNME7-X1は、より低濃度およびより高濃度の、約1nM~16nMの範囲でも十分に機能するが、癌細胞を転移性の細胞へ形質転換させるために、最少培地の別々のパッチに添加される場合には、約4nMの最終濃度で用いられる。ヒトまたは細菌性NME1二量体は、4nM~32nMの最終濃度で使用され、これらの実験では16nMで典型的に使用され、ヒトNME1はS120G変異を有する。野生型を使用する場合、より低い濃度が必要である。これらの正確な濃度が重要であるとは意図されない。特定の変異はより高濃度で二量体として存在することを許容するが、NME1タンパク質が二量体であることが重要であり、これが起こる濃度の範囲は、低いナノモル範囲にある。同様に、NME7タンパク質の濃度は、変化し得る。NME7_{AB}およびNME7-X1は、モノマーであり、また、癌細胞を転移性の細胞へ形質転換するために使用される濃度は、タンパク質がモノマーとして残ることを可能にする必要がある。

30

40

【0095】

NME7、NME7_{AB}、NME7-X1、および2i阻害剤、MEKiとGSK3iに加えて、他の試薬および阻害剤が、幹細胞をよりナイーブな状態に戻らせることが、他の研究者により示された。これらの阻害剤「i」は、JNKi、p38i、PKCi、ROCKi、BMPi、BRAFi、SRCi、ならびに、成長因子アクチビンおよびLIFを含む(Gafni et al 2013, Chan et al 2013, Valamehr et al 2014, Ware et al 2014, Theuni

50

ssen et al 2014)を含む。これらの試薬も、癌細胞をより転移性の状態に進行させるために使用できる。幹細胞をよりナイーブな状態に戻らせる阻害剤または成長因子を単独でまたは組み合わせて使用して、より転移性の状態に形質転換するように誘導された細胞は次いで、癌転移を治療または予防するための薬物を特定または試験するための発見ツールとして使用できる。

【0096】

様々な分子マーカーが、転移性癌細胞の指標として提案されてきた。異なる癌タイプは、上方制御される異なる分子を有し得る。例えば、受容体、CXCR4は、転移性の乳癌で上方制御され、一方、CHD1としても知られるE-カドヘリンは、転移性の前立腺癌でより上方制御される。これらの特定の転移マーカーに加えて、OCT4、SOX2、NANO GおよびKLF4などの多分化能の典型的なマーカーは、癌が転移性になると、上方制御される。出発癌細胞および後の転移性癌細胞は、これらの遺伝子の発現レベルを測定するPCRにより、アッセイされる。本発明者らは、転移マーカーおよび多能性幹細胞マーカーの増加した発現によって証拠づけられる、より転移性の状態にそれらを形質転換させるNME7_{AB}などの薬剤中で培養されたこれらの癌細胞が、転移性癌細胞として機能することを実証した。

【0097】

癌細胞集団が転移性かどうかの機能試験は、免疫不全マウスに、細胞の非常に少ない数、例えば200個、を注入し、それらが腫瘍に進展するかどうかを確かめることである。典型的には、500~600万個の癌細胞が、免疫不全マウスで腫瘍を形成するのに必要とされる。本発明者らは、わずか50個ほどのNME誘導転移性癌細胞が、マウスにおいて腫瘍を形成したことを示した。さらに、ヒトNME7_{AB}、NME1またはNME7-X1を試験期間中に注入されたマウスは、遠隔転移を発生した。

【0098】

一特定実験では、T47Dヒト乳癌細胞を、14日間標準RPMI培地中で培養し、48時間ごとに培地交換し、約75%集密度状態でトリプシン処理に供した。細胞をその後、6ウェルプレートに播種し、4nM NME7_{AB}を補充した最小幹細胞培地(実施例1を参照)中で培養した。培地を、48時間ごとに交換した。約4日目までに、いくつかの細胞は、表面から離脱し、浮遊する。これらは転移マーカーのRT-PCR測定により明らかなるように最も高い転移能を有する細胞であるので、培地を、「浮遊物」を保持するように注意深く交換する。7日目または8日目に、浮遊物を回収し計数した。試料を、RT-PCR測定のために保持した。測定された重要なマーカーは、CXCR4であり、これはNME7_{AB}中で短時間培養された後で40~200倍上方制御される。

【0099】

新しく回収された浮遊性の転移性細胞を、90日間の徐放性エストロゲンペレットを移植したメスnu/nu無胸腺マウスの脇腹に異種間移植した。浮遊性細胞を、各々10,000、1,000、100、または50個の細胞でそれぞれ異種移植した。6匹の各グループ中のマウスの半分はまた、元の移植部位の近くに32nM NME7_{AB}を毎日注入された。NME7_{AB}のないRPMI培地中で培養された親T47D細胞も、対照として600万個、10,000個または100個でマウスに移植した。NME7誘導浮遊性細胞を移植されたマウスは、わずか50個の細胞が移植された場合でさえ、腫瘍を生じた。浮遊性細胞が移植され、かつNME7_{AB}の毎日の注射を受けたマウスもまた、様々な器官で遠隔の腫瘍または遠隔の転移を生じた。NME7_{AB}培養癌細胞の移植後にヒトNME7_{AB}を注入された12匹のマウスのうちの11匹、すなわち92%が、注入部位に腫瘍を生じた。移植後にヒトNME7_{AB}を注入されなかった12匹のマウスのうちの7匹のみ、すなわち58%のみが、腫瘍を生じた。腫瘍を示し、かつヒトNME7_{AB}を注入された11匹のマウスのうちの9匹(82%)が、注入部位から遠隔部で複数腫瘍を生じた。NME7_{AB}を注入されなかったいずれのマウスも、複数の目視可能な腫瘍を生じなかった。

【0100】

10

20

30

40

50

殺の後、RT-PCRおよびウエスタンブロットは、NME7_{AB}を注入されたマウスの遠隔隆起は、確かにヒト乳癌腫瘍だったことを示した。それらの器官の同様の分析は、遠隔隆起に加えて、マウスは、移植されたヒト乳癌細胞のヒト乳癌特性を伴って、肝臓および肺にランダムに転移したことを示した。予想通りに、600万個の細胞が注入されたマウスだけが腫瘍を増殖させた。

【0101】

本発明者らは、ヒト組換えNME7_{AB}のサイズおよび配列が、NME7-X1、および30~33kDaのNME7切断産物と同等であることを示した。本発明者らは、NME7_{AB}が、癌性増殖を促進し、癌細胞を、腫瘍開始細胞(TIC)とも呼ばれる高い転移性の癌幹細胞(CSC)状態に加速させることを示した。したがって、本発明者らは、NME7-X1、およびDM10ドメインを欠失するNME7切断産物がまた、癌性増殖を促進し、癌細胞を、腫瘍開始細胞(TIC)とも呼ばれる、高度に転移性の癌幹細胞(CSC)状態に加速させる、と結論づけた。一例では、NME7_{AB}を、無血清培地中で、および何らの他の成長因子またはサイトカインも存在しない条件下で、癌細胞に添加した。7~10日以内に、癌細胞は、転移性癌細胞の指標であるCXCR4などの分子マーカーの発現の100倍を越える増加により明らかのように、高度に転移性のCSC/TICに戻った。一例では、T47D乳癌細胞を、標準RPMI培地中、または16nMの最終濃度で組換えNME7_{AB}を添加した最小幹細胞培地(実施例1)中で培養した。10日後に、細胞を集め、10~200倍まで高められたCSCの分子マーカーの発現に関しRT-PCRにより分析した(図2)。これは、本発明者らが、どのように1個の癌細胞タイプをより転移性の状態に形質転換したかに関する具体的で詳細な例である。この方法で形質転換される一連の癌細胞があり、幹細胞をよりナイーブな状態へ戻し、さらに癌細胞をより転移性の状態に進展させる一連の薬剤があり、さらに添加された薬剤が癌細胞を形質転換する一連の濃度があるので、本発明は、これらの詳細によって限定されることを意図するものではない。癌細胞の他のタイプは、転移マーカーの劇的な発現上昇および移植された癌細胞の非常に少ない数から腫瘍を形成する能力のために、NME7_{AB}中でのより長い培養期間を要した。例えば、NME7_{AB}、2i、ヒトNME1、またはヒトNME1もしくはヒトNME7に対して高い相同性を有する細菌性NME1中で培養された前立腺癌細胞は、2~3継代の後に転移マーカーの劇的な増加を示した。

【0102】

転移マーカーCXCR4は、転移性の乳癌細胞の中で特に上昇され、一方、CHD1は転移性の前立腺癌で特に上昇された。ここで、本発明者らは、OCT4、SOX2、NANOG、KLF2/4およびTBX3などの多能性幹細胞マーカーも、癌細胞がより転移性の細胞へ形質転換する場合、上方制御されることを示す。

【0103】

DU145前立腺癌細胞を、同様に培養し、かつNME7_{AB}中で培養されたこれらの細胞もまた、CSCマーカー発現の劇的な増加を示した(図3)。前立腺癌細胞では、CHD1(別名E-カドヘリン)およびCXCR4は、NME7_{AB}中で増殖しない対照癌細胞と比較して、他の多能性幹細胞マーカーと共に、上方制御された。図20A~20Cは、卵巣癌細胞株SK-OV3、OV-90および乳癌細胞株MDA-MBのすべてが、付着性から非付着性の浮遊細胞に移行し、NME7_{AB}との培養の72時間または144時間の後に転移マーカーの発現を増加させたことを示す。卵巣癌細胞、前立腺癌細胞、膀胱癌細胞および黒色腫細胞もまたNME7_{AB}中で培養され、わずか3日の培養後に、より転移性の状態に形質転換された。図21は、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌細胞および黒色腫細胞がMUC1およびMUC1*を発現することを示す。

【0104】

ここで、本発明者らは、NME7_{AB}が、より転移性の状態へ、広範囲の癌細胞を形質転換することを示した。本発明者らはまた、癌細胞が、組換えNME7_{AB} 33kDaとほぼ同じ分子量であり(図17、図18、図19、および図22)かつNME7_{AB}のようにDM10ドメインを欠く天然起源種、およびN末端から33アミノ酸を欠くことを

10

20

30

40

50

除き N M E 7_{A B} と同じ配列である選択的アイソフォーム N M E 7 - X 1 3 0 k D a も発現することを示した。共免疫沈降実験を T 4 7 D 乳癌細胞で行ない、細胞抽出物を、M U C 1 の細胞質側末端、A b - 5 または対照抗体、I g G に対する抗体とインキュベートし、共免疫沈降させた。免疫沈降した種を、ゲル電気泳動法によって分離した。ゲルを、2 種の異なる市販の抗 N M E 7 抗体でプロットした。両方のゲルは、約 3 3 k D a と約 3 0 k D a で特有の N M E 7 バンドを示す (図 2 2 A および 図 2 2 B) 。ゲルを、ストリップし、M U C 1 * の細胞外ドメインに対する抗体、抗 P S M G F R (図 2 2 C および 図 2 2 D) で再検出した。これは N M E 7 種および M U C 1 * が、相互作用することを示す。本発明者らが作製した組換え N M E 7_{A B} および組換え N M E 7 - X 1 を共に混合し、ゲル上で展開させ、その後、抗 N M E 7 抗体で検出した。乳癌細胞において自然発生し、M U C 1 * と相互作用する 2 種の特有の N M E 7 種が、N M E 7_{A B} 様種および N M E 7 - X 1 であることを示す (図 2 2 E) 。同様の実験を、ヒト幹細胞で実行した。図 2 3 A ~ 2 3 C は、共免疫沈降実験のウエスタンプロットの写真を示す。ヒト誘導多能性幹細胞、i P S 7 細胞、または胚性幹細胞、H E S 3 細胞抽出物を、M U C 1 の細胞質側末端に対する抗体、A b - 5、または対照抗体、I g G と共にインキュベートし、共免疫沈降させた。ゲルを、市販の抗 N M E 7 抗体 B 9 (図 2 3 A) でプロットした。両方の細胞型は、約 3 3 k D a と約 3 0 k D a で特有の N M E 7 バンドを示す。ゲルを、ストリップし、M U C 1 * の細胞外ドメインに対する抗体、抗 P S M G F R (図 2 3 B) で再検出した。これは、N M E 7 種および M U C 1 * が相互作用することを示す。本発明者らが作製した組換え N M E 7_{A B} および組換え N M E 7 - X 1 を共に混合し、ゲル上で展開させ、その後、抗 N M E 7 抗体で検出した。乳癌細胞において自然発生し、M U C 1 * と相互作用する 2 種の特有の N M E 7 種が、N M E 7_{A B} 様種および N M E 7 - X 1 であることを示す (図 2 3 C) 。N M E 7_{A B} は組換え型タンパク質であるので、自然発生の種が、余分な 1 ~ 1 5 個の追加のアミノ酸を含むかまたは組換え N M E 7_{A B} より 1 ~ 1 5 個の追加のアミノ酸を欠くかは明らかでないが、それは同じ見掛けの分子量で展開する。「N M E 7_{A B} 様」は、これが癌細胞増殖を刺激でき、より転移性の状態への癌細胞の移行を誘導し、ヒト幹細胞の多能性の展開を全面的に支援できるという点で、組換え N M E 7_{A B} が行うように機能できる、約 3 3 k D a の見掛けの分子量で展開する N M E 7 種を意図する。

【 0 1 0 5 】

本発明者らは、N M E 7 およびより低い分子量の N M E 7 種を発現する癌細胞株および癌細胞集団が、C S C または転移性癌細胞であるいくつかの癌細胞を含むと結論した。これらの癌は、N M E 7_{A B}、N M E 7 - X 1、またはより低い分子量の N M E 7 種中で細胞を培養することにより、より転移性になるか、または転移性である細胞の集団を増加させ得る。図 1 9 は、全てが N M E 7 ならびに、より低分子量種である 3 3 k D a で N M E 7_{A B} 様および 3 0 k D a で N M E 7 - X 1 を発現する、一連の癌細胞のウエスタンプロットを示す。図 2 1 は、T 4 7 D 乳癌細胞株、P C 3 および D U 1 4 5 前立腺癌細胞株、B T - 4 7 4 乳癌細胞株、C H L - 1 と A 2 0 5 8 の黒色腫細胞株、ならびに C A P A N - 2 と P A N C - 1 の膵臓癌細胞株の全てが、M U C 1、M U C 1 * を発現することを示す。図 2 1 A では、B T 4 7 4 細胞は、M U C 1 または M U C 1 * を発現しないように見えるが、本発明者らは以前に、これらの H E R 2 陽性乳癌細胞が化学療法薬に抵抗性になるとき、つまり転移性になるとき、それらは M U C 1 * の発現を増加させることにより転移性になることを示した (F e s s l e r e t a l 2 0 0 9) (図 2 1 D) 。抗 M U C 1 * F a b による M U C 1 * 受容体の遮断は、ハーセプチン (図 2 1 E)、タキソール (図 2 1 F) ならびに他の化学療法剤に対するそれらの抵抗性を逆転させた。N M E 7 および 3 3 k D a、3 0 k D a などのより低分子量 N M E 7 種を発現するこれらの癌型および他の癌型は、N M E 7_{A B}、N M E 7 - X 1 またはより低分子量 N M E 7 種中での細胞の培養により、より転移性にされ得る、または転移性である細胞集団を増加させ得る。

【 0 1 0 6 】

逆に、N M E 7 および 3 3 k D a または 3 0 k D a などのより低い分子量の N M E 7 種を発現するこれらおよび他の癌型の転移能は、抗 N M E 7 抗体で細胞を治療することによ

り逆転させることができる。抗NME7抗体またはNME7_{AB}またはNME7-X1に結合する抗体を、乳、前立腺、卵巣、膵臓および肝臓癌を含む癌の治療または予防のために患者に投与する。本発明者らは、NME7_{AB}が、MUC1*成長因子受容体に結合し、それを活性化することにより、その腫瘍原性の効果を発揮することを示したので、抗NME7抗体は、それらは、限定されないが、乳、肺、肝臓、膵臓、胃、結腸直腸、前立腺、脳、黒色腫、腎臓などを含む任意のMUC1*陽性癌に対して効果的であると思われる。抗NME7、抗NME7_{AB}、または抗NME7-X1抗体を、NME7_{AB}、NME7_{AB}様、またはNME7-X1陽性、またはMUC1*陽性の癌の治療または予防のために患者に投与する。

【0107】

効果的治療のための患者癌細胞の試験

NME7_{AB}、NME7-X1ならびに2iおよびよりナイーブな状態へ幹細胞を戻す他の試薬はまた、癌細胞をより転移性状態に形質転換するように誘導する。これらの試薬のいずれか1種または組み合わせでの治療の後に、癌細胞はより高い生着率を有し、試験動物に腫瘍を生じさせるのに最大100,000倍少ない細胞しか必要としない。したがって、本開示で記載の方法は、試験動物中への患者の原発性腫瘍細胞の異種移植を可能にするために使用できる。

【0108】

候補治療薬をその後、レシピエント動物で試験できる。このようにして特定された効果的治療薬を、ドナー患者または類似の癌を有する他の患者を治療するために使用できる。一実施形態では、特定の患者または特定の型の癌のための効果的な治療薬を特定する方法は、次のステップを含む：1)癌細胞が、細胞株、患者または試験治療薬が投与される予定の患者から取得されるステップ；2)癌細胞が、NME7_{AB}、NME7-X1、ヒトNME1、ヒトNME1またはNME7に対して高い相同性を有する細菌性NME1、2i、またはよりナイーブな状態へ幹細胞を戻すことが示された他の試薬中で培養されるステップ；3)得られた癌細胞を、ヒトNME7_{AB}、NME7-X1、ヒトNME1、ヒトNME1またはNME7に対して高い相同性を有する細菌性NME1、2i、またはよりナイーブな状態へ幹細胞を戻すことが示された他の試薬が同様に投与され得る試験動物へ移植される、または動物が、ヒトNME7_{AB}またはNME7-X1を遺伝導入されるステップ；4)候補抗癌治療薬が、動物に投与されるステップ；5)治療薬の有効性が、評価されるステップ；および6)効果的な治療薬が、ドナー患者または類似の癌を有する別の患者に投与されるステップ。

【0109】

抗NME7抗体

抗NME7抗体は、有力な抗癌剤である。NME7は、癌細胞の増殖を促進し、さらにより転移性の状態またはよりより高悪性度状態にそれらの進行を促進する、成長因子である。NME7、および約33kDaまたは30kDaであるNME7の切断型は、いずれかの他の成長因子またはサイトカインが欠けている無血清培地中でさえ、癌増殖を完全に支援することが示された。プルダウンアッセイ、ELISAおよびナノ粒子結合実験で、本発明者らは、成長因子受容体MUC1*がNME7およびNME7_{AB}の結合パートナーであることを示した。他の全ての成長因子またはサイトカインの排除によるこの相互作用の促進は、癌幹細胞マーカーの発現を増加させた。NME7に特異的に結合するポリクローナル抗体を用いた、相互作用の遮断は血清の存在下でさえ、癌細胞を活発に死滅させた。したがって、抗NME7または抗NME7_{AB}抗体は、癌の治療または予防のために患者に投与できる有力な抗癌剤である。すべての癌の75%超は、MUC1*陽性である。MUC1*は、MUC1の膜貫通型切断産物であり、細胞外ドメインのほとんどが欠失されており、ほとんどのPSMGFR配列を含む細胞外ドメインの一部を残し、PSMGFR配列の境界に9~20個の追加のアミノ酸N末端を含み得る。

【0110】

本発明の一態様は、対象に有効な量の抗NME7抗体を投与することを含む、対象にお

10

20

30

40

50

いて癌を治療または予防する方法である。一例では、抗NME7抗体は、NME7_{AB}に結合できる。別の例では、抗NME7抗体は、NME7-X1に結合できる。また別の例では、患者に投与される抗NME7抗体は、癌の促進におけるその標的への結合を抑制または防止する。一例では、標的は、切断されたMUC1の細胞外ドメインである。より具体的には、癌を促進するNME7標的は、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFR領域である。一態様では、効果的な治療薬は、主としてMUC1*のPSMGFR部分またはPSMGFRペプチドからなる、NME7種と、MUC1*細胞外ドメインとの間の相互作用を破壊するか防止する薬剤である。癌の治療または予防のための薬剤は、NME7、NME7_{AB}様切断産物、またはNME7-X1を含む選択的アイソフォームの発現または機能を直接または間接的に抑制する薬剤である。一例では、効果的な抗癌治療薬は、NME7種に結合する、またはその腫瘍活性を無効にするものである。癌の治療または予防の効果的な治療薬は、NME7、NME7_{AB}様切断産物、または選択的アイソフォーム、またはNME7-X1に結合するまたは不能にする薬剤である。一態様では、NME7種に結合する治療薬は、抗体である。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、二価、一価、単鎖、scFvまたは起源が動物であり得る抗体模倣物、ヒト動物のキメラ、ヒト化、またはヒト抗体であり得る。抗体は、NME7種またはそのフラグメントで接種または免疫化することにより生成でき、または、例えば、抗体ライブラリーもしくは抗体プールからNME7、NME7_{AB}様切断産物またはNME7-X1を含む選択的アイソフォームを含む、NME7種に対するそれらの結合能力により選択できる。

10

20

30

40

50

【0111】

抗NME7抗体の生成

抗NME7抗体は、宿主動物中などの患者の外部でまたは患者中で生成できる。抗体は、NME7またはNME7フラグメントによる免疫化により、またはNME7_{AB}またはNME7-X1などの所望のNME7種に対するそれらの結合能力を基準にして、天然の、合成の、全長抗体または抗体フラグメントであり得る抗体のライブラリーまたはプールから選択できる。一態様では、抗体は、図6~9に列挙されたものから選択されたペプチドによる免疫化から生成される、またはペプチドへのその結合能力のため選択される。別の態様では、抗体は、その配列がヒトNME1のものと同じでないペプチドから生成される、または、抗体は、NME7種への結合能力およびヒトNME1へのそれらの結合不能性のため選択される。

【0112】

癌増殖を抑制し、転移への移行を抑制する抗体を生ずる、NME7またはNME7-X1由来ペプチド、またはそれら自体が抑制性であるペプチドを特定するために使われる1つの方法は、次の通りである：1) ヒトNME1またはヒトNME7に対して高い配列相同性を有するヒトNME1、ヒトNME7、ヒトNME7-X1およびいくつかの細菌または真菌NMEタンパク質のタンパク質配列が、整列される；2) すべてのNMEで高い配列相同性の領域が、特定される；3) NME7またはNME7-X1に特有であるが、高い配列相同性の領域に隣接するペプチド配列が、特定される。ペプチドがその後、合成され、ヒトまたは宿主動物中で抗体を生成するために使用される。得られた抗体は、次記の場合に、治療的使用のため選択される：1) それらは、NME7_{AB}またはNME7-X1に結合するが、NME1には結合しない；2) 癌増殖を抑制する能力を有する；3) より転移性状態への癌細胞の移行を抑制する能力を有する；または4) インビボで転移を抑制する。いくつかの事例では、治療的使用のための抗体は、NME7_{AB}またはNME7-X1のMUC1*細胞外ドメインへの結合、PSMGFRペプチドへの結合、またはN-10ペプチドへの結合を分断するそれらの能力のため選択される。

【0113】

癌の治療のための抗NME7抗体の使用

癌増殖またはより転移性の状態への移行を抑制する抗体は、抗癌治療薬として使用するために選択され、癌の治療または予防のために患者に投与され得る。選択された抗体は、例えば、ヒトキメラ抗体または完全ヒト抗体を設計または作製することによりさらに最適

化され得る。この手法の有効性を実証するために、本発明者らは、その癌性機能に不可欠であると思われるNME7の領域からNME7ペプチドを選択した。本発明者らはその後、これらのペプチドを使用して抗体を生成し、次に、a)癌性増殖を抑制する；およびb)癌細胞から転移性癌細胞への移行の誘導を抑制する、それらの能力に関し、得られた抗体、ならびに免疫化ペプチドの両方を試験した。NME7ペプチドは、抗体産生のための免疫化剤、および抑制剤それ自体として選択された(図9および実施例7)。ペプチドA1(配列番号141)、A2(配列番号142)、B1(配列番号143)、B2(配列番号144)およびB3(配列番号145)、ここで、Aは、ペプチドが由来するドメインを意味し、すなわち、NDPK Aドメインを意味し、BはそのペプチドがNDPK Bドメインに由来することを意味する(図5)。各々のペプチドは、免疫原として使用され、ポリクローナル抗体の産生のために2羽のウサギ各々に注入された。免疫化ウサギ血液から採取された抗体は、免疫化ペプチドで誘導体化されたカラムで精製された。精製された抗体はその後、ヒトNME7へのそれらの結合能力に関して試験された。得られた抗体はすべて、所望の通り、ヒトNME7に結合したが、ヒトNME1には結合しなかった(図10A~10B、実施例8)。これらの結果は、その配列がNME7で見つかるがNME1に正確に同一でないペプチドを選ぶことによって、NME7に特異的に結合するがNME1に結合しない抗体が生成されることを示す。NME1は健康な機能を有するので、NME1と干渉しない抗体を生成することが、ほとんどの場合、望ましい。抗体はまた、MUC1*細胞外ドメインペプチドへのNME7の結合を抑制するそれらの能力に関して試験された。図11に示されるELISA実験は、抗体が、それらがNME1の結合を抑制したよりはるかに多くのMUC1*細胞外ドメインペプチドへのNME7_{AB}の結合を阻害したことを示す。それぞれのNME7 AドメインおよびBドメインがPSMGFRペプチドに結合できることを想起されたい。従って、NME7_{AB}のPSMGFRペプチドへの結合の完全抑制は、単一抗体またはただ1つのドメイン由来のペプチドでは達成できない。これらの抗体およびそれらそれぞれの免疫化ペプチドはまた、癌細胞増殖を抑制した(図12~13)。これらの抗体はまた、NME7_{AB}中で増殖する癌細胞から生ずる非付着性「浮遊」細胞の形成を抑制した(図14)。図から分かるように、B3ペプチドによる免疫化により精製されたポリクローナル抗体は、転移性の浮遊細胞の数を95%低減し、B3ペプチドに結合する抗NME7抗体が癌転移を抑制するのに最も効果的であることを示す。同様に、抗体は、転移マーカーCXCR4の発現を抑制した(図15A)。

この場合も、B3抗体が、CXCR4の発現の抑制で最も効率的であった；NME7 FL(NME7浮遊細胞)と標識したバーは、B3抗体61が20倍に低減した(NME7+61FLと標識したバー)、CXCR4の70倍の増加を示す。加えて、免疫化ペプチド其れ自体は、T47D癌細胞がNME7_{AB}または2i中で増殖された場合、CXCR4および他の転移マーカーの上方制御を抑制した。

10

20

30

40

50

【0114】

これは、NME7とNME7種の癌性機能を抑制する抗体を生成する選択ペプチドの一例にすぎない。ヒトNME1、ヒトNME7、ヒトNME7-X1、およびヒトNME1またはNME7に対して高い配列相同性を有するバクテリアNMEタンパク質の間の配列アラインメントは、5つの相同ドメインを特定した。ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3はすべて、癌増殖または転移性の状態へのそれらの移行を阻害した抗体を生成したという事実は、これらのペプチドが由来する5つの領域が、癌の促進におけるその機能にとって重要なNME7の領域であることを意味する。これらの領域からの他のペプチドもまた、癌増殖および転移を抑制し、したがって有力な抗癌治療薬である抗NME7抗体を生じさせるであろう。ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3から生成された抗体は、癌増殖を抑制することを示し、より転移性の状態への移行を抑制した。同じまたは類似のペプチドによる免疫化およびその後のモノクローナル抗体の試験により生成されたモノクローナル抗体は、当業者に既知のヒト化または他の操作後、癌の治療または予防のために患者に投与される得る抗体を特定するであろう。

【0115】

特定の実験では、抗体または免疫化ペプチドの添加が癌細胞増殖を阻害するかどうか確かめるために、ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3 による免疫化により生成された抗体、ならびに免疫化ペプチドそれ自体が、培養中の癌細胞に添加された。低濃度で、かつ別々に加えられて、抗体ならびに免疫化ペプチドは、癌細胞増殖を抑制した（1 実施例のために図 1 2）。しかし、より高い濃度でまたは組み合わせで添加された場合、抗体ならびに免疫化ペプチドは、癌細胞増殖を強く阻害した（図 1 3）。免疫化ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3 の対応するヒト N M E 7 アミノ酸番号は、配列番号 8 2 または 1 4 7 を有するヒト完全長 N M E 7 からの、それぞれ、1 2 7 ~ 1 4 2、1 8 1 ~ 1 9 1、2 6 3 ~ 2 8 2、2 8 7 ~ 3 0 1、3 4 3 ~ 3 7 1 である。

【0 1 1 6】

10

明確にするために、N M E 7 の残基番号が議論される場合、それらは、配列番号 8 2 または 1 4 7 で示される N M E 7 の残基番号を指す。

【0 1 1 7】

癌増殖抑制実験で使用された抗体および図 1 2 に示される抗体の 1 種は、N M E 7 のアミノ酸 1 0 0 ~ 3 7 6（配列番号 8 2 または 1 4 7）に対応する N M E 7 ペプチドで免疫化することにより生成された。より高い親和性および特異性の抗 N M E 7 抗体を生成するために、次のステップが続いた：ヒト N M E 7 アミノ酸 1 0 0 ~ 3 7 6 を含むペプチドで動物を免疫化し、その後：1）ヒト N M E 1 に結合する抗体を除く；2）N M E 7_{A B}、2 i またはより転移性の状態へ癌細胞の移行を誘導する他の N M E を抑制する抗体を選択する；3）癌細胞の増殖を抑制する抗体を選択する；4）M U C 1^{*} 陽性癌細胞の増殖を抑制する抗体を選択する；5）M U C 1^{*} 細胞外ドメインへの N M E 7_{A B} または N M E 7 - X 1 の結合を抑制する、実質的に P S M G F R ペプチドへの結合を抑制する抗体を選択する；および / または 6）図 9 に列挙されたペプチド A 1、A 2、B 1、B 2、または B 3 ペプチドの 1 個または複数に結合する抗体を選択する。

20

【0 1 1 8】

より高い親和性モノクローナル抗体、またはより長いペプチドから生成されたモノクローナル抗体は、より効果的な抗体治療薬であり得る。あるいは、抗 N M E 7、抗 N M E 7_{A B}、または抗 N M E 7 - X 1 抗体の組み合わせが、有効性を高めるために患者に投与される。

【0 1 1 9】

30

抗 N M E 7 抗体は、転移性癌細胞への癌細胞の移行を抑制する

抗 N M E 7 抗体は、癌幹細胞（C S C）と呼ばれる転移性癌細胞または腫瘍開始細胞（T I C）への癌細胞の移行を抑制する。本発明者らは、N M E 7_{A B} の存在下での種々様々の癌細胞を培養することが、それらの癌細胞を、通常 of 癌細胞から転移性の C S C または T I C に移行させることを実証したことを想起されたい。したがって、N M E 7、N M E 7_{A B} または N M E 7 - X 1 に結合する抗体は、より転移性の状態への癌細胞の進行を抑制するであろう。

【0 1 2 0】

癌細胞は、よりナイーブな状態へ幹細胞に戻す薬剤の存在下で培養された場合、より転移性の状態に形質転換する。本発明者らは、N M E 7_{A B}、ヒト N M E 1 二量体、細菌性 N M E 1 二量体または M E K および G S K 3 ベータ阻害剤（「2 i」と呼ぶ）中で癌細胞を培養することが、細胞をより転移性になるようにさせることを実証した。細胞がより転移性の状態に移行するに伴い、それらは非付着性が低付着性になり、培養皿から離れて浮遊する。これらの浮遊細胞、「浮遊物」は、付着性のものから別々に集められ、次のことが示された：a）遙かに高レベルの転移性遺伝子を発現する；および b）非常に少ないコピー数でマウスへ異種移植された場合、腫瘍を生成した。乳癌用の C X C R 4、前立腺癌用の C H D 1 などの特異的転移マーカー、および O C T 4、S O X 2、N A N O G、K L F 4 などの他の多能性幹細胞マーカーの R T - P C R 測定は、N M E 7_{A B} 中で培養された癌細胞において劇的に過剰発現され、ここでおよび図で「浮遊物」と呼ばれる、非付着性になった細胞中で最も過剰発現された。

40

50

【 0 1 2 1 】

一実施例では、N M E 7 由来ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3 による免疫化により生成された N M E 7_{A B} 特異性抗体、ならびに免疫化ペプチドそれ自身を、それらが通常の癌細胞の転移性癌幹細胞への形質転換を抑制するかどうかを決定するために、N M E 7_{A B} または 2 i のいずれかと共に培地中へ添加した。抗体とペプチドは別々に、転移性形質転換を引き起こす薬剤、この場合は N M E 7_{A B} または 2 i 阻害剤 P D 0 3 2 5 9 0 1 および C H I R 9 9 0 2 1、と共に添加された。N M E 7_{A B} および 2 i は、癌細胞がよりより高悪性度の転移性状態へ形質転換されるよう誘導するために、別々に使用された。2 i は、培地に添加された抗体が単にすべての N M E 7_{A B} を塞ぎ、そのため原因薬剤が効果的に存在しなかった、と主張できないように使用された（実施例 1 0）。

10

【 0 1 2 2 】

目視観察結果が、実験の進行に伴い 2 人の科学者により独立に記録された（図 1 4）。最も際だった観察は、抗体とペプチドが劇的に浮遊性細胞の数を減らしたということであり、それは、抗体とペプチドが転移性癌細胞への形質転換を抑制するという最初の指標であった。特に、それに対し抗体が B 3 ペプチドによる免疫化から生成された細胞は、浮遊細胞をほとんど生成しなかった。m R N A が、浮遊性細胞、付着細胞の両方および対照癌細胞から抽出された。細胞の生存率と増殖を示す m R N A の量が、測定された。抗体で治療された細胞は、遙かに少ない m R N A を有し、少ない生存分裂細胞を示し（図 1 6）、これは抗 N M E 7_{A B} 抗体が、癌細胞増殖ならびにより転移性の状態へのそれらの移行を抑制することを確認する。R T - P C R を用いて、C X C R 4 を含む転移マーカーの発現レベルを測定した。抗 N M E 7 抗体での治療は、C X C R 4 などの転移マーカーの量を大きく低減し、抗 N M E 7 抗体またはペプチドが転移性癌への移行を抑制したことを示す（図 1 5 A ~ 1 5 C）。これらの結果は、N M E 7_{A B} に結合する抗体を、転移性癌の治療または予防のために、患者に投与できることを示す。

20

【 0 1 2 3 】

N M E 7_{A B}、または N M E 7 - X 1 由来ペプチドは、インタクト N M E 7_{A B} および N M E 7 - X 1 の結合を競合的に抑制し、かつ抗癌剤である。

本発明の別の態様では、癌の治療または予防のための治療薬は、N M E 7 配列に由来するペプチドであり、これは癌の治療または予防のために患者に投与される。一態様では、N M E 7 由来ペプチドは患者に投与され、それにより、完全 N M E 7 より短く、かつ N M E 7 の発癌活性を与えることができないはずであるペプチドは、N M E 7 の標的に結合し、その標的とインタクト N M E 7 の間の癌を促進する相互作用を競合的に抑制する。N M E 7_{A B} は発癌活性を完全に付与できるので、N M E 7_{A B} の配列は、より短いペプチド源として好ましく、その場合、ペプチドがそれ自体、癌性増殖または他の腫瘍活性または発癌活性を促進できないことを確認する必要がある。好ましい実施形態では、N M E 7_{A B} の一部の配列を有し、好ましくは約 1 2 ~ 5 6 個のアミノ酸長である 1 個または複数のペプチドが、患者に投与される。半減期を増加させるために、ペプチドは、非天然骨格または L 型の代わりに D 型アミノ酸を有するペプチドなどの、ペプチド模倣物であり得る。また別の事例では、抗癌治療薬は、ペプチドかペプチド模倣物であり、ペプチドは、N M E 7、N M E 7_{A B}、または N M E 7 - X 1、またはその標的である、本明細書のいくつ

30

40

【 0 1 2 4 】

図 6 ~ 9 は、その同族の標的への N M E 7 の結合を抑制すると予想される、好ましいアミノ酸配列のリストを提供する。さらにより好ましい実施形態では、癌を罹患している患者または癌を発症するおそれがある患者への投与のために選択されるペプチドは、それらが N M E 7 結合パートナーに結合する、およびペプチド自身が腫瘍活性を与えないという理由で選択される。さらにより好ましい実施形態では、N M E 7 結合パートナーは、M U C 1 * の細胞外ドメインである。さらにより好ましい実施形態では、N M E 7 結合パートナーは、P S M G F R ペプチドである。

50

【 0 1 2 5 】

「腫瘍活性または発癌活性を与える」という用語は、当該ペプチドそれ自体は癌の増殖を支援または促進できないことを意味する。NME7に由来するペプチドまたは複数ペプチドが、腫瘍形成を促進できるかどうかを試験する別の方法は、ペプチドが、ヒト幹細胞の多能性増殖を支援できるかどうかを試験することである。多能性のヒト幹細胞増殖を支援するNMEタンパク質およびペプチドはまた、癌増殖も支援する。また別の方法では、ペプチドは、それらが、より低い成熟状態に体細胞を戻し得る場合、選択解除される。

【 0 1 2 6 】

NME7_{AB}のフラグメントは、癌細胞増殖およびより転移性の状態への癌細胞の移行を抑制する。実例として、別々に(図12)または組み合わせて(図13)添加されたNME7ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3は、癌細胞の増殖を抑制する。さらに、NME7ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3は、より転移性の状態への癌細胞の移行を抑制した(図15)。

10

【 0 1 2 7 】

したがって、NME7に特異的な、およびNME7_{AB}またはNME7-X1に特異的なペプチドによる免疫化により生成された抗体は、NME7種の癌性作用を阻止し、有効な抗癌剤であろう。同様に、これらの結果は、NME7に特異的な、およびNME7_{AB}またはNME7-X1に特異的なペプチドが、NME7種の癌性作用を阻止することを示す。本発明の一態様では、ペプチドは、図6に示されるリストから選ばれる。本発明の一態様では、ペプチドは、図7に示されるリストから選ばれる。本発明の一態様では、ペプチドは、図8に示されるリストから選ばれる。さらに本発明の別の態様では、ペプチドは、図9に示されるリストから選ばれる。これらの抗体は、免疫化により生成され得、または他の手段により生成または選択され得、その後、限定されないが、NME7由来ペプチドA1(配列番号141)、A2(配列番号142)、B1(配列番号143)、B2(配列番号144)またはB3(配列番号145)を含むNME7、NME7_{AB}、NME7-X1またはNME7由来ペプチドに結合するそれらの能力について選択される。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、二価、一価、単鎖、scFv、ヒト、またはヒト化抗体であり得、または特異的標的に結合する認識領域を提供するタンパク質スキャホールドなどの抗体模倣物であり得る。

20

【 0 1 2 8 】

癌の治療または予防で使用される抗NME7抗体は、当業者に既知の標準的方法により調製でき、これらの方法は、NME7、NME7_{AB}またはN末端からの追加の10~25個のアミノ酸が存在しないNME7_{AB}のより短い型を認識する抗体または抗体様分子を生成するために使用される。このような抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、二価、一価、単鎖、scFv、ヒト、またはヒト化抗体であり得、または特異的標的に結合する認識領域を提供するタンパク質スキャホールドなどの抗体模倣物であり得る。

30

【 0 1 2 9 】

NME7由来ペプチドA1(配列番号141)、A2(配列番号142)、B1(配列番号143)、B2(配列番号144)またはB3(配列番号145)による免疫化により生成される抗NME7抗体、またはA1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに結合する抗体は、NME7_{AB}およびNME7-X1に結合するが、いくつかの健康な細胞の機能のために必要であり得るNME1への結合には抵抗する抗体である。このような抗体は、NME7_{AB}またはNME7-X1のそれらの標的受容体、MUC1*への結合を抑制する。A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに結合する抗体は、癌または転移と診断された、または癌または転移を発症するおそれのある患者に投与できる。このような抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、二価、一価、単鎖、scFvであり得、または特異的標的に結合する認識領域を提供するタンパク質スキャホールドなどの抗体模倣物であり得る。

40

【 0 1 3 0 】

50

B 3 ペプチドによる免疫化により生成された抗 N M E 7 抗体、または B 3 ペプチドに結合する抗体は、N M E 7 A B および N M E 7 - X 1 の認識に関し特に特異的である。このような抗体は、N M E 7 A B または N M E 7 - X 1 のそれらの標的受容体、M U C 1 * への結合の抑制で極めて効率的でもある。B 3 ペプチドに結合する抗体はまた、癌または癌転移の予防、抑制および回復の点で、極めて効率的でもある。このような抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、二価、一価、単鎖、s c F v であり得、または特異的標的に結合する認識領域を提供するタンパク質スキャホールドなどの抗体模倣物であり得る。

【 0 1 3 1 】

ウサギ中で B 3 ペプチドにより免疫化により生成されたポリクローナル抗体 # 6 1 は、転移マーカー C X C R 4 の発現上昇を遮断する抗体 # 6 1 から明らかなように、癌細胞の癌幹細胞への形質転換を抑制したことに留意されたい (図 1 5) 。

【 0 1 3 2 】

N M E 7 由来の B 3 ペプチド (配列番号 1 4 5) は、位置 1 4 にシステインを有し、これは、抗 N M E 7 抗体の生成を複雑化する。本発明者らは、システイン 1 4 をセリンに変異させて、A I F G K T K I Q N A V H S T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号 1 6 9) を作製し、動物を免疫化し、抗 N M E 7 モノクローナル抗体を生成した。得られた抗体は、天然の B 3 配列ならびに B 3 C y s 1 4 S e r ペプチドに結合する。7 種の高親和性および特異的モノクローナル抗体 : 8 F 9 A 5 A 1 、 8 F 9 A 4 A 3 、 5 F 3 A 5 D 4 、 5 D 9 E 2 B 1 1 、 5 D 9 E 1 0 E 4 、 5 D 9 G 2 C 4 、 および 8 H 5 H 5 G 4 を生成した。しかし、様々な配列アラインメントは、以下に示すように、3 種のみの特有の配列抗体 : 8 F 9 A 5 A 1 、 8 F 9 A 4 A 3 、 8 F 9 A 4 P 3 、 および 5 F 3 A 5 D 4 が存在することを示した。太字でかつ斜字体で示した領域は C D R 配列を示す。

【 0 1 3 3 】

重鎖アラインメント

【 化 1 】

```

8F9A5A1H      IQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNVVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYV 60
8F9A4A3H      VQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGNTFTEYTMHVVKQSHGKSLEWIGGFNPNGVTNYN 60
5D9E2B11H     VQLQQSGPDLVKPGTSVKISCKTSGNTFTEYTMHVVKQSHGKSLEWIGGFNPNGVTNYN 60
5D9E10E4H     VQLQQSGPDLVKPGTSVKISCKTSGNTFTEYTMHVVKQSHGKSLEWIGGFNPNGVTNYN 60
5D9G2C4H      VQLQQSGPDLVKPGTSVKISCKTSGNTFTEYTMHVVKQSHGKSLEWIGGFNPNGVTNYN 60
5F3A5D4H      VQLQQSGPDLVKPGTSVKISCKTSGNTFTEYTMHVVKQSHGKSLEWIGGFNPNGVTNYN 60
8H5H5G4H      VQLQQSGPDLVKPGTSVKISCKTSGNTFTEYTMHVVKQSHGKSLEWIGGFNPNGVTNYN 60
:*** :*** :*****:*** :***:*** :***:*** :***:*** :*** :***

```

```

8F9A5A1H      DDFKGRFAFSLETSATTAYLQINNLKNEDTSTYFCARLR--GIRPGPLAYWQGTLVTVS 118
8F9A4A3H      QKFKGKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSLYVFYFDYWGQTLTVS 120
5D9E2B11H     QKFKGKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQTLTVS 116
5D9E10E4H     QKFKGKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQTLTVS 120
5D9G2C4H      QKFKGKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQTLTVS 120
5F3A5D4H      QKFKGKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQTLTVS 120
8H5H5G4H      QKFKGKATLTVDKSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQTLTVS 120
:*** :*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

```

8F9A5A1H      A 119 (SEQ ID NO:172)
8F9A4A3H      S 121 (SEQ ID NO:173)
5D9E2B11H     - 116 (SEQ ID NO:174)
5D9E10E4H     S 121 (SEQ ID NO:175)
5D9G2C4H      S 121 (SEQ ID NO:176)
5F3A5D4H      S 121 (SEQ ID NO:177)
8H5H5G4H      S 121 (SEQ ID NO:178)

```

10

20

30

40

50

8F9A4A3H VQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGNTFTEYTMHWKQSHGKSLEWIGGFNPNNGVTNYN 60
 5D9E2B11H VQLQQSGPDLVKPGT SVKISCKTSGNTFTEYTMHWKQSHGKSLEWIGGFNPNNGVTNYN 60
 5D9E10E4H VQLQQSGPDLVKPGT SVKISCKTSGNTFTEYTMHWKQSHGKSLEWIGGFNPNNGVTNYN 60
 5D9G2C4H VQLQQSGPDLVKPGT SVKISCKTSGNTFTEYTMHWKQSHGKSLEWIGGFNPNNGVTNYN 60
 5F3A5D4H VQLQQSGPDLVKPGT SVKISCKTSGNTFTEYTMHWKQSHGKSLEWIGGFNPNNGVTNYN 60
 8H5H5G4H VQLQQSGPDLVKPGT SVKISCKTSGNTFTEYTMHWKQSHGKSLEWIGGFNPNNGVTNYN 60
 *****:*****:*****

8F9A4A3H QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSLYVFYFDYWGQGTTLTVS 120
 5D9E2B11H QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQGT---- 116
 5D9E10E4H QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQGTTLTVS 120
 5D9G2C4H QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQGTTLTVS 120
 5F3A5D4H QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQGTTLTVS 120
 8H5H5G4H QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARRYYHSTYVFYFDSWGQGTTLTVS 120
 ***** *****

10

8F9A4A3H S 121 (SEQ ID NO:179)
 5D9E2B11H - 116 (SEQ ID NO:180)
 5D9E10E4H S 121 (SEQ ID NO:181)
 5D9G2C4H S 121 (SEQ ID NO:182)
 5F3A5D4H S 121 (SEQ ID NO:183)
 8H5H5G4H S 121 (SEQ ID NO:184)

20

【 0 1 3 4 】

軽鎖アラインメント

【 化 2 】

8F9A4A3L ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCITSTDDIDDMWYQQKPGEPKLLISEGNTLRGVPVS 60
 5D9E2B11L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 5D9E10E4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 5D9G2C4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 5F3A5D4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 8H5H5G4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 8F9A5A1L EILLTQSPAIIAASPGKVTITCSASSSV-SYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLSAGVPA 59
 : :*: : : : *::** * :* :. :*:*****. * : * ..* ***:

30

8F9A4A3L RFSSSGYGTDFVFTIENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFGSGTKLEIKR 108 (SEQ ID
 NO:185)
 5D9E2B11L RFSSSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEIKR 108 (SEQ ID
 NO:186)
 5D9E10E4L RFSSSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEIKR 108 (SEQ ID
 NO:187)
 5D9G2C4L RFSSSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEIKR 108 (SEQ ID
 NO:188)
 5F3A5D4L RFSSSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEIKR 108 (SEQ ID
 NO:189)
 8H5H5G4L RFSSSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGKLEIKR 108 (SEQ ID
 NO:190)
 8F9A5A1L RFSSSGSGTFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPPTFGGGKLEIKR 107 (SEQ ID
 NO:191)
 .** **.: :*.:. :*: * ** * .. * ***.**

40

5D9E2B11L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 5D9E10E4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 5D9G2C4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 5F3A5D4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60
 8H5H5G4L DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKPDGTIKLLIYTTSSLHSGVPS 60

50

```

5D9E2B11L   RFSGSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR   108 (SEQ ID
NO:192)
5D9E10E4L   RFSGSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR   108 (SEQ ID
NO:193)
5D9G2C4L    RFSGSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR   108 (SEQ ID
NO:194)
5F3A5D4L    RFSGSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR   108 (SEQ ID
NO:195)
8H5H5G4L    RFSGSGSGTDYSLTISNVEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR   108 (SEQ ID
NO:196)

```

```

8F9A4A3L    ETTVTQSPASLSMAIGEKVTIRCI TSTDIDDDMNWYQQKPGEPKLLIS EGNLREGVPS   60
8F9A5A1L    EILLTQSPAIIAASPGEKVTITCSASSSV-SYMNWYQQKPGSSPKIWIYGISNLASGVPA   59
* :***** :: : ***** * :*:: . *****. **: * ..* ***:

```

```

8F9A4A3L    RFSSSGYGTDFVFTIENMLSEDVADYYCLQSDNLPLTFGSGTKLEIKR   108 (SEQ ID
NO:197)
8F9A5A1L    RFSGSGSGTFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPPTFGGGTKLEIKR   107 (SEQ ID
NO:198)

```

. **.* ***:. * :**** * ** * .. * ***.*****

【 0 1 3 5 】

モノクローナル抗体 5 D 9 E 2 B 1 1、5 D 9 E 1 0 E 4、5 D 9 G 2 C 4、および 8 H 5 H 5 G 4 は全て、5 D 4 としても知られる 5 F 3 A 5 D 4 と同じ配列を有する。ここで、本発明者らが抗体 5 F 3 A 5 D 4、別名 5 D 4 に言及する場合、それは、5 D 9 E 2 B 1 1、5 D 9 E 1 0 E 4、5 D 9 G 2 C 4、および 8 H 5 H 5 G 4 に対しても当てはまると理解される。図 2 4 および図 2 5 からわかるように、抗 N M E 7 抗体 8 F 9 A 5 A 1、8 F 9 A 4 A 3、および 5 F 3 A 5 D 4 は全て、N M E 7 A B に結合するが、N M E 1 には結合しない。このことは重要であり、なぜなら N M E 7 の A ドメインは N M E 1 に高い相同性を有し、これは正常細胞機能にとって必要だからである。抗癌治療薬または抗転移治療薬の場合、N M E 7 A B を抑制し、N M E 1 を抑制しないことは必須であろう。

【 0 1 3 6 】

図 2 6、図 2 7 および図 2 8 は、これらの抗 N M E 7 抗体はまた、N M E 7 A B の M U C 1 * P S M G F R ペプチドおよび N - 1 0 P S M G F R ペプチドへの結合を分断できることを示す。図から分かるように、M U C 1 * ペプチドからの N M E 7 A B の全体的置換は存在しない。しかし、N M E 7 A B は A ドメインおよび B ドメインからなり、これらのそれぞれは M U C 1 * に結合できることを想起されたい。これらの抗体は、B ドメインの M U C 1 * への結合を分断するように設計され；N M E 7 A B の A ドメインはまだ、プレート表面上の M U C 1 * ペプチドに結合できるであろう。有用な治療薬のために、抗体は、1 つのドメインの M U C 1 * への結合を分断するのみで十分であり、そうすることで、リガンド誘導二量体化および M U C 1 * 成長因子受容体の活性化が阻止され得る。N M E 7 B 3 ペプチドまたは B 3 C y s 1 4 S e r ペプチド (配列番号 1 6 9) に結合する抗体または抗体模倣物は、癌または転移と診断された患者、または癌または転移を発症するおそれのある患者に投与できる抗体である。

【 0 1 3 7 】

動物モデルで転移する癌細胞を作製することは困難であることは、この分野でよく知られている。ヒト腫瘍では、1 0 0 , 0 0 0 個の癌細胞中の 1 個、あるいは、1 , 0 0 0 , 0 0 0 個の癌細胞中の 1 個のみが、腫瘍から分離し、どこかに着床して、転移を開始すると推定されている [A l - H a j j e t a l . , 2 0 0 3]。いくつかの研究者は、免疫機能が低下したマウス中に注入された T 4 7 D 乳癌細胞は、約 1 2 週後に転移することを報告している [H a r r e l l e t a l 2 0 0 6]。他の研究者は、A s P C - 1 膵臓癌細胞は、約 4 週後に転移することを報告している [S u z u k i e t a l , 2 0 1 3]。

【 0 1 3 8 】

10

20

30

40

50

ここで、本発明者らは、T47D乳癌細胞が、組換えNME7_{AB}を唯一の成長因子として含む無血清培地中で10日間増殖したことを示す。NME7_{AB}中で増殖させる場合、約25%の癌細胞が浮遊を開始し、分裂を停止したが、なお生存可能であった。PCR測定は、これらの「浮遊」細胞が、乳癌転移性因子CXCR4の発現を大きく上方制御することを示した。

【0139】

本明細書で提供される図のいくつかでは、これらの浮遊細胞は、癌幹細胞(CSC)と呼ばれる。免疫機能が低下した雌nu/nuマウスに、90日間エストロゲン放出ペレットを移植した。500,000個のT47D-wt細胞または10,000個のT47D-CSC(癌幹細胞)を、nu/nuマウスの尾静脈(i.v.)皮下(s.c.)に、または腹腔内の空隙(i.p.)に注入した。これらの癌細胞は、ルシフェラーゼを発現するように操作された。腫瘍または癌細胞を可視化するために、動物にルシフェリンを注入した後、IVIS測定器で10分後に可視化した。図33A~図33BのIVIS測定から分かるように、6日目までに、尾静脈に注入された500,000個のT47D-wt細胞は、生存癌細胞または細胞生着の徴候を示さない。

10

【0140】

全く対照的に、尾静脈へ注入した10,000個のT47D-CSCは、転移した。6日目のIVIS測定の前に、T47D-CSCマウスに、32nMの組換えNME7_{AB}を注入した。翌日、2匹のCSCマウスの1匹に、15mg/kgに相当する濃度の、抗NME7モノクローナル抗体8F9A5A1、8F9A4A3、および5F3A5D4のカクテルを200uLの体積で注入した。NME7_{AB}および抗NME7抗体のほぼ同時注入は、抗体の効果を帳消しにした可能性が高い。図34は、10日目までに、治療マウスはほぼ完全に転移性であることを示す。図から分かるように、治療のために選択されたマウスは、同等のT47D-CSCマウスよりも転移性が高い。

20

【0141】

動物は、10日目に再度、抗NME7抗体を注入された。12日目(図35)のIVIS測定は、抗体治療マウスが転移を除去し始めることを示す。14日目までに(図36)、未治療マウスは、激しい転移により死亡し、治療マウスは転移を排除した。図37は、抗体治療が中止された場合17日目まで抗NME7治療を受けた、500,000個のT47D-wt細胞を注入されたマウスおよびT47D-CSCを注入されたマウスについてのIVIS測定の経時変化を示す。図から分かるように、17日目には、癌細胞の小クラスターが残存し、これは19日目までにより大きく成長した。21日目までに、転移が伝搬し、抗体治療が再開された。図で示されるように、抗NME7抗体治療の再開後、動物は全ての転移を排除し、不健康の徴候を示さない。

30

【0142】

図38は、皮下または腹腔内に注入された動物についてのIVIS経時変化を示す。CSCの皮下または腹腔内に注入された動物に対する抗体注入はまた、s.c.またはi.p.による抗NME7抗体も注入した。これらの動物では、抗体注入は、17日目に停止され、再開されなかった。図39および図40は、B3ペプチド株による免疫化により生成されたポリクローナル抗NME7抗体は、進行癌および転移性癌を進行させたが、正常組織または低悪性度の癌は進行させず、100,000個の癌細胞の1個または1,000,000個の癌細胞の1個が転移性癌細胞であろうことを示す。まとめると、これらのデータは、癌と診断された患者または癌を発症するおそれのある患者に投与された抗NME7抗体8F9A5A1、8F9A4A3、および5F3A5D4もしくは8F9A5A1、または8F9A4A3、または5F3A5D4は、癌転移の形成を防止、抑制する、または癌転移を逆転させるであろう。

40

【0143】

転移性の動物の抗NME7_{AB}抗体カクテルによる治療に加えて、本発明者らはまた、モノクローナル抗NME7_{AB}抗体を個別に投与し、それらが癌転移を防止でき、ならばに元に戻すことができることを示した。一実証試験では、それぞれ約20gの、8~10

50

週齢の雌 *nu/nu* マウスに、90日間エストロゲン放出ペレットを移植した。癌細胞は、成長因子 NME7_{AB} を補充した無血清培地中で10～15日間培養することにより、転移性にされた。付着および浮遊細胞の両方が、転移マーカーの上方制御を示し、動物中で、4～7日以内に転移できる。この場合、浮遊細胞は、インビトロ培養の11日目に採取され、試験動物の尾静脈中に注入された。予防モデルを試験するために、1つの群の動物の尾静脈に、抗 NME7_{AB} 抗体 $8\text{F}9\text{A}4\text{A}3$ を 15mg/kg で、転移性癌細胞の注入の24時間前に注入し、その後、約48時間毎に同じ投与量を注入した。図42A～42Fは、10,000個のルシフェラーゼ陽性 $\text{T}47\text{D}$ 転移性乳癌幹細胞を尾静脈に注入され、かつ抗 NME7_{AB} 抗体 $4\text{A}3$ ($8\text{F}9\text{A}4\text{A}3$ としても知られる) で治療された、雌 *nu/nu* マウスの写真を示す。癌細胞を画像化するために、ルシフェラーゼ基質のルシフェリンが、IVIS測定器で撮影の10分前に腹腔内注入される。図42A～42Cは、下向きの動物のIVIS写真を示す。図42D～42Fは、上向きの動物のIVIS写真を示す。図42Aおよび42Dは、リン酸緩衝食塩水を注入された対照動物を示す。図42Bおよび42Eは、動物が転移性癌細胞の注入の24時間前に抗 NME7_{AB} 抗体 $4\text{A}3$ を注入され、その後、ほぼ1日おきに、22日間にわたり合計12回の抗体注入をされた、予防モデルを示す。図42Cおよび42Fは、動物が転移性癌細胞の注入の24時間後に抗 NME7_{AB} 抗体 $4\text{A}3$ を注入され、その後、ほぼ1日おきに、20日間にわたり合計11回の抗体注入をされた、逆転モデルを示す。図から分かるように、抗 NME7_{AB} 抗体 $8\text{F}9\text{A}4\text{A}3$ は、確立された転移を防止でき、ならびに元に戻すことができる。

10

20

【0144】

抗 NME7_{AB} 抗体 $5\text{A}1$ および $5\text{D}4$ はまた、転移予防モデルでも試験され、癌転移を大きく抑制することが示された。図43A～43Fは、10,000個のルシフェラーゼ陽性 $\text{T}47\text{D}$ 転移性乳癌幹細胞を尾静脈に注入され、抗 NME7_{AB} 抗体 $5\text{A}1$ ($8\text{F}9\text{A}5\text{A}1$ としても知られる)、および $5\text{D}4$ ($5\text{F}3\text{A}5\text{D}4$ としても知られる) で治療された、それぞれ体重約20gの雌 *nu/nu* マウスの写真である。癌細胞を画像化するために、ルシフェラーゼ基質のルシフェリンが、IVIS測定器で撮影の10分前に腹腔内注入される。図43A～43Cは、下向きの動物のIVIS写真を示す。図43D～43Fは、上向きの動物のIVIS写真を示す。図43Aおよび43Dは、リン酸緩衝食塩水を注入された対照動物を示す。図43B、43E、43Cおよび43Fは、動物が転移性癌細胞の注入の24時間前に 15mg/kg の抗 NME7_{AB} 抗体を注入され、その後、ほぼ1日おきに、22日間にわたり合計12回の抗体注入をされた、予防モデルを示す。写真は、24日目または27日目に取得された。具体的には、抗体 $5\text{A}1$ で治療された群のマウス#1を、27日目に撮影し、一方、マウス#2および#3を、24日目に撮影した。理由は、動物が26日目に死亡したからである。

30

【0145】

抗 NME7_{AB} 抗体 $5\text{A}1$ および $5\text{D}4$ は、転移逆転モデルでも試験され、確立された癌転移を大きく抑制することが示された。この実験で、動物は、0日目に、 32nM の最終濃度で NME7_{AB} と混合された10,000個の $\text{T}47\text{D}$ 転移性癌細胞を尾静脈に注入された。さらに、動物は、2回、3日目と4日目に、本発明者らの実験で逆転がより困難な転移を形成することを示したより多くの NME7_{AB} を注射された。最初の抗体注入は、7日目であった。各試験動物中の転移の程度が幾分変動するので、本発明者らは、転移性癌細胞の見かけの除去が抗 NME7_{AB} 治療によるものであることを確認することを必要とした。従って、本発明者らは、高用量および低用量を交互に用いて動物を治療した。図44から容易に分かるように、高用量抗 NME7_{AB} は、転移の除去をもたらし、完全に除去できない場合には、戻って、より少ない投与量を用いてさらに増やした。この実験は、試験した3種全ての抗 NME7_{AB} 抗体、 $5\text{A}1$ 、 $4\text{A}3$ および $5\text{D}4$ は、 $\text{NME7-B}3$ に結合でき、濃度依存性方式で癌転移を抑制することを示す。図44A～44Dは、 32nM の最終濃度で NME7_{AB} と混合された10,000個のルシフェラーゼ陽性 $\text{T}47\text{D}$ 転移性乳癌幹細胞を尾静脈に注入された、雌 *nu/nu* マウスの写真である。

40

50

動物はその後、 32 nM の NME7_{AB} を尾静脈に注入された後、個別の抗 NME7_{AB} 抗体により治療された。図44Aは、リン酸緩衝食塩水を注入された対照動物を示す。図44Bは、抗 NME7_{AB} モノクローナル抗体8F9A5A1で治療された動物を示す。図44Cは、抗 NME7_{AB} モノクローナル抗体8F9A4A3で治療された動物を示す。図44Dは、抗 NME7_{AB} モノクローナル抗体5F3A5D4で治療された動物を示す。緑矢印は、示した期間にわたる抗体投与量($5\sim 7\text{ mg/kg}$)を示し、赤矢印は、高投与量(15 mg/kg)を示す。図から分かるように、抗体が 15 mg/kg で投与される場合、転移は大幅に消える。

【0146】

本発明の抗 NME7_{AB} 抗体が転移を抑制できるのを実証することに加えて、本発明者らは、原発腫瘍からの転移に対するそれらの効果を試験した。これは、癌転移の生理学をより厳密に模倣することになる。本発明者らは、癌幹細胞(CSC)としても知られるT47D転移性乳癌細胞を、 NME7_{AB} 含有無血清最小培地中で癌細胞を10~15日間にわたり培養することにより生成した。これらのT47D CSCはその後、90日間エストロゲン放出ペレットが移植されているNSGマウスの右脇腹の皮下に移植された。移植癌細胞はルシフェラーゼ陽性であるため、ルシフェラーゼ基質、ルシフェリンの注入後に、癌細胞は、光子を放出し、IVIS測定器で撮影されて、移植癌細胞を測定し、その場所を見つけることができる。図45Aおよび45Bは、0日目に、 32 nM の最終濃度まで NME7_{AB} と混合された後、マトリゲルと1:1 vol:volで混合された、10,000個のルシフェラーゼ陽性T47D転移性乳癌幹細胞を右脇腹に皮下注入された、雌nu/nuマウスの写真を示す。腫瘍生着を、0日目~6日目に進行させた。動物をその後、抗 NME7_{AB} 抗体の尾静脈注入によりi.v.治療した。対照動物は、PBSを注入された。図45Aは、対照動物のIVIS写真を示す。図45Bは、抗 NME7_{AB} 抗体5A1、4A3および5D4の合計濃度 15 mg/kg のカクテルを尾静脈に注入した動物のIVIS写真を示す。抗体またはPBSを、7日目~18日目の間に4回投与した。図から分かるように、抗 NME7_{AB} 抗体治療した動物は、対照群より少ない転移(全身の青色ドット)を示す。治療群中で、5匹の動物中の2匹が、対照群中の腫瘍より大きい原発性腫瘍を有する。これはおそらく、抗 NME7_{AB} 抗体が癌細胞の拡散を妨げ、そのため、原発腫瘍中に濃縮されて残ったためと思われる。この実験では、癌細胞の注入の前に実施されたPCR分析は、 NME7_{AB} を含む培養物中で11日後、T47D乳癌細胞が、CXCR4を109倍、OCT4を2倍、NANOGを3.5倍およびMUC1を2.7倍、上方制御したことを示した。

【0147】

別の実験では、本発明者らは、原発腫瘍から、乳癌が通常転移する器官への転移に対する本発明の抗 NME7_{AB} 抗体の効果を試験した。乳癌は通常、肝臓、肺、骨および脳へ、この順に転移する。本発明者らは、T47D転移性乳癌細胞を、 NME7_{AB} 含有無血清最小培地中で癌細胞を11日間にわたり培養することにより生成した。これらのT47D CSCはその後、90日間エストロゲン放出ペレットが移植されているNSGマウスの右脇腹の皮下に移植された。図46A~46Pは、0日目に、 32 nM の最終濃度に NME7_{AB} と混合された後、マトリゲルと1:1 vol:volで混合された、10,000個のルシフェラーゼ陽性T47D転移性乳癌幹細胞を右脇腹に皮下注入された、雌nu/nuマウスの写真を示す。腫瘍生着を、0日目~6日目に進行させた。動物をその後、抗 NME7_{AB} 抗体の尾静脈注入によりi.v.治療した。対照動物はPBSを注入された。38日目に、動物を殺し、肝臓を採取した後、IVISで分析して肝臓に転移した癌細胞を検出した。図46Aおよび46Bは、PBSのみを注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46Cおよび46Dは、抗 NME7_{AB} 抗体5A1を注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46Eおよび46Fは、抗 NME7_{AB} 抗体4A3を注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46Gおよび46Hは、抗 NME7_{AB} 抗体5D4を注入した対照動物の全身IVIS写真を示す。図46A、46C、46E、および46Gは、全ての治療前7日目に取得したIVIS写真である。図46B、46

D、46F、および46Hは、抗NME7_{AB}抗体治療またはモック治療後31日目に取得したIVIS写真である。図から分かるように、PBS対照群中の動物は、全身IVIS写真で転移を示し(青色ドット)、一方、抗NME7_{AB}抗体で治療した動物は、転移を示さない。図46I~46Pは、殺後の動物から採取した肝臓および肺の写真およびIVIS写真を示す。図46I、46K、46M、および46Oは、通常の写真である。図46J、46L、46N、および46Pは、そこに転移した癌細胞を明らかにする、IVIS写真である。図から分かるように、抗NME7_{AB}抗体は、肝臓への転移を大きく抑制した。肝臓は、乳癌転移のための原発性部位である。図46Qは、対照動物とそれに対する治療動物から採取された肝臓についての、IVIS測定器による放出されカウントされた測定光子の棒グラフである。IVIS測定の挿入グラフから分かるように、肝臓への転移の抑制は、細胞が尾静脈に注入された場合、転移の順番に従い、これは、NME7_{AB}-MUC1*相互作用を分断できる効力の順番にも一致する。

10

【0148】

本発明者らは、多くの癌細胞株の免疫蛍光イメージングを実施して、培養癌細胞株がNME7_{AB}を発現するかどうかを決定した。図47A~47Fおよび48A~48Iが明確に示すように、本発明者らが試験した各MUC1陽性癌細胞株は、NME7_{AB}に対し陽性であり、その結合は膜性であり、癌細胞から分泌されるNME7_{AB}と一致し、その結果、それはMUC1*の細胞外ドメインに結合する。図47A~47Fは、種々の癌細胞株がNME7_{AB}の存在について染色される、免疫蛍光実験の写真を示す。図47Aは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したT47D乳癌細胞を示す。図47Bは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したZR-75-1乳癌細胞(1500sとしても知られる)を示す。図47Cは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したH1975非小細胞肺癌細胞を示す。図47Dは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したH292非小細胞肺癌細胞を示す。図47Eは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したHPAFII膵臓癌細胞を示す。図47Fは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色したDU145前立腺癌細胞を示す。図から分かるように、本発明者らが試験した全ての癌細胞株は、NME7_{AB}に対する強力な膜性染色を示す。これらの実験で使用したモノクローナル抗体は、5D4であった。並行して、NME7_{AB}抗体5A1および4A3を使って同じ細胞株を染色し、同じ結果を得た。

20

【0149】

図48A~48Iは、種々のヒト肺癌細胞株がNME7_{AB}の存在について染色される、免疫蛍光実験の写真を示す。図48A~48Cは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色した腺癌であるH1975非小細胞肺癌細胞を示す。図48Aは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイである。図48Bは、抗NME7_{AB}単独染色を示す。図48Cは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイの拡大図である。図48D~48Fは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色された、肺粘表皮癌であるH292非小細胞肺癌細胞を示す。図48Dは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイである。図48Eは、抗NME7_{AB}単独染色を示す。図48Fは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイの拡大図である。図48G~48Iは、種々の濃度の抗NME7_{AB}抗体5D4で染色された、転移性気管支肺胞上皮癌であるH358非小細胞肺癌細胞を示す。図48Gは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイである。図48Hは、抗NME7_{AB}単独染色を示す。図48Iは、DAPIおよび抗NME7_{AB}染色のオーバーレイの拡大図である。

30

40

【0150】

加えて、NME7_{AB}含有無血清培地中でのこれらの細胞株の培養は、それらの幹細胞および転移マーカーの発現をまたさらに高めた。特に、ここでは浮遊物と呼ばれる、非付着性になった細胞は、それらの付着性対応物よりもさらに高い幹細胞および転移マーカーの発現を有する。図49A~49Iは、NME7_{AB}中で培養の前後での癌細胞株:乳T47D、肺H1975、肺H358および膵臓HPAFIIのPCRグラフを示す。図49Aは、測定された乳癌転移マーカーCXCR4である。図49Bは、測定された幹細胞

50

マーカー O C T 4 である。図 4 9 C は、測定された転移マーカー A L D H 1 である。図 4 9 D は、測定された幹細胞マーカー S O X 2 である。図 4 9 E は、測定された幹細胞マーカー N A N O G である。図 4 9 F は、測定された転移マーカー C D H 1 (E - カドヘリンとしても知られる) である。図 4 9 G は、測定された転移マーカー C D 1 3 3 である。図 4 9 H は、測定された幹細胞マーカー Z E B 2 である。図 4 9 I は、測定された幹、癌および転移マーカー M U C 1 である。浮遊細胞 (腫瘍スフェアとしても知られる) は、独立に足場を増殖できるようになり、付着細胞より増加される転移マーカーを示す。癌幹細胞を注入された動物は、N M E 7 _{A B} 増殖浮遊細胞を注入された動物である。図から分かるように、転移マーカー、幹細胞マーカー、または上皮間葉転換 (E M T) のマーカーは、N M E 7 _{A B} 中での培養後に増大しており、より高い転移性状態への転換を示している。図 5 0 は、N M E 7 _{A B} を含む培養物中で 1 0 ~ 1 2 日後、1 0 , 0 0 0 個の H 3 5 8 肺癌親細胞または H 3 5 8 細胞を尾静脈に注入した N S G マウスの 6 日目の I V I S 写真を示す。図から分かるように、N M E 7 _{A B} 中で増殖された N C I - H 3 5 8 肺癌細胞は、其れ自体が転移性細胞であると報告されている親細胞に比べて、転移能を大きく高めた。ほんの 1 0 , 0 0 0 個の N C I - H 3 5 8 N M E 7 _{A B} 転移性癌幹細胞からの 6 日での転移の機能的増大は、図 4 9 と一致し、H 3 5 8 が N M E 7 _{A B} 中での培養後に転移マーカーの発現を大きく高めることを示す。

10

【 0 1 5 1 】

図 5 1 は、二量体 N M 2 3 - H 1 (N M E 1 としても知られる)、または N M E 7 _{A B} 中での培養における 2 または 3 継代の前後の M U C 1 陰性前立腺癌株 P C 3 の P C R グラフを示す。グラフは、幹細胞、癌細胞マーカーならびに転移マーカーの倍数差異を示す。図から分かるように、N M E 1 または N M E 7 _{A B} 中の反復培養は、幹、癌および転移マーカーの上方制御を誘導するが、また、M U C 1 の発現の 5 ~ 8 倍の上方制御ももたらす。

20

【 0 1 5 2 】

まとめると、これらのデータは、D M 1 0 ドメインを欠く N M E 7 が、癌細胞により選択され、タンデムリピートドメインを欠く M U C 1 の細胞外ドメインに結合し、その結果 N M E 7 が M U C 1 * 細胞外ドメインを二量体化し、これが増大された癌細胞増殖および癌細胞の転移能の増大をもたらすことを実証した。N M E 7 _{A B} と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の相互作用を分断する抗体が、癌細胞増殖を抑制し、癌転移を抑制し得ることは道理に適う。ここで、本発明者らは、N M E 7 _{A B} と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の相互作用を抑制する抗 N M E 7 _{A B} 抗体が実際に、癌細胞増殖および癌転移を抑制することを示した。したがって、抗 N M E 7 _{A B} 抗体は、癌の治療または予防のために、癌または転移と診断された患者、または癌または転移を発症するおそれのある患者に投与することになる。

30

【 0 1 5 3 】

N M E 1 は全ての細胞の細胞質中で発現され、かつロックアウトされると致命的であり、また重要なことに N M E 1 A ドメインは N M E 7 A ドメインに高い配列相同性を有するので、治療的使用のための抗 N M E 7 _{A B} 抗体は、N M E 7 _{A B} または N M E 7 - X 1 に結合するが、N M E 1 には結合しないことが重要である。本発明の一態様では、治療的使用に最適であると思われる抗体は、N M E 7 _{A B} または N M E 7 - X 1 に特有でありかつ N M E 1 配列中には存在しないペプチドに結合するそれらの能力のため選択された。図 6 ~ 図 9 は、N M E 7 _{A B} に特有のペプチドを列挙する。

40

【 0 1 5 4 】

好ましい実施形態では、癌または癌転移の治療または予防のために、患者への投与に好適な抗体は、N M E 7 B 3 ペプチドに結合する抗体群から選択される。さらに好ましい実施形態では、癌または癌転移の治療または予防のために、患者への投与に好適な抗体は、N M E 7 B 3 ペプチド、N M E 7 _{A B} に結合するが、N M E 1 には結合しない抗体群から選択される。インビトロおよびインビボでそのような抗癌活性および抗転移活性を実証した、癌または癌転移の治療または予防のための治療的使用に好適な抗体の例としては

50

、抗NME7抗体5A1、4A3および5D4が挙げられる。これらは例に過ぎず、本明細書で記載されたように生成された抗体および本明細書で記載されたように選択された抗体は、同じ抗癌および抗転移活性を有するであろう。このような抗体は、抗体の可変ドメインが抗体を模倣するタンパク質スキャホールド中に組み込まれている、scFvまたは抗体模倣物を含む完全抗体またはそのフラグメントであり得る。抗体は、マウス、ラクダ類、ラマ、ヒトまたはヒト化を含むヒトまたは非ヒト種であり得、モノクローナル、ポリクローナル、scFvまたはそのフラグメントであってよい。

【0155】

癌または転移の治療または予防のための抗NME7抗体は、多くの異なる治療フォーマットで使用できる。例えば、本明細書で記載のいずれかの抗体、またはそのフラグメントは、独立型抗体または抗体フラグメントとして、または抗体薬物複合体(ADC)などの毒素に結合されて、または二重特異性抗体中に組み込まれるかまたはBiTE(二重特異的T細胞エンゲージャー)中に組み込まれ、またはキメラ抗原受容体(CAR)に組み込むかまたはCARも発現する細胞により発現されるように操作されて、患者に投与できる。細胞は、免疫細胞、T細胞、NK細胞または幹細胞もしくは前駆細胞であってよく、これらはその後、T細胞またはNK細胞に分化され得る。

10

【0156】

本明細書で記載のいずれかの抗体、またはそのフラグメントは、癌または癌に対する感受性の指標であると思われる、NME7_{AB}またはNME7-X1の存在について体液、細胞、組織または身体検体を検出するための診断薬として使用できる。診断用の抗体は、イメージング剤、核酸タグに接続され、ラクダ類を含む任意の種であってよく、全身用途または、血液などの体液、細胞、もしくは組織、またはインビトロ、インビボで、または術中で使用できる。

20

【0157】

治療的に有用なまたは診断的に有用な抗NME7抗体の選択基準は、抗体が組み込まれる治療または診断のフォーマットまたは形式に依存する。抗体または抗体フラグメントが癌または癌転移の治療または予防のために、独立型薬剤として患者に投与される場合、抗体は、i) NME7_{AB}またはNME7-X1に結合するがNME1に結合しない；ii) PSMGFRペプチドに結合する；iii) N-10ペプチドに結合する；およびiv) NME7_{AB}またはNME7-X1と、MUC1*細胞外ドメインの間の相互作用、またはNME7_{AB}またはNME7-X1と、N-10の間の相互作用を分断する、その能力について選択される。抗体は、NME7_{B3}ペプチドへのその結合能力についても選択され得る。この治療フォーマットは、CARおよび選択された抗NME7抗体を発現するように操作されている細胞も包含する。

30

【0158】

他の形式は、抗NME7抗体のための他の選択基準を必要とする。抗NME7抗体がADC中に組み込まれる場合、ADCは、標的細胞の死滅を誘発するために、標的細胞により内部移行されなければならない。NME7_{AB}またはNME7-X1はMUC1*の細胞外ドメインに結合されることを想起されたい。抗体がMUC1*細胞外ドメインに対するNMEの結合を分断する場合には、毒素複合化抗体は内部移行され、細胞は死滅させられない。同様に、抗NME7抗体がCARまたはBiTE中に組み込まれる場合、NME7_{AB}またはNME7-X1間の相互作用は分断できない、または免疫細胞は最早、癌細胞に殺作用剤を向けることができないであろう。抗NME7抗体が診断薬として使われる場合、NME7_{AB}またはNME7-X1間の相互作用は分断できない、または抗体および関連標識は洗い流されるであろう。したがって、ADC、CAR-T、またはCAR-NK、BiTEまたは診断適用の場合、抗NME7抗体は、i) NME7_{AB}またはNME7-X1に結合するがNME1に結合しない；ii) PSMGFRペプチドに結合する；iii) N-10ペプチドに結合する；およびiv) MUC1*細胞外ドメインとの相互作用、またはNME7_{AB}またはNME7-X1と、N-10ペプチドの間の相互作用を分断することなく、NME7_{AB}またはNME7-X1に結合する、その能力について

40

50

選択される。抗体は、NME7 B3ペプチドへのその結合能力についても選択され得る。

【0159】

本発明の一態様では、細胞は、本発明の抗NME7_{AB}抗体またはそのフラグメントを発現するように操作される。細胞は、T細胞、NK細胞などの免疫細胞であってよく、または幹細胞もしくは前駆細胞であってよく、これらは、T細胞またはNK細胞などのより成熟した免疫細胞に分化され得る。好ましい実施形態では、抗NME7_{AB}抗体を発現するように操作される細胞はまた、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するようにも操作される。好ましい実施形態では、CARは、腫瘍関連抗原を認識する。好ましい実施形態では、CARはMUC1*を標的にする。より好ましい実施形態では、CARは、抗MUC1*抗体MNC2により腫瘍に向けられる。本発明の別の態様では、CARを発現するよ

10

【0160】

本発明の別の態様では、NME7_{AB}またはNME7-X1に特有のペプチドが、癌または癌転移に対し、ヒトに免疫またはワクチン接種するのに使用される物質中に組み込まれる。好ましい実施形態では、ペプチドは、NME7 B3ペプチドの全てまたは一部を含み、これは、Cys-14-Ser変異を有するNME7 B3ペプチドであってもよい。

20

【0161】

本発明の別の態様は、宿主動物中で抗NME7_{AB}抗体を生成する方法を含み、動物は、NME7 B3ペプチドで免疫される。好ましい実施形態では、NME7 B3ペプチドは、セリンに変異されたシステイン14を有し(配列番号169)で、NME7特異的抗体生成を抑制するジスルフィド結合の形成を回避する。

【0162】

本発明の別の態様は、細胞をNME7_{AB}またはNME7-X1と共に培養することを

30

含む、高められた転移能を有する細胞を生成する方法を含む。これらの細胞はその後、薬物発見の多くの態様で使用できる。

【0163】

本発明の別の態様は、抗NME7_{AB}またはNME7-X1を発現するようにも操作される細胞を含む。NME7_{AB}またはNME7-X1は、ヒト配列である。それらの発現は、誘導性であり得る。一態様では、細胞は卵であり、これは、ヒトNME7_{AB}またはNME7-X1を発現できる遺伝子導入動物であり得る動物へと成長する。

【0164】

NME7はMUC1*成長因子受容体の細胞外ドメインに結合し、それを二量体化する。組織研究は、MUC1*が、腫瘍悪性度および転移が増大するに伴い増加することを示す。ここで、本発明者らは、NME7発現が、腫瘍悪性度および転移が増大するに伴い増加することを示す(図39~図41)。ここで、本発明者らは、NME7とMUC1*の相互作用を抑制する抗体は、腫瘍増殖および転移を抑制することを示した。

40

【0165】

他のNMEファミリーメンバーは、MUC1*成長因子受容体の細胞外ドメインに結合し、それを二量体化し得る。例えば、本発明者らは、NME1、NME2およびNME6は二量体として存在すること、およびそれらはMUC1*細胞外ドメインに結合し、それらを二量体化することを示した。NME7_{AB}およびNME7-X1は、MUC1*細胞外ドメインに結合できる2つのドメインを有し、そのため、それらはモノマーとしてMUC1*成長因子受容体を二量体化し、活性化する。本発明者らはここで、抗NME7抗体

50

が癌および癌転移を抑制することを示した。同様に、これらの他のNMEタンパク質に結合する抗体または抗体模倣物は、癌または転移と診断された患者、または癌または転移を発症するおそれのある患者に投与できる、抗癌または抗転移治療薬であり得る。本発明の一態様では、癌または転移の治療のために治療的に使用できる抗体は、NME1、NME2、NME3、NME4、NME5、NME6、NME7、NME8、NME9またはNME10に結合する抗体である。本発明の一態様では、治療抗体または抗体模倣物は、NMEタンパク質およびその同族成長因子受容体の結合を抑制する。本発明の一態様では、治療抗体または抗体模倣物は、NMEタンパク質と、MUC1*の細胞外ドメインの相互作用を抑制する。本発明の別の態様では、治療抗体または抗体模倣物は、NME1、NME2、NME3、NME4、NME5、NME6、NME7、NME8、NME9またはNME10由来のペプチドに結合し、ペプチドはNME7 A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに相同である。

【0166】

下記は、NME7と他のNMEファミリーメンバーの間の相同性および同一性アラインメントを示す配列アラインメントである。下線または下線+太字の配列は、NME7ペプチドA1(配列番号141)、A2(配列番号142)、B1(配列番号143)、B2(配列番号144)またはB3(配列番号145)に対応する。

【0167】

ヌクレオシドニリン酸キナーゼ7アイソフォームa[ホモサピエンス](Hu_7)

【化3】

MNHSERFVFAIEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGVSVMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
 LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIN
KAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFNFELIQFITTGPIIAMEILRDDAI
CEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPS
 SGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVN
VEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHL
RPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

> NME2 理論的 pI / Mw : 8.52 / 17298.04

【化4】

MANLERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKGFRLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLKDRPFFPGLVKYMNSGPPVAMVWEGLNV
 VKTGRVMLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNIIHGSDSVKSAEKEISLWFKPEELVDYKSCAHDWVYE

グローバル/グローバル(N-W)スコア: 171; 155 aaオーバーラップ(1~131:1~152)中26.5%同一(56.8%類似)

【化5】

```

      10      20      30      40      50
7A  ----EKTALIKPDAISKA--GEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPF
      :... :..... :... :. :. :... :... :... :... :... :... :...
2   MANLERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKGFRLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLKDRPF
      10      20      30      40      50      60

      60      70      80      90      100     110
7A  FNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAA
      : :.....:..... :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.
2   FPGLVKYMNSGPPVAMVWEGLNVVKTGRVMLGETNPADSKPG---TIRGDFCIQVGRNII
      70      80      90      100     110

      120     130
7A  HGPDSFASAAREMELFF----- (SEQ ID NO:199)
      :: :: :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :.
2   HGSDSVKSAEKEISLWFKPEELVDYKSCAHDWVYE (SEQ ID NO:200)
      120     130     140     150

```

10

20

30

40

50

グローバル / グローバル (N - W) スコア : 1 0 4 ; 1 5 6 a a オーバーラップ (1 ~ 1 3 4 : 1 ~ 1 5 2) 中 2 4 . 4 % 同 ー (5 1 . 3 % 類 似)

【 化 6 】

```

              10      20      30      40      50
7B  NC----TCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVVEEFYEVYKGVVI
      :  ::  :::::.....  ...  ::::  ::::  ..  ....  :  :
2   MANLERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKGFRLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLKDR-P
              10      20      30      40      50

              60      70      80      90      100     110
7B  EYHDMVTIEMYSGPCVAMEIQONNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA
      .  .:  :  :::  :::  .  :::::  :  .  :  :::  ..  :::::  :  .:
2   FFPGLVKYMNSGPVVAMVWVWEGLVVVKTRVMLGETNPADSK---PGTIRGDFCIQVGRNI
60      70      80      90      100     110

              120     130
7B  VHCTDLPEDGLLEVQYFF----- (SEQ ID NO:201)
      .:  .:  ...  :..  .:
2   IHGSDSVKSAAEKEISLWFKPEELVDYKSCAHDWVYE (SEQ ID NO:202)
              120     130     140     150

```

10

> N M E 3 理論的 p I / M w : 5 . 9 6 / 1 9 0 8 8 . 9 7

【 化 7 】

20

**MICLVLTIFANLFPSAYSGVNERTFLAVKPDGVQRRLVGEIVRRFERKGFKLVALKLVQASEELLREHYVELRERPFYSRLVK
 YMGSGPVVAMVWVWQGLDVVRASRALIGATDPGDATPGTIRGDFCVEVGKQVNIHGSDSVESAQREIALWRFREDELLCWEDSAGHW
 LYE**

```

              10      20      30      40      50
7A  EKTALIKPDAISK--AGEIIEIINKAGFTITKMKMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNEL
      :..  :::::.....  ::::  ..  ::::  ...  .  .:  :::::
3   ERTFLAVKPDGVQRRLVGEIVRRFERKGFKLVALKLVQASEELLREHYVELRERPFYSRL
              30      40      50      60      70      80

              60      70      80      90      100     110
7A  IQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNSGVARTDASE-SIRALFGTDGIRNAHGP
      ....  :::::.....  ...  .  :::  ..  :  :::  :::::  :  ..  .:  ::
3   VKYMGSGPVVAMVWVWQGLDVVRASRALIGATDPG----DATPGTIRGDFCVEVGKQVNIHGS
              90      100     110     120     130

```

30

40

50

```

120      130
7A  DSFASAAREMELFF (SEQ ID NO:203)
     :: :: :. ::
3    DSVESAQREIALWF (SEQ ID NO:204)
     140      150

```

```

                           10      20      30
7B  N-C-----TCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNM
     :           :   :: :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :
3    MICLVLTIFANLFPSAYSGVNERTFLAVKPDGVQRRVGEIVRRFERKGFKLVALKLVQA
     10      20      30      40      50      60

100      110      120      130
7B  DRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQONNATKTFREFCGPADPEIARHL
     .. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :
3    SEELLREHY-VELRERPFYSRLVKYMGSGPVVAMVWQGLDVVRASRALIGATDPGDAT--
     70      80      90      100     110

```

10

```

100      110      120      130
7B  RPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF----- (SEQ ID NO:205)
     :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :
3    -PGTIRGDFCVEVGKNVIHGSDSVESAQREIALWRFREDELLCWEDSAGHWLYE (SEQ ID NO:206)
     120     130     140     150     160

```

> NME4 理論的 pI / Mw : 10.30 / 20658.59

20

【化8】

**MGGLFWRSAALRGLRCGPRAPGPSLLVRHSGGSPSWTRERTLVAVKPDGVQRRVGDVQRFERRGFTLVGMKMLQAPESVLAE
HYQDLRRKPFYPALIRYMSSGPVVAMVWEGYNVVRASRAMIGHTDSAEAAPGTIRGDFSVHISRNVIHASDSVEGAQREIQLW
FQSSELVSWADGGQHSSIHPA**

133 a a オーバーラップ (1 ~ 131 : 56 ~ 185) 中 29.3% 同一 (68.4% 類似)

【化9】

```

              10      20      30      40      50
7A  EKTALIKPDAISK--AGEIIEIINKAGFTITKMKMMMLSRKEALDFHVDHQSSRPFNFEL
     :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :
4  ERTLVAVKPDGVQRRVGDVQRFERRGFTLVGMKMLQAPESVLAEHYQDLRRKPFYPAL
     60      70      80      90      100     110

60      70      80      90      100     110
7A  IQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
     :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :. :
4  IRYMSSGPVVAMVWEGYNVVRASRAMIGHTDSAEA---APGTIRGDFSVHISRNVIHASD
     120     130     140     150     160     170

```

30

```

120      130
7A  SFASAAREMELFF (SEQ ID NO:207)
     :   :. :. :. :. :
4  SVEGAQREIQLWF (SEQ ID NO:208)
     180

```

40

132 a a オーバーラップ (3 ~ 134 : 40 ~ 167) 中 28.8% 同一 (56.8% 類似)

【化 1 0】

```

      10      20      30      40      50      60
7B   TCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMV
      :   :: . . . . . : : . . . . . . . : : . . . . . : . .
4    TLVAVKPDGVRRLVGDVIQRFERRGFTLVGMKMLQAPESVLAEHYQDLRRK-PFYPALI
      40      50      60      70      80      90

```

```

      70      80      90      100     110     120
7B   TEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDL
      :   :: : : : . : . . . . : . : . : : : : : : : : : : : : : :
4    RYMSSGPVVAMVWEGYNVVRASRAMIGHTDSAEAA---PGTIRGDFSVHISRNVIHASDS
      100     110     120     130     140     150

```

10

```

      130
7B   PEDGLLEVQYFF (SEQ ID NO:209)
      : . : : : :
4    VEGAQREIQLWF (SEQ ID NO:210)
      160

```

> NME5 理論的 pI / Mw : 6 . 0 8 / 2 9 2 9 6 . 2 3

【化 1 1】

```

MEISMPPQIYVEKTLAIKPDIVDKEEEIQDIILRSGFTIVQRRKLRLSPEQCSNFYVEKYGKMFFPNLTAYMSSGPLVAMI
LARHKAI SYWLELLGPNNSLVAKETHPDSLRAIYGTDDLRLNALHGSNDFAAAEREIRFMFPEVIVEPIPIGQAADYLNHIM
PTLLEGLTELCKQKPADPLFWYMCRRREHWTLRSILLVCMMSGIRMSLPHCADYCSFVEGFEIWLADWLLKNNPNKPKLCHHP I
VEEY

```

20

1 3 1 a a オーバーラップ (1 ~ 1 3 1 : 1 3 ~ 1 4 3) 中 4 4 . 3 % 同 一 (7 4 . 8 % 類似)

【化 1 2】

```

      10      20      30      40      50      60
7A   EKTALAIKPDIAISKAGEIIEIINKAGFTITKLMMLLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQ
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
5    EKTALAIKPDIVDKEEEIQDIILRSGFTIVQRRKLRLSPEQCSNFYVEKYGKMFFPNLTA
      20      30      40      50      60      70

```

```

      70      80      90      100     110     120
7A   FITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSE
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
5    YMSSGPLVAMILARHKAI SYWLELLGPNNSLVAKETHPDSLRAIYGTDDLRLNALHGSNDF
      80      90      100     110     120     130

```

30

```

      130
7A   ASAAREMELFF (SEQ ID NO:211)
      : : : : : :
5    AAAEREIRFMF (SEQ ID NO:212)
      140

```

1 3 2 a a オーバーラップ (3 ~ 1 3 4 : 1 5 ~ 1 4 3) 中 2 8 . 0 % 同 一 (5 8 . 3 % 類似)

40

【化 1 3】

```

      10      20      30      40      50      60
7B  TCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMV
   : : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : :
5  TLAIKPDIVDKEE--EIQDIILRSQFTIVQRRKLRSLPEQCSNFY-VEKYGKMFFPNTL
      20      30      40      50      60      70

      70      80      90      100     110     120
7B  TEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDL
   . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : : . : : : :
5  AYMSSGPLVAMILARHKAI SYWLELLGPNNSLVAKETHPDSLRAIYGTDDLRLNALHGSND
      80      90      100     110     120     130

      130
7B  PEDGLLEVQYFF (SEQ ID NO:213)
   . : : : :
5  FAAAEREIRFMF (SEQ ID NO:214)
      140

```

10

> NME6 理論的 pI / Mw : 7.81 / 22003.16

【化 1 4】

```

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQIILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEF
MASGPIRAYILAHKDAIQLWRITLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEE
PQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGGLGPA

```

20

133 a a オーラップ (3 ~ 131 : 22 ~ 153) 中 37.6% 同一 (68.4% 類似)

【化 1 5】

```

      10      20      30      40      50
7A  TLALIKPDAISKAGEIIEIINKA----GFTITKMKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNEL
   : : : : : . : : . : : : : : : . : : . : : . : : : : . : : : :
6  TLALIKPDAVAHP-LILEAVHQIILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
      30      40      50      60      70      80

      60      70      80      90      100     110
7A  IQFITGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
   . : : : : . : : . : : : : . : : . : : . : : . : : . : : . : :
6  VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRITLMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDRNTTHGSD
      90      100     110     120     130     140

      120     130
7A  SFASAAREMELFF (SEQ ID NO:215)
   : : : : : . : :
6  SVVSASREIAAFF (SEQ ID NO:216)
      150

```

30

133 a a オーラップ (3 ~ 134 : 22 ~ 153) 中 29.3% 同一 (57.9% 類似)

40

50

【化 1 6】

```

      10      20      30      40      50      60
7B  TCCIVKPHAVSEGL-LGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDM
   :  . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . .
6   TLALIKPDAVAHPLILEAVHQIILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF-YQRL
      30      40      50      60      70      80

      70      80      90      100     110     120
7B  VTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTD
   :  : : : : . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . .
6   VEFMASGPIRVMILAHKDAIQLWRILMGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLIDTRNTHGSD
      90      100     110     120     130     140

      130
7B  LPEDGLLEVQYFF (SEQ ID NO:217)
   . . : . : :
6   SVVSASREIAAFF (SEQ ID NO:218)
      150

```

10

> N M E 8 理論的 p I / M w : 4 . 9 0 / 6 7 2 6 9 . 9 4

【化 1 7】

```

MASKKREVQLQTVINNQSLWDEMLQNKGLTVIDVYQAWCGPCRAMQPLFRKLNELNEDEILHFAVAEADNIVTLQPFPRDKCE
PVFLFSVNGKIIIEKIQGANAPLVNKKVINLIDEERKIAAGEMARPYEIPLVSDSEVSEESPCESVQELYSIAI IKPDAVI
SKKVLEIKRKITKAGFIIIEAEHKTVLTEEQVVNFYSRIADQCDFEEFVSFMTSGLSYILVVSQGSKHNPPSEETEPQTDTEPN
ERSEDQPEVEAQVTPGMMKNKQDSLQEYLERQHLAQLCDIEEDAANVAKFMDAFFPDFKMKMSMKLEKTLALLRPNLFHERKD
DVLRI IKDEDFKILEQRQVVLSEKEAQALCKEYENEDYFNKLIENMTSGPSLALVLLRDNGLQYWKQLLGPRTVEEAIEYFPE
SLCAQFAMDSLFPVNQLYGSDSLTAEREIQHFFPLQSTLGLIKPHATSEQREQILKIVKEAGFDLTQVKKMFLTPEQIEKIYP
KVTGKDFYKDLLEMLSVGP SMVMILTKWNAVAEWRRMLMGPTDPEEAKLLSPDSIRAQFGISKLNIVHGASNAYEAKEVVNRL
FEDPEEN

```

20

1 3 3 a a オーバーラップ (1 ~ 1 3 1 : 3 1 6 ~ 4 4 8) 中 3 6 . 1 % 同 一 (6 9 . 2 % 類 似)

【化 1 8】

```

      10      20      30      40      50
7A  EKTALIKPDAIS-KAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELI
   : : : : : . . . . . : : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . . : . . . .
8   EKTALLRPNLFHERKDDVLRI IKDEDFKILEQRQVVLSEKEAQALCKEYENEDYFNKLI
      320     330     340     350     360     370

      60      70      80      90      100     110
7A  QFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNSGVARTDASESIRALFGTDGIR-NAAHGPD
   . . . . . : . . . . . : : : : . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
8   ENMTSGPSLALVLLRDNGLQYWKQLLGPRTVEEAIEYFPESLCAQFAMDSLFPVNQLYGS
      380     390     400     410     420     430

      120     130
7A  SFASAAREMELFF (SEQ ID NO:219)
   . . : . : : : :
8   SLETAEREIQHFF (SEQ ID NO:220)
      440

```

30

40

Waterman - Egger tスコア : 2 6 9 ; 8 5 . 9 ビット ; E (1) < 1 . 1 e - 2 1

1 2 8 a a オーバーラップ (1 ~ 1 2 7 : 4 5 1 ~ 5 7 7) 中 3 3 . 6 % 同 一 (7 2 . 7 % 類 似)

50

【化 1 9】

```

      10      20      30      40      50
7A  EKTLLALIKPDAISKAGE-IIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELI
      ..... : : . : ..... : ..... : ..... : ..... : .....
8   QSTLGLIKPHATSEQRE-QILKIVKEAGFDLTQVKKMFLTPEQIEKIYPKVTGKDFYKDLL
      460      470      480      490      500      510

      60      70      80      90      100     110
7A  QFITTGPPIAMEILRDDAICEWKRLGFPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
      ..... : . . . . : ..... : . . . . : . . . . : . . . . : . . . .
8   EMLSVGSPSMVLMILTKWNAVAEWRRLMGPTDPEEAKLLSPDSIRAQFGISKLNIVHGAS
      520      530      540      550      560      570

120
7A  FASAAREM (SEQ ID NO:221)
      : : : .
8   -AYEAKEV (SEQ ID NO:222)

```

10

Waterman - Egger tスコア : 119 ; 40 . 4ビット ; E (1) < 5 . 3 e - 0 8

65aaオーバーラップ (3 ~ 65 : 156 ~ 220) 中 33 . 8 % 同一 (73 . 8 % 類似)

【化 2 0】

```

      10      20      30      40      50      60
7A  TLALIKPDAI--SKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQ
      ..... : . : . : ..... : . . . . . : . . . . . : .....
8   SIAIIPDAVISKKVLEIKRKITKAGFIIIEAEHKTVLTEEQVVFYSRIADQCDFEEFVS
      160      170      180      190      200      210

7A  FITTG (SEQ ID NO:223)

      : : : .
8   FMTSG (SEQ ID NO:224)
      220

```

20

116aaオーバーラップ (3 ~ 118 : 453 ~ 566) 中 33 . 6 % 同一 (65 . 5 % 類似)

【化 2 1】

33.6% identity (65.5% similar) in 116 aa overlap (3-118:453-566)

```

      10      20      30      40      50      60
7B  TCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMV
      : ..... : . : . : ..... : . . . . . : ..... : .....
8   TLGLIKPHATSEQRE-QILKIVKEAGFDLTQVKKMFLTPEQIEKIYPKVTGK-DFYKDLL
      460      470      480      490      500      510

      70      80      90      100     110
7B  TEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTIQNAVH (SEQ ID
NO:225)
      . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
8   EMLSVGSPSMVLMILTKWNAVAEWRRLMGPTDPEEAKLLSPDSIRAQFGISKLNIVH (SEQ ID
NO:226)
      520      530      540      550      560

```

30

40

Waterman - Egger tスコア : 128 ; 41 . 3ビット ; E (1) < 2 . 9 e - 0 8

116aaオーバーラップ (20 ~ 134 : 334 ~ 448) 中 22 . 3 % 同一 (60 . 3 % 類似)

50

【化 2 2】

```

20      30      40      50      60      70
7B      ILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNN
      .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:
8      VLRIIKDEDFKILEQRQVVLSEKEAQAALCKEYENE-DYFNKLIENMTSGPSLALVLLRDN
      340      350      360      370      380      390

80      90      100     110     120     130
7B      ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQ-NAVHCTDLPEDGLLEVQYFF (SEQ ID
NO:227)
      . . . . . : : : : : . . . . . : : : : : . . . . . : : : : :
8      GLQYWKQLLGPRTVEEAIEYFPESLCAQFAMDSLQVNLVYSDSLETAEREIQHFF (SEQ ID
NO:228)
      400      410      420      430      440

```

10

> - - Waterman - Egger tスコア : 76 ; 26.4ビット ; (E (1) < 0 . 00088
111aaオーバーラップ (6 ~ 105 : 159 ~ 268) 中 23.4% 同一 (46.8% 類似)

【化 2 3】

```

10      20      30      40      50      60
7B      IVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEM
      : : : : : . : : : : : : . . . : : : . . . . . :
8      IIKPDAVISKKVLKIKRKITKAGFIEAEHKTIVLTEEQVVNFYSRIADQC-DFEEFVSFM
160      170      180      190      200      210

70      80      90      100
7B      YSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPA-----DPEIARHLRPGTLR (SEQ ID NO:229)
      : : . . . . . : : : : : . . . . . : : : : :
8      TSGLSYILVVSQGSKHNPPEETEPQTDTEPNERSEDQPEVEAQVTPGMMK (SEQ ID NO:230)
220      230      240      250      260

```

20

> N M E 9

【化 2 4】

```

MLSSKGLTVVDVYQGWCGPCKPVVSLFQKMRIEVLGDLHFAAEADRLDVLEKYRGKCE
PTFLFYAIKDEALSDEDECVSHGKNGEDEDVSSERTCTLAIKPDVAHAGKTDEIIMK
IQEAGFEILTNEERTMTEAEVRLFYQHKAGESPSSVRHRNALQCRPWKPGQRR (SEQ ID NO:231)

```

30

46aaオーバーラップ (3 ~ 46 : 100 ~ 145) 中 41.3% 同一 (67.4% 類似)

【化 2 5】

```

10      20      30      40
7A      TLAIKPDVAIS--KAGEIIEIINKAGFTITKMKMMLSRKEALDFH
      : : : : : . : : : : : : : : : : . . . : : : . :
9      TLAIKPDVAHAGKTDEIIMKIQEAGFEILTNEERTMTEAEVRLFY
100      110      120      130      140

```

40

> - - Waterman - Egger tスコア : 30 ; 13.5ビット ; (E (1) < 0 . 85
14aaオーバーラップ (69 ~ 82 : 100 ~ 113) 中 28.6% 同一 (71.4% 類似)

【化 2 6】

```

70      80
7A      AMEILRDDAICEWK (SEQ ID NO:232)
      . . . . . : : : : :
9      TLAIKPDVAHAGK (SEQ ID NO:233)
100      110

```

50

> - - Waterman - Egger tスコア : 29 ; 13 . 2ビット ; (E (1) < 0 . 91

31aaオーバーラップ (12 ~ 42 : 121 ~ 149) 中 25 . 8 % 同一 (74 . 2 % 類似)

【化27】

```

          20          30          40
7A  ISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEA (SEQ ID NO:234)
      :...: :...: :...: :...:
9   IQEAG--FEILTNEERTMTEAEVRLFYQHKA (SEQ ID NO:235)
          130          140

```

10

53aaオーバーラップ (1 ~ 53 : 98 ~ 150) 中 39 . 6 % 同一 (69 . 8 % 類似)

【化28】

```

          10          20          30          40          50
7B  NCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKG (SEQ ID NO:236)
      .:. :...: :...: :...: :...: :...: :...: :...: :...:
9   TCTLAIKPDVAHAGKTDEIIMKIQEAGFEILTNEERTMTEAEVRLFYQHKA (SEQ ID NO:237)
          100          110          120          130          140          150

```

> NME10 NP__008846 . 2タンパク質XRP2 [ホモサピエンス]

【化29】

20

```

MGCFFSKRRKADKESRPENEEERPQYSWDQREKVDPKDYMFSGLKDETVGRLPGTVAGQQFLIQDCENC
NIYIFDHSATVTIDDCINCIIFLGPVKGSVFFRNCRDCKCTLACQQFRVRDCRKLEVLCCATQPIIESS
SNIKFGCFQWYYPELAFQFKDAGLSIFNNTWSNIHDFTPVSGELNWSLLPEDAVVQDYVPIPTTEELKAV
RVSTEANRSIVPISRQQRQKSSDESCLVVLVAFAGDYTIANARKLIDEMVGKGFLLVQTKEVSMKAEDAQRV
FREKAPDFLPLLNGKPVIALEFNGDGAVEVCQLIVNEIFNGTKMFVSESKETASGDVDSFYNFADIQMG I (SEQ
ID NO:238)

```

68aaオーバーラップ (11 ~ 78 : 246 ~ 308) 中 23 . 5 % 同一 (66 . 2 % 類似)

【化30】

```

          20          30          40          50          60          70
7A  AISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAM
      .:. :...: :...: :...: :...: :...: :...: :...: :...:
10  TIANARKLIDEMVGKGFLLVQTKEVSMKAEDAQ--RVFREKAP---DFLPLLNGKPVIAL
          250          260          270          280          290          300

```

30

```

7A  EILRDDAI (SEQ ID NO:239)
      :. :..
10  EFNGDGAV (SEQ ID NO:240)

```

> Waterman - Egger tスコア : 35 ; 15 . 1ビット ; (E (1) < 0 . 73

45aaオーバーラップ (66 ~ 108 : 200 ~ 244) 中 28 . 9 % 同一 (57 . 8 % 類似)

40

【化31】

```

          70          80          90          100
7A  PIIAMEILRDDAIC-EWKRLGPPANSGVARTDASES-IRALFGTD (SEQ ID NO:241)
      :. :...: :...: :...: :...: :...: :...: :...:
10  PIPTTEELKAVRVSTEANRSIVPISRQQRQKSSDESCLVVLVAFAGD (SEQ ID NO:242)
          200          210          220          230          240

```

> - - Waterman - Egger tスコア : 33 ; 14 . 4ビット ; (E (1) < 0 . 87

75aaオーバーラップ (7 ~ 80 : 35 ~ 109) 中 14 . 7 % 同一 (52 . 0 % 類似)

50

)

【化32】

```

      10      20      30      40      50      60
7A    IKPDAISKAGEIIEIINKAGFTIITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQ-FITTG
      . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
10    VDPKDYMFSGLKDETVGRLPGTVAGQQFLIQDCENCNIYIFDHSATVTIDDCTNCIIFLG
      40      50      60      70      80      90

      70      80
7A    PIIAMEILRDDAICE (SEQ ID NO:243)
      . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
10    FVKGSVFFRNCRDCK (SEQ ID NO:244)
      100

```

10

> - - Waterman - Egger tスコア : 45 ; 17.5ビット ; (E (1) < 0 . 22
 51aaオーバーラップ (4 ~ 50 : 130 ~ 180) 中 21.6% 同一 (58.8% 類似)

【化33】

```

      10      20      30      40      50
7B    CCIVKP--HAVSEGLLGKILMAIRDAGFEI--SAMQMFNMDRVNVEEFYEV (SEQ ID NO:245)
      :: ..: . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . : . :
10    CCATQPIIESSNIKFGCFQWYYPELAFQFKDAGLSIFNNTWSNIHDFTPV (SEQ ID NO:246)
      130      140      150      160      170      180

```

20

【0168】

一例として、NME7に相同なペプチド(「相同ペプチド」、特に、A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに相同なペプチドに結合する抗体または抗体模倣物は、癌または癌転移と診断された患者、または癌または癌転移を発症するおそれのある患者に投与され得る。

【0169】

A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに相同なペプチド

A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに相同なペプチドは、限定されないが、下記を含み得る：

30

NME2A1
 (アミノ酸)

RASEEHLKQH YIDLKD (配列番号247)

【0170】

NME2A2
 (アミノ酸)

PADSKPGT (配列番号248)

【0171】

NME2B1
 (アミノ酸)

40

QKGFRLVAMKFLRASEEHLK (配列番号249)

【0172】

NME2B2
 (アミノ酸)

IDLKDRPFPGLVKY (配列番号250)

【0173】

NME2B3
 (アミノ酸)

GDFCIQVGRNI IHGSDSVKSAEKEISLWF (配列番号251)

50

【 0 1 7 4 】	
N M E 3 A 1	
(ア ミ ノ 酸)	
Q A S E E L L R E H Y V E L R E (配 列 番 号 2 5 2)	
【 0 1 7 5 】	
N M E 3 A 1	
(ア ミ ノ 酸)	
P G D A T P G T (配 列 番 号 2 5 3)	
【 0 1 7 6 】	
N M E 3 B 1	10
(ア ミ ノ 酸)	
R K G F K L V A L K L V Q A S E E L L R (配 列 番 号 2 5 4)	
【 0 1 7 7 】	
N M E 3 B 2	
(ア ミ ノ 酸)	
V E L R E R P F Y S R L V K Y (配 列 番 号 2 5 5)	
【 0 1 7 8 】	
N M E 3 B 3	
(ア ミ ノ 酸)	
G D F C V E V G K N V I H G S D S V E S A Q R E I A L W F (配 列 番 号 2 5 6)	20
【 0 1 7 9 】	
N M E 4 A 1	
(ア ミ ノ 酸)	
Q A P E S V L A E H Y Q D L R R (配 列 番 号 2 5 7)	
【 0 1 8 0 】	
N M E 4 A 2	
(ア ミ ノ 酸)	
S A E A A P G T (配 列 番 号 2 5 8)	
【 0 1 8 1 】	
(ア ミ ノ 酸)	30
R R G F T L V G M K M L Q A P E S V L A (配 列 番 号 2 5 9)	
【 0 1 8 2 】	
N M E 4 B 2	
(ア ミ ノ 酸)	
Q D L R R K P F Y P A L I R Y (配 列 番 号 2 6 0)	
【 0 1 8 3 】	
N M E 4 B 3	
(ア ミ ノ 酸)	
G D F S V H I S R N V I H A S D S V E G A Q R E I Q L W F (配 列 番 号 2 6 1)	
【 0 1 8 4 】	
N M E 5 A 1	40
(ア ミ ノ 酸)	
R L S P E Q C S N F Y V E K Y G (配 列 番 号 2 6 2)	
【 0 1 8 5 】	
N M E 5 A 2	
(ア ミ ノ 酸)	
S L V A K E T H P D S (配 列 番 号 2 6 3)	
【 0 1 8 6 】	
N M E 5 B 1	
(ア ミ ノ 酸)	50

R S G F T I V Q R R K L R L S P E Q C S (配列番号 2 6 4)	
【 0 1 8 7 】	
N M E 5 B 2	
(アミノ酸)	
V E K Y G K M F F P N L T A Y (配列番号 2 6 5)	
【 0 1 8 8 】	
N M E 5 B 3	
(アミノ酸)	
A I Y G T D D L R N A L H G S N D F A A A E R E I R F M F (配列番号 2 6 6)	
【 0 1 8 9 】	10
N M E 6 A 1	
(アミノ酸)	
L W R K E D C Q R F Y R E H E G (配列番号 2 6 7)	
【 0 1 9 0 】	
N M E 6 A 2	
(アミノ酸)	
V F R A R H V A P D S (配列番号 2 6 8)	
【 0 1 9 1 】	
N M E 6 B 1	
(アミノ酸)	20
S N K F L I V R M R E L L W R K E D C Q (配列番号 2 6 9)	
【 0 1 9 2 】	
N M E 6 B 2	
(アミノ酸)	
R E H E G R F F Y Q R L V E F (配列番号 2 7 0)	
【 0 1 9 3 】	
N M E 6 B 3	
(アミノ酸)	
G S F G L T D T R N T T H G S D S V V S A S R E I A A F F (配列番号 2 7 1)	
【 0 1 9 4 】	30
N M E 8 A 1	
(アミノ酸)	
V L S E K E A Q A L C K E Y E N (配列番号 2 7 2)	
【 0 1 9 5 】	
N M E 8 A 2	
(アミノ酸)	
V E E A I E Y F P E S (配列番号 2 7 3)	
【 0 1 9 6 】	
N M E 8 A 3	
(アミノ酸)	40
F L T P E Q I E K I Y P K V T G (配列番号 2 7 4)	
【 0 1 9 7 】	
N M E 8 A 4	
(アミノ酸)	
P E E A K L L S P D S (配列番号 2 7 5)	
【 0 1 9 8 】	
N M E 8 A 5	
(アミノ酸)	
V L T E E Q V V N F Y S R I A D (配列番号 2 7 6)	
【 0 1 9 9 】	50

NME 8 B 1 (アミノ酸)	
EAGFDLTQVKKMFLTPEQIE (配列番号 277)	
【0200】	
NME 8 B 2 (アミノ酸)	
PKVTGKDFYKDLLEM (配列番号 278)	
【0201】	
NME 8 B 3 (アミノ酸)	10
AQFGISKLNKNI V H (配列番号 279)	
【0202】	
NME 8 B 4 (アミノ酸)	
DEDFKILEQRQVVLSEKEAQ (配列番号 280)	
【0203】	
NME 8 B 5 (アミノ酸)	
KEYENEDYFNKLIEN (配列番号 281)	
【0204】	20
NME 8 B 6 (アミノ酸)	
AQFAMDSL P V N Q L Y G S D S L E T A E R E I Q H F F (配列番号 282)	
【0205】	
NME 8 B 7 (アミノ酸)	
KAGFIIIEAEHKTVLTEEQVV (配列番号 283)	
【0206】	
NME 8 B 8 (アミノ酸)	30
SRIADQCDFEEFVSF (配列番号 284)	
【0207】	
NME 9 A 1 (アミノ酸)	
TMTEAEVRLFY (配列番号 285)	
【0208】	
NME 9 B 1 (アミノ酸)	
EAGFEILTNEERTMTEAEVR (配列番号 286)	
【0209】	40
NME 10 A 1 (アミノ酸)	
SMKAEDAQRVFREK (配列番号 287)	
【0210】	
NME 10 A 2 (アミノ酸)	
GQRQKSSDES (配列番号 288)	
【0211】	
NME 10 A 3 (アミノ酸)	50

I Q D C E N C N I Y I F D H S A (配列番号 2 8 9)

【 0 2 1 2 】

N M E 1 0 B 1

E L A F Q F K D A G L S I F N N T W S N I H (配列番号 2 9 0)

【 0 2 1 3 】

いくつかの事例では、他の N M E タンパク質由来のペプチドは、フレームを移動させることにより、または伸長ペプチドが癌または癌転移を抑制する抗体を生じさせる N M E 7 ペプチドにより相同になるように N M E 7 ペプチドを伸長することにより、N M E 7 A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 ペプチドにより相同にできる。別の例として、N M E 7 に相同な伸長ペプチド(「伸長ペプチド」)に結合する抗体または抗体模倣物は、癌または癌転移と診断された患者、または癌または癌転移を発症するおそれのある患者に投与され得る。

10

【 0 2 1 4 】

A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 ペプチドに相同な伸長ペプチド

【 0 2 1 5 】

伸長ペプチドである A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 ペプチドに相同なペプチドは、限定されないが、次記を含み得る：

【 0 2 1 6 】

N M E 2 A 1

(アミノ酸)

20

R A S E E H L K Q H Y I D L K D R P F F P G L (配列番号 2 9 1)

【 0 2 1 7 】

N M E 2 A 2

(アミノ酸)

L G E T N P A D S K P G T I R G D F (配列番号 2 9 2)

【 0 2 1 8 】

N M E 2 B 1

(アミノ酸)

G L V G E I I K R F E Q K G F R L V A M K F L R A S E E H L K Q H Y (配列番号 2 9 3)

30

【 0 2 1 9 】

N M E 2 B 2

(アミノ酸)

Y I D L K D R P F F P G L V K Y M N S G P V V A M (配列番号 2 9 4)

【 0 2 2 0 】

N M E 2 B 3

(アミノ酸)

P G T I R G D F C I Q V G R N I I H G S D S V K S A E K E I S L W F (配列番号 2 9 5)

【 0 2 2 1 】

N M E 3 A 1

(アミノ酸)

40

L K L V Q A S E E L L R E H Y V E L R E R P F Y S R L (配列番号 2 9 6)

【 0 2 2 2 】

N M E 3 A 1

(アミノ酸)

L I G A T D P G D A T P G T I R G D F (配列番号 2 9 7)

【 0 2 2 3 】

N M E 3 B 1

(アミノ酸)

50

LVGEIVRRFERKGFKLVALKLVQASEELLRE (配列番号 298)
 【0224】
 NME3B2
 (アミノ酸)
 EHY-VELRERPFFYSRLVKYMGSGPVVAM (配列番号 299)
 【0225】
 (アミノ酸)
 PGTIRGDFCVEVGKNVIHGSDSVESAQREIALWF (配列番号 300)
 【0226】 10
 NME4A1
 (アミノ酸)
 GFTLVGMKMLQAPESVLAEHYQDLRRKPF (配列番号 301)
 【0227】
 NME4A2
 (アミノ酸)
 GHTDSAEAAPGTIRGDF (配列番号 302)
 【0228】
 NME4B1 20
 (アミノ酸)
 LVGDVIQRFERRGFTLVGMKMLQAPESVLAEHY (配列番号 303)
 【0229】
 NME4B2
 (アミノ酸)
 EHYQDLRRKPFYPALIRYMSSGPVVAM (配列番号 304)
 【0230】
 NME4B3
 (アミノ酸)
 PGTIRGDFSVHISRNVIHASDSVEGAQREIQ LWF (配列番号 305) 30
 【0231】
 NME5A1
 (アミノ酸)
 GFTIVQRRKLR L S P E Q C S N F Y V E K Y G K M F F (配列番号 306)
 【0232】
 NME5A2
 (アミノ酸)
 LLGPNNSLVAKETHPDSLRAIYGTD (配列番号 307)
 【0233】 40
 NME5B1
 (アミノ酸)
 IQDII L R S G F T I V Q R R K L R L S P E Q C S N F Y (配列番号 308)
 【0234】
 NME5B2
 (アミノ酸)
 FYVEKYGKMFFPNLTAYMSSGPLVAM (配列番号 309)
 【0235】
 NME5B3 50
 (アミノ酸)

P D S L R A I Y G T D D L R N A L H G S N D F A A A E R E I R F M F (配列番号 3
1 0)
【 0 2 3 6 】
N M E 6 A 1
(アミノ酸)
F L I V R M R E L L W R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L (配列番号 3 1 1
)
【 0 2 3 7 】
N M E 6 A 2
(アミノ酸) 10
L M G P T R V F R A R H V A P D S I R G S F G (配列番号 3 1 2)
【 0 2 3 8 】
N M E 6 B 1
(アミノ酸)
I L S N K F L I V R M R E L L W R K E D C Q R F Y (配列番号 3 1 3)
【 0 2 3 9 】
N M E 6 B 2
(アミノ酸)
F Y R E H E G R F F Y Q R L V E F M A S G P I R A (配列番号 3 1 4)
【 0 2 4 0 】 20
N M E 6 B 3
(アミノ酸)
A R H V A P D S I R G S F G L T D T R N T T H G S D S V V S A S R E I A A F F (配列番号 3 1 5)
【 0 2 4 1 】
N M E 8 A 1
(アミノ酸)
F K I L E Q R Q V V L S E K E A Q A L C K E Y E N E D Y F N K L I (配列番号 3 1
6)
【 0 2 4 2 】 30
N M E 8 A 2
(アミノ酸)
W K Q L L G P R T V E E A I E Y F P E S L C A Q F A M D (配列番号 3 1 7)
【 0 2 4 3 】
N M E 8 A 3
(アミノ酸)
A G F D L T Q V K K M F L T P E Q I E K I Y P K V T G K D F Y K D L (配列番号 3
1 8)
【 0 2 4 4 】 40
N M E 8 A 4
(アミノ酸)
E W R R L M G P T D P E E A K L L S P D S I R A Q F G (配列番号 3 1 9)
【 0 2 4 5 】
N M E 8 A 5
(アミノ酸)
K A G F I I E A E H K T V L T E E Q V V N F Y S R I A D Q C D F E E (配列番号 3
2 0)
【 0 2 4 6 】
N M E 8 B 1
(アミノ酸) 50

I L K I V K E A G F D L T Q V K K M F L T P E Q I E K I Y (配列番号 3 2 1)	
【 0 2 4 7 】	
N M E 8 B 2	
(アミノ酸)	
Y P K V T G K D F Y K D L L E M L S V G P (配列番号 3 2 2)	
【 0 2 4 8 】	
N M E 8 B 3	
(アミノ酸)	
D P E E A K L L S P D S I R A Q F G I S K L K N I V H (配列番号 3 2 3)	
【 0 2 4 9 】	10
N M E 8 B 4	
(アミノ酸)	
L R I I K D E D F K I L E Q R Q V V L S E K E A Q (配列番号 3 2 4)	
【 0 2 5 0 】	
N M E 8 B 5	
(アミノ酸)	
K E Y E N E D Y F N K L I E N M T S G P S L A (配列番号 3 2 5)	
【 0 2 5 1 】	
(アミノ酸)	
P E S L C A Q F A M D S L P V N Q L Y G S D S L E T A E R E I Q H F F (配列番号 3 2 6)	20
【 0 2 5 2 】	
N M E 8 B 7	
(アミノ酸)	
I K R K I T K A G F I I E A E H K T V L T E E Q V V N F Y (配列番号 3 2 7)	
【 0 2 5 3 】	
N M E 8 B 8	
(アミノ酸)	
F Y S R I A D Q C D F E E F V S F M T S G (配列番号 3 2 8)	
【 0 2 5 4 】	30
N M E 9 A 1	
(アミノ酸)	
A G F E I L T N E E R T M T E A E V R L F Y (配列番号 3 2 9)	
【 0 2 5 5 】	
N M E 9 B 1	
(アミノ酸)	
I I M K I Q E A G F E I L T N E E R T M T E A E V R L F Y (配列番号 3 3 0)	
【 0 2 5 6 】	
N M E 1 0 A 1	
(アミノ酸)	40
G F F L V Q T K E V S M K A E D A Q R V F R E K A P (配列番号 3 3 1)	
【 0 2 5 7 】	
N M E 1 0 A 2	
(アミノ酸)	
E A N R S I V P I S R G Q R Q K S S D E S C L V V L F A G D (配列番号 3 3 2)	
【 0 2 5 8 】	
N M E 1 0 A 3	
(アミノ酸)	
I Q D C E N C N I Y I F D H S A (配列番号 3 3 3)	
【 0 2 5 9 】	50

N M E 1 0 B 1

E L A F Q F K D A G L S I F N N T W S N I H D F T P V D C T (配列番号 3 3 4)

【 0 2 6 0 】

いくつかの N M E タンパク質は、正常細胞増殖または発生のために必要である機能を発揮する。例えば、N M E 1 は、正常細胞機能に必要とされると考えられる。他の N M E タンパク質は、その機能が正常細胞または組織で必要とされる触媒ドメインを有する。これらの事例では、治療抗体は、標的にされた癌関連 N M E に結合するが、非標的化 N M E には結合しないそれらの能力に基づいて選択できる。例えば、ここで提示される抗 N M E 7 抗体、8 F 9 A 5 A 1、8 F 9 A 4 A 3、および 5 F 3 A 5 D 4 は、N M E 7 A B に結合するが、N M E 1 には結合しないそれらの能力について選択され；それらは、癌および癌転移を抑制するそれらの能力に基づいてさらに選択される。

【 0 2 6 1 】

本発明の別の態様では、抗 N M E 7 抗体、抗体フラグメント、例えば、s c F v、または抗体模倣物のフラグメントは、免疫細胞中で発現するように操作されるキメラ抗原受容体 (C A R) に組み込まれる。免疫細胞は、抗 N M E 7 C A R、抗 M U C 1 * C A R、または両方を発現するように操作できる。C A R の 1 つは、誘導性プロモーターから発現され得る。あるいは、免疫細胞は、M U C 1 * C A R などの C A R および誘導性抗 N M E 7 抗体または抗体フラグメントを発現するように操作され得る。いくつかの事例では、誘導性プロモーターは、N F A T 応答エレメントを含み得る。一態様では、これらの操作された種は、T 細胞、N K 細胞または樹状細胞中で発現される。免疫細胞は、患者または供与体から取得され得る。いくつかの事例では、M H C、チェックポイント阻害剤またはチェックポイント阻害剤のための受容体などの免疫分子は、例えば C r i s P R または C r i s P R 様技術を用いて、変異導入、または除去される。別の態様では、I T A M 分子、F o s、または J u n は、患者または供与体由来免疫細胞中で、変異導入または T a l e n、S l e e p i n g B e a u t y、C r i s P R または C r i s P R 様技術により遺伝的に切除される。

【 0 2 6 2 】

本発明の一態様では、C A R T フォーマットで使用するための抗 N M E 7 抗体または抗体模倣物は、N M E 7 に特異的であるが M U C 1 * の細胞外ドメインに対する N M E 7 の結合を分断しない抗体または抗体模倣物の群から選択される。このように、C A R T を腫瘍に向ける抗 N M E 7 抗体または抗体模倣物は、受容体からリガンドを単に奪うだけでなく、その際に T 細胞が標的癌細胞にグランザイム B を注入できなくなるであろう。このような抗体または抗体模倣物は、N M E 7 ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 などの N M E 7 ペプチドで動物を免疫することにより生成されるか、または N M E 7 ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 に結合するそれらの能力により選択される。抗体または抗体模倣物は、N M E 7 に特異的に結合するが、N M E 1 または N M E 2 には結合しないそれらの能力について、および N M E 7 と M U C 1 * 細胞外ドメインの間の結合をそれらが分断できないことについてスクリーニングできる。例えば、E L I S A 装置において、P S M G F R ペプチドが表面に固定される。標識 N M E 7 A B は、表面固定化 M U C 1 * 細胞外ドメインに結合させられ、N M E 7 A B 標識の検出が、試験抗体または抗体模倣物の存在または非存在下で測定される。本発明の一態様では、N M E 7 A B と表面固定化 M U C 1 * 細胞外ドメインペプチドとの間の結合を減少させない抗体が、C A R 中に組み込まれる抗体として選択され、免疫細胞中で発現されるように操作され、その後、癌または癌転移の治療または予防のために患者に投与される。

【 0 2 6 3 】

本発明の一態様では、抗 N M E 7 抗体またはそのフラグメントは、癌または癌転移と診断された患者、または癌または癌転移を発症するおそれのある患者に投与される。一態様では、抗 N M E 7 抗体または抗体フラグメントは、特にセクション「A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 ペプチドに相同なペプチド」および「A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 ペプチドに相同な伸長ペプチド」において上で考察した N M E ペプチドに結合する。

【0264】

別の態様では、抗体、抗体フラグメントまたは抗体模倣物は、A1、A2、B1、B2またはB3（配列番号141～145）から選択されるNME7由来ペプチドに結合する。さらに別の態様では、抗体、抗体フラグメントまたは抗体模倣物は、B3ペプチドのほとんどまたは全てを含むNME7ペプチドに結合する。本発明の一態様では、抗NME7抗体、抗体フラグメントまたは抗体模倣物は、以下に示す抗NME7抗体8F9A4A3（配列番号1001～1015）、8F9A5A1（配列番号1016～1030）、または8H5H5G4（配列番号1031～1045）の可変ドメイン由来の配列を含む。

【0265】

抗NME7 B3ペプチドモノクローナル抗体

10

モノクローナル抗体8F9A4A3「4A3」

重鎖可変領域配列

G a g g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a a c t g g t g a a g c
 c t g g g g c t t c a g t g a a g a t a t c c t g c a a g a c t t c t g g a a a
 c a c a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c
 c a t g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a
 a c a a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a
 g g c c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t
 a t t a c t g t g c a a g a c g g t a c t a c c a t a g t c t c t a c g t g t t
 t t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c
 t c c t c a (配列番号386)

20

【0266】

下線を付した配列が相補性決定領域(CDR)である翻訳タンパク質

E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K T S G N T F T E Y T M H W V K Q S
 H G K S L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y
 M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T T L T V
 S S (配列番号387)

【0267】

マウス8F9A4A3重鎖可変ドメインフレームワーク1(FR1)配列

30

g a g g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a a c t g g t g a a g
 c c t g g g g c t t c a g t g a a g a t a t c c t g c a a g a c t t c t g g a (

配列番号)
 E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S V K I S C K T S G (配列番号)

【0268】

重鎖可変領域CDR1:

a a c a c a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c

N T F T E Y T M H (配列番号388)

【0269】

マウス8F9A4A3重鎖可変ドメインフレームワーク2(FR2)配列

40

t g g g t g a a g c a g a g c c a t g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t
 g g a (配列番号)

W V K Q S H G K S L E W I G (配列番号)

【0270】

マウス8F9A4A3重鎖可変領域CDR2:

g g t t t t a a t c c t a a c a a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g
 a a g t t c a a g g g c (配列番号)

G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号389)

【0271】

マウス4A3重鎖可変ドメインフレームワーク3(FR3)配列

50

a a g g c c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c
 t a c a t g g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g
 t c t a t t a c t g t g c a a g a (配列番号)

K A T L T V D K S S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R (配列番号)
 【 0 2 7 2 】

マウス 8 F 9 A 4 A 3 重鎖可変領域 C D R 3 :

c g g t a c t a c c a t a g t c t c t a c g t g t t t t a c t t t g a c t a c
 (配列番号)

R Y Y H S L Y V F Y F D Y (配列番号 3 9 0)
 【 0 2 7 3 】

10

マウス 8 F 9 A 4 A 3 軽鎖可変領域配列

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
 c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c c t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
 g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t a t c a g c a g a a a c c a
 g a t g g a a c t g t t g a a c t c c t g a t c t t t t a c a c a t c a a g t t
 t a c a c t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
 t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g c a a c c t g g a a c c t
 g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
 t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a a a t a a a
 a (配列番号 3 9 1)

20

【 0 2 7 4 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T L S C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
 D G T V E L L I F Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E P
 E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K (配列番号 3 9 2)

【 0 2 7 5 】

マウス 8 F 9 A 4 A 3 軽鎖可変ドメインフレームワーク 1 (F R 1) 配列

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
 c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c c t c a g t t g c (配列番号)
 D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T L S C (配列番号)

30

【 0 2 7 6 】

マウス 8 F 9 A 4 A 3 軽鎖可変領域 C D R 1 :

a g t g c a a g t c a g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c (配列番号)
 S A S Q G I S N Y L N (配列番号 3 9 3)

【 0 2 7 7 】

マウス 4 A 3 軽鎖可変ドメインフレームワーク 2 (F R 2) 配列

t g g t a t c a g c a g a a a c c a g a t g g a a c t g t t g a a c t c c t g a
 t c t t t (配列番号)
 W Y Q Q K P D G T V E L L I F (配列番号)

40

【 0 2 7 8 】

マウス 8 F 9 A 4 A 3 軽鎖可変領域 C D R 2 :

t a c a c a t c a a g t t t a c a c t c a (配列番号)
 Y T S S L H S (配列番号 3 9 4)

【 0 2 7 9 】

マウス 8 F 9 A 4 A 3 軽鎖可変ドメインフレームワーク 3 (F R 3) 配列

g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g g a c a
 g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g c a a c c t g g a a c c t g a a g a t a
 t t g c c a c t t a c t a t t g t (配列番号)

G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N L E P E D I A T Y Y C (配列番号)

【 0 2 8 0 】

50

マウス 8 F 9 A 4 A 3 軽鎖可変領域 C D R 3 :

C a g c a g t a t a g t a a g c t t c c t t a c a c g (配列番号)

Q Q Y S K L P Y T (配列番号 3 9 5)

【0281】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 H - o r i 重鎖可変ドメイン配列

c a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g t g c a g a a g t g a a g a a a c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
 t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
 c c t g g c a a a g g a c t t g a a t g g a t g g g c g g c t t c a a c c c c a
 a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c c g 10
 c g t g a c c a t g a c c g a g g a c a c a a g c a c a g a c a c c g c c t a c
 a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
 a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c c t g t a c g t g t t
 c t a c t t c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t c a c a g t t
 t c t t c t (配列番号)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G K G L E W M G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G R V T M T E D T S T D T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
 S S (配列番号)

【0282】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 H - 1 . 4 6 重鎖可変ドメイン配列

c a a g t g c a g c t g g t g c a g a g c g g c g c c g a g g t g a a g a a a c
 c t g g c g c c a g c g t g a a a g t g t c c t g c a a g g c c a g c g g c a a
 t a c a t t c a c c g a g t a c a c a a t g c a c t g g g t c a g a c a g g c c
 c c c g g c c a g g g c c t g g a a t g g a t c g g c g g a t t t a a c c c c a
 a c a a c g g c g t g a c a a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a
 g g t g a c c a t c a c a a g a g a c a c c a g c a g c a g c a c c g t g t a c
 a t g g a a c t g t c t t c t c t g c g g a g c g a g g a t a c c g c c g t g t
 a c t a t t g t g c c a g a c g g t a c t a c c a c a g c c t g t a c g t g t t
 c t a c t t c g a c t a c t g g g g a c a g g g c a c c c t g g t t a c c g t g 30
 t c c t c t (配列番号)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G Q G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T I T R D T S S S T V Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
 S S (配列番号)

【0283】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 H - 3 . 1 5 重鎖可変ドメイン配列

g a g g t g c a g c t g g t g g a a a g c g g c g g c g g c c t g g t t a a g c
 c t g g c g g a t c t c t g a g a c t g a g c t g t g c c g c t t c t g g c a a
 t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t g c g g c a g g c c 40
 c c t g g a a a a g g c c t g g a a t g g a t c g g c g g a t t t a a c c c c a
 a c a a c g g c g t g a c a a a t t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c a a
 g t t c a c c a t c a c a a g a g a t a a g a g c a a g a a c a c c c t g t a c
 c t g c a a a t g a a c a g c c t g a a g t c c g a g g a c a c c g c c g t g t
 a c t a c t g c g c c a g a c g g t a c t a c c a c a g c c t c t a t g t g t t
 c t a c t t c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c a c t g g t c a c c g t g
 t c c a g c (配列番号)

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

SS (配列番号)

【 0 2 8 4 】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 H - 4 . 4 重鎖可変ドメイン配列

c a a g t g c a g c t g c a g g a g a g c g g a c c t g g c c t g g t t a a g c
c t g g a g g c a c c c t g t c t c t g a c a t g t g c t g t g t c t g g c a a
t a c c t t t a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t g c g g c a g c c t
c c a g g c a a g g g c c t g g a a t g g a t c g g c g g c t t c a a c c c c a
a c a a c g g c g t g a c a a a t t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g a a a
a g t g a c c a t c a c c g t g g a t a a g t c c a a g a a c a c c t t c a g c
c t c a a g c t g a g c a g c g t g a c a g c c g c c g a c a c c g c c g t g t 10
a c t a c t g c g c c a g a a g a t a c t a t c a c a g c c t g t a c g t g t t
c t a c t t c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c a c t g g t c a c c g t g
t c c a g c (配列番号)

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

SS (配列番号)

【 0 2 8 5 】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 L - 1 . 6 重鎖可変ドメイン配列

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a g c c c t a g c t c c c t g a g c g c c a 20
g c g t g g g c g a c c g g g t c a c c a t t a c a t g c a g c g c t t c t c a
g g g c a t c t c c a a c t a c c t g a a c t g g t a c c a g c a g a a a c c c
g g c a a g g c c c c t a a g c t g c t g a t c t t c t a c a c c a g c t c t c
t g c a c a g c g g c g t g c c a t c t a g a t t c a g c g g a t c t g g c a g
c g g c a c c g a c t a c a c c c t g a c c a t c a g c t c c c t c c a g c c t
g a g g a c t t c g c c a c c t a c t a c t g t c a g c a a t a c a g c a a g c
t g c c t t a t a c c t t t g g c g g c g g a a c a a a g g t g g a a a t c a a
g (配列番号)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
G K A P K L L I F Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P 30
E D F A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K (配列番号)

【 0 2 8 6 】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 L - 3 . 1 5 重鎖可変ドメイン配列

g a g a t c g t g a t g a c c c a g a g c c c a g c t a c a c t t a g t g t g a
g t c c a g g t g a a c g g g c t a c c c t g t c c t g c a g c g c c a g c c a
g g g c a t c a g c a a c t a c c t g a a c t g g t a c c a g c a g a a a c c t
g g c c a g g c c c c t a g a c t g c t g a t c t t c t a c a c c a g c a g c c
t g c a c a g c g g c a t c c c c g c c a g a t t c a g c g g c a g c g g c t c
t g g a a c a g a c t a c a c c c t g a c a a t c t c t a g c c t g c a g t c t
g a a g a t t t t g c c g t c t a c t a c t g t c a g c a a t a c a g c a a g c 40
t g c c t t a t a c c t t c g g c g g c g g a a c c a a g g t g g a a a t t a a
g (配列番号)

E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
G Q A P R L L I F Y T S S L H S G I P A R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q S
E D F A V Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K (配列番号)

【 0 2 8 7 】

ヒト化 8 F 9 A 4 A 3 L - 4 . 1 重鎖可変ドメイン配列

g a t a t c g t g a t g a c c c a g a g c c c a g a c a g c c t g g c a g t g a
g t c t g g g t g a g c g t g c t a c a a t c a a c t g c a g c g c c a g c c a
g g g c a t c t c c a a c t a c c t g a a t t g g t a t c a g c a g a a a c c t 50

g g c c a g g c t c c t a a g c t g c t g a t c t t c t a c a c c a g c a g c c
t g c a c a g c g g c g t g c c a g a t a g a t t c a g c g g c a g c g g a t c
t g g c a c c g a c t a c a c a c t g a c c a t t t c t t c t c t c c a g g c c
g a g g a c g t g g c c g t c t a c t a c t g t c a g c a a t a c a g c a a g c
t g c c t t a c a c c t t t g g c g g a g g c a c a a a g g t g g a a a t c a a
g (配列番号)

D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
G Q A P K L L I F Y T S S L H S G V P D R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q A
E D V A V Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K (配列番号)

【0288】

10

モノクローナル抗体5D9E2B11

重鎖可変領域配列

H - 1 , 4 , 7 , 8 , 12

g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a t c t g g t g a a g c c t g
g g a c t t c a g t g a a g a t a t c c t g t a a g a c t t c t g g a a a c a c
a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c c a t
g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a a c a
a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a g g c
c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c a t g
g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t a t t
a c t g t g c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t c t a
c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c
t c a (配列番号396)

20

【0289】

下線を付した配列が相補性決定領域(CDR)である翻訳タンパク質:

V Q L Q Q S G P D L V K P G T S V K I S C K T S G N T F T E Y T M H W V K Q S H
G K S L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M
E L R S L T S E D S A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T T L T V S
S (配列番号397)

【0290】

30

重鎖可変領域CDR1:

N T F T E Y T M H (配列番号398)

【0291】

重鎖可変領域CDR2:

G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号399)

【0292】

重鎖可変領域CDR3:

R Y Y H S T Y V F Y F D S (配列番号400)

【0293】

重鎖可変領域配列

40

K - 3 , 4 , 5 , 6 , 12

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c a t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t t t c a g c a g a a a c c a
g a t g g a a c t a t t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
t a c a t t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g t a a t g t g g a a c c t
g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a g a t a a a
a c g g (配列番号401)

50

【0294】

翻訳タンパク質

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKP
DGTIKLLIYYTSSSLHSGVPSRFSGSGSGT DYSLTISNVEP
EDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR (配列番号402)

【0295】

下線を付した配列が相補性決定領域(CDR)である翻訳タンパク質:

DIQMTQTTSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLNWFQQKP
DGTIKLLIYYTSSSLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNVEP
EDIATYYCQQYSKLPYTFGGGTKLEIKR (配列番号403)

10

【0296】

軽鎖可変領域CDR1:

SASQGISNYLN (配列番号404)

【0297】

軽鎖可変領域CDR2:

YTSSSLHS (配列番号405)

【0298】

軽鎖可変領域CDR3:

QQYSKLPYT (配列番号406)

【0299】

モノクローナル抗体5D9E10E4

重鎖可変領域配列

H-2, 4, 7, 10, 12

gtccagctgcaacagctctggaccctgatctgggtgaaagccctg
ggacttcagtgaaagataatcctgttaagacttctggaaaacac
attcactgaatacacccatgcactgggtgaaagcagagccat
gaaagagcccttgagtggaattggagggttttaatacctaaca
atggtgttactaactacaaccagaagttcaaggggcaaggc
cacattgactgtagacaagttcctccagcacagccctacatg
gagctccgcagccctgacatctgaggatctctgcagtcctatt
actgtgcaagacgttactaccatagtaacctacgtgttcta
ctttgactcctggggccaaggcaccactctcacagtcctcc
tca (配列番号407)

30

【0300】

下線を付した配列が相補性決定領域(CDR)である翻訳タンパク質:

VQLQQSGPDLVKPGT SVKISCKTSGNTFTEYTMHWVKQSH
GKSLIEWIGGFNPNGVTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYM
ELRSLTSEDS AVYYCARRYYHSTYVFYFDSWVGQGTTLTVS
S (配列番号408)

40

【0301】

重鎖可変領域CDR1:

NTFTEYTMH (配列番号409)

【0302】

重鎖可変領域CDR2:

GFNPNGVTNYNQKFKG (配列番号410)

【0303】

重鎖可変領域CDR3:

RYYHSTYVFYFDS (配列番号411)

【0304】

重鎖可変領域配列

50

K - 2 , 6 , 8 , 1 4 , 1 5

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c a t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t t t c a g c a g a a a c c a
g a t g g a a c t a t t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
t a c a t t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g t a a t g t g g a a c c t
g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a g a t a a a
a c g g (配列番号 4 1 2)

10

【 0 3 0 5 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W F Q Q K P
D G T I K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N V E P
E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K R (配列番号 4 1 3)

【 0 3 0 6 】

軽鎖可変領域 C D R 1 :

S A S Q G I S N Y L N (配列番号 4 1 4)

【 0 3 0 7 】

軽鎖可変領域 C D R 2 :

Y T S S L H S (配列番号 4 1 5)

20

【 0 3 0 8 】

軽鎖可変領域 C D R 3 :

Q Q Y S K L P Y T (配列番号 4 1 6)

【 0 3 0 9 】

モノクローナル抗体 5 D 9 G 2 C 4

重鎖可変領域配列

H - 4 , 9 , 1 0 , 1 1 , 1 3

g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a t c t g g t g a a g c c t g
g g a c t t c a g t g a a g a t a t c c t g t a a g a c t t c t g g a a a c a c
a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c c a t
g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a a c a
a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a g g c
c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c a t g
g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t a t t
a c t g t g c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t c t a
c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c
t c a (配列番号 4 1 7)

30

【 0 3 1 0 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

V Q L Q Q S G P D L V K P G T S V K I S C K T S G N T F T E Y T M H W V K Q S H
G K S L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M
E L R S L T S E D S A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T T L T V S
S (配列番号 4 1 8)

40

【 0 3 1 1 】

重鎖可変領域 C D R 1 :

N T F T E Y T M H (配列番号 4 1 9)

【 0 3 1 2 】

重鎖可変領域 C D R 2 :

G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 4 2 0)

50

【 0 3 1 3 】

重鎖可変領域 C D R 3 :

R Y Y H S T Y V F Y F D S (配列番号 4 2 1)

【 0 3 1 4 】

軽鎖可変領域配列

K - 4 , 6 , 7 , 8 , 1 0

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c a t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t t t c a g c a g a a a c c a
g a t g g a a c t a t t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t 10
t a c a t t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g t a a t g t g g a a c c t
g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a g a t a a a
a c g g (配列番号 4 2 2)

【 0 3 1 5 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W F Q Q K P
D G T I K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N V E P
E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K R (配列番号 4 2 3) 20

【 0 3 1 6 】

軽鎖可変領域 C D R 1 :

S A S Q G I S N Y L N (配列番号 4 2 4)

【 0 3 1 7 】

軽鎖可変領域 C D R 2 :

Y T S S L H S (配列番号 4 2 5)

【 0 3 1 8 】

軽鎖可変領域 C D R 3 :

Q Q Y S K L P Y T (配列番号 4 2 6)

【 0 3 1 9 】

モノクローナル抗体 5 F 3 A 5 D 4

重鎖可変領域配列

H - 2 , 3 , 4 , 1 3 , 1 5

g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a t c t g g t g a a g c c t g
g g a c t t c a g t g a a g a t a t c c t g t a a g a c t t c t g g a a a c a c
a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c c a t
g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a a c a
a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a g g c
c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c a t g
g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t a t t 40
a c t g t g c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t c t a
c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c
t c a (配列番号 4 2 7)

【 0 3 2 0 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

V Q L Q Q S G P D L V K P G T S V K I S C K T S G N T F T E Y T M H W V K Q S H
G K S L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M
E L R S L T S E D S A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T T L T V S
S (配列番号 4 2 8)

【 0 3 2 1 】

10

20

30

40

50

重鎖可変領域 C D R 1 :

N T F T E Y T M H (配列番号 4 2 9)

【 0 3 2 2 】

重鎖可変領域 C D R 2 :

G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 4 3 0)

【 0 3 2 3 】

重鎖可変領域 C D R 3 :

R Y Y H S T Y V F Y F D S (配列番号 4 3 1)

【 0 3 2 4 】

軽鎖可変領域配列

K - 1 , 2 , 3 , 4 , 9

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c a t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t t t c a g c a g a a a c c a
g a t g g a a c t a t t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
t a c a t t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g t a a t g t g g a a c c t
g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a g a t a a a
a c g g (配列番号 4 3 2)

10

20

【 0 3 2 5 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W F Q Q K P
D G T I K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N V E P
E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K R (配列番号 4 3 3)

【 0 3 2 6 】

軽鎖可変領域 C D R 1 :

S A S Q G I S N Y L N (配列番号 4 3 4)

【 0 3 2 7 】

軽鎖可変領域 C D R 2 :

Y T S S L H S (配列番号 4 3 5)

30

【 0 3 2 8 】

軽鎖可変領域 C D R 3 :

Q Q Y S K L P Y T (配列番号 4 3 6)

【 0 3 2 9 】

モノクローナル抗体 8 F 9 A 5 A 1

重鎖可変領域配列

H - 3 , 4 , 6 , 1 0 , 1 1

a t c c a g t t g g t g c a g t c t g g a c c t g a g c t g a a g a a g c c t g
g a g a g a c a g t c a a g a t c t c c t g c a a g g c t t c t g g g t a t a c
c t t c a c a a a c t a t g g a a t g a a c t g g g t g a a g c a g g c t c c a
g g a a a g g g t t t a a a g t g g a t g g g c t g g a t a a a c a c c t a c a
c t g g a g a g c c a a c a t a t g t t g a t g a c t t c a a g g g a c g g t t
t g c c t t c t c t t t g g a a a c c t c t g c c a c c a c t g c c t a t t t g
c a g a t c a a c a a c c t c a a a a a t g a g g a c a c g t c t a c a t a t t
t c t g t g c a a g a t t g a g g g g g a t a c g a c c g g g t c c c t t g g c
t t a c t g g g g c c a a g g g a c t c t g g t c a c t g t c t c t g c a (配列
番号 4 3 7)

40

【 0 3 3 0 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

50

I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P
 G K G L K W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F A F S L E T S A T T A Y L
 Q I N N L K N E D T S T Y F C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S A
 (配列番号 438)

【0331】

重鎖可変領域 CDR 1 :
 Y T F T N Y G M N (配列番号 439)

【0332】

重鎖可変領域 CDR 2 :
 W I N T Y T G E P T Y V D D F K G (配列番号 440)

10

【0333】

重鎖可変領域 CDR 3 :
 L R G I R P G P L A Y (配列番号 441)

【0334】

軽鎖可変領域配列

K - 1, 2, 3, 4, 5

g a a a t t t t g c t c a c c c a g t c t c c a g c a a t c a t a g c t g c a t
 c t c c t g g g g a g a a g g t c a c c a t c a c c t g c a g t g c c a g c t c
 a a g t g t a a g t t a c a t g a a c t g g t a c c a g c a g a a a c c a g g a
 t c c t c c c c a a a a t a t g g a t t t a t g g t a t a t c c a a c c t g g
 c t t c t g g a g t t c c t g c t c g c t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g
 g a c a t c t t t c t c t t t c a c a a t c a a c a g c a t g g a g g c t g a a
 g a t g t t g c c a c t t a t t a c t g t c a g c a a a g g a g t a g t t a c c
 c a c c c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a a a t a a a a c g
 g (配列番号 442)

20

【0335】

下線を付した配列が相補性決定領域 (CDR) である翻訳タンパク質 :

E I L L T Q S P A I I A A S P G E K V T I T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
 S S P K I W I Y G I S N L A S G V P A R F S G S G S G T S F S F T I N S M E A E
 D V A T Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K L E I K R (配列番号 443)

30

【0336】

軽鎖可変領域 CDR 1 :
 S A S S S V S Y M N (配列番号 444)

【0337】

軽鎖可変領域 CDR 2 :
 G I S N L A S (配列番号 445)

【0338】

軽鎖可変領域 CDR 3 :
 Q Q R S S Y P P T (配列番号 446)

【0339】

モノクローナル抗体 8H5H5G4

軽鎖可変領域配列

H - 1, 3, 5, 6, 10

g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a t c t g g t g a a g c c t g
 g g a c t t c a g t g a a g a t a t c c t g t a a g a c t t c t g g a a a c a c
 a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c c a t
 g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a a c a
 a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a g g c
 c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c a t g
 g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t a t t

50

a c t g t g c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t c t a
c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c
t c a (配列番号 4 4 7)

【 0 3 4 0 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

V Q L Q Q S G P D L V K P G T S V K I S C K T S G N T F T E Y T M H W V K Q S H
G K S L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M
E L R S L T S E D S A V Y Y C A R R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T T L T V S
S (配列番号 4 4 8)

【 0 3 4 1 】

重鎖可変領域 C D R 1 :

N T F T E Y T M H (配列番号 4 4 9)

【 0 3 4 2 】

重鎖可変領域 C D R 2 :

G F N P N N G V T N Y N Q K F K G (配列番号 4 5 0)

【 0 3 4 3 】

重鎖可変領域 C D R 3 :

R Y Y H S T Y V F Y F D S (配列番号 4 5 1)

【 0 3 4 4 】

軽鎖可変領域配列

K - 2 , 5 , 8 , 9 , 1 5

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c a t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t t t c a g c a g a a a c c a
g a t g g a a c t a t t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
t a c a t t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g t a a t g t g g a a c c t
g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a g a t a a a
a c g g (配列番号 4 5 2)

【 0 3 4 5 】

下線を付した配列が相補性決定領域 (C D R) である翻訳タンパク質 :

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W F Q Q K P
D G T I K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N V E P
E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K R (配列番号 4 5 3)

【 0 3 4 6 】

軽鎖可変領域 C D R 1 :

S A S Q G I S N Y L N (配列番号 4 5 4)

【 0 3 4 7 】

軽鎖可変領域 C D R 2 :

Y T S S L H S (配列番号 4 5 5)

【 0 3 4 8 】

軽鎖可変領域 C D R 3 :

Q Q Y S K L P Y T (配列番号 4 5 6)

【 0 3 4 9 】

8 F 9 A 4 P 3 重鎖可変領域配列マウス

G t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a a c t g g t g a a g c c t g
g g g c t t c a g t g a a g a t a t c c t g c a a g a c t t c t g g a a a c a c
a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c c a t
g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a a c a

10

20

30

40

50

a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a g g c
 c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c a t g
 g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t a t t
 a c t g t g c a a g a c g g t a c t a c c a t a g t c t c t a c g t g t t t t a
 c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c
 t c a (配列番号 335)

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

S (配列番号 1001)

10

【0350】

I G H V 1 - 2 4 * 0 1 V - R E G I O N 配列ヒト (最も近く一致するヒト抗体配列)

C a g g t c c a g c t g g t a c a g t c t g g g g c t g a g g t g a a g a a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g t t t c c g g a t a
 c a c c c t c a c t g a a t t a t c c a t g c a c t g g g t g c g a c a g g c t
 c c t g g a a a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a g g t t t t g a t c c t g
 a a g a t g g t g a a a c a a t c t a c g c a c a g a a g t t c c a g g g c a g
 a g t c a c c a t g a c c g a g g a c a c a t c t a c a g a c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g c a g c c t g a g a t c t g a g g a c a c g g c c g t g t
 a t t a c t g t g c a a c a (配列番号 336)

20

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G Y T L T E L S M H W V R Q A
 P G K G L E W M G G F D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T M T E D T S T D T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A T (配列番号 1002)

【0351】

ヒト (最も近く一致するヒト抗体配列)

I G H J 4 * 0 1 J - R E G I O N 配列

t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g a a c c c t g g t c a c c g t c t
 c c t c a (配列番号 337)

Y F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 1003)

【0352】

ヒト化重鎖可変配列 (配列番号 1001 + 配列番号 1002 + 配列番号 1003)

ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 重鎖可変領域配列

(DNA)

c a g g t c c a g c t g g t a c a g t c t g g g g c t g a g g t g a a g a a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g t t t c c g g a a a
 c a c a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g c g a c a g g c t
 c c t g g a a a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a g g t t t t a a t c c t a
 a c a a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a g
 a g t c a c c a t g a c c g a g g a c a c a t c t a c a g a c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g c a g c c t g a g a t c t g a g g a c a c g g c c g t g t
 a t t a c t g t g c a a g a c g g t a c t a c c a t a g t c t c t a c g t g t t
 t t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g a a c c c t g g t c a c c g t c
 t c c t c a (配列番号 338)

40

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G K G L E W M G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G R V T M T E D T S T D T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
 S S (配列番号 1004)

【0353】

ヒト化重鎖可変配列 (1004 のコドン最適化バージョン)

50

ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 重鎖可変領域配列 (コドン最適化)

(DNA)

c a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a g a a a c
c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
c c t g g c a a a g g a c t t g a a t g g a t g g g c g g c t t c a a c c c c a
a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c c g
c g t g a c c a t g a c c g a g g a c a c a a g c a c a g a c a c c g c c t a c
a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c c t g t a c g t g t t
c t a c t t c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t c a c a g t t
t c t t c t (配列番号 339)

10

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
P G K G L E W M G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G R V T M T E D T S T D T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
S S (配列番号 1005)

【0354】

ヒト化重鎖可変配列 (「修飾」配列番号 1005 配列、ここで、修飾とは、結合または構造のために決定的に重要であると考えられている特定のアミノ酸がマウス配列に戻っていることを意味する)

20

修飾配列 8 F 9 A 4 P 3 重鎖可変領域配列

c a g g t c c a g c t g g t a c a g t c t g g g g c t g a g g t g a a g a a g c
c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g t t t c c g g a a a
c a c a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g c g a c a g g c t
c c t g g a a a a g g g c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a
a c a a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a
a g t c a c c c t g a c c g t g g a c a c a t c t a g c a g c a c a g c c t a c
a t g g a g c t g a g c a g c c t g a g a t c t g a g g a c a c g g c c g t g t
a t t a c t g t g c a a g a c g g t a c t a c c a t a g t c t c t a c g t g t t
t t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g a a c c c t g g t c a c c g t c
t c c t c a (配列番号 340)

30

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
P G K G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T L T V D T S S S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
S S (配列番号 1006)

【0355】

ヒト化重鎖可変配列 (配列番号 1006 コドン最適化)

修飾ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 重鎖可変領域配列 (コドン最適化)

c a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a g a a a c
c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
c c t g g c a a a g g a c t g g a a t g g a t c g g c g g c t t c a a c c c c a
a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c a a
a g t g a c c c t g a c c g t g g a c a c c a g c a g c a g c a c a g c c t a c
a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c c t g t a c g t g t t
c t a c t t c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t c a c a g t t
t c t t c t (配列番号 341)

40

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A

50

P G K G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T L T V D T S S S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
 S S (配列番号 1 0 0 7)

【 0 3 5 6 】

8 F 9 A 4 P 3 軽鎖可変領域配列マウス

g a a a c a a c t g t g a c c c a g t c t c c a g c a t c c c t g t c c a t g g
 c t a t a g g a g a a a a a g t c a c c a t c a g a t g c a t a a c c a g c a c
 t g a t a t t g a t g a t g a t a t g a a c t g g t a c c a g c a g a a g c c a
 g g g g a a c c t c c t a a g c t c c t t a t t t c a g a a g g c a a t a c t c
 t t c g t c c t g g a g t c c c a t c c c g a t t c t c c a g c a g t g g c t a
 t g g t a c a g a t t t t g t t t t a c a a t t g a a a a c a t g c t c t c a
 g a a g a t g t t g c a g a t t a c t a c t g t t t g c a a a g t g a t a a c t
 t g c c t c t c a c g t t c g g c t c g g g g a c a a a g t t g g a a a t a a a
 a c g g (配列番号 3 4 2)

10

E T T V T Q S P A S L S M A I G E K V T I R C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P
 G E P P K L L I S E G N T L R P G V P S R F S S S G Y G T D F V F T I E N M L S
 E D V A D Y Y C L Q S D N L P L T F G S G T K L E I K R (配列番号 1 0 0 8)

【 0 3 5 7 】

ヒト (最も近く一致するヒト抗体配列)

I G K V 5 - 2 * 0 1 V - R E G I O N 配列

g a a a c g a c a c t c a c g c a g t c t c c a g c a t t c a t g t c a g c g a
 c t c c a g g a g a c a a a g t c a a c a t c t c c t g c a a a g c c a g c c a
 a g a c a t t g a t g a t g a t a t g a a c t g g t a c c a a c a g a a a c c a
 g g a g a a g c t g c t a t t t t c a t t a t t c a a g a a g c t a c t a c t c
 t c g t t c c t g g a a t c c c a c c t c g a t t c a g t g g c a g c g g g t a
 t g g a a c a g a t t t t a c c c t c a c a a t t a a t a a c a t a g a a t c t
 g a g g a t g c t g c a t a t t a c t t c t g t (配列番号 3 4 3)

20

E T T L T Q S P A F M S A T P G D K V N I S C K A S Q D I D D D M N W Y Q Q K P
 G E A A I F I I Q E A T T L V P G I P P R F S G S G Y G T D F T L T I N N I E S
 E D A A Y Y F C (配列番号 1 0 0 9)

30

【 0 3 5 8 】

ヒト (最も近く一致するヒト抗体配列)

I G K J 4 * 0 2 J - R E G I O N 配列

c t c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a (配列番
 号 3 4 4)
 L T F G G G T K V E I K (配列番号 1 0 1 0)

【 0 3 5 9 】

ヒト化軽鎖可変配列 (配列番号 1 0 0 8 + 配列番号 1 0 0 9 + 配列番号 1)

ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 軽鎖可変領域配列

g a a a c g a c a c t c a c g c a g t c t c c a g c a t t c a t g t c a g c g a
 c t c c a g g a g a c a a a g t c a a c a t c t c c t g c a t a a c c a g c a c
 t g a t a t t g a t g a t g a t a t g a a c t g g t a c c a a c a g a a a c c a
 g g a g a a g c t g c t a t t t t c a t t a t t c a a g a a g g c a a t a c t c
 t t c g t c c t g g a a t c c c a c c t c g a t t c a g t g g c a g c g g g t a
 t g g a a c a g a t t t t a c c c t c a c a a t t a a t a a c a t a g a a t c t
 g a g g a t g c t g c a t a t t a c t t c t g t t t g c a a a g t g a t a a c t
 t g c c t c t c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a
 a c g g (配列番号 3 4 5)

40

E T T L T Q S P A F M S A T P G D K V N I S C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P
 G E A A I F I I Q E G N T L R P G I P P R F S G S G Y G T D F T L T I N N I E S

50

E D A A Y Y F C L Q S D N L P L T F G G G T K V E I K R (配列番号 1 0 1 1)

【 0 3 6 0 】

ヒト化軽鎖可変配列 (1 0 1 1 のコドン最適化バージョン)

ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 軽鎖可変領域配列 (コドン最適化)

G a g a c a a c c c t g a c a c a g a g c c c t g c c t t c a t g t c t g c c a
c a c c t g g c g a c a a a g t g a a c a t c a g c t g c a t c a c c a g c a c
c g a c a t c g a c g a c g a c a t g a a c t g g t a t c a g c a g a a g c c t
g g c g a g g c c g c c a t c t t c a t c a t c c a a g a g g g c a a c a c a c
t g c g g c c t g g c a t c c c t c c t a g a t t t t c t g g c a g c g g c t a
c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a a c a a c a t c g a g a g c
g a g g a c g c c g c c t a c t a c t t c t g c c t g c a a a g c g a c a a c c
t g c c t c t g a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a
g c g g (配列番号 3 4 6)

10

E T T L T Q S P A F M S A T P G D K V N I S C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P
G E A A I F I I Q E G N T L R P G I P P R F S G S G Y G T D F T L T I N N I E S
E D A A Y Y F C L Q S D N L P L T F G G G T K V E I K R (配列番号 1 0 1 2)

【 0 3 6 1 】

ヒト化軽鎖可変配列 (「修飾」配列番号 1 0 1 2 配列、ここで、修飾とは、結合または構造のために決定的に重要であると考えられている特定のアミノ酸がマウス配列に戻っていることを意味する)

20

修飾配列 8 F 9 A 4 P 3 軽鎖可変領域配列

g a a a c g a c a g t g a c g c a g t c t c c a g c a t t c a t g t c a g c g a
c t c c a g g a g a c a a a g t c a c c a t c t c c t g c a t a a c c a g c a c
t g a t a t t g a t g a t g a t a t g a a c t g g t a c c a a c a g a a a c c a
g g a g a a g c t g c t a t t c t g c t g a t t a g c g a a g g c a a t a c t c
t t c g t c c t g g a a t c c c a c c t c g a t t c a g t a g c a g c g g g t a
t g g a a c a g a t t t t a c c c t c a c a a t t a a t a a c a t a g a a t c t
g a g g a t g c t g c a t a t t a c t t c t g t t t g c a a a g t g a t a a c t
t g c c t c t c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a
a c g g (配列番号 3 4 7)

30

E T T V T Q S P A F M S A T P G D K V T I S C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P
G E A A I L L I S E G N T L R P G I P P R F S S S G Y G T D F T L T I N N I E S
E D A A Y Y F C L Q S D N L P L T F G G G T K V E I K R (配列番号 1 0 1 3)

【 0 3 6 2 】

ヒト化軽鎖可変配列 (1 0 1 3 のコドン最適化バージョン)

ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 軽鎖可変領域配列 (コドン最適化)

g a g a c a a c c g t g a c a c a g a g c c c t g c c t t c a t g t c t g c c a
c a c c t g g c g a c a a a g t g a c c a t c a g c t g c a t c a c c a g c a c
c g a c a t c g a c g a c g a c a t g a a c t g g t a t c a g c a g a a g c c t
g g c g a g g c c g c c a t c c t g c t t a t c t c t g a g g g a a a c a c a c
t g c g g c c t g g c a t c c c t c c t a g a t t t t c c a g c a g c g g c t a
c g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t c a a c a a c a t c g a g a g c
g a g g a c g c c g c c t a c t a c t t c t g c c t g c a a a g c g a c a a c c
t g c c t c t g a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a
g c g g (配列番号 3 4 8)

40

E T T V T Q S P A F M S A T P G D K V T I S C I T S T D I D D D M N W Y Q Q K P
G E A A I L L I S E G N T L R P G I P P R F S S S G Y G T D F T L T I N N I E S
E D A A Y Y F C L Q S D N L P L T F G G G T K V E I K R (配列番号 1 0 1 4)

【 0 3 6 3 】

フレキシブルリンカーを介して接続されたヒト化重鎖および軽鎖

50

修飾ヒト化 8 F 9 A 4 P 3 配列 (コドン最適化)

C a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a g a a a c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
 t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
 c c t g g c a a a g g a c t g g a a t g g a t c g g c g g c t t c a a c c c c a
 a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c a a
 a g t g a c c c t g a c c g t g g a c a c c a g c a g c a g c a c a g c c t a c
 a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
 a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c c t g t a c g t g t t
 c t a c t t c g a c t a c t g g g g c c a g g g c a c c c t g g t c a c a g t t 10
 t c t t c t g g c g g t g g c g g a a g c g g a g g c g g t g g c t c c g g t g
 g c g g a g g c a g c g a a a c g a c a g t g a c g c a g t c t c c a g c a t t
 c a t g t c a g c g a c t c c a g g a g a c a a a g t c a c c a t c t c c t g c
 a t a a c c a g c a c t g a t a t t g a t g a t g a t a t g a a c t g g t a c c
 a a c a g a a a c c a g g a g a a g c t g c t a t t c t g c t g a t t a g c g a
 a g g c a a t a c t c t t c g t c c t g g a a t c c c a c c t c g a t t c a g t
 a g c a g c g g g t a t g g a a c a g a t t t t a c c c t c a c a a t t a a t a
 a c a t a g a a t c t g a g g a t g c t g c a t a t t a c t t c t g t t t g c a
 a a g t g a t a a c t t g c c t c t c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g
 g t g g a g a t c a a a c g g (配列番号 3 4 9) 20

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G K G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T L T V D T S S S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S L Y V F Y F D Y W G Q G T L V T V
 S S G G G G S G G G G S G G G G S E T T V T Q S P A F M S A T P G D K V T I S C
 I T S T D I D D M N W Y Q Q K P G E A A I L L I S E G N T L R P G I P P R F S
 S S G Y G T D F T L T I N N I E S E D A A Y Y F C L Q S D N L P L T F G G G T K
 V E I K R (配列番号 1 0 1 5)

【 0 3 6 4 】

8 F 9 A 5 A 1 重鎖可変領域配列

a t c c a g t t g g t g c a g t c t g g a c c t g a g c t g a a g a a g c c t g 30
 g a g a g a c a g t c a a g a t c t c c t g c a a g g c t t c t g g g t a t a c
 c t t c a c a a a c t a t g g a a t g a a c t g g g t g a a g c a g g c t c c a
 g g a a a g g g t t t a a a g t g g a t g g g c t g g a t a a a c a c c t a c a
 c t g g a g a g c c a a c a t a t g t t g a t g a c t t c a a g g g a c g g t t
 t g c c t t c t c t t t g g a a a c c t c t g c c a c c a c t g c c t a t t t g
 c a g a t c a a c a a c c t c a a a a a t g a g g a c a c g t c t a c a t a t t
 t c t g t g c a a g a t t g a g g g g g a t a c g a c c g g g t c c c t t g g c
 t t a c t g g g g c c a a g g g a c t c t g g t c a c t g t c t c t g c a (配列
 番号 3 5 0)

I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A P 40
 G K G L K W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F A F S L E T S A T T A Y L
 Q I N N L K N E D T S T Y F C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S A (配列
 番号 1 0 1 6)

【 0 3 6 5 】

I G H V 7 - 8 1 * 0 1 V - R E G I O N 配列

c a g g t g c a g c t g g t g c a g t c t g g c c a t g a g g t g a a g c a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g c t t c t g g t t a
 c a g t t t c a c c a c c t a t g g t a t g a a t t g g g t g c c a c a g g c c
 c c t g g a c a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a t g g t t c a a c a c c t
 a c a c t g g g a a c c c a a c a t a t g c c c a g g g c t t c a c a g g a c g 50

g t t t g t c t t c t c c a t g g a c a c c t c t g c c a g c a c a g c a t a c
 c t g c a g a t c a g c a g c c t a a a g g c t g a g g a c a t g g c c a t g t
 a t t a c t g t g c g a g a (配列番号 3 5 1)
 Q V Q L V Q S G H E V K Q P G A S V K V S C K A S G Y S F T T Y G M N W V P Q A
 P G Q G L E W M G W F N T Y T G N P T Y A Q G F T G R F V F S M D T S A S T A Y
 L Q I S S L K A E D M A M Y Y C A R (配列番号 1 0 1 7)

【 0 3 6 6 】

I G H J 4 * 0 3 J - R E G I O N 配列

t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g g a c c c t g g t c a c c g t c t
 c c t c a (配列番号 3 5 2)

10

Y F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 1 0 1 8)

【 0 3 6 7 】

ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 重鎖可変領域配列

C a g g t g c a g c t g g t g c a g t c t g g c c a t g a g g t g a a g c a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g c t t c t g g g t a
 t a c c t t c a c a a a c t a t g g a a t g a a c t g g g t g c c a c a g g c c
 c c t g g a c a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a t g g a t a a a c a c c t
 a c a c t g g a g a g c c a a c a t a t g t t g a t g a c t t c a a g g g a c g
 g t t t g t c t t c t c c a t g g a c a c c t c t g c c a g c a c a g c a t a c
 c t g c a g a t c a g c a g c c t a a a g g c t g a g g a c a t g g c c a t g t
 a t t a c t g t g c a a g a t t g a g g g g g a t a c g a c c g g g t c c c t t
 g g c t t a c t g g g g c c a a g g g a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a
 (配列番号 3 5 3)

20

Q V Q L V Q S G H E V K Q P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V P Q A
 P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F V F S M D T S A S T A Y
 L Q I S S L K A E D M A M Y Y C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S S
 (配列番号 1 0 1 9)

【 0 3 6 8 】

ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 重鎖可変領域配列 (コドン最適化)

c a g g t t c a g c t g g t g c a g t c t g g c c a c g a a g t g a a a c a g c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g t a a a g c c a g c g g c t a
 c a c c t t t a c c a a c t a c g g c a t g a a c t g g g t g c c c c a g g c t
 c c t g g a c a a g g c t t g g a a t g g a t g g g c t g g a t c a a c a c c t
 a c a c c g g c g a g c c t a c c t a c g t g g a c g a c t t c a a g g g c a g
 a t t c g t g t t c a g c a t g g a c a c c a g c g c c a g c a c a g c c t a c
 c t g c a g a t c a g c t c t c t g a a g g c c g a g g a t a t g g c c a t g t
 a c t a c t g c g c c a g a c t g a g a g g c a t c a g a c c t g g a c c t c t
 g g c c t a t t g g g g a c a g g g c a c a c t g g t c a c a g t g t c c t c t
 (配列番号 3 5 4)

30

Q V Q L V Q S G H E V K Q P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V P Q A
 P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F V F S M D T S A S T A Y
 L Q I S S L K A E D M A M Y Y C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S S
 (配列番号 1 0 2 0)

40

【 0 3 6 9 】

修飾ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 重鎖可変領域配列

c a g a t c c a g c t g g t g c a g t c t g g c c c c g a g g t g a a g c a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g c t t c t g g g t a
 t a c c t t c a c a a a c t a t g g a a t g a a c t g g g t g a a g c a g g c c
 c c t g g a c a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a t g g a t a a a c a c c t
 a c a c t g g a g a g c c a a c a t a t g t t g a t g a c t t c a a g g g a c g

50

g t t t g c c t t c t c c a t g g a c a c c t c t g c c a g c a c a g c a t a c
 c t g c a g a t c a g c a g c c t a a a g g c t g a g g a c a c c g c c a c c t
 a t t a c t g t g c a a g a t t g a g g g g g a t a c g a c c g g g t c c c t t
 g g c t t a c t g g g g c c a a g g g a c c c t g g t c a c c g t c t c c t c a
 (配列番号 355)

Q I Q L V Q S G P E V K Q P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A
 P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F A F S M D T S A S T A Y
 L Q I S S L K A E D T A T Y Y C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S S
 (配列番号 1021)

【0370】

修飾ヒト化 8F9A5A1 重鎖可変領域配列 (コドン最適化)

c a g a t t c a g c t g g t g c a g t c t g g c c c c g a a g t g a a a c a a c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g c c a g c g g c t a
 c a c c t t t a c c a a c t a c g g c a t g a a c t g g g t c a a g c a g g c c
 c c t g g a c a a g g c c t g g a a t g g a t g g g c t g g a t c a a c a c c t
 a c a c c g g c g a g c c t a c c t a c g t g g a c g a c t t c a a g g g c a g
 a t t c g c c t t c a g c a t g g a c a c c a g c g c c a g c a c a g c c t a c
 c t g c a g a t c a g c t c t c t g a a g g c c g a g g a c a c c g c c a c c t
 a c t a c t g t g c c a g a c t g a g a g g c a t c a g a c c c g g a c c t c t
 g g c c t a t t g g g g a c a g g g a a c a c t g g t c a c c g t g t c c t c t
 (配列番号 356)

Q I Q L V Q S G P E V K Q P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A
 P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F A F S M D T S A S T A Y
 L Q I S S L K A E D T A T Y Y C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S S
 (配列番号 1022)

【0371】

8F9A5A1 軽鎖可変領域配列

g a a a t t t t g c t c a c c c a g t c t c c a g c a a t c a t a g c t g c a t
 c t c c t g g g g a g a a g g t c a c c a t c a c c t g c a g t g c c a g c t c
 a a g t g t a a g t t a c a t g a a c t g g t a c c a g c a g a a a c c a g g a
 t c c t c c c c a a a a t a t g g a t t t a t g g t a t a t c c a a c c t g g
 c t t c t g g a g t t c c t g c t c g c t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g
 g a c a t c t t t c t c t t t c a c a a t c a a c a g c a t g g a g g c t g a a
 g a t g t t g c c a c t t a t t a c t g t c a g c a a a g g a g t a g t t a c c
 c a c c c a c g t t c g g a g g g g g g a c c a a g c t g g a a a t a a a a c g
 g (配列番号 357)

E I L L T Q S P A I I A A S P G E K V T I T C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
 S S P K I W I Y G I S N L A S G V P A R F S G S G S G T S F S F T I N S M E A E
 D V A T Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K L E I K R (配列番号 1023)

【0372】

I G K V 3 D - 1 5 * 0 2 V - R E G I O N 配列

g a a a t a g t g a t g a t g c a g t c t c c a g c c a c c c t g t c t g t g t
 c t c c a g g g g a a a g a g c c a c c c t c t c c t g c a g g g c c a g t c a
 g a g t g t t a g c a g c a a c t t a g c c t g g t a c c a g c a g a a a c c t
 g g c c a g g c t c c c a g g c t c c t c a t c t a t g g t g c a t c c a c c a
 g g g c c a c t g g c a t c c c a g c c a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
 t g g g a c a g a g t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g t c t
 g a a g a t t t t g c a g t t t a t t a c t g t c a g c a g t a t a a t a a c (配列番号 358)

E I V M M Q S P A T L S V S P G E R A T L S C R A S Q S V S S N L A W Y Q Q K P

10

20

30

40

50

G Q A P R L L I Y G A S T R A T G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S
E D F A V Y Y C Q Q Y N N (配 列 番 号 1 0 2 4)

【 0 3 7 3 】

I G K J 4 * 0 2 J - R E G I O N 配 列

c t c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a (配 列 番
号 3 5 9)

L T F G G G T K V E I K (配 列 番 号 1 0 2 5)

【 0 3 7 4 】

ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 軽鎖可変領域配列

g a a a t a g t g a t g a t g c a g t c t c c a g c c a c c c t g t c t g t g t 10
c t c c a g g g g a a a g a g c c a c c c t c t c c t g c a g t g c c a g c t c
a a g t g t a a g t t a c a t g a a c t g g t a c c a g c a g a a a c c t g g c
c a g g c t c c c a g g c t c c t c a t c t a t g g t a t a t c c a a c c t g g
c t t c t g g c a t c c c a g c c a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g
g a c a g a g t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g t c t g a a
g a t t t t g c a g t t t a t t a c t g t c a g c a a a g g a g t a g t t a c c
c a c c c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g
g (配 列 番 号 3 6 0)

E I V M M Q S P A T L S V S P G E R A T L S C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
Q A P R L L I Y G I S N L A S G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S E 20
D F A V Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K V E I K R (配 列 番 号 1 0 2 6)

【 0 3 7 5 】

ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 軽鎖可変領域配列 (コドン最適化)

g a g a t c g t g a t g a t g c a g a g c c c c g c c a c a c t g a g t g t g t
c t c c a g g c g a a a g a g c c a c a c t g t c c t g t a g c g c c a g c a g
c a g c g t g t c c t a c a t g a a c t g g t a t c a g c a g a a g c c c g g a
c a g g c c c c t a g a c t g c t g a t c t a c g g c a t c a g c a a t c t g g
c c a g c g g c a t c c c t g c c a g a t t t t c t g g c t c t g g c t c c g g
c a c c g a g t t c a c c c t g a c a a t c t c t a g c c t g c a g a g c g a g
g a c t t c g c c g t g t a c t a c t g c c a g c a g a g a a g c a g c t a c c 30
c t c c t a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a g c g
g (配 列 番 号 3 6 1)

E I V M M Q S P A T L S V S P G E R A T L S C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
Q A P R L L I Y G I S N L A S G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S E
D F A V Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K V E I K R (配 列 番 号 1 0 2 7)

【 0 3 7 6 】

修飾ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 軽鎖可変領域配列

g a a a t a g t g c t g a c c c a g t c t c c a g c c a c c c t g t c t g t g t
c t c c a g g g g a a a g a g c c a c c c t c t c c t g c a g t g c c a g c t c
a a g t g t a a g t t a c a t g a a c t g g t a c c a g c a g a a a c c t g g c 40
c a g g c t c c c a g g c t c t g g a t c t a t g g t a t a t c c a a c c t g g
c t t c t g g c a t c c c a g c c a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c t g g
g a c a a g c t t c a g c c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g t c t g a a
g a t t t t g c a g t t t a t t a c t g t c a g c a a a g g a g t a g t t a c c
c a c c c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a c g
g (配 列 番 号 3 6 2)

E I V L T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
Q A P R L W I Y G I S N L A S G I P A R F S G S G S G T S F S L T I S S L Q S E
D F A V Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K V E I K R (配 列 番 号 1 0 2 8)

【 0 3 7 7 】

修飾ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 軽鎖可変領域配列 (コドン最適化)

(DNA)

g a g a t c g t g c t g a c a c a g t c t c c c g c c a c a c t g a g t g t g t
 c t c c a g g c g a a a g a g c c a c a c t g t c c t g t a g c g c c a g c a g
 c a g c g t g t c c t a c a t g a a c t g g t a t c a g c a g a a g c c c g g a
 c a g g c c c c t a g a c t g t g g a t c t a c g g c a t c a g c a a t c t g g
 c c a g c g g c a t c c c t g c c a g a t t t t c t g g c t c t g g c t c c g g
 c a c c a g c t t c a g c c t g a c a a t c a g c a g c c t g c a g a g c g a g
 g a c t t c g c c g t g t a c t a c t g c c a g c a g a g a a g c a g c t a c c
 c t c c t a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a g c g
 g (配列番号 363)

(アミノ酸)

E I V L T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C S A S S S V S Y M N W Y Q Q K P G
 Q A P R L W I Y G I S N L A S G I P A R F S G S G S G T S F S L T I S S L Q S E
 D F A V Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K V E I K R (配列番号 1029)

【0378】

修飾ヒト化 8 F 9 A 5 A 1 s c F V 配列 (コドン最適化)

C a g a t t c a g c t g g t g c a g t c t g g c c c c g a a g t g a a a c a a c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g c c a g c g g c t a
 c a c c t t t a c c a a c t a c g g c a t g a a c t g g g t c a a g c a g g c c
 c c t g g a c a a g g c c t g g a a t g g a t g g g c t g g a t c a a c a c c t
 a c a c c g g c g a g c c t a c c t a c g t g g a c g a c t t c a a g g g c a g
 a t t c g c c t t c a g c a t g g a c a c c a g c g c c a g c a c a g c c t a c
 c t g c a g a t c a g c t c t c t g a a g g c c g a g g a c a c c g c c a c c t
 a c t a c t g t g c c a g a c t g a g a g g c a t c a g a c c c g g a c c t c t
 g g c c t a t t g g g g a c a g g g a a c a c t g g t c a c c g t g t c c t c t
 g g c g g t g g c g g a a g c g g a g g c g g t g g c t c c g g t g g c g g a g
 g c a g c g a g a t c g t g c t g a c a c a g t c t c c c g c c a c a c t g a g
 t g t g t c t c c a g g c g a a a g a g c c a c a c t g t c c t g t a g c g c c
 a g c a g c a g c g t g t c c t a c a t g a a c t g g t a t c a g c a g a a g c
 c c g g a c a g g c c c c t a g a c t g t g g a t c t a c g g c a t c a g c a a
 t c t g g c c a g c g g c a t c c c t g c c a g a t t t t c t g g c t c t g g c
 t c c g g c a c c a g c t t c a g c c t g a c a a t c a g c a g c c t g c a g a
 g c g a g g a c t t c g c c g t g t a c t a c t g c c a g c a g a g a a g c a g
 c t a c c c t c c t a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c
 a a g c g g (配列番号 364)

Q I Q L V Q S G P E V K Q P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V K Q A
 P G Q G L E W M G W I N T Y T G E P T Y V D D F K G R F A F S M D T S A S T A Y
 L Q I S S L K A E D T A T Y Y C A R L R G I R P G P L A Y W G Q G T L V T V S S
 G G G S G G G S G G G S E I V L T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C S A
 S S S V S Y M N W Y Q Q K P G Q A P R L W I Y G I S N L A S G I P A R F S G S G
 S G T S F S L T I S S L Q S E D F A V Y Y C Q Q R S S Y P P T F G G G T K V E I
 K R (配列番号 1030)

【0379】

8 H 5 H 5 G 4 重鎖可変領域配列

g t c c a g c t g c a a c a g t c t g g a c c t g a t c t g g t g a a g c c t g
 g g a c t t c a g t g a a g a t a t c c t g t a a g a c t t c t g g a a a c a c
 a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g a a g c a g a g c c a t
 g g a a a g a g c c t t g a g t g g a t t g g a g g t t t t a a t c c t a a c a
 a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a g g c

c a c a t t g a c t g t a g a c a a g t c c t c c a g c a c a g c c t a c a t g
 g a g c t c c g c a g c c t g a c a t c t g a g g a t t c t g c a g t c t a t t
 a c t g t g c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t c t a
 c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g c a c c a c t c t c a c a g t c t c c
 t c a (配列番号 365)

V Q L Q Q S G P D L V K P G T S V K I S C K T S G N T F T E Y T M H W V K Q S H
 G K S L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K A T L T V D K S S S T A Y M
 E L R S L T S E D S A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T T L T V S
 S (配列番号 1031)

【0380】

I G H V 1 - 2 4 * 0 1 V - R E G I O N 配列
 (DNA)

c a g g t c c a g c t g g t a c a g t c t g g g g c t g a g g t g a a g a a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g t t t c c g g a t a
 c a c c c t c a c t g a a t t a t c c a t g c a c t g g g t g c g a c a g g c t
 c c t g g a a a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a g g t t t t g a t c c t g
 a a g a t g g t g a a a c a a t c t a c g c a c a g a a g t t c c a g g g c a g
 a g t c a c c a t g a c c g a g g a c a c a t c t a c a g a c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g c a g c c t g a g a t c t g a g g a c a c g g c c g t g t
 a t t a c t g t g c a a c a (配列番号 366)

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G Y T L T E L S M H W V R Q A
 P G K G L E W M G G F D P E D G E T I Y A Q K F Q G R V T M T E D T S T D T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A T (配列番号 1032)

【0381】

I G H J 4 * 0 3 J - R E G I O N 配列
 (DNA)

t a c t t t g a c t a c t g g g g c c a a g g g a c c c t g g t c a c c g t c t
 c c t c a (配列番号 367)

(アミノ酸)

Y F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 1033)

【0382】

ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 重鎖可変領域配列
 (DNA)

c a g g t c c a g c t g g t a c a g t c t g g g g c t g a g g t g a a g a a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g t t t c c g g a a a
 c a c a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c T g g g t g c g a c a g g c t
 c c t g g a a a a g g g c t t g a g t g g a t g g g a g g t t t t a a t c c t a
 a c a a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c A g
 a g t c a c c a t g a c c g a g g a c a c a t c t a c a g a c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g c a g c c t g a g a t c t g a g g a c a c g g c c g t g t
 a t t a c t g t G c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t
 c t a c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g g a c c c t g g t c a c c g t c
 t c c t c a (配列番号 368)

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G K G L E W M G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G R V T M T E D T S T D T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T L V T V
 S S (配列番号 1034)

【0383】

10

20

30

40

50

ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 重鎖可変領域配列 (コドン最適化)

(DNA)

c a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a g a a a c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
 t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
 c c t g g c a a a g g a c t t g a a t g g a t g g g c g g c t t c a a c c c c a
 a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c c g
 c g t g a c c a t g a c c g a g g a c a c a a g c a c a g a c a c c g c c t a c
 a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
 a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c a c c t a c g t g t t
 c t a c t t c g a c a g c t g g g g c c a g g g c a c a c t g g t c a c a g t t
 t c t t c t (配列番号 369)

10

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G K G L E W M G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G R V T M T E D T S T D T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T L V T V
 S S (配列番号 1035)

【0384】

修飾ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 重鎖可変領域配列

(DNA)

c a g g t c c a g c t g g t a c a g t c t g g g g c t g a g g t g a a g a a g c
 c t g g g g c c t c a g t g a a g g t c t c c t g c a a g g t t t c c g g a a a
 c a c a t t c a c t g a a t a c a c c a t g c a c t g g g t g c g a c a g g c t
 c c t g g a a a a g g g c t t g a g t g g a t c g g a g g t t t t a a t c c t a
 a c a a t g g t g t t a c t a a c t a c a a c c a g a a g t t c a a g g g c a a
 g g t c a c c c t g a c c g t g g a c a c a t c t a g c a g c a c a g c c t a c
 a t g g a g c t g a g c a g c c t g a g a t c t g a g g a c a c g g c c g t g t
 a t t a c t g t g c a a g a c g t t a c t a c c a t a g t a c c t a c g t g t t
 c t a c t t t g a c t c c t g g g g c c a a g g g a c c c t g g t c a c c g t c
 t c c t c a (配列番号 370)

20

30

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
 P G K G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T L T V D T S S S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T L V T V
 S S (配列番号 1036)

【0385】

修飾ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 重鎖可変領域配列 (コドン最適化)

(DNA)

c a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a g a a a c
 c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
 t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
 c c t g g c a a a g g a c t t g g a a t g g a t c g g c g g c t t c a a c c c c a
 a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c a a
 a g t g a c c c t g a c c g t g g a c a c c a g c a g c a g c a c a g c c t a c
 a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
 a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c a c c t a c g t g t t
 c t a c t t c g a c a g c t g g g g c c a g g g c a c a c t g g t c a c a g t t
 t c t t c t (配列番号 371)

40

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A

50

P G K G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T L T V D T S S S T A Y
 M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T L V T V
 S S (配列番号 1 0 3 7)

【 0 3 8 6 】

8 H 5 H 5 G 4 軽鎖可変領域配列

(D N A)

g a t a t c c a g a t g a c a c a g a c t a c a t c c t c c c t g t c t g c c t
 c t c t g g g a g a c a g a g t c a c c a t c a g t t g c a g t g c a a g t c a
 g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t t t c a g c a g a a a c c a
 g a t g g a a c t a t t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
 t a c a t t c a g g a g t c c c a t c a a g g t t c a g t g g c a g t g g g t c
 t g g g a c a g a t t a t t c t c t c a c c a t c a g t a a t g t g g a a c c t
 g a a g a t a t t g c c a c t t a c t a t t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
 t t c c t t a c a c g t t c g g a g g g g g a c c a a g c t g g a g a t a a a
 a c g g (配列番号 3 7 2)

10

(アミノ酸)

D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T I S C S A S Q G I S N Y L N W F Q Q K P
 D G T I K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y S L T I S N V E P
 E D I A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K L E I K R (配列番号 1 0 3 8)

20

【 0 3 8 7 】

I G K V 1 - 2 7 * 0 1 V - R E G I O N 配列

(D N A)

g a c a t c c a g a t g a c c c a g t c t c c a t c c t c c c t g t c t g c a t
 c t g t a g g a g a c a g a g t c a c c a t c a c t t g c c g g g c g a g t c a
 g g g c a t t a g c a a t t a t t t a g c c t g g t a t c a g c a g a a a c c a
 g g g a a a g t t c c t a a g c t c c t g a t c t a t g c t g c a t c c a c t t
 t g c a a t c a g g g g t c c c a t c t c g g t t c a g t g g c a g t g g a t c
 t g g g a c a g a t t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c t
 g a a g a t g t t g c a a c t t a t t a c t g t c a a a a g t a t a a c a g t g
 c c c c t (配列番号 3 7 3)

30

(アミノ酸)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L A W Y Q Q K P
 G K V P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 E D V A T Y Y C Q K Y N S A P (配列番号 1 0 3 9)

【 0 3 8 8 】

I G K J 4 * 0 2 J - R E G I O N 配列

(D N A)

c t c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a a (配列番
 号 3 7 4)

40

(アミノ酸)

L T F G G G T K V E I K (配列番号 1 0 4 0)

【 0 3 8 9 】

ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 軽鎖可変領域配列

(D N A)

g a c a t c c a g a t g a c c c a g t c t c c a t c c t c c c t g t c t g c a t
 c t g t a g g a g a c a g a g t c a c c a t c a c t t g c a g t g c a a g t c a
 g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c T g g t a t c a g c a g a a a c c a
 g g g a a a g t t c c t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
 t a c a t t c a g g g g t c c c a t c t c g g t t c a g t g g c a g t g g a t c
 t g g g a c a g a t t t c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c t

50

g a a g a t g t t g c a a c t t a t t a c t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
 t t c c t t a c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a
 a c g g (配列番号 375)

(アミノ酸)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
 G K V P K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 E D V A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K R (配列番号 1041)

【 0390 】

ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 軽鎖可変領域配列 (コドン最適化)

(DNA)

g a c a t c c a g a t g a c a c a g a g c c c t a g c a g c c t g t c t g c c a
 g c g t g g g a g a c a g a g t g a c c a t c a c a t g t a g c g c c a g c c a
 g g g c a t c a g c a a c t a c c t g a a c t g g t a t c a g c a g a a a c c c
 g g c a a g g t g c c c a a g c t g c t g a t c t a c t a c a c c a g c a g c c
 t g c a c a g c g g c g t g c c a a g c a g a t t t t c t g g c a g c g g c t c
 t g g c a c c g a c t t c a c c c t g a c c a t a t c t a g c c t g c a g c c t
 g a g g a c g t g g c c a c c t a c t a c t g t c a g c a g t a c a g c a a g c
 t g c c c t a c a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a
 g c g g (配列番号 376)

(アミノ酸)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
 G K V P K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 E D V A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K R (配列番号 1042)

【 0391 】

修飾ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 軽鎖可変領域配列

(DNA)

g a c a t c c a g a t g a c c c a g t c t c c a t c c t c c c t g t c t g c a t
 c t g t a g g a g a c a g a g t c a c c a t c a c t t g c a g t g c a a g t c a
 g g g c a t t a g c a a t t a t t t a a a c t g g t a t c a g c a g a a a c c a
 g g g a a a g t t c c t a a g c t c c t g a t c t a t t a c a c a t c a a g t t
 t a c a t t c a g g g g t c c c a t c t c g g t t c a g t g g c a g t g g a t c
 t g g g a c a g a t t a c a c t c t c a c c a t c a g c a g c c t g c a g c c t
 g a a g a t g t t g c a a c t t a t t a c t g t c a g c a g t a t a g t a a g c
 t t c c t t a c a c g t t c g g c g g a g g g a c c a a g g t g g a g a t c a a
 a c g g (配列番号 377)

(アミノ酸)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
 G K V P K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
 E D V A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K R (配列番号 1043)

【 0392 】

修飾ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 軽鎖可変領域配列 (コドン最適化)

(DNA)

g a c a t c c a g a t g a c a c a g a g c c c t a g c a g c c t g t c t g c c a
 g c g t g g g a g a c a g a g t g a c c a t c a c a t g t a g c g c c a g c c a
 g g g c a t c a g c a a c t a c c t g a a c t g g t a t c a g c a g a a a c c c
 g g c a a g g t g c c c a a g c t g c t g a t c t a c t a c a c c a g c a g c c
 t g c a c a g c g g c g t g c c a a g c a g a t t t t c t g g c a g c g g c t c
 t g g c a c c g a c t a c a c c c t g a c c a t a t c t a g c c t g c a g c c t
 g a g g a c g t g g c c a c c t a c t a c t g t c a g c a g t a c a g c a a g c
 t g c c c t a c a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g g t g g a a a t c a a

(アミノ酸)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
 G K V P K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
 E D V A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K R (配列番号 1044)

10

20

30

40

50

g c g g (配列番号 3 7 8)
(アミノ酸)

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P
G K V P K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
E D V A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K V E I K R (配列番号 1 0 4 4)

【 0 3 9 3 】

修飾ヒト化 8 H 5 H 5 G 4 s c F V 配列 (コドン最適化)

(D N A)

C a g g t t c a g c t g g t t c a g t c t g g c g c c g a a g t g a a g a a a c
c t g g c g c c t c t g t g a a g g t g t c c t g c a a g g t g t c c g g a a a
t a c c t t c a c c g a g t a c a c c a t g c a c t g g g t c c g a c a g g c c
c c t g g c a a a g g a c t g g a a t g g a t c g g c g g c t t c a a c c c c a
a c a a c g g c g t g a c c a a c t a c a a c c a g a a a t t c a a g g g c a a
a g t g a c c c t g a c c g t g g a c a c c a g c a g c a g c a c a g c c t a c
a t g g a a c t g a g c a g c c t g a g a a g c g a g g a c a c c g c c g t g t
a c t a c t g c g c c a g a a g g t a c t a c c a c a g c a c c t a c g t g t t
c t a c t t c g a c a g c t g g g g c c a g g g c a c a c t g g t c a c a g t t
t c t t c t g g c g g t g g c g g a a g c g g a g g c g g t g g c t c c g g t g
g c g g a g g c a g c g a c a t c c a g a t g a c a c a g a g c c c t a g c a g
c c t g t c t g c c a g c g t g g g a g a c a g a g t g a c c a t c a c a t g t
a g c g c c a g c c a g g g c a t c a g c a a c t a c c t g a a c t g g t a t c
a g c a g a a a c c c g g c a a g g t g c c c a a g c t g c t g a t c t a c t a
c a c c a g c a g c c t g c a c a g c g g c g t g c c a a g c a g a t t t t c t
g g c a g c g g c t c t g g c a c c g a c t a c a c c c t g a c c a t a t c t a
g c c t g c a g c c t g a g g a c g t g g c c a c c t a c t a c t g t c a g c a
g t a c a g c a a g c t g c c c t a c a c c t t t g g c g g a g g c a c c a a g
g t g g a a a t c a a g c g g (配列番号 3 7 9)

10

20

(アミノ酸)

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K V S G N T F T E Y T M H W V R Q A
P G K G L E W I G G F N P N N G V T N Y N Q K F K G K V T L T V D T S S S T A Y
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R R Y Y H S T Y V F Y F D S W G Q G T L V T V
S S G G G G S G G G G S G G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C
S A S Q G I S N Y L N W Y Q Q K P G K V P K L L I Y Y T S S L H S G V P S R F S
G S G S G T D Y T L T I S S L Q P E D V A T Y Y C Q Q Y S K L P Y T F G G G T K
V E I K R (配列番号 1 0 4 5)

30

【 0 3 9 4 】

ヒト I g G 1 重鎖定常領域配列 : (カッパまたはラムダのいずれかの定常領域を伴う完全な抗体ペアを作製するために、2つのプラスミドを一緒に発現する)

(D N A)

g c t a g c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c c c t g g c a c c c t
c c t c c a a g a g c a c c t c t g g g g g c a c a g c g g c c c t g g g c t g
c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g
t g g a a c t c a g g c g c c c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c
c g g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g
c g t g g t g a c a g t g c c c t c c a g c a g c t t g g g c a c c c a g a c c
t a c a t c t g c a a c g t g a a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g
t g g a c a a g a a a g t t g a g c c c a a a t c t t g t g a c a a a a c t c a
c a c a t g c c c a c c g t g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a
c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c
t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t

40

50

g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g
t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c
c g c g g g a g g a g c a g t a c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g
c g t c c t c a c c g t c c t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g
g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c
c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g
a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c c a t c c c g g g a g g a g
a t g a c c a a g a a a c c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g
g c t t c t a t c c c a g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a
t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g
c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a
c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c
a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g
c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g t a a a t g a (配列番号 3 8
0)

10

20

40

50

(アミノ酸)

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K (配列番号 1 0 4 6)

【 0 3 9 5 】

ヒト I g G 2 重鎖定常領域配列：(カッパまたはラムダのいずれかの定常領域を伴う完全な抗体ペアを作製するために、2つのプラスミドと一緒に発現する)

(D N A)

g c c t c c a c c a a g g g c c c a t c g g t c t t c c c c c t g g c g c c c t
g c t c c a g g a g c a c c t c c g a g a g c a c a g c c g c c c t g g g c t g
c c t g g t c a a g g a c t a c t t c c c c g a a c c g g t g a c g g t g t c g
t g g a a c t c a g g c g c t c t g a c c a g c g g c g t g c a c a c c t t c c
c a g c t g t c c t a c a g t c c t c a g g a c t c t a c t c c c t c a g c a g
c g t g g t g a c c g t g c c c t c c a g c a a c t t c g g c a c c c a g a c c
t a c a c c t g c a a c g t a g a t c a c a a g c c c a g c a a c a c c a a g g
t g g a c a a g a c a g t t g a g c g c a a a t g t t g t g t c g a g t g c c c
a c c g t g c c c a g c a c c a c c t g t g g c a g g a c c g t c a g t c t t c
c t c t t c c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c
g g a c c c c t g a g g t c a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a
c g a a g a c c c c g a g g t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c
g t g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c a c g g g a g g a g c
a g t t c a a c a g c a c g t t c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t
t g t g c a c c a g g a c t g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a g t g c
a a g g t c t c c a a c a a a g g c c t c c c a g c c c c a t c g a g a a a a
c c a t c t c c a a a a c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t
g t a c a c c c t g c c c c a t c c c g g g a g g a g a t g a c c a a g a a c
c a g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c c c c a
g c g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a
g a a c a a c t a c a a g a c c a c a c c t c c c a t g c t g g a c t c c g a c

g g c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a
g c a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t
g c a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c
t c c c t g t c t c c g g g t a a a t a g (配列番号 3 8 1)

(アミノ酸)

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
S L S P G K (配列番号 1 0 4 7)

10

【 0 3 9 6 】

ヒトカッパ軽鎖定常領域配列

(D N A)

a g g a c g g t g g c t g c a c c a t c t g t c t t c a t c t t c c c g c c a t
c t g a t g a g c a g t t g a a a t c t g g a a c t g c c t c t g t t g t g t g
c c t g c t g a a t a a c t t c t a t c c c a g a g a g g c c a a a g t a c a g
t g g a a g g t g g a t a a c g c c c t c c a a t c g g g t a a c t c c c a g g
a g a g t g t c a c a g a g c a g g a c a g c a a g g a c a g c a c c t a c a g
c c t c a g c a g c a c c c t g a c g c t g a g c a a a g c a g a c t a c g a g
a a a c a c a a a g t c t a c g c c t g c g a a g t c a c c c a t c a g g g c c
t g a g c t c g c c c g t c a c a a a g a g c t t c a a c a g g g g a g a g t g
t t a g (配列番号 3 8 2)

20

(アミノ酸)

R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号 1 0 4 8)

30

【 0 3 9 7 】

ヒトラムダ軽鎖定常領域配列

(D N A)

g g t c a g c c c a a g g c t g c c c c c t c g g t c a c t c t g t t c c c g c
c c t c c t c t g a g g a g c t t c a a g c c a a c a a g g c c a c a c t g g t
g t g t c t c a t a a g t g a c t t c t a c c c g g g a g c c g t g a c a g t g
g c c t g g a a g g c a g a t a g c a g c c c c g t c a a g g c g g g a g t g g
a g a c c a c c a c a c c c t c c a a a c a a a g c a a c a a c a a g t a c g c
g g c c a g c a g c t a t c t g a g c c t g a c g c c t g a g c a g t g g a a g
t c c c a c a g a a g c t a c a g c t g c c a g g t c a c g c a t g a a g g g a
g c a c c g t g g a g a a g a c a g t g g c c c c t a c a g a a t g t t c a t a
g (配列番号 3 8 3)

40

(アミノ酸)

G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V
A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K
S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S (配列番号 1 0 4 9)

【 0 3 9 8 】

ヒト I g G 1 F c 領域配列 (ホモ二量体のために s c F v に融合される)

(D N A)

g a g c c c a a a t c t t g t g a c a a a a c t c a c a c a t g c c c a c c g t

50

g c c c a g c a c c t g a a c t c c t g g g g g g a c c g t c a g t c t t c c t
c t t c c c c c a a a a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g
a c c c c t g a g g t c a c a t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g
a a g a c c c t g a g g t c a a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t
g g a g g t g c a t a a t g c c a a g a c a a a g c c g c g g g a g g a g c a g
t a c a a c a g c a c g t a c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t c c
t g c a c c a g g a c t g g c t g a a t g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a
g g t c t c c a a c a a a g c c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c
a t c t c c a a a g c c a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t
a c a c c c t g c c c c c a t c c c g g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a
g g t c a g c c t g a c c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a t c c c a g c
g a c a t c g c c g t g g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a
a c a a c t a c a a g a c c a c g c c t c c c g t g c t g g a c t c c g a c g g
c t c c t t c t t c c t c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c
a g g t g g c a g c a g g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c
a t g a g g c t c t g c a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c
c c t g t c t c c g g g t a a a t g a (配列番号 384)

(アミノ酸)

E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R
T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q
Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T
I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S
D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S
R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K * (配列番号 1050)

【 0399 】

ヒト Ig G 2 Fc 領域配列

(DNA)

g a g c g c a a a t g t t g t g t c g a g t g c c c a c c g t g c c c a g c a c
c a c c t g t g g c a g g a c c g t c a g t c t t c c t c t t c c c c c c a a a
a c c c a a g g a c a c c c t c a t g a t c t c c c g g a c c c c t g a g g t c
a c g t g c g t g g t g g t g g a c g t g a g c c a c g a a g a c c c c g a g g
t c c a g t t c a a c t g g t a c g t g g a c g g c g t g g a g g t g c a t a a
t g c c a a g a c a a a g c c a c g g g a g g a g c a g t t c a a c a g c a c g
t t c c g t g t g g t c a g c g t c c t c a c c g t t g t g c a c c a g g a c t
g g c t g a a c g g c a a g g a g t a c a a g t g c a a g g t c t c c a a c a a
a g g c c t c c c a g c c c c c a t c g a g a a a a c c a t c t c c a a a a c c
a a a g g g c a g c c c c g a g a a c c a c a g g t g t a c a c c c t g c c c c
c a t c c c g g g a g g a g a t g a c c a a g a a c c a g g t c a g c c t g a c
c t g c c t g g t c a a a g g c t t c t a c c c c a g c g a c a t c g c c g t g
g a g t g g g a g a g c a a t g g g c a g c c g g a g a a c a a c t a c a a g a
c c a c a c c t c c c a t g c t g g a c t c c g a c g g c t c c t t c t t c c t
c t a c a g c a a g c t c a c c g t g g a c a a g a g c a g g t g g c a g c a g
g g g a a c g t c t t c t c a t g c t c c g t g a t g c a t g a g g c t c t g c
a c a a c c a c t a c a c g c a g a a g a g c c t c t c c c t g t c t c c g g g
t a a a t a g (配列番号 385)

(アミノ酸)

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

K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q
 G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K * (配列番号 1 0 5 1)

【 0 4 0 0 】

本発明の別の態様では、CARを発現するように操作された免疫細胞は、癌または癌転移と診断された患者、または癌または癌転移を発症するおそれのある患者に投与され、免疫細胞はまた、抗NME7抗体または抗体フラグメントを発現するように操作され、これらは、誘導性プロモーターから発現され得る。一態様では、CARは、MUC1*抗体フラグメントにより誘導される。一例では、CARは、hMNC2-CAR44である。一態様では、抗NME7抗体または抗体フラグメントは、上でセクション「A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに相同なペプチド」および「A1、A2、B1、B2またはB3ペプチドに相同な伸長ペプチド」に列挙されたNME7ペプチドに結合する。別の態様では、抗体または抗体フラグメントは、A1、A2、B1、B2またはB3（配列番号141～145）から選択されるNME7由来ペプチドに結合する。さらに別の態様では、抗体、抗体フラグメントまたは抗体模倣物は、B3ペプチドを含むNME7ペプチドに結合する。本発明の一態様では、抗NME7抗体、抗体フラグメントまたは抗体模倣物は、抗NME7抗体8F9A4A3、8F9A5A1、または8H5H5G4の可変ドメイン由来の配列を含む。

10

【 0 4 0 1 】

このような抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり得る。このような抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、二価、一価、単鎖、scFvであり得、または特定の標的に結合する認識領域を提供するタンパク質スキャホールドなどの抗体模倣物であり得る。当業者により理解されるように、抗体は、非ヒト起源、ヒトまたはヒト化抗体であり得る。抗体をヒト化する方法は、マウス可変領域の全てまたは一部を、例えば、配列番号1001～1045として列挙された配列で示されるような、最近接マッチヒト抗体配列のVおよびJ領域に融合することを含む。単鎖構築物ではなく、完全抗体も作製できる。例えば、重鎖可変マウス配列が、ヒトVおよびJ領域に融合され、その後、ヒト重鎖定常領域のIgG1、IgG2またはIgG3に融合される。同様に、軽鎖可変マウス配列が、ヒトVおよびJ領域に融合され、その後、ヒトC_H1またはラムダ定常領域のIgG1、IgG2またはIgG3に融合される。プラスミドと一緒に発現され、結合して完全抗体を形成する（配列番号1047～1051）。

20

30

【 0 4 0 2 】

本発明の別の態様では、小分子は、NME7、NME7_{AB}またはNME7-X1の腫瘍形成性の効果を阻害するそれらの能力について選ばれる抗癌剤である。例えば、ハイスルーブットスクリーニングは、癌を治療する小分子を特定する。マルチウェルプレートにおいて、小分子は、その中で癌細胞がNME7_{AB}を含む培地中で培養されるウェルに、別々に加えられる。小分子が、浮遊物になる細胞の量を低減させ、および/またはCXCR4、CHD1などの転移マーカーまたは多能性幹細胞マーカーの発現を低減させる場合、その小分子は、抗癌剤候補である。抗癌剤である小分子を特定する別の方法は、NME7、NME7_{AB}またはNME7-X1と結合するまたはNME7種の発現を抑制する小分子を選択することである。さらに別のハイスルーブットスクリーニングは、MUC1*細胞外ドメインのPSMGFRペプチドへのNME7_{AB}の結合を抑制する小分子を選択することであり、これらの小分子は抗癌剤である。

40

【 0 4 0 3 】

NME7_{AB}およびNME7-X1の配列は、NME7-X1が、NME7_{AB}が有するN末端配列のいくつかを欠いている点でのみ異なる。実験は、NME7_{AB}とほぼ同一の天然起源NME7種が存在することを示し、本発明者らはそれをNME_{AB}様種と呼ぶ。NME7-X1に結合する抗体は、抗体が識別できる高次構造的差異がなければ、NME7_{AB}を模倣する天然起源種にも結合できる。したがって、NME7_{AB}様種ではなくNME7-X1を抑制することが望まれる場合、またはその逆も同じであるが、siRN

50

A、アンチセンス核酸、または遺伝子編集技術を、1つの種の発現を抑制し、他の種は抑制しないように使用できる。

【0404】

一例では、抗癌治療薬は、NME7、NME7-X1またはNME7_{AB}様種の特異的発現を直接または間接的に抑える核酸である。このような核酸は、直接NME7種を抑制するsiRNA、RNAi、アンチセンス核酸などであり得る。本発明の別の態様では、核酸は、例えば、それを調節する分子の発現の変更により、NME7種を間接的に抑制できる。例えば、スーパーエンハンサーBRD4は、NME7の発現を抑制する。したがって、癌の治療または予防に有効な治療薬は、BRD4の発現を高める薬剤である。有効な治療薬は、BRD4の補助因子、JMJD6の発現を増加させる薬剤であり得る。

10

【0405】

NME7_{AB}またはNME7-X1由来ペプチドまたは全タンパク質は、癌増殖を抑制し、転移性癌細胞への癌細胞の移行を抑制することを本発明者らが実証した、抗NME7および抗NME7-X1抗体を、動物中で、生成するために使用される。同様に、NME7由来ペプチドは、癌を治療または予防するまたは転移性癌細胞への癌細胞の移行を抑制する抗体を生成するようにヒトに投与できる。NME7ペプチドまたはタンパク質は、レシピエント中で、抗NME7、抗NME7_{AB}、または抗NME7-X1抗体の産生を刺激するように、一種のワクチンとしてヒトに投与される。図12および13に示される結果は、NME7に由来する、特にNME7-X1またはNME7_{AB}配列中のペプチドの一群でヒトを免疫することは、単一のペプチドでの免疫化より、より有効なワクチンであり得ることを示す。当該ペプチドまたはタンパク質は、免疫反応の刺激を補助すると当業者に既知の、担体タンパク質または他のアジュバントにさらに結合され得る。

20

【0406】

DM10ドメインの外側に位置するNME7ペプチドは、癌の治療または予防用抗体を生成するのに好ましい。癌または転移の予防のために患者に投与できるペプチドは、図6~9に列挙されたペプチドの配列を含む。A1、A2、B1、B2およびB3は、NME7_{AB}およびNME7-X1に結合しかつ癌の治療または予防のために患者に投与される抗体を生成する、ペプチドの例である。本発明は、NME7またはNME7-X1における天然起源配列のような正確な配列のペプチドに限定されない。当業者に知られているように、ペプチド配列のいくつかのアミノ酸の置換はなお、天然タンパク質配列を特異的に認識する抗体を生じさせることができる。本発明が、癌増殖を阻害するか、または転移性癌細胞への通常の癌細胞の移行を阻害する本明細書で実証されたペプチドに限定されることは意図されない。ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3を特定するためにここで使用される方法はまた、ここで実証されたペプチドと等しいまたはより効果的であり得る他のペプチド配列を特定するためにも使用できる。

30

【0407】

ヒトNME7_{AB}またはNME7-X1の一部を含むか、NME7_{AB}またはNME7-X1に結合する抗体フラグメントを含む、キメラ抗原受容体分子は、抗癌治療薬であり、癌または癌の転移の治療または予防のために患者に投与される。

【0408】

一例では、抗NME7抗体の認識ユニットまたは可変領域は、CAR（キメラ抗原受容体）技術またはCAR-T技術として知られる技術を使用して、T細胞の分子に融合される。癌を治療するか予防するために治療上使用できる抗体またはそのフラグメントの顕著な特徴は、NME7を認識し、かつ癌を促進する標的とのその相互作用を防止する、抗体様可変領域の特定である。一例では、標的は、MUC1*のPSMGFR領域である。

40

【0409】

抗体、抗体フラグメント、または単鎖抗体は、CARとしても知られるキメラ抗原受容体を含むキメラ分子中に操作でき、その分子はその後、T細胞などの免疫系細胞へ遺伝子導入または形質導入され、患者に投与される。ヒト化抗体または抗体フラグメント、典型的には、scFvは、CARの細胞外ドメインの多くを含む。抗体フラグメントは、膜貫

50

通ドメインとしてのCD8、活性化ドメインとも呼ばれるT細胞受容体シグナル伝達分子などの細胞質シグナル伝達モチーフ、または、限定されないがCD3ゼータ、CD28、41bb、OX40を含む共刺激ドメインなどの、免疫系シグナル伝達分子に生化学的に融合される。CARは、T細胞または他の細胞、好ましくは免疫系細胞へ遺伝子導入され、患者に投与できる。ここで本発明者らは、細胞外部分が、抗NME7、抗NME7_{AB}または抗NME7-X1抗体、抗体フラグメントまたは単鎖、scFv抗体フラグメントを含む、CARについて記述する。好ましい実施形態では、抗体または抗体フラグメントは、ヒトまたはヒト化抗体である。

【0410】

効果的な抗NME7または抗NME7-X1抗体、またはフラグメントは、天然NME7、NME7_{AB}またはNME7-X1に結合する能力を有する。実際に、それからCARの細胞外ドメインが操作される親抗体は、NME7、NME7_{AB}またはNME7-X1由来ペプチドで動物を免疫化することにより生成される。本発明の一態様では、免疫化ペプチドは、NME7アミノ酸1~376で構成される。本発明の一態様では、免疫化ペプチドは、NME7アミノ酸92~376で構成される。本発明の別の態様では、免疫化ペプチドは、NME7アミノ酸125~376で構成される。本発明のさらに別の態様では、免疫化ペプチドは、図6~8に列挙された配列から構成される。本発明の別の態様では、免疫化ペプチドは、図9に列挙された配列から構成される。あるいは、親抗体または抗体フラグメントは、天然の、合成のまたはいずれかのフラグメントあり得る抗体ライブラリーまたはプールから選択され、それらは、NME7、NME7_{AB}またはNME7-X1、図6~8に列挙されたペプチドまたは図9に列挙されたペプチドに結合する能力について選択される。

【0411】

CARの標的化部分は、抗体または抗体フラグメントである必要はない。ここで本発明者らは、細胞外ドメインがNME7フラグメントを含む、CARについて記述する。NME7由来ペプチドは、細胞外ドメインの標的化部分が抗体または抗体フラグメントではなく、タンパク質フラグメントまたはペプチドである、異なる種類のCAR中に操作される。ペプチドCARは、免疫系細胞、典型的にはT細胞中に遺伝子導入されるか形質導入される。NME7フラグメントまたはNME7由来ペプチドは、それらの同族結合パートナーへ結合するが、インタクトNME7、NME7_{AB}、またはNME7-X1のように機能できない、および発癌活性を付与できない、という能力について選択される。NME7フラグメントまたはNME7由来ペプチドは、膜貫通ドメインとしてのCD8、活性化ドメインとも呼ばれるT細胞受容体シグナル伝達分子などの細胞質シグナル伝達モチーフ、または、限定されないが、CD3ゼータ、CD28、41bb、OX40を含む共刺激ドメイン、などの免疫系シグナル伝達分子に生化学的に融合される。

【0412】

本発明の一態様では、NME7フラグメントは、NME7NDPKBドメインの大部分または全てである。本発明の別の態様では、NME7フラグメントは、図6~9に列挙されたペプチド配列の1種または複数を含む、NME7ペプチドである。実験結果は、操作された免疫細胞治療剤のためのキメラ抗原受容体(CAR)の標的化部分として、NME7またはNME7、NME7_{AB}またはNME7-X1のフラグメントを使用する戦略の場合、NME7_{AB}またはNME7-X1のかなり大きなフラグメントが、より短いペプチド、例えば、15アミノ酸長さ未満のペプチドより有効であり得ることを示す。あるいは、各々が異なるNME7_{AB}由来ペプチドを有する一群のCARはまとめて、免疫系細胞に遺伝子導入または形質導入でき、癌の治療または予防のために患者に投与できる。図12および13に示される実験は、この手法の妥当性を支持する。

【0413】

細胞外ドメインに、NME7フラグメントを含むCARは、免疫系細胞、典型的にはT細胞に遺伝子導入または形質導入され、癌の治療または予防のために患者に投与される。一態様では、癌はMUC1^{*}陽性の癌である。別の態様では、癌は転移性癌である。

【0414】

NME7を切断する酵素を阻害する薬剤は、癌を治療するまたは予防するために使用できる。いくつかの形態のNME7は、細胞内に隔離され、したがって、細胞から分泌されず、その際それらは癌を促進するための成長因子として作用し得る。完全長NME7は、42kDaである。しかし、本発明者らは、DM10ドメインを欠き、かつ本発明者らが生成した組換えNME7_{AB}と実質的に同一に見える、約33kDaのNME7種が、癌細胞と幹細胞から分泌されることを見出した。この約33kDaのNME7種および別の約25kDaのNME7種は、NME7の切断を抑制する薬剤の利用により除去された切断産物であり得る。

【0415】

患者試料中の、高いレベルのNME7、約33kDaのNME7種（本発明者らは、これをNME7_{AB}様種と呼ぶ）、またはNME7-X1の検出は、癌の存在またはより高悪性度または転移性状態へのその進行の指標である。本発明者は、両方の初期段階で、ナイーブ幹細胞および癌細胞、特にMUC1^{*}陽性の癌細胞は、DM10ドメインを欠く約33kDaのNME7およびNME7-X1を高レベルで発現することを見出した。

【0416】

NME7-X1は、NME7の理論的な選択的アイソフォームであるとしてタンパク質データベースに最近列挙された。しかし、それは組織または細胞で検出されていない。本発明者らは、PCRによりNME7-X1とNME7を区別するプライマーを設計した。ヒトNME7、NME7a、NME7bおよびNME7-X1の発現レベルが、繊維芽細胞、ヒト胚性幹細胞、ヒトiPS細胞、T47Dヒト乳癌細胞、DU145のヒト前立腺癌細胞、PC3ヒト前立腺癌細胞、HEK295のヒト胎児肝細胞および他のヒト幹細胞株を含む一連の細胞のPCRにより測定された。NME7は、幹細胞より癌細胞でより高レベルで発現される。特に、NME7-X1は、繊維芽細胞または幹細胞でより、前立腺癌細胞において10倍高く、および乳癌細胞において3倍高く、発現される。NME7-X1は、繊維芽細胞または幹細胞でより、HEK293胎児肝細胞において約5倍高く発現され、したがって、NME7-X1は、肝臓癌で上昇されると予想される。NME7bは、幹細胞でよりも前立腺癌細胞中で、17~25倍高く発現される。

【0417】

患者試料中のNME7種の高レベルの検出は、患者が、癌を有する、または癌を発症するおそれがあるという指標である。NME7種のレベルは、PCR、ハイブリダイゼーションスキーム、サイクリングプローブ技術、FISH、免疫細胞化学、IHC、ウェスタンブロット、免疫沈降、サンドイッチ分析、ELISAアッセイなどにより測定または評価できる。患者試料は、液体試料、血液試料、乳汁、尿、細胞、液体生検、生検などであり得る。癌と診察された患者においては、NME7種の高いレベルが、増加した転移能の指標である。NME7-X1の高いレベルは、前立腺癌の指標である。本発明の抗体は、NME7種を検出し区別するために使用され、診断のツールとして使用される。

【0418】

成人ヒト細胞および組織は、有意な水準のNME7を発現しない、またはNME7を分泌しないので、癌を診断するまたはより高悪性度のまたは転移性型を診断するまたはより高悪性度の型へのシフトを診断する有効な方法は、健康な試料でのNME7レベルに比べて、および/または健康な成人細胞または組織に存在することが既知のNME7のレベルに比べて、患者からの、細胞または組織の収集物からの、または培養細胞からの試料中のNME7レベルを測定することである。NME7の増加したレベルは、癌の存在、転移性癌の存在、または転移の開始を示す。また、NME7の増加したレベルは、MUC1^{*}陽性癌を示す。NME7の存在についてアッセイされる試料は、患者からの細胞、培養細胞株、体液、血液試料、組織標本または生検材料であり得る細胞の収集物であり得る。したがって、癌の存在または癌の進行を検出する診断アッセイは、次のステップを含む：1) 癌患者から、または癌を発症するおそれがある患者から試料を取得するステップ；2) NME7のレベル、またはNME7をコードする核酸のレベルを検出もしくは測定できるア

10

20

30

40

50

ッセイに試料を供するステップ；3) 対照患者または対照細胞のレベルに対して、試験試料中の測定されたNME7タンパク質またはNME7コード核酸のレベルを比較するステップ；4) NME7のレベルまたはNME7をコードする核酸のレベルが、対照と比較して、上昇していることを特定するステップ；および5) 試験試料のドナーが、癌に罹患している、またはそれに対し試験物が比較される対照が、癌であると以前に診断されたドナーからのものである場合、癌が進行していると結論を下すステップ。

【0419】

このアッセイでは、それに対し試験試料が比較される対照試料は、非癌性細胞、培養細胞、健康なドナー由来の試料、ドナーからの非癌性の試料、または前の時点でドナーから採取された対照試料である試験試料のドナーからの試料、であり得る。このような試料源は、体液、脳脊髄液、骨髓試料、血液、組織、細胞、生検組織または細胞、患者細胞由来の培養細胞等を含む、癌の存在または癌の進行に関して試験される患者から採取された任意の標本であり得る。それに対し試験試料が比較される試料源は、体液、脳脊髄液、骨髓試料、血液、組織、細胞、生検組織または細胞、または健康なドナーまたは試料が前の時点で得られた試験患者に由来する培養細胞であり得る。それに対し試験試料が比較される測定レベルは、以前に記録されたデータ由来であってよく、試験試料への比較のためのリストに蓄積される。

10

【0420】

セラノスティクス

NME7タンパク質またはNME7をコードする核酸の高いレベルと診断された患者はその後、NME7の発現を抑えるか、NME7の切断を抑制するか、その標的へのNME7の結合を抑制する治療薬で治療される（このような相互作用は癌を促進する）。NME7の重要な標的またはNME7の切断産物は、MUC1*である。NME7は、MUC1*細胞外ドメインに結合し、それを二量化する。したがって、NME7の高いレベルと診断された患者は、NME7を抑制する治療薬および/またはその細胞外ドメインがPSMGFR配列のいくらかまたはすべてからなるMUC1の切断型の二量化を抑制する治療薬による治療から恩恵を受ける。このように、癌治療の適合性および癌の治療または予防のための有効量の治療薬の投与を評価することは、次のステップから成る：1) 癌に罹患していると疑われる、または癌を発症するおそれのある、または転移性癌を発症するおそれのある、患者から試料を得るステップ；2) NME7、またはその切断産物、NME7コード核酸の量を測定するステップであって、測定されたレベルが、対照試料で測定した量より優位に高い、ステップ；3) 患者が、癌に罹患しているかまたはより高悪性度の癌または転移性の癌に進展したことを特定するステップ；4) NME7の発現を抑える、NME7の切断を抑制する、またはその標的へのNME7の結合を抑制する、治療薬の有効量を患者に投与するステップ、および/またはMUC1の発現を抑える、MUC1*へのMUC1の切断を抑制する、またはその標的へのMUC1*の結合を抑制する、有効量の治療薬を患者に投与するステップ。好ましい実施形態では、その標的へのNME7結合を抑制する治療薬は、MUC1*とのその相互作用を抑制する。より好ましい実施形態では、それは、PSMGFR配列で実質的に構成されたMUC1*の細胞外ドメインとのその相互作用を抑制する。好ましい実施形態では、その標的へのMUC1*結合を抑制する治療薬は、MUC1*とNME7の間の相互作用を抑制する。より好ましい実施形態では、MUC1*とNME7の間の相互作用を抑制する治療薬は、NME7_{AB}の配列から実質的に構成されるNME7の部分へのMUC1*の結合を抑制する。

20

30

40

【0421】

化学修飾ペプチド

ポリペプチドまたは抗体治療薬は、短い循環半減期およびタンパク分解および低い溶解性に問題を有する。本発明のバイオ医薬品の薬物動態学的および薬動力学的の特性を改善するために、アミノ酸配列の操作などの方法は、免疫原性を減少させるか増加させ、かつタンパク質切断を減少させ得る；アルブミンなどの免疫グロブリンへおよび血清タンパク質のペプチドの融合または結合がなされ得る；保護および徐放のために本発明のペプチド

50

および抗体などのバイオ医薬品の薬物送達担体中への取り込みもなされ得る；および、天然のまたは合成のポリマーへの結合も考慮され得る。特に、合成ポリマー結合のために、ペグ化またはN - アシル化、S - アシル化などのアシル化も考慮され得る。

【0422】

核酸構築物

本明細書に記載されるような、本発明の核酸分子を含む発現ベクターもまた提供され、核酸分子は、発現制御配列に動作可能に連結される。また、ポリペプチドの発現に適する宿主細胞へ導入された本発明の発現ベクターを含むポリペプチドの産生のために、宿主 - ベクター系が提供される。適切な宿主細胞は、大腸菌 (E. coli) などの細菌細胞、ピキアバストリスなどの酵母細胞、ヨトウガなどの昆虫細胞、またはCOS、HEKまたはCHO細胞などの哺乳動物細胞であり得る。

10

【0423】

本発明は、ポリペプチドの産生を許容する条件下で、本明細書に記載の宿主 - ベクター系の細胞を増殖させることにより本発明のポリペプチドを産生する方法、およびそのように産生されたポリペプチドを回収する方法も提供する。本発明を実施するために役立つポリペプチドは、原核生物または真核生物の発現系での発現により調製され得る。

【0424】

組換え遺伝子が、発現され、ポリペプチドが、多くの方法を利用して精製される。遺伝子は、限定されないが、例えば、pZEROなどの、バクテリア発現ベクターにサブクローン化され得る。

20

【0425】

ポリペプチドは、その後の安定な生物学的活性タンパク質の形成を可能にする任意の技術により精製され得る。例えば、限定されないが、因子は、可溶性タンパク質としてまたは封入体としてのいずれかで細胞から回収され得、そこから8Mのグアニジウム塩酸塩によって定量的に抽出され、透析される。因子をさらに精製するために、数多くの精製法が使用され、限定されないが、従来のイオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、デイファレント糖クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、またはゲル濾過を含む。

【0426】

本明細書で使用される場合、ポリペプチドは、その中でアミノ酸残基が配列内の残基と置換されてサイレントまたは保存的な変化をもたらす、機能的に等価な分子を含む。例えば、配列内の1個または複数のアミノ酸残基は、機能的に等価物として作用する、類似の極性の別のアミノ酸によって置換でき、サイレントなまたは保存的な変化をもたらす。配列内のアミノ酸の置換は、そのアミノ酸が属するクラスの他のメンバーから選択され得る。例えば、非極性の（疎水性）アミノ酸は、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびメチオニンを含む。極性が中性のアミノ酸は、グリシン、セリン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギンおよびグルタミンを含む。正に帯電した（塩基性）アミノ酸は、アルギニン、リジンおよびヒスチジンを含む。負に帯電した（酸性）アミノ酸は、アスパラギン酸とグルタミン酸を含む。潜在的なグリコシル化アミノ酸はセリン、スレオニンおよびアスパラギンを含む。また、本発明の範囲内に含まれるのは、タンパク質またはフラグメントまたは同じまたは類似の生物活性を示すその誘導体、および翻訳中または翻訳後に、例えば、グリコシル化、タンパク質切断割、抗体分子または他の細胞リガンドへの連結などにより、異なるように修飾される誘導体である。

30

40

【0427】

ベクターへのDNAフラグメントの挿入のための当業者に既知のいずれかの方法が、適切な転写/翻訳制御シグナルおよびタンパク質コード配列を使用して、本発明のポリペプチドをコードする発現ベクターを構築するために使用され得る。これらの方法は、インビトロ組換えDNAおよび合成技術、およびインビボ組換え（遺伝的組換え）を含み得る。本発明のポリペプチドをコードする核酸配列の発現は、第二の核酸配列によって調節され

50

得、それによりポリペプチドは、組換えDNA分子で形質転換された宿主中で発現される。例えば、本明細書で記載のポリペプチドの発現は、当技術分野で既知の任意のプロモーター/エンハンサー配列によって制御され得る。ポリペプチドの発現を制御するために使用され得るプロモーターは、限定されないが、以下を含む：Squintoら(1991, Cell 65:1-20)に記述の長末端反復配列；SV40アーリープロモーター領域(Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310)、CMVプロモーター、M-MuLV 5'末端反復、ラウス肉腫ウィルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター(Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797)、ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:144-1445)、メタロチオネイン遺伝子の調節配列(Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42)； β -ラクタマーゼプロモーターなどの原核生物の発現ベクター(Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731)、またはtacプロモーター(DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25)、Scientific American, 1980, 242:74-94の「Useful proteins from recombinant bacteria」も参照；酵母または他の菌類由来のプロモーター配列、例えば、ギャル4プロモーター、ADH(アルコール脱水素酵素)プロモーター、PGK(ホスホグリセリン酸キナーゼ)プロモーター、アルカリフォスファターゼプロモーター、および組織特異性を示し遺伝子導入動物で利用された、次の動物転写制御領域：膵腺房細胞において活性を有するエラスターゼI遺伝子制御領域(Swift et al., 1984, Cell 38:639-646；Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409；MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515)；膵臓の細胞において活性を有するインシュリン遺伝子制御領域(Hanahan, 1985, Nature 315:115-122)、リンパ系細胞において活性を有する免疫グロブリン遺伝子制御領域(Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658；Adames et al., 1985, Nature 318:533-538；Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444)、精巢、乳房、リンパ性およびマスト細胞において活性を有するマウス乳房腫瘍ウィルス制御領域(Leder et al., 1986, Cell 45:485-495)、センドライウィルス、レンチウィルス、肝臓において活性を有するアルブミン遺伝子制御領域(Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276)、肝臓において活性を有するアルファフェトプロテイン遺伝子制御領域(Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648；Hammer et al., 1987, Science 235:53-58)；肝臓において活性を有するアルファ1-抗トリプシン遺伝子制御領域(Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171)、ミエロイド細胞において活性を有するグロビン遺伝子制御領域(Mogram et al., 1985, Nature 315:338-340；Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94)；脳のオリゴデンドロサイト細胞において活性を有するミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域(Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712)；骨格筋において活性を有するミオシン軽鎖-2遺伝子制御領域(Shani, 1985, Nature 314:283-286)、および視床下部において活性を有する性腺刺激放出ホルモン遺伝子制御領域(Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378)。

【0428】

10

20

30

40

50

したがって、本発明により、本明細書に記載されるポリペプチドをコードする核酸を含む、バクテリアか真核生物の宿主で複製できる発現ベクターは、宿主に遺伝子導入するために使用され、それにより、生物学的活性型で回収され得るポリペプチドを産生するためにこのような核酸の発現を誘導する。本明細書で使用される場合、生物学的活性型は、関連する受容体に結合でき、分化機能を生じさせ、および/または受容体を発現する細胞の発現型に影響を及ぼし得る、型を含む。

【0429】

核酸挿入物を含む発現ベクターは、限定されないが、少なくとも3つの一般的な手法：(a) DNA-DNAハイブリダイゼーション、(b)「マーカー」遺伝子機能の存在または非存在、および(c)挿入配列の発現、により特定できる。最初の手法では、発現ベクターに挿入された異種核酸の存在は、挿入された核酸配列に相同である配列を含むプローブを使用して、DNA-DNAハイブリダイゼーションによって検出できる。第2の手法では、組換えベクター/宿主系は、ベクター中の異種核酸配列の挿入によって引き起こされる、特定の「マーカー」遺伝子機能(例えばチミジンキナーゼ活性、抗生物質耐性、形質転換表現型、バキュロウィルスでの閉塞体形成など)の存在または非存在に基づいて、特定および選択できる。例えば、efl核酸配列が、ベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入される場合、挿入物を含む組換え体は、マーカー遺伝子機能の非存在によって特定できる。3番目の手法では、組換え発現ベクターは、組換え構築物により発現された異種核酸産物のアッセイにより特定できる。このようなアッセイは、例えば、検出できる抗体またはその部分でタグ化され得るレセプターまたはその部分へのリガンドの結合などの、または目的のタンパク質またはその部分に対して産生された抗体への結合による、例えば、目的の核酸産物の物理的または機能的特性に基づき得る。

【0430】

ポリペプチド、特に本発明の修飾ポリペプチドは、宿主細胞中で、一時的に、恒常的にまたは永久に発現され得る。

【0431】

本発明で示された疾患または障害を治療するのに有用な有効量は、当業者に既知の方法により決定され得る(例えば、Fingler, et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co, New York, pp. 1-46 (1975))。本発明による使用のための医薬組成物は、薬学的に許容される液体、固体、または半固形担体中に上で記述のポリペプチドを含み、担体または標的化分子(例えば、抗体、ホルモン、成長因子など)に連結され、および/またはインビボ投与前にリポソーム、マイクロカプセルに、および徐放性製剤に組み込まれる。例えば、医薬組成物は、滅菌水、生理食塩水、燐酸緩衝液、またはデキストロース溶液などの水溶液中にポリペプチドを含み得る。あるいは、活性薬剤が、このような治療を必要としている患者に移植される得る固体(例えば、ワックス)または半固形(例えば、ゼラチン)製剤中に含まれ得る。投与経路は、当該技術分野で既知の任意の投与方法でよく、限定されないが、静脈内、くも膜下腔内、皮下、子宮内、病変組織中への注射、動脈内、鼻腔内、経口、または埋め込みデバイスによる経路を含む。

【0432】

投与は、全身または局所的領域にわたり、本発明の活性薬剤の分布をもたらし得る。例えば、神経系の離れた領域を含むいくつかの状態では、薬剤の静脈内またはくも膜下腔内投与が望ましい場合がある。場合によっては、活性薬剤を含む植込錠が、損傷を受けた領域またはその領域の近くに留置され得る。適切な植込錠は、限定されないが、ゲルフォーム、ワックス、スプレー、または微粒子ベース植込錠を含む。

【0433】

本発明はまた、薬学的に許容可能な担体中に本明細書に記載のポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。組成物は、全身的にまたは局所的に投与され得る。当該技術分野で既知の任意の投与方法を使用し得、投与方法には、限定されないが、静脈内、くも膜下腔内

10

20

30

40

50

、動脈内、鼻腔内、経口、皮下、腹腔内、または局所注入または外科インプラントによる方法が挙げられる。持続放出製剤も提供される。

【0434】

遺伝子療法

遺伝子療法は、発現されたまたは発現し得る核酸の対象への投与により実施される療法を指す。本発明のこの実施形態では、核酸は、治療効果を媒介するそれらのコードされたタンパク質を産生する。

【0435】

当該技術分野において利用可能な遺伝子療法のための方法のいずれかが、本発明により使用できる。例示的方法が以下に記載される。

【0436】

遺伝子療法の概説については、Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 12: 488 - 505 (1993); Wu and Wu, *Biotherapy* 3: 87 - 95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573 - 596 (1993); Mulligan, *Science* 260: 926 - 932 (1993); および Morgan and Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191 - 217 (1993); May, *TIBTECH* 11(5): 155 - 215 (1993) を参照されたい。使用できる組換えDNA技術の分野で一般に知られる方法は、Ausubel et al. (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); および Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990) に記載されている。

【0437】

患者への核酸の送達は、直接的または間接的であり得、直接的な場合には、患者は、核酸または核酸担持ベクターに直接曝露され、間接的な場合には、最初に細胞が核酸を用いてインビトロで形質転換され、次に、患者へ移植される。これらの2つの手法は、インビボまたはエクスピボ遺伝子療法として、それぞれ知られている。

【0438】

特定の実施形態では、核酸配列は、インビボで直接投与され、そこでそれが発現されて、コードされた産物を産生する。これは、当該技術分野で知られる多数の方法のいずれかにより実現でき、例えば、適切な核酸発現ベクターの一部としてそれらを構築し、それらが細胞内となるようにそれらを投与することにより；例えば、欠陥のあるまたは弱められたレトロウイルスまたは他のウイルスベクターを用いる感染により、またはネイキッドDNAの直接注入により、または脂質または細胞表面受容体または遺伝子導入剤でのコーティング、リボソーム、マイクロ粒子またはマイクロカプセル中へのカプセル封入、または核に入ることが知られているペプチドに連結してそれらを投与することにより、受容体仲介エンドサイトーシスに曝露されるリガンドに連結してそれを投与することにより（例えば、Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429 - 4432 (1987) を参照）（これは、特に受容体を発現する細胞型を標的にするように使用できる）、等々により実現できる。別の実施形態では、核酸-リガンド複合体が形成され、リガンドがエンドソームを破壊する融合性ウイルスペプチドを含み、核酸がリソソームの分解を回避できるようにする。また別の実施形態では、核酸は、特定の受容体を標的にすることによって、細胞特異的取込および発現のために、インビボ標的化され得る。あるいは、核酸は、細胞内部に導入され、相同組換えにより、発現のために宿主細胞DNA内に組込むことができる（Koller and Smithies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932 - 8935 (1989); Zijlstra et al., *Nature* 342: 435 - 438 (1989)）。

【0439】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸配列を含むウィルスベクターが使用される。遺伝子療法で使用されるポリペプチドをコードする核酸配列は、1個または複数のベクターへクローン化され、これは患者中への遺伝子の送達を促進する。レトロウィルスベクターなどのレンチウィルスベクター、およびアデノウィルスベクターおよびアデノ随伴ウィルスなどの他のベクターは、使用され得るウィルスベクターの例である。レトロウィルスベクターは、ウィルスゲノムの正確なパッケージングおよび宿主細胞DNAへの組み込みに必要な成分を含む。

【0440】

アデノウィルスは、それらが穏やかな疾患を引き起こす気道上皮に自然に感染するので、気道上皮に遺伝子を送達するための特に魅力的な担体である。アデノウィルスベース送達システムのための他の標的は、肝臓、中枢神経系、内皮細胞および筋肉である。アデノウィルスは、非分裂細胞に感染できるという長所を有する。さらに、アデノ随伴ウィルス(AAV)も、遺伝子療法での使用のために提案されてきた。

10

【0441】

遺伝子療法の別の手法は、エレクトロポレーション、リポフェククチン、リン酸カルシウム媒介トランスフェクションまたはウィルス感染などの方法により、組織培養で細胞に遺伝子を移入することを含む。通常、移入の方法は、細胞への選択可能なマーカーの移入を含む。細胞はその後、導入遺伝子を取り込み、発現している細胞を分離するために、選択処理される。それらの細胞はその後、患者に送達される。

【0442】

この実施形態では、核酸は得られた組換え細胞のインビボ投与の前に細胞中に導入される。このような導入は、限定されないが、トランスフェクション、エレクトロポレーション、微量注入、核酸配列を含むウィルスベクターまたはバクテリオファージベクターによる感染、細胞融合、染色体媒介遺伝子移入、マイクロ細胞媒介遺伝子移入、スフェロプラスト融合などを含む、当該技術分野において既知の任意の方法により実施できる。レシピエント細胞の必要な発育的および生理的機能が破壊されない限りにおいて、細胞中への外来遺伝子の導入のための多数の技術が当技術分野において既知であり、本発明により使用され得る。技術は、細胞への核酸の安定した移入を提供するはずであり、それにより、核酸は細胞により発現され、かつ好ましくは遺伝性であり、その細胞の子孫により発現できる。

20

30

【0443】

遺伝子療法の目的のために核酸を導入できる細胞は、いずれの所望の利用可能な細胞型も包含し、限定されないが、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、繊維芽細胞、筋細胞、肝細胞；Tリンパ球、B-リンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒球などの血液細胞；例えば、骨髄、臍帯血、末梢血、胎児肝臓などから得られる、種々の幹または前駆細胞、特に造血性幹または前駆細胞、などを含む。

【0444】

好ましい実施形態では、遺伝子療法に使用される細胞は、患者自己由来である。

【0445】

組換え細胞が、遺伝子療法で使用される実施形態では、ポリペプチドをコードする核酸配列は、それらがその細胞によってまたはそれらの子孫によって発現され得るように細胞に導入され、組換え細胞はその後、治療効果のためにインビボ投与される。特定の実施形態では、幹細胞または前駆細胞が使用される。単離されかつインビトロで維持できるいずれの幹細胞および/または前駆細胞もおそらく、本発明のこの実施形態に従って使用できる。

40

【0446】

特定の実施形態では、遺伝子療法の目的のために導入される核酸は、コード領域に動作可能に連結された誘導可能なプロモーターを含み、それにより核酸の発現は、適切な転写誘導因子の存在または非存在を調節することにより制御可能である。

【0447】

50

治療組成物

治療用化合物の製剤は、当該技術分野で一般に知られており、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., USAを都合よく参照できる。例えば、1日当たり、kg体重当り、約0.05ng~約20mgが、投与され得る。投与計画は、最適の治療反応を得るために調節され得る。例えば、いくつかの分割された投与量が、毎日投与され得る、または投与量は、治療状況の急性性によって示されるように、比例して低減され得る。活性化合物は、経口、静脈内（水溶性の場合）、筋肉内、皮下、鼻腔内、眼内、皮内または坐薬経路または移植（例えば、腹腔内経路により徐放性分子を用いて、または細胞、例えば、インビトロ感作され、レシピエントに養子導入された単球または樹状細胞を用いることにより）などの簡便な方法で投与され得る。投与経路に応じて、ペプチドは、酵素、酸および当該成分を不活化し得る他の天然条件の作用からそれを防御する物質でコートされる必要がある場合がある。

10

【0448】

例えば、ペプチドの低い親油性は、ペプチド結合を切断できる酵素により消化管中で、または酸加水分解により胃中でそれらを破壊することを可能にする。非経口投与以外の方法によりペプチドを投与するために、ペプチドは、その不活性化を防止する物質によりコートされる、またはその物質と共に投与される。例えば、ペプチドは、アジュバント中で、酵素阻害剤との共投与により、またはリポソーム中で投与され得る。本明細書で意図されるアジュバントは、レゾルシノール；ポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性の界面活性剤を含む。酵素阻害剤は、膵臓トリプシンインヒビター、ジソプロピルフルオロホスフェート（DEP）およびトラジロールを含む。リポソームは、水中油中水型CGF乳剤、ならびに従来のリポソームを含む。

20

【0449】

活性化合物もまた、非経口的にまたは腹腔内に投与され得る。分散剤もまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびこれらの混合物中で、ならびに油中で調製できる。貯蔵と使用の通常の条件下では、これらの調製は、微生物の増殖を防止するために防腐剤を含む。

【0450】

注射可能な使用に好適な剤形は、無菌水溶液（可溶性の場合）または分散液と、無菌注射溶液または分散剤による即時製剤化用の無菌粉末を含む。全ての場合において、形態は無菌でなければならず、容易に注射可能な程度に流体でなければならない。それは製造と貯蔵の条件下で安定でなければならず、バクテリアと真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されねばならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）、好適なそれらの混合物および植物油を含む溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、レシチンなどのコーティングの使用により、分散の場合に必要な粒径の維持、および界面活性剤の使用により維持できる。微生物の作用の防止は、種々の抗菌性および抗真菌剤（例えばクロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チオメルサールなど）によりもたらされ得る。多くの場合、等張剤（例えば、ショ糖または塩化ナトリウム）を含むことが好ましい。注射可能な組成物の持続的吸収は、吸収遅延剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物中での使用によりもたらされ得る。

30

40

【0451】

無菌注射溶液は、上記で列挙される種々のほかの成分と共に適切な溶媒中で必要量の活性化合物を組み込み、必要に応じ、続いて滅菌ろ過を行うことにより調製される。一般に、分散剤は、基本的分散媒および上に列挙されたものから選ばれる必要な他の成分を含む無菌の担体中に様々な無菌の有効成分を組み入れることにより調製される。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製法は、その事前に滅菌濾過された溶液由来の有効成分と任意の追加の所望成分の混合粉末を生じる、真空乾燥および凍結乾燥技術

50

である。

【0452】

ペプチドが上述のように適切に保護される場合、活性化合物は、例えば、不活性の希釈剤または同化可能な食用の担体と共に投与される、または、それはハードまたはソフトシェルゼラチンカプセルに封入され、または、それは錠剤に圧縮され、または、それは、食事用の食品に直接組み入れられ、経口投与される。経口治療投与の場合、活性化合物は、賦形剤と共に組み込まれ、摂取型錠剤、パッカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、ウエハーなどの形態で使用され得る。このような組成物および製剤は、少なくとも1重量%の活性化合物を含むべきである。組成物と製剤のパーセンテージは、無論、変化してよく、好都合には約5～約80重量%単位の間であり得る。このような治療上有用な組成物中の活性化合物の量は、適切な投与量が得られるような量である。本発明による、好ましい組成物または製剤は、経口投与単位剤形が約0.1 μ gと2000mgの間の活性成分を含むように、調製される。

10

【0453】

錠剤、丸薬、カプセル剤などは、下記も含み得る：トラガカントゴム、アラビアゴム、トウモロコシデンプンまたはゼラチンなどの結合剤；リン酸二カルシウムなどの賦形剤；トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、アルギン酸などの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤；および、スクロース、ラクトースまたはサッカリンなどの甘味料、またはペパーミント、冬緑油、またはチェリー風味剤などの香味料。投与単位剤形がカプセルである場合、それは、上記のタイプの物質に加えて、液体担体を含み得る。様々な他の物質が、コーティング剤として、または別の理由で、投与単位の物理的な形態を変更するために存在し得る。例えば、タブレット、ピル、またはカプセル剤は、セラック、ショ糖、または両方でコートされ得る。シロップまたはエリキシル剤は、活性化合物、甘味料としてスクロース、保存剤としてメチルおよびプロピルパラベン、およびチェリーまたはオレンジ風味などの風味剤を含み得る。無論、いずれかの投与単位剤形の調製で使用されるどの物質も、用いられた量で、薬学的に純粋で、実質的に無毒でなければならない。加えて、活性化合物が、徐放製剤および配合物に組み入れられ得る。

20

【0454】

送達システム

様々な送達システムが知られており、例えば、リポソーム中へのカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、化合物を発現できる組換え細胞、受容体依存性エンドサイトーシス、レトロウィルスまたは他のベクターなどの一部としての核酸の構築物、などを、本発明の化合物を投与するために使用できる。導入の方法は、限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、眼内、硬膜外および経口経路を含む。化合物または組成物は、任意の簡便な経路で投与され得、例えば、注入またはボーラス注入により、上皮または皮膚粘膜表層（例えば、口腔粘膜、直腸および腸粘膜など）による吸収によって投与され、また、他の生理活性物質と共に投与され得る。投与は、全身性または局所的であり得る。加えて、本発明の医薬化合物または組成物は、脳室内注射およびくも膜下腔内注射を含む、任意の好適な経路により中枢神経系に導入することが望ましい場合がある。脳室内注射は、例えば、オマヤレザパーなどのレザパーに取り付けられた脳室内カテーテルにより促進され得る。例えば、吸入器か噴霧器およびエアロゾル化剤を有する製剤の使用により、肺内投与も採用できる。

30

40

【0455】

特定の実施形態では、治療を必要とする領域へ、本発明の医薬化合物または組成物を、局所的に投与することが望ましい場合があり；これは、例えば、限定されないが、手術中の局所注入、局所適用、例えば、手術後の創傷被覆材と併せて、注射により、カテーテルにより、坐薬により、またはインプラントにより達成し得る。インプラントは、サイラスティック膜などの膜、または繊維を含む、多孔性、非多孔性、ゼラチン状物質であり得る。好ましくは、本発明の抗体またはペプチドを含むタンパク質を投与する場合、タンパク質が吸収しない物質を使用するように注意しなければならない。別の実施形態では、化合

50

物または組成物は、小胞、特にリポソーム中で送達できる。また別の実施形態では、化合物または組成物は、制御放出系で送達できる。一実施形態では、ポンプを使用し得る。別の実施形態では、高分子材料を使用できる。さらに別の実施形態では、制御放出システムは、治療標的の近傍に配置でき、それにより全身投与量の極わずかの量しか必要としない。

【0456】

配列表フリーテキスト

a、g、c、t以外のヌクレオチド略号の使用については、それらは、WIPO標準S T . 25、補足資料2、表1に定められた規則にしたがい、そこでは、kはtまたはgを表し；nはa、c、t、またはgを表し；mはaまたはcを表し；rはaまたはgを表し；sはcまたはgを表し；wはaまたはtを表し、およびyはcまたはtを表す。

10

【0457】

MTPGTQSPFF LLLLLLTVLTV VTGSGHASST PGGGEKE
 TSAT QRSSVPSSTE KNAVSM TSSV LSSHSPGSGS ST
 TQGQDVT L APATEPASGS AATWGQDVTS VPVTRPALG
 S TTPPAHDVTS APDNKPAPGS TAPPAHGVTS APDTR
 PAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS A
 PDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGV
 TS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPP
 AHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPA
 PGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APD
 TRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS
 APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPP
 AHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPA
 PGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APD
 TRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS
 APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPP
 AHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPA
 PGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APD
 TRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS
 APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPP
 AHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDNRPALGS
 TAPPVHNVTS ASGSASGSAS TLVHNGTSAR ATTTPAS
 KST PFSIPSHHSD TPTTLASHST KTDASSTHHS SVP
 PLTSSNH STSPQLSTGV SFFFLSFHIS NLQFNSSLED
 PSTDYYQELQ RDISEMFLQI YKQGGFLGLS NIKFRPG
 SVV VQLTLAFREG TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYN
 LTISDVS VSDVPFPFSA QSGAGVPGWG IALLVLCVL
 VALAIVYLIA LAVCQCRRKN YGQLDIFPAR DTYHPMS
 EYP TYHTHGRYVP PSSTDRSPYE KVSAGNGGSS LSY
 TNPAVAA ASANL (配列番号1) は、完全長MUC1受容体(ムチン1前駆物
 質、GENBANK受入番号15941)を表す。

20

30

40

【0458】

MTPGTQSPFFLLLLLTVLT (配列番号2)

50

M T P G T Q S P F F L L L L L T V L T V V T A (配列番号3)

M T P G T Q S P F F L L L L L T V L T V V T G (配列番号4)

配列番号2, 3および4は、MUC1受容体と短縮型アイソフォームを細胞膜表面に向けるためのN末端MUC-1シグナル伝達配列である。配列番号2, 3および4におけるバリエーションにより示されるように、最大で3個のアミノ酸残基がC末端で欠失し得る。

【0459】

G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A G V P G W G I A L L V L V C V L V A L A I V Y L I A L A V C Q C R R K N Y G Q L D I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G N G G S S L S Y T N P A V A A A S A N L (配列番号5)は、そのN末端に天然PSMGFRを有する短縮型MUC1受容体アイソフォームを表し、完全長MUC1受容体の膜貫通および細胞質側配列を含む。

10

【0460】

G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A (配列番号6)は、MUC1受容体の天然1次配列の細胞外ドメイン(nat-PSMGFR-「PSMGFR」の例)を表す。

【0461】

T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A (配列番号7)は、配列番号6のN末端に単一アミノ酸欠失を有する、MUC1成長因子受容体の天然一次配列の細胞外ドメイン(nat-PSMGFR-「PSMGFR」の例)を表す。

20

【0462】

G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S P Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A (配列番号8)は、高められた安定性を有するMUC1成長因子受容体の天然一次配列の「SPY」機能性バリエーションの細胞外ドメイン(var-PSMGFR-「PSMGFR」の例)を表す。

【0463】

T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S P Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A (配列番号9)は、配列番号8のC末端に単一のアミノ酸欠失を有する、高められた安定性を有するMUC1成長因子受容体の「SPY」機能的バリエーションの細胞外ドメイン(var-PSMGFR-「PSMGFR」の例)を表す。

30

【0464】

t g t c a g t g c c g c c g a a a g a a c t a c g g g c a g c t g g a c a t c t t t c c a g c c c g g g a t a c c t a c c a t c c t a t g a g c g a g t a c c c c a c c t a c c a c a c c c a t g g g c g c t a t g t g c c c c c t a g c a g t a c c g a t c g t a g c c c c t a t g a g a a g g t t t c t g c a g g t a a c g g t g g c a g c a g c c t c t c t t a c a c a a a c c c a g c a g t g g c a g c c g c t t c t g c c a a c t t g (配列番号10)は、MUC1細胞質ドメインヌクレオチド配列を表す。

【0465】

C Q C R R K N Y G Q L D I F P A R D T Y H P M S E Y P T Y H T H G R Y V P P S S T D R S P Y E K V S A G N G G S S L S Y T N P A V A A A S A N L (配列番号11)は、MUC1細胞質ドメインアミノ酸配列を表す。

40

【0466】

g a g a t c c t g a g a c a a t g a a t c a t a g t g a a a g a t t c g t t t t c a t t g c a g a g t g g t a t g a t c c a a a t g c t t c a c t t c t t c g a c g t t a t g a g c t t t t a t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a a a g a a t c a t c g c a c c t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a t g t c t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a

50

a t t g a c t a t g g g g a t c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a
g t a g g a a a g a a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c
a a t a t c a a a g g c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a
g c t g g a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t
c a a g g a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c
a a g a c c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t
g g t c c t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a
t a t g t g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g
a g t g g c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c
t t t g g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g
a t t c t t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t
t c c t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a
t t t a c t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g
t c a g t g a a g g t a t g t t g a a t a c a c t a t a t t c a g t a c a t t t
t g t t a a t a g g a g a g c a a t g t t t a t t t t c t t g a t g t a c t t t
a t g t a t a g a a a a t a a (配列番号 1 2) は、N M E 7 ヌクレオチド配列 (N M
E 7 : G E N B A N K 受入番号 A B 2 0 9 0 4 9) を表す。

【 0 4 6 7 】

D P E T M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V
E M H D V K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L
I D Y G D Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K
A G F T I T K L K M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T
G P I I A M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L
F G T D G I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K
F T N C T C C I V K P H A V S E G M L N T L Y S V H F V N R R A M F I F L M Y F
M Y R K (配列番号 1 3) は、N M E 7 アミノ酸配列 (N M E 7 : G E N B A N K 受入番
号 A B 2 0 9 0 4 9) を表す。

【 0 4 6 8 】

a t g g t g c t a c t g t c t a c t t t a g g g a t c g t c t t t c a a g g c
g a g g g g c c t c c t a t c t c a a g c t g t g a t a c a g g a a c c a t g g
c c a a c t g t g a g c g t a c c t t c a t t g c g a t c a a a c c a g a t g g
g g t c c a g c g g g g t c t t g t g g g a g a g a t t a t c a a g c g t t t t
g a g c a g a a a g g a t t c c g c c t t g t t g g t c t g a a a t t c a t g c
a a g c t t c c g a a g a t c t t c t c a a g g a a c a c t a c g t t g a c c t
g a a g g a c c g t c c a t t c t t t g c c g g c c t g g t g a a a t a c a t g
c a c t c a g g g c c g g t a g t t g c c a t g g t c t g g g a g g g g c t g a
a t g t g g t g a a g a c g g g c c g a g t c a t g c t c g g g g a g a c c a a
c c c t g c a g a c t c c a a g c c t g g g a c c a t c c g t g g a g a c t t c
t g c a t a c a a g t t g g c a g g a a c a t t a t a c a t g g c a g t g a t t
c t g t g g a g a g t g c a g a g a a g g a g a t c g g c t t g t g g t t t c a
c c c t g a g g a a c t g g t a g a t t a c a c g a g c t g t g c t c a g a a c
t g g a t c t a t g a a t g a (配列番号 1 4) は、N M 2 3 - H 1 ヌクレオチド配列
(N M 2 3 - H 1 : G E N B A N K 受入番号 A F 4 8 7 3 3 9) を表す。

【 0 4 6 9 】

M V L L S T L G I V F Q G E G P P I S S C D T G T M A N C E R T F I A I K P D
G V Q R G L V G E I I K R F E Q K G F R L V G L K F M Q A S E D L L K E H Y V D
L K D R P F F A G L V K Y M H S G P V V A M V W E G L N V V K T G R V M L G E T
N P A D S K P G T I R G D F C I Q V G R N I I H G S D S V E S A E K E I G L W F
H P E E L V D Y T S C A Q N W I Y E (配列番号 1 5) N M 2 3 - H 1 は、アミノ酸配
列 (N M 2 3 - H 1 : G E N B A N K 受入番号 A F 4 8 7 3 3 9) を表す。

10

20

30

40

50

【0470】

a t g g t g c t a c t g t c t a c t t t a g g g a t c g t c t t t c a a g g c
g a g g g g c c t c c t a t c t c a a g c t g t g a t a c a g g a a c c a t g g
c c a a c t g t g a g c g t a c c t t c a t t g c g a t c a a a c c a g a t g g
g g t c c a g c g g g g t c t t g t g g g a g a g a t t a t c a a g c g t t t t
g a g c a g a a a g g a t t c c g c c t t g t t g g t c t g a a a t t c a t g c
a a g c t t c c g a a g a t c t t c t c a a g g a a c a c t a c g t t g a c c t
g a a g g a c c g t c c a t t c t t t g c c g g c c t g g t g a a a t a c a t g
c a c t c a g g g c c g g t a g t t g c c a t g g t c t g g g a g g g g c t g a
a t g t g g t g a a g a c g g g c c g a g t c a t g c t c g g g g a g a c c a a
c c c t g c a g a c t c c a a g c c t g g g a c c a t c c g t g g a g a c t t c
t g c a t a c a a g t t g g c a g g a a c a t t a t a c a t g g c g g t g a t t
c t g t g g a g a g t g c a g a g a a g g a g a t c g g c t t g t g g t t t c a
c c c t g a g g a a c t g g t a g a t t a c a c g a g c t g t g c t c a g a a c
t g g a t c t a t g a a t g a (配列番号16)は、NM23-H1 S120G変異
体ヌクレオチド配列(NM23-H1:GENBANK受入番号AF487339)を表
す。

10

【0471】

M V L L S T L G I V F Q G E G P P I S S C D T G T M A N C E R T F I A I K P D
G V Q R G L V G E I I K R F E Q K G F R L V G L K F M Q A S E D L L K E H Y V D
L K D R P F F A G L V K Y M H S G P V V A M V W E G L N V V K T G R V M L G E T
N P A D S K P G T I R G D F C I Q V G R N I I H G G D S V E S A E K E I G L W F
H P E E L V D Y T S C A Q N W I Y E (配列番号17)は、NM23-H1 S120
G変異体アミノ酸配列(NM23-H1:GENBANK受入番号AF487339)を
表す。

20

【0472】

a t g g c c a a c c t g g a g c g c a c c t t c a t c g c c a t c a a g c c g
g a c g g c g t g c a g c g c g g c c t g g t g g g c g a g a t c a t c a a g c
g c t t c g a g c a g a a g g g a t t c c g c c t c g t g g c c a t g a a g t t
c c t c c g g g c c t c t g a a g a a c a c c t g a a g c a g c a c t a c a t t
g a c c t g a a a g a c c g a c c a t t c t t c c c t g g g c t g g t g a a g t
a c a t g a a c t c a g g g c c g g t t g t g g c c a t g g t c t g g g a g g g
g c t g a a c g t g g t g a a g a c a g g c c g a g t g a t g c t t g g g g a g
a c c a a t c c a g c a g a t t c a a a g c c a g g c a c c a t t c g t g g g g
a c t t c t g c a t t c a g g t t g g c a g g a a c a t c a t t c a t g g c a g
t g a t t c a g t a a a a a g t g c t g a a a a a g a a a t c a g c c t a t g g
t t t a a g c c t g a a g a a c t g g t t g a c t a c a a g t c t t g t g c t c
a t g a c t g g g t c t a t g a a t a a (配列番号18)は、NM23-H2ヌクレ
オチド配列(NM23-H2:GENBANK受入番号AK313448)を表す。

30

【0473】

M A N L E R T F I A I K P D G V Q R G L V G E I I K R F E Q K G F R L V A M K
F L R A S E E H L K Q H Y I D L K D R P F F P G L V K Y M N S G P V V A M V W E
G L N V V K T G R V M L G E T N P A D S K P G T I R G D F C I Q V G R N I I H G
S D S V K S A E K E I S L W F K P E E L V D Y K S C A H D W V Y E (配列番号19
) NM23-H2アミノ酸配列(NM23-H2:GENBANK受入番号AK3134
48)を表す。

40

【0474】

大腸菌(E.coli)発現のために最適化されたヒトNM23-H7-2配列:
(DNA)

a t g c a t g a c g t t a a a a t c a c c g t a c c t t t c t g a a a c g c

50

a c g a a a t a t g a t a a t c t g c a t c t g g a a g a c c t g t t t a t t g
 g c a a c a a a g t c a a t g t g t t c t c t c g t c a g c t g g t g c t g a t
 c g a t t a t g g c g a c c a g t a c a c c g c g c g t c a a c t g g g t a g t
 c g c a a a g a a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a
 t c t c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c
 g g g t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c
 c g t a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c
 g c c c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g
 t c c g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c
 t g c g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g 10
 t t g c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t
 t g g c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c
 t c a t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c
 c g a g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t
 t a c c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g
 t c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g
 a t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t
 g g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a
 g g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t
 a c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a 20
 t g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t
 c c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g
 c a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g
 t a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c
 t t t t t c a a a a t t c t g g a t a a t t g a (配列番号 20)

(アミノ酸)

M H D V K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L
 I D Y G D Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K
 A G F T I T K L K M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T 30
 G P I I A M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L
 F G T D G I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K
 F T N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N
 M D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N
 N A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H
 C T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号 21)

【0475】

ヒトNME7 - A :

(DNA)

a t g g a a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a
 t c a a a g g c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g 40
 g a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g
 g a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a
 c c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c
 c t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g
 t g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g
 g c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g
 g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c
 t t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t g a

(配列番号 22)

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIEIINKAGFTITKLKMMMLS
 RKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTTGPIIAMEILRDDAI
 CEWKRL LGPANS GVAR TDASESIRALFGTDGIRNA AHGPD
 SFASAA REMELFF (配列番号23)

【0476】

ヒトNME7 - A1 :

(DNA)

atggaa a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t
 caaagg c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g
 atttactataaacc a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g
 a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c
 c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c
 t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t
 g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g
 c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g
 a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t
 t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t c c t t
 c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c
 t t g a (配列番号24)

10

(アミノ酸)

20

MEKTLALIKPDAISKAGEIEIEIINKAGFTITKLKMMMLS R
 KEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTTGPIIAMEILRDDAIC
 EWKRL LGPANS GVAR TDASESIRALFGTDGIRNA AHGPD S
 FASAA REMELFF PS SGGCGPANTAKFT (配列番号25)

【0477】

ヒトNME7 - A2 :

(DNA)

atgaa t c a t a g t g a a a g a t t c g t t t t c a t t g c a g a g t g g t
 atgat c c a a a t g c t t c a c t t c t t c g a c g t t a t g a g c t t t t
 attttacc c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a
 a a g a a t c a t c g c a c c t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a
 a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a
 t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g a t
 caata t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a a g a a a a a a
 c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t g g
 a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g a t t t a c t a t a
 a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c a t
 t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t t c a a
 t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c
 a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a a
 g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a
 t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c
 a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g
 c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t t g a (配列番号26)

30

(アミノ酸)

40

MNHSE R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
 KNHRT F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
 QY T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
 T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
 M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G

50

IRNA AHGPDSFASAA REMELFF (配列番号 27)

【0478】

ヒトNME7 - A3 :

(DNA)

```

a t g a a t c a t a g t g a a a g a t t c g t t t t c a t t g c a g a g t g g t
a t g a t c c a a a t g c t t c a c t t c t t c g a c g t t a t g a g c t t t t
a t t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a
a a g a a t c a t c g c a c c t t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a
a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a
t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g a t
c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a a g a a a a a a
c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t g g
a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g a t t t a c t a t a
a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c a t
t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t t c a a
t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c
a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a a
g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a
t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c
a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g
c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c t t c a a g t g g a g g
t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c t t g a (配列番号 2
8 )

```

(アミノ酸)

```

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T (配列
番号 29 )

```

【0479】

ヒトNME7 - B :

(DNA)

```

a t g a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a
g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a
t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g
g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g
g a g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a
t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t
g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c
c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c
a a t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t
a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t
t c t t c t g a (配列番号 30 )

```

(アミノ酸)

```

M N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M
D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N
A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C
T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号 31 )

```

【0480】

ヒトNME7 - B1 :

(DNA)

a t g a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a
 g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a
 t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g
 g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g
 g a g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a
 t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t
 g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c
 c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c
 a a t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t
 a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t
 t c t t c a a g a t c t t g g a t a a t t a g t g a (配列番号32)

10

(アミノ酸)

M N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M
 D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N
 A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C
 T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号33)

20

【0481】

ヒトNME7 - B2 :

(DNA)

a t g c c t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a
 a a t t t a c t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c
 t g t c a g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c
 c g a g a t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a
 a t a t g g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a
 t a a a g g a g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a
 a t g t a t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a
 a t a a t g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c
 t g a t c c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c
 a g a g c a a t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c
 a c t g t a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a
 a t a c t t c t t c t g a (配列番号34)

30

(アミノ酸)

M P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I
 R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E
 M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L
 R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号35)

40

【0482】

ヒトNME7 - B3 :

(DNA)

a t g c c t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a
 a a t t t a c t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c
 t g t c a g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c
 c g a g a t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a
 a t a t g g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a
 t a a a g g a g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a
 a t g t a t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a
 a t a a t g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c

50

t g a t c c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c
 a g a g c a a t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c
 a c t g t a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a
 a t a c t t c t t c a a g a t c t t g g a t a a t t a g t g a (配列番号 36)

(アミノ酸)

M P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I
 R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E
 M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L
 R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号
 37)

10

【 0 4 8 3 】

N M E 7 - A B と し て も 知 ら れ る ヒ ト N M E 7 A B :

(D N A)

a t g g a a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t
 c a a a g g c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g
 a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g
 a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c
 c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c
 t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t
 g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g
 c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g
 a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t
 t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c t t
 c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c
 t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a g t
 g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a t g
 c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g g a
 t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g g a
 g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a t t
 c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t g c
 t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c c t
 g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c a a
 t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t a c
 t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t t c
 t t c a a g a t c t t g g a t a a t t a g t g a (配列番号 38)

20

30

(アミノ酸)

M E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I T K L K M M M L S R
 K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I L R D D A I C
 E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A A H G P D S
 F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V K P H A V S
 E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F Y E V Y K G
 V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P
 E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F
 F K I L D N - (配列番号 39)

40

【 0 4 8 4 】

ヒ ト N M E 7 - A B 1 :

(D N A)

a t g g a a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t
 c a a a g g c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g
 a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g

50

a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c
 c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c
 t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t
 g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g
 c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g
 a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t
 t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c t t
 c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c
 t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a g t
 g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a t g
 c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g g a
 t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g g a
 g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a t t
 c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t g c
 t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c c t
 g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c a a
 t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t a c
 t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t t c
 t t c t g a (配列番号 40)

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSR
 KEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
 EWKRLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
 FASAAAREMELFFPSGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
 EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKG
 VVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADP
 EIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYF

【 0 4 8 5 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - A配列 :

(DNA)

a t g g a a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t
 c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g
 t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t
 a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c
 c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c
 g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c
 g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g
 c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g
 c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a
 t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c t g a (

配列番号 42)

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSR
 KEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
 EWKRLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
 FASAAAREMELFF (配列番号 43)

【 0 4 8 6 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - A1配列 :

(DNA)

50

a t g g a a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t
c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g
t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t
a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c
c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c
g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c
g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g
c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g
c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a
t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c g a
g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t a c
c t g a (配列番号 4 4)

(アミノ酸)

M E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I T K L K M M M L S R
K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I L R D D A I C
E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A A H G P D S
F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T (配列番号 4 5)

【 0 4 8 7 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - A 2 配列 :

(D N A)

a t g a a t c a c t c c g a a c g c t t t g t t t t a t c g c c g a a t g g t
a t g a c c c g a a t g c t t c c c t g c t g c g c c g c t a c g a a c t g c t
g t t t t a t c c g g g c g a t g g t a g c g t g g a a a t g c a t g a c g t t
a a a a a t c a c c g t a c c t t t c t g a a a c g c a c g a a a t a t g a t a
a t c t g c a t c t g g a a g a c c t g t t t a t t g g c a a c a a a g t c a a
t g t g t t c t c t c g t c a g c t g g t g c t g a t c g a t t a t g g c g a c
c a g t a c a c c g c g c g t c a a c t g g g t a g t c g c a a a g a a a a a a
c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t c c a a a g c t g g
c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g t t t c a c c a t c
a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t a a a g a a g c c c
t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c c g t t t t t c a a
t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c g a t t a t c g c a
a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c g a a t g g a a a c
g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g c g c g t a c c g a
t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g c a c c g a t g g t
a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a t t c g c a t c g g
c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c t g a (配列番号 4 6)

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F (配列番号 4 7)

【 0 4 8 8 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - A 3 配列 :

(D N A)

a t g a a t c a c t c c g a a c g c t t t g t t t t a t c g c c g a a t g g t
a t g a c c c g a a t g c t t c c c t g c t g c g c c g c t a c g a a c t g c t
g t t t t a t c c g g g c g a t g g t a g c g t g g a a a t g c a t g a c g t t

a a a a a t c a c c g t a c c t t t c t g a a a c g c a c g a a a t a t g a t a
a t c t g c a t c t g g a a g a c c t g t t t a t t g g c a a c a a a g t c a a
t g t g t t c t c t c g t c a g c t g g t g c t g a t c g a t t a t g g c g a c
c a g t a c a c c g c g c g t c a a c t g g g t a g t c g c a a a g a a a a a a
c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t c c a a a g c t g g
c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g t t t c a c c a t c
a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t a a a g a a g c c c
t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c c g t t t t t c a a
t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c g a t t a t c g c a
a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c g a a t g g a a a c 10
g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g c g c g t a c c g a
t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g c a c c g a t g g t
a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a t t c g c a t c g g
c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c g a g c t c t g g c g g
t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t a c c t g a (配列番号 4
8)

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I 20
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T (配列
番号 49)

【0489】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - B配列：

(DNA)

a t g a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t
c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a
t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g 30
g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g
g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a
c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t
g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c
c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c
a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t
a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t
t t t t c t g a (配列番号 50)

(アミノ酸)

M N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M 40
D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N
A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C
T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号 51)

【0490】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - B1配列：

(DNA)

a t g a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t
c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a
t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g
g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g 50

g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a
c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t
g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c
c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c
a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t
a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t
t t t t c a a a a t t c t g g a t a a t t g a (配列番号 5 2)

(アミノ酸)

M N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M
D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N
A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C
T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号 5 3)

10

【 0 4 9 1 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - B2配列 :

(DNA)

a t g c c g a g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a
a a t t t a c c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c
a g t g t c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c
c g t g a t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a
a c a t g g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a
c a a a g g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a
a t g t a c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a
a c a a t g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c
a g a t c c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g
c g c g c a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c
a c t g t a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a
a t a c t t t t t c t g a (配列番号 5 4)

20

(アミノ酸)

M P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I
R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E
M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L
R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号 5 5)

30

【 0 4 9 2 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7 - B3配列 :

(DNA)

a t g c c g a g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a
a a t t t a c c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c
a g t g t c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c
c g t g a t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a
a c a t g g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a
c a a a g g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a
a t g t a c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a
a c a a t g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c
a g a t c c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g
c g c g c a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c
a c t g t a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a
a t a c t t t t t c a a a a t t c t g g a t a a t t g a (配列番号 5 6)

40

(アミノ酸)

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

50

M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L
R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号
57)

【 0 4 9 3 】

大腸菌発現用に最適化された N M E 7_{A B} 配列としても知られるヒト N M E 7 - A B :
(D N A)

a t g g a a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t
c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g
t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t
a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c 10
c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c
g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c
g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g
c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g
c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a
t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c g a
g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t a c
c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t c a
g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a t g
c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g g a 20
c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g g c
g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a c t
c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t g c
c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c c g
g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c a a
t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t a c
c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t t t
t t c a a a a t t c t g g a t a a t t g a (配列番号 58)

(アミノ酸)

M E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I T K L K M M M L S R 30
K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I L R D D A I C
E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A A H G P D S
F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V K P H A V S
E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F Y E V Y K G
V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P
E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F
F K I L D N (配列番号 59)

【 0 4 9 4 】

大腸菌発現用に最適化された N M E 7_{A B 1} 配列としても知られるヒト N M E 7 - A B
1 :

(D N A)

A t g g a a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t
c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g
t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t
a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c
c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c
g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c
g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g
c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g
c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a 40
50

t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c g a
g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t a c
c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t c a
g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a t g
c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g g a
c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g g c
g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a c t
c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t g c
c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c c g
g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c a a
t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t a c
c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t t t
t t c t g a (配列番号 60)

10

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLMMLLSR
KEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRL LGPANS GVAR TDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDS
FASAA REMELFFPS SGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKG
VVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFFCGPADP
EIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYF
F (配列番号 61)

20

【0495】

マウスNME6

(DNA)

A t g a c c t c c a t c t t g c g a a g t c c c c a a g c t c t t c a g c t c a
c a c t a g c c c t g a t c a a g c c t g a t g c a g t t g c c c a c c c a c t
g a t c c t g g a g g c t g t t c a t c a g c a g a t t c t g a g c a a c a a g
t t c c t c a t t g t a c g a a c g a g g g a a c t g c a g t g g a a g c t g g
a g g a c t g c c g g a g g t t t t a c c g a g a g c a t g a a g g g c g t t t
t t t c t a t c a g c g g c t g g t g g a g t t c a t g a c a a g t g g g c c a
a t c c g a g c c t a t a t c c t t g c c c a c a a a g a t g c c a t c c a a c
t t t g g a g g a c a c t g a t g g g a c c c a c c a g a g t a t t t c g a g c
a c g c t a t a t a g c c c c a g a t t c a a t t c g t g g a a g t t t g g g c
c t c a c t g a c a c c c g a a a t a c t a c c c a t g g c t c a g a c t c c g
t g g t t t c c g c c a g c a g a g a g a t t g c a g c c t t c t t c c c t g a
c t t c a g t g a a c a g c g c t g g t a t g a g g a g g a g g a a c c c c a g
c t g c g g t g t g g t c c t g t g c a c t a c a g t c c a g a g g a a g g t a
t c c a c t g t g c a g c t g a a a c a g g a g g c c a c a a a c a a c c t a a
c a a a a c c t a g (配列番号 62)

30

40

(アミノ酸)

MTSILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNK
FLIVRTRELQWKLEDCRRFYREHEGRFFYQRLVEFMTSGP
IRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARYIAPDSIRGSLG
LTDTRNTTHGSDSVVSA SREIAAFPFDFSEQRWYEEEEEPQ
LRCGPVHYSPEEGIHCA AETGGHKQP NKT (配列番号 63)

【0496】

ヒトNME6:

(DNA)

A t g a c c c a g a a t c t g g g g a g t g a g a t g g c c t c a a t c t t g c

50

g a a g c c c t c a g g c t c t c c a g c t c a c t c t a g c c c t g a t c a a
g c c t g a c g c a g t c g c c c a t c c a c t g a t t c t g g a g g c t g t t
c a t c a g c a g a t t c t a a g c a a c a a g t t c c t g a t t g t a c g a a
t g a g a g a a c t a c t g t g g a g a a a g g a a g a t t g c c a g a g g t t
t t a c c g a g a g c a t g a a g g g c g t t t t t t c t a t c a g a g g c t g
g t g g a g t t c a t g g c c a g c g g g c c a a t c c g a g c c t a c a t c c
t t g c c c a c a a g g a t g c c a t c c a g c t c t g g a g g a c g c t c a t
g g g a c c c a c c a g a g t g t t c c g a g c a c g c c a t g t g g c c c c a
g a t t c t a t c c g t g g g a g t t t c g g c c t c a c t g a c a c c c g c a
a c a c c a c c c a t g g t t c g g a c t c t g t g g t t t c a g c c a g c a g
a g a g a t t g c a g c c t t c t t c c c t g a c t t c a g t g a a c a g c g c
t g g t a t g a g g a g g a a g a g c c c c a g t t g c g c t g t g g c c c t g
t g t g c t a t a g c c c a g a g g g a g g t g t c c a c t a t g t a g c t g g
a a c a g g a g g c c t a g g a c c a g c c t g a (配列番号 6 4)

10

(アミノ酸)

M T Q N L G S E M A S I L R S P Q A L Q L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V
H Q Q I L S N K F L I V R M R E L L W R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L
V E F M A S G P I R A Y I L A H K D A I Q L W R T L M G P T R V F R A R H V A P
D S I R G S F G L T D T R N T T H G S D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R
W Y E E E E P Q L R C G P V C Y S P E G G V H Y V A G T G G L G P A (配列番号 6

20

5)

【 0 4 9 7 】

ヒトNME6 1 :

(DNA)

A t g a c c c a g a a t c t g g g g a g t g a g a t g g c c t c a a t c t t g c
g a a g c c c t c a g g c t c t c c a g c t c a c t c t a g c c c t g a t c a a
g c c t g a c g c a g t c g c c c a t c c a c t g a t t c t g g a g g c t g t t
c a t c a g c a g a t t c t a a g c a a c a a g t t c c t g a t t g t a c g a a
t g a g a g a a c t a c t g t g g a g a a a g g a a g a t t g c c a g a g g t t
t t a c c g a g a g c a t g a a g g g c g t t t t t t c t a t c a g a g g c t g
g t g g a g t t c a t g g c c a g c g g g c c a a t c c g a g c c t a c a t c c
t t g c c c a c a a g g a t g c c a t c c a g c t c t g g a g g a c g c t c a t
g g g a c c c a c c a g a g t g t t c c g a g c a c g c c a t g t g g c c c c a
g a t t c t a t c c g t g g g a g t t t c g g c c t c a c t g a c a c c c g c a
a c a c c a c c c a t g g t t c g g a c t c t g t g g t t t c a g c c a g c a g
a g a g a t t g c a g c c t t c t t c c c t g a c t t c a g t g a a c a g c g c
t g g t a t g a g g a g g a a g a g c c c c a g t t g c g c t g t g g c c c t g
t g t g a (配列番号 6 6)

30

(アミノ酸)

M T Q N L G S E M A S I L R S P Q A L Q L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V
H Q Q I L S N K F L I V R M R E L L W R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L
V E F M A S G P I R A Y I L A H K D A I Q L W R T L M G P T R V F R A R H V A P
D S I R G S F G L T D T R N T T H G S D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R
W Y E E E E P Q L R C G P V (配列番号 6 7)

40

【 0 4 9 8 】

ヒトNME6 2 :

(DNA)

A t g c t c a c t c t a g c c c t g a t c a a g c c t g a c g c a g t c g c c c
a t c c a c t g a t t c t g g a g g c t g t t c a t c a g c a g a t t c t a a g
c a a c a a g t t c c t g a t t g t a c g a a t g a g a g a a c t a c t g t g g

50

a g a a a g g a a g a t t g c c a g a g g t t t t a c c g a g a g c a t g a a g
g g c g t t t t t c t a t c a g a g g c t g g t g g a g t t c a t g g c c a g
c g g g c c a a t c c g a g c c t a c a t c c t t g c c c a c a a g g a t g c c
a t c c a g c t c t g g a g g a c g c t c a t g g g a c c c a c c a g a g t g t
t c c g a g c a c g c c a t g t g g c c c c a g a t t c t a t c c g t g g g a g
t t t c g g c c t c a c t g a c a c c c g c a a c a c c a c c c a t g g t t c g
g a c t c t g t g g t t t c a g c c a g c a g a g a g a t t g c a g c c t t c t
t c c c t g a c t t c a g t g a a c a g c g c t g g t a t g a g g a g g a a g a
g c c c c a g t t g c g c t g t g g c c c t g t g t g a (配列番号 68)

(アミノ酸)

10

M L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V H Q Q I L S N K F L I V R M R E L L W
R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L V E F M A S G P I R A Y I L A H K D A
I Q L W R T L M G P T R V F R A R H V A P D S I R G S F G L T D T R N T T H G S
D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R W Y E E E E P Q L R C G P V (配列番号
69)

【 0499 】

ヒトNME6 3 :

(DNA)

A t g c t c a c t c t a g c c c t g a t c a a g c c t g a c g c a g t c g c c c
a t c c a c t g a t t c t g g a g g c t g t t c a t c a g c a g a t t c t a a g
c a a c a a g t t c c t g a t t g t a c g a a t g a g a g a a c t a c t g t g g
a g a a a g g a a g a t t g c c a g a g g t t t t a c c g a g a g c a t g a a g
g g c g t t t t t c t a t c a g a g g c t g g t g g a g t t c a t g g c c a g
c g g g c c a a t c c g a g c c t a c a t c c t t g c c c a c a a g g a t g c c
a t c c a g c t c t g g a g g a c g c t c a t g g g a c c c a c c a g a g t g t
t c c g a g c a c g c c a t g t g g c c c c a g a t t c t a t c c g t g g g a g
t t t c g g c c t c a c t g a c a c c c g c a a c a c c a c c c a t g g t t c g
g a c t c t g t g g t t t c a g c c a g c a g a g a g a t t g c a g c c t t c t
t c c c t g a c t t c a g t g a a c a g c g c t g g t a t g a g g a g g a a g a
g c c c c a g t t g c g c t g t g g c c c t g t g t g c t a t a g c c c a g a g
g g a g g t g t c c a c t a t g t a g c t g g a a c a g g a g g c c t a g g a c
c a g c c t g a (配列番号 70)

20

30

(アミノ酸)

M L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V H Q Q I L S N K F L I V R M R E L L W
R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L V E F M A S G P I R A Y I L A H K D A
I Q L W R T L M G P T R V F R A R H V A P D S I R G S F G L T D T R N T T H G S
D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R W Y E E E E P Q L R C G P V C Y S P E
G G V H Y V A G T G G L G P A (配列番号 71)

【 0500 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6配列 :

40

(DNA)

A t g a c g c a a a a t c t g g g c t c g g a a a t g g c a a g t a t c c t g c
g c t c c c c g c a a g c a c t g c a a c t g a c c c t g g c t c t g a t c a a
a c c g g a c g c t g t t g c t c a t c c g c t g a t t c t g g a a g c g g t c
c a c c a g c a a a t t c t g a g c a a c a a a t t t c t g a t c g t g c g t a
t g c g c g a a c t g c t g t g g c g t a a a g a a g a t t g c c a g c g t t t
t t a t c g c g a a c a t g a a g g c c g t t t c t t t t a t c a a c g c c t g
g t t g a a t t c a t g g c c t c t g g t c c g a t t c g c g c a t a t a t c c
t g g c t c a c a a a g a t g c g a t t c a g c t g t g g c g t a c c c t g a t
g g g t c c g a c g c g c g t c t t t c g t g c a c g t c a t g t g g c a c c g

50

g a c t c a a t c c g t g g c t c g t t c g g t c t g a c c g a t a c g c g c a
 a t a c c a c g c a c g g t a g c g a c t c t g t t g t t a g t g c g t c c c g
 t g a a a t c g c g g c c t t t t t c c c g g a c t t c t c c g a a c a g c g t
 t g g t a c g a a g a a g a a g a a c c g c a a c t g c g c t g t g g c c c g g
 t c t g t t a t t c t c c g g a a g g t g g t g t c c a t t a t g t g g c g g g
 c a c g g g t g g t c t g g g t c c g g c a t g a (配列番号 7 2)

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDVAHPLILEAV
 HQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
 VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARHVAP
 DSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSA SREIAAFFP DFSEQR
 WYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGG LGPA (配列番号 7
 3)

10

【 0 5 0 1 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 1配列 :

(DNA)

A t g a c g c a a a a t c t g g g c t c g g a a a t g g c a a g t a t c c t g c
 g c t c c c c g c a a g c a c t g c a a c t g a c c c t g g c t c t g a t c a a
 a c c g g a c g c t g t t g c t c a t c c g c t g a t t c t g g a a g c g g t c
 c a c c a g c a a a t t c t g a g c a a c a a a t t t c t g a t c g t g c g t a
 t g c g c g a a c t g c t g t g g c g t a a a g a a g a t t g c c a g c g t t t
 t t a t c g c g a a c a t g a a g g c c g t t t c t t t t a t c a a c g c c t g
 g t t g a a t t c a t g g c c t c t g g t c c g a t t c g c g c a t a t a t c c
 t g g c t c a c a a a g a t g c g a t t c a g c t g t g g c g t a c c c t g a t
 g g g t c c g a c g c g c g t c t t t c g t g c a c g t c a t g t g g c a c c g
 g a c t c a a t c c g t g g c t c g t t c g g t c t g a c c g a t a c g c g c a
 a t a c c a c g c a c g g t a g c g a c t c t g t t g t t a g t g c g t c c c g
 t g a a a t c g c g g c c t t t t t c c c g g a c t t c t c c g a a c a g c g t
 t g g t a c g a a g a a g a a g a a c c g c a a c t g c g c t g t g g c c c g g
 t c t g a (配列番号 7 4)

20

30

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDVAHPLILEAV
 HQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
 VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARHVAP
 DSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSA SREIAAFFP DFSEQR
 WYEEEEEPQLRCGPV (配列番号 7 5)

【 0 5 0 2 】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 2配列 :

(DNA)

A t g c t g a c c c t g g c t c t g a t c a a a c c g g a c g c t g t t g c t c
 a t c c g c t g a t t c t g g a a g c g g t c c a c c a g c a a a t t c t g a g
 c a a c a a a t t t c t g a t c g t g c g t a t g c g c g a a c t g c t g t g g
 c g t a a a g a a g a t t g c c a g c g t t t t t a t c g c g a a c a t g a a g
 g c c g t t t c t t t t a t c a a c g c c t g g t t g a a t t c a t g g c c t c
 t g g t c c g a t t c g c g c a t a t a t c c t g g c t c a c a a a g a t g c g
 a t t c a g c t g t g g c g t a c c c t g a t g g g t c c g a c g c g c g t c t
 t t c g t g c a c g t c a t g t g g c a c c g g a c t c a a t c c g t g g c t c
 g t t c g g t c t g a c c g a t a c g c g c a a t a c c a c g c a c g g t a g c
 g a c t c t g t t g t t a g t g c g t c c c g t g a a a t c g c g g c c t t t t
 t c c c g g a c t t c t c c g a a c a g c g t t g g t a c g a a g a a g a a g a

40

50

a c c g c a a c t g c g c t g t g g c c c g g t c t g a (配列番号 7 6)
(アミノ酸)

M L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V H Q Q I L S N K F L I V R M R E L L W
R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L V E F M A S G P I R A Y I L A H K D A
I Q L W R T L M G P T R V F R A R H V A P D S I R G S F G L T D T R N T T H G S
D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R W Y E E E E P Q L R C G P V (配列番号
7 7)

【 0 5 0 3 】

大腸菌発現用に最適化されたヒト N M E 6 3 配列 :

(D N A)

A t g c t g a c c c t g g c t c t g a t c a a a c c g g a c g c t g t t g c t c
a t c c g c t g a t t c t g g a a g c g g t c c a c c a g c a a a t t c t g a g
c a a c a a a t t t c t g a t c g t g c g t a t g c g c g a a c t g c t g t g g
c g t a a a g a a g a t t g c c a g c g t t t t a t c g c g a a c a t g a a g
g c c g t t t c t t t t a t c a a c g c c t g g t t g a a t t c a t g g c c t c
t g g t c c g a t t c g c g c a t a t a t c c t g g c t c a c a a a g a t g c g
a t t c a g c t g t g g c g t a c c c t g a t g g g t c c g a c g c g c g t c t
t t c g t g c a c g t c a t g t g g c a c c g g a c t c a a t c c g t g g c t c
g t t c g g t c t g a c c g a t a c g c g c a a t a c c a c g c a c g g t a g c
g a c t c t g t t g t t a g t g c g t c c c g t g a a a t c g c g g c c t t t t
t c c c g g a c t t c t c c g a a c a g c g t t g g t a c g a a g a a g a a g a
a c c g c a a c t g c g c t g t g g c c c g g t c t g t t a t t c t c c g g a a
g g t g g t g t c c a t t a t g t g g c g g g c a c g g g t g g t c t g g g t c
c g g c a t g a (配列番号 7 8)

(アミノ酸)

M L T L A L I K P D A V A H P L I L E A V H Q Q I L S N K F L I V R M R E L L W
R K E D C Q R F Y R E H E G R F F Y Q R L V E F M A S G P I R A Y I L A H K D A
I Q L W R T L M G P T R V F R A R H V A P D S I R G S F G L T D T R N T T H G S
D S V V S A S R E I A A F F P D F S E Q R W Y E E E E P Q L R C G P V C Y S P E
G G V H Y V A G T G G L G P A (配列番号 7 9)

【 0 5 0 4 】

O r i G e n e - N M E 7 - 1 完全長

(D N A)

g a c g t t g t a t a c g a c t c c t a t a g g g c g g c c g g g a a t t c g t
c g a c t g g a t c c g g t a c c g a g g a g a t c t g c c g c c g c g a t c g
c c a t g a a t c a t a g t g a a a g a t t c g t t t t c a t t g c a g a g t g
g t a t g a t c c a a a t g c t t c a c t t c t t c g a c g t t a t g a g c t t
t t a t t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g
t a a a g a a t c a t c g c a c c t t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a
t a a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g
a a t g t c t t c t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g
a t c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a a g a a a a
a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t
g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g a t t t a c t a
t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c
a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t t c
a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g
c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a
a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a
g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g

g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c
t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t c c t t c a a g t g g a
g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c t a a t t g t a
c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a g t g a a g g a c t
g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a t g c a g g t t t t
g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g g a t c g g g t t a
a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g g a g t a g t g a c
c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a t t c t g g c c c t
t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t g c t a c a a a g a
c a t t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c c t g a a a t t g c
c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c a a t c t t t g g t
a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t a c t g a t c t g c
c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t t c t t c a a g a t
c t t g g a t a a t a c g c g t a c g c g g c c g c t c g a g c a g a a a c t c
a t c t c a g a a g a g g a t c t g g c a g c a a a t g a t a t c c t g g a t t
a c a a g g a t g a c g a c g a t a a g g t t t a a (配列番号 80)

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T
C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N
V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T
F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P
E D G L L E V Q Y F F K I L D N T R T R R L E Q K L I S E E D L A A N D I L D Y
K D D D D K V (配列番号 81)

【0505】

Abnova NME7-1完全長

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T
C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N
V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T
F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P
E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号 82)

【0506】

Abnova 部分的NME7-B

(アミノ酸)

D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N
A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C
T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L (配列番号 83)

【0507】

ヒスチジンタグ

(c t c g a g) c a c c a c c a c c a c c a c c a c t g a (配列番号 84)

【0508】

ストレプトIIタグ

(accggt)tgga gccatcctcagttcga a a agta atga (配列番号85)

【0509】

N-10ペプチド:

QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA (配列番号86)

【0510】

C-10ペプチド

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDV (配列番号87)

LALIKPDA (配列番号88)

MMMLSRKEALDFHVDHQ S (配列番号89)

ALDFHVDHQ S (配列番号90)

EILRDDAICEWKRL (配列番号91)

FNELIQFIT TGP (配列番号92)

RDDAICEW (配列番号93)

SGVARTDASESIRALFGTDGIRNAA (配列番号94)

ELFFPSSGG (配列番号95)

KFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMA (配列番号96)

LMAIRDAGFEISAMQMFMMDRVNVEEFYEVYKGVVT (配列番号97)

EFYEVYKGVVTEYHD (配列番号98)

EIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA (配列番号99)

YSGPCVAM (配列番号100)

FREFCGP (配列番号101)

VHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN (配列番号102)

IQNAVHCTD (配列番号103)

TDLPEDGLLEVQYFFKILDN (配列番号104)

PEDGLLEVQYFFK (配列番号105)

EIINKAGFTITK (配列番号106)

MLSRKEALDFHVDHQ S (配列番号107)

NELIQFIT T (配列番号108)

EILRDDAICEWKRL (配列番号109)

SGVARTDASESIRALFGTDGI (配列番号110)

SGVARTDASES (配列番号111)

ALFGTDGI (配列番号112)

NCTCCIVKPHAVSE (配列番号113)

LGKILMAIRDA (配列番号114)

EISAMQMFMMDRVNVE (配列番号115)

EVYKGVVT (配列番号116)

EYHDMVTE (配列番号117)

EFCGPADPEIARHLR (配列番号118)

AIFGKTKIQNAV (配列番号119)

LPEDGLLEVQYFFKILDN (配列番号120)

GPDSFASAA REMELFFP (配列番号121)

【0511】

ヒトNME7由来免疫化ペプチド

10

20

30

40

50

I C E W K R L (配列番号 1 2 2)
 L G K I L M A I R D A (配列番号 1 2 3)
 H A V S E G L L G K (配列番号 1 2 4)
 V T E M Y S G P (配列番号 1 2 5)
 N A T K T F R E F (配列番号 1 2 6)
 A I R D A G F E I (配列番号 1 2 7)
 A I C E W K R L L G P A N (配列番号 1 2 8)
 D H Q S R P F F (配列番号 1 2 9)
 A I C E W K R L L G P A N (配列番号 1 3 0)
 V D H Q S R P F (配列番号 1 3 1)
 P D S F A S (配列番号 1 3 2)
 K A G E I I E I I N K A G F T I T K (配列番号 1 3 3)

10

【 0 5 1 2 】

ヒト N M E 1 由来免疫化ペプチド

M A N C E R T F I A I K P D G V Q R G L V G E I I K R F E (配列番号 1 3 4)
 V D L K D R P F (配列番号 1 3 5)
 H G S D S V E S A E K E I G L W F (配列番号 1 3 6)
 E R T F I A I K P D G V Q R G L V G E I I K R F E (配列番号 1 3 7)
 V D L K D R P F F A G L V K Y M H S G P V V A M V W E G L N (配列番号 1 3 8)
 N I I H G S D S V E S A E K E I G L W F H P E E L V (配列番号 1 3 9)
 K P D G V Q R G L V G E I I (配列番号 1 4 0)

20

【 0 5 1 3 】

ヒト N M E 7 由来であるが、N M E 1 には結合しない免疫化ペプチド

M L S R K E A L D F H V D H Q S (配列番号 1 4 1) ペプチド A 1
 S G V A R T D A S E S (配列番号 1 4 2) ペプチド A 2
 D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E (配列番号 : 1 4 3) ペプチド B 1
 E V Y K G V V T E Y H D M V T E (配列番号 1 4 4) ペプチド B 2
 A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号 1 4 5) ペプチド B 3

30

【 0 5 1 4 】

ヒト N M E 7 a

(D N A)

a t g a a t c a t a g t g a a a g a t t c g t t t t c a t t g c a g a g t g g t
 a t g a t c c a a a t g c t t c a c t t c t t c g a c g t t a t g a g c t t t t
 a t t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a
 a a g a a t c a t c g c a c c t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a
 a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a
 t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g a t
 c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a a g a a a a a a
 c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t g g
 a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g a t t t a c t a t a
 a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c a t
 t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t c a a
 t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c
 a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a a
 g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a
 t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c
 a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g
 c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c t t c a a g t g g a g g
 t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c t a a t t g t a c c

40

50

t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a g t g a a g g a c t g t
t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a t g c a g g t t t t g a
a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g g a t c g g g t t a a t
g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g g a g t a g t g a c c g
a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a t t c t g g c c c t t g
t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t g c t a c a a a g a c a
t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c c t g a a a t t g c c c
g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c a a t c t t t g g t a a
a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t a c t g a t c t g c c a
g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t t c t t c a a g a t c t 10
t g g a t a a t t a g (配列番号 146)

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T
C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N
V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T 20
F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P
E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号 147)

【 0515 】

ヒト NME7 b

(DNA)

a t g c a t g a t g t a a a g a a t c a t c g c a c c t t t t t a a a g c g g a
c c a a a t a t g a t a a c c t g c a c t t g g a a g a t t t a t t t a t a g g
c a a c a a a g t g a a t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t
g a c t a t g g g g a t c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a
g g a a a g a a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t 30
a t c a a a g g c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t
g g a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a
g g a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g
a c c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t
c c t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t
g t g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t
g g c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t
g g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t
c t t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c
t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t 40
a c t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a
g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a
t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g
g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g
g a g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a
t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t
g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c
c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c
a a t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t
a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t 50

t c t t c a a g a t c t t g g a t a a t t a g (配列番号 1 4 8)

(アミノ酸)

M H D V K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I
D Y G D Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A
G F T I T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G
P I I A M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F
G T D G I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F
T N C T C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M
D R V N V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N
A T K T F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C
T D L P E D G L L E V Q Y F F K I L D N (配列番号 1 4 9)

10

【 0 5 1 6 】

N M E 7 _{A B} としても知られるヒト N M E 7 - A B

(D N A)

a t g g a a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t
c a a a g g c t g g a g a a a t a a t t g a a a t a a t a a a c a a a g c t g g
a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g
a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c
c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c
t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t
g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g
c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g
a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t
t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t t c c t t
c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t t a c
t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t a a a c c c c a t g c t g t c a g t
g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c t g a t g g c t a t c c g a g a t g
c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t g c a g a t g t t c a a t a t g g a
t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c t a t g a a g t t t a t a a a g g a
g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a t g g t g a c a g a a a t g t a t t
c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a g a t t c a a c a g a a t a a t g c
t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t t g t g g a c c t g c t g a t c c t
g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c c t g g a a c t c t c a g a g c a a
t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a g a a t g c t g t t c a c t g t a c
t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a t t a g a g g t t c a a t a c t t c
t t c a a g a t c t t g g a t a a t t a g (配列番号 1 5 0)

20

30

(アミノ酸)

M E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I T K L K M M M L S R
K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I L R D D A I C
E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A A H G P D S
F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V K P H A V S
E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F Y E V Y K G
V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F C G P A D P
E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F
F K I L D N (配列番号 1 5 1)

40

【 0 5 1 7 】

ヒト N M E 7 - X 1

(D N A)

a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a a g a a g c a t t g g a t t t t c a t g
t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t t c a a t g a g c t g a t c c a

50

g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c a t g g a g a t t t t a
a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c
c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a t g c t t c t g a a a g
c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a
g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g c g g c c a g a g a a a
t g g a g t t g t t t t t t c c t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c
a a a c a c t g c t a a a t t t a c t a a t t g t a c c t g t t g c a t t g t t
a a a c c c c a t g c t g t c a g t g a a g g a c t g t t g g g a a a g a t c c
t g a t g g c t a t c c g a g a t g c a g g t t t t g a a a t c t c a g c t a t
g c a g a t g t t c a a t a t g g a t c g g g t t a a t g t t g a g g a a t t c
t a t g a a g t t t a t a a a g g a g t a g t g a c c g a a t a t c a t g a c a
t g g t g a c a g a a a t g t a t t c t g g c c c t t g t g t a g c a a t g g a
g a t t c a a c a g a a t a a t g c t a c a a a g a c a t t t c g a g a a t t t
t g t g g a c c t g c t g a t c c t g a a a t t g c c c g g c a t t t a c g c c
c t g g a a c t c t c a g a g c a a t c t t t g g t a a a a c t a a g a t c c a
g a a t g c t g t t c a c t g t a c t g a t c t g c c a g a g g a t g g c c t a
t t a g a g g t t c a a t a c t t c t t c a a g a t c t t g g a t a a t t a g (

配列番号152)

(アミノ酸)

M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I L
R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A
A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V
K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F
Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F
C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L
L E V Q Y F F K I L D N * (配列番号153)

【0518】

ヒトNME7 a (大腸菌発現用に最適化)

(DNA)

a t g a a t c a c t c c g a a c g c t t t g t t t t a t c g c c g a a t g g t
a t g a c c c g a a t g c t t c c c t g c t g c g c c g c t a c g a a c t g c t
g t t t t a t c c g g g c g a t g g t a g c g t g g a a a t g c a t g a c g t t
a a a a a t c a c c g t a c c t t t c t g a a a c g c a c g a a a t a t g a t a
a t c t g c a t c t g g a a g a c c t g t t t a t t g g c a a c a a a g t c a a
t g t g t t c t c t c g t c a g c t g g t g c t g a t c g a t t a t g g c g a c
c a g t a c a c c g c g c g t c a a c t g g g t a g t c g c a a a g a a a a a a
c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t c c a a a g c t g g
c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g t t t c a c c a t c
a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t a a a g a a g c c c
t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c c g t t t t t c a a
t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c g a t t a t c g c a
a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c g a a t g g a a a c
g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g c g c g t a c c g a
t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g c a c c g a t g g t
a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a t t c g c a t c g g
c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c g a g c t c t g g c g g
t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t a c c a a t t g t a c g
t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t c a g a a g g c c t g c
t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a t g c t g g c t t t g a
a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g g a c c g c g t t a a c

配列番号152)

(アミノ酸)

M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I L
R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A
A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I V
K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E F
Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E F
C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L
L E V Q Y F F K I L D N * (配列番号153)

g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g g c g t g g t t a c c g
a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a c t c c g g t c c g t g
c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t g c c a c c a a a a c g
t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c c g g a a a t c g c a c
g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c a a t t t t t g g t a a
a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t a c c g a t c t g c c g
g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t t t t t c a a a a t t c
t g g a t a a t (配列番号 154)

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V 10
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K E K T L A L I K P D A I S K A G E I I E I I N K A G F T I
T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G
I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T
C C I V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N
V E E F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T
F R E F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P
E D G L L E V Q Y F F K I L D N T G (配列番号 155)

【0519】

20

ヒトNME7 b (大腸菌発現用に最適化)

(DNA)

a t g c a t g a c g t t a a a a t c a c c g t a c c t t t c t g a a a c g c a
c g a a a t a t g a t a a t c t g c a t c t g g a a g a c c t g t t t a t t g g
c a a c a a a g t c a a t g t g t t c t c t c g t c a g c t g g t g c t g a t c
g a t t a t g g c g a c c a g t a c a c c g c g c g t c a a c t g g g t a g t c
g c a a a g a a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t
c t c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g
g g t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c
g t a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g 30
c c c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t
c c g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t
g c g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t
t g c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t
g g c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t
c a t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c
g a g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t
a c c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t
c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a
t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g 40
g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g
g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a
c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t
g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c
c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c
a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t
a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t
t t t t c a a a a t t c t g g a t a a t (配列番号 156)

(アミノ酸)

M H D V K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I 50

DYGDQY TARQLGSRKEKTLALIKPD AISKAGEIIEIINKA
 GFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTTG
 PIIAMEILRDDAICEWKRL LGPANS GVARTDASESIRALF
 GTDGI RNAAHGPDSFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKF
 TNCTCCI V KPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNM
 DRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
 ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHC
 TDLPEDGLLEVQYFFKILDNTG (配列番号157)

【0520】

NME7_{AB}としても知られるヒトNME7 - AB (大腸菌発現用に最適化)

10

(DNA)

atgga a a a a a c g c t g g c c c t g a t t a a a c c g g a t g c a a t c t
 c c a a a g c t g g c g a a a t t a t c g a a a t t a t c a a c a a a g c g g g
 t t t c a c c a t c a c g a a a c t g a a a a t g a t g a t g c t g a g c c g t
 a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g t c g a c c a c c a g t c t c g c c
 c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a a t t c a t c a c c a c g g g t c c
 g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g c g t g a t g a c g c t a t c t g c
 g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c c g g c a a a c t c a g g t g t t g
 c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c c a t t c g c g c t c t g t t t g g
 c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a g c a c a t g g t c c g g a c t c a
 t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a t g g a a c t g t t t t t c c c g a
 g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c a a a c a c c g c c a a a t t t a c
 c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c a a a c c g c a c g c a g t g t c a
 g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c t g a t g g c a a t c c g t g a t g
 c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t g c a g a t g t t c a a c a t g g a
 c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c t a c g a a g t t t a c a a a g g c
 g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a t g g t t a c g g a a a t g t a c t
 c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a a a t t c a g c a a a a c a a t g c
 c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c t g t g g t c c g g c a g a t c c g
 g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c c g g g t a c c c t g c g c g c a a
 t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a g a a c g c t g t g c a c t g t a c
 c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g c t g g a a g t t c a a t a c t t t
 t t c a a a a t t c t g g a t a a t (配列番号158)

20

30

(アミノ酸)

MEKTLALIKPD AISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSR
 KEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTTGPIIAMEILRDDAIC
 EWKRL LGPANS GVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDS
 FASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCI V KPHAVS
 EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKG
 VVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADP
 E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F
 F K I L D N T G (配列番号159)

40

【0521】

ヒトNME7 - X1 (大腸菌発現用に最適化)

(DNA)

atg at g a t g c t g a g c c g t a a a g a a g c c c t g g a t t t t c a t g
 t c g a c c a c c a g t c t c g c c c g t t t t t c a a t g a a c t g a t t c a
 a t t c a t c a c c a c g g g t c c g a t t a t c g c a a t g g a a a t t c t g
 c g t g a t g a c g c t a t c t g c g a a t g g a a a c g c c t g c t g g g c c
 c g g c a a a c t c a g g t g t t g c g c g t a c c g a t g c c a g t g a a t c

50

c a t t c g c g c t c t g t t t g g c a c c g a t g g t a t c c g t a a t g c a
g c a c a t g g t c c g g a c t c a t t c g c a t c g g c a g c t c g t g a a a
t g g a a c t g t t t t t c c c g a g c t c t g g c g g t t g c g g t c c g g c
a a a c a c c g c c a a a t t t a c c a a t t g t a c g t g c t g t a t t g t c
a a a c c g c a c g c a g t g t c a g a a g g c c t g c t g g g t a a a a t t c
t g a t g g c a a t c c g t g a t g c t g g c t t t g a a a t c t c g g c c a t
g c a g a t g t t c a a c a t g g a c c g c g t t a a c g t c g a a g a a t t c
t a c g a a g t t t a c a a a g g c g t g g t t a c c g a a t a t c a c g a t a
t g g t t a c g g a a a t g t a c t c c g g t c c g t g c g t c g c g a t g g a
a a t t c a g c a a a a c a a t g c c a c c a a a a c g t t t c g t g a a t t c
t g t g g t c c g g c a g a t c c g g a a a t c g c a c g t c a t c t g c g t c
c g g g t a c c c t g c g c g c a a t t t t t g g t a a a a c g a a a a t c c a
g a a c g c t g t g c a c t g t a c c g a t c t g c c g g a a g a c g g t c t g
c t g g a a g t t c a a t a c t t t t t c a a a a t t c t g g a t a a t (配列番
号 1 6 0)

10

(アミノ酸)

M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A M E I
L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N
A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T N C T C C I
V K P H A V S E G L L G K I L M A I R D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E E
F Y E V Y K G V V T E Y H D M V T E M Y S G P C V A M E I Q Q N N A T K T F R E
F C G P A D P E I A R H L R P G T L R A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G
L L E V Q Y F F K I L D N T G (配列番号 1 6 1)

20

【 0 5 2 2 】

N M E 7 の D M 1 0 ドメイン

(アミノ酸)

M N H S E R F V F I A E W Y D P N A S L L R R Y E L L F Y P G D G S V E M H D V
K N H R T F L K R T K Y D N L H L E D L F I G N K V N V F S R Q L V L I D Y G D
Q Y T A R Q L G S R K (配列番号 1 6 2)

30

【 0 5 2 3 】

P S M G F R ペプチドのフラグメントまたはバリエーション

S N I K F R P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A
S R Y (配列番号 1 6 3) ;

P S M G F R ペプチドのフラグメントまたはバリエーション

S V V V Q L T L A F R E G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y (配列番号
1 6 4) ;

P S M G F R ペプチドのフラグメントまたはバリエーション

V Q L T L A F R E G T I N V H D V E T Q F N Q Y (配列番号 1 6 5) ;

P S M G F R ペプチドのフラグメントまたはバリエーション

S N I K F R P G S V V V Q L T L A F R E G T I N (配列番号 1 6 6) ;

40

P S M G F R ペプチドのフラグメントまたはバリエーション

S N I K F R P G S V V V Q L T L A F R E G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E (配
列番号 1 6 7) ;

P S M G F R ペプチドのフラグメントまたはバリエーション

V Q L T L A F R E G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S
V S D V P (配列番号 1 6 8) 。

【 0 5 2 4 】

N M E 7 B ペプチド 3 (B ドメイン) の残基 1 4 の C y s は S e r に変異される :

A I F G K T K I Q N A V H S T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号 1 6 9)

【 0 5 2 5 】

50

N - 10 ペプチド

Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A (配列番号
170)

【0526】

C - 10 ペプチド

G T I N V H D V E T Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V (配列番号
171)

【0527】

実施例

実施例 1 - 最小無血清ベースの成分 (「MM」) (500ml)

400ml の DME / F12 / GlutaMAX I (Invitrogen # 105
65 - 018)

100ml の ノックアウト血清置換物 (KO - SR、Invitrogen # 1082
8 - 028)

5ml の 100x MEM 非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen # 11140 -
050)

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

【0528】

実施例 2 - タンパク質構築物の生成

組換え NME7 の生成のために、最初に、構築物が、効率的に可溶型で発現され得る組
換え NME7 を作製するために調製された。最初の手法は、天然 NME7 (a)、または
N 末端欠失を有する選択的スプライスバリエーション NME7 (b) をコードする構築物を作
製することであった。いくつかの事例では、構築物は、精製に役立つヒスチジンタグまた
はストレプトタグを有した。NME7 - a、完全長 NME7 は大腸菌中で発現が不十分であ
り、NME7 - b は、大腸菌中で全く発現しなかった。しかし、DM10 配列が欠失され
、NME7 が 33kDa の計算分子量を有する NDPK A および B ドメインを実質的に
含む、新規構築物が作製された。

【0529】

この新規 NME7_{AB} は、大腸菌中で非常に良好に発現し、可溶性タンパク質として存
在した。NME7_{AB} は、最初に NTA - Ni カラムで精製され、次に、セファデックス
200 カラムによるサイズ排除クロマトグラフィー (FPLC) によりさらに精製された
。画分が集められ、NME7_{AB} の最も多く最も純粋な発現を有する画分を特定するため
に、SDS - PAGE により試験された。組み合わせられた画分用に、最も純粋であった F
PLC 分離物を組み合わせた。その後、精製された NME7_{AB} タンパク質が試験され、
ヒト幹細胞の増殖を十分に支援すること、および最もナイーブな、X 染色体不活性化前
の状態にそれらを戻すことが示された。精製された NME7_{AB} は、癌細胞の増殖を加速す
ることも示された。

【0530】

実施例 3 - NME7_{AB} が 2 つの MUC1* 細胞外ドメインペプチドに同時に結合するこ
とを示す、ELISA アッセイ

結果を図 1 に示す。C 末端システイン (PSMGFR - Cys) を有する PSMGFR
ペプチドが、Inject Maleimide 活性化 BSA キット (Thermo F
isher) を使用して、BSA に共有結合された。PSMGFR - Cys 結合 BSA は
、0.1M 炭酸塩 / 重炭酸塩緩衝 pH 9.6 中で 10ug/ml に希釈され、50ul が
、96 ウェルプレートの各ウェルに添加された。4 で一晩のインキュベーション後、プ
レートを PBS - T で 2 回洗浄し、3% BSA 溶液を加えて、ウェル上に残っている結合
部位をブロッキングした。室温で 1 時間後、プレートを PBS - T で 2 回洗浄し、NME
7 を PBS - T + 1% BSA で希釈し、これを異なる濃度で添加した。室温で 1 時間後、
プレートを PBS - T で 3x 洗浄し、PBS - T + 1% BSA で希釈した抗 NM23 - H

10

20

30

40

50

7 (B - 9、 S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) を 1 / 5 0 0 希釈で添加した。室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3x洗浄し、PBS-T+1%BSAで希釈したヤギ抗マウス-HRPを、1/3333の希釈で添加した。室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3x洗浄し、ABTS溶液(Pierce)を使用して、NME7の結合を415nmで測定した。

【0531】

ELISA MUC1* 二量体化：NME7結合のためのプロトコルを使用し、NME7を11.6ug/mLで使用した。

室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3x洗浄し、PBS-T+1%BSAで希釈した、HisタグPSMGFRペプチド(PSMGFR-His)またはビオチン化PSMGFRペプチド(PSMGFR-ビオチン)を種々の濃度で添加した。室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3x洗浄し、PBS-T+1%BSAで希釈した抗ヒスタグ-HRP(Abcam)またはPBS-T+1%BSAで希釈したストレプトアビジン-HRP(Pierce)を1/5000の濃度で添加した。室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3x洗浄し、別のPSMGFRペプチド(これは、抗His抗体またはストレプトアビジンによりシグナル伝達できなかった)を結合したBSAに既に結合したNME7へのPSMGFRペプチドの結合を、ABTS溶液(Pierce)を用いて415nmで測定した。

【0532】

実施例4 - ヒト組換えNME7_{AB}の機能試験

多分化能を維持し、分化を抑制する能力に関して、組換えNME7_{AB}を試験するために、NME7の可溶性バリエーション、NME7_{AB}を生成し、精製した。ヒト幹細胞(iPScat#SC101a-1、System Biosciences)を、製造業者の説明書に従い、4継代用のマウス繊維芽フィーダー細胞の層上で、4ng/mLのbFGF中で増殖させた。これらの幹細胞源をその後、12.5ug/ウェルの抗MUC1*モノクローナル抗体(MN-C3)でコートされた6ウェル細胞培養プレート(Vita(商標)、Thermo Fisher)に播種した。細胞を、ウェル当たり300,000個細胞の密度で播種した。基本培地は次からなる最小幹細胞培地であった：400mLのDME/F12/Glutamax I(Invitrogen#10565-018)、100mLのノックアウト血清代替物(KO-SR、Invitrogen#10828-028)、5mLの100x MEM非必須アミノ酸溶液(Invitrogen#11140-050)および0.9mL(0.1mM)のβ-メルカプトエタノール(55mMストック、Invitrogen#21985-023)。基本培地は任意の培地であり得る。好ましい実施形態では、基本培地は、他の成長因子およびサイトカイン不含である。この基本培地に、8nMのNME7_{AB}または安定な二量体としてリフォルディングされ精製された8nMのNM23-H1のいずれかが添加された。培地を、48時間ごとに交換し、加速的増殖のために、播種後3日目に回収し継代しなければならなかった。幹細胞がNM23-H1二量体、またはNME7モノマー中で増殖された場合、同等の多能性幹細胞増殖が達成された。

【0533】

NME7およびNM23-H1(NME1)二量体は両方とも、多能性に増殖し、100%コンフルエントな場合でさえ分化がなかった。写真から分かるように、NME7細胞は、NM23-H1二量体中で増殖された細胞より速く増殖した。最初の回収での細胞数は、NME7中での培養はNM23-H1二量体中での培養に比べて1.4倍多くの細胞を産生したことを確認した。典型的な多能性マーカーについてのICC染色は、NME7_{AB}が十分にヒト幹細胞増殖、多能性、および分化抵抗性を支援したことを確認した。

【0534】

約30~33kDaのNME7種は、選択的スプライスアイソフォームまたは切断などの翻訳後修飾であり得、これは細胞からの分泌を可能にし得る。

【0535】

実施例 5 - よりナイーブな状態へ幹細胞を戻す条件下での細胞培養による転移性癌細胞への癌細胞の移行の誘導

癌細胞は通常、RPMIなどの血清含有培地で培養される。本発明者らは、よりナイーブな状態に幹細胞を戻す試薬の存在下での癌細胞の培養は、癌細胞をより転移性状態に形質転換することを見出した。

【0536】

本発明者らは、NME7_{AB}、ヒトNME1二量体、細菌性NME1二量体、NME7-X1および「2i」阻害剤の各々が、通常、癌細胞を、癌幹細胞「CSC」または腫瘍開始細胞「TIC」とも呼ばれる、転移性癌細胞に形質転換できることを実証した。2iは、研究者が、ヒト幹細胞をよりナイーブな状態に戻すことを見つけた、2種の生化学的阻害剤に与えられた名称である。2iは、MEKおよびGSK3ベータ阻害剤(PD0325901およびCHIR99021)であり、これらは約1mMと3mMの最終濃度に、各々、培地へ加えられる。

10

【0537】

NME7_{AB}およびNME7-X1は、より低濃度およびより高濃度の、約1nM~16nMの範囲でも十分に機能するが、癌細胞を転移性の細胞へ形質転換させるために、最少培地の別々のバッチに添加される場合には、約4nMの最終濃度である。ヒトまたは細菌性NME1二量体は、4nM~32nMの最終濃度で使用され、これらの実験で典型的には16nMで使用され、ヒトNME1はS120G変異を有する。野生型を使用する場合、より低い濃度が必要である。これらの正確な濃度が重要であるとは意図されない。特定の変異はより高濃度で二量体として存在することを許容するが、NME1タンパク質が二量体であり、かつ二量体を生じさせる濃度の範囲は低いナノモル範囲にあることが重要である。

20

【0538】

同様に、NME7タンパク質の濃度は、変化し得る。NME7_{AB}およびNME7-X1は、モノマーであり、および、癌細胞を転移性の細胞へ形質転換するために使用される濃度は、タンパク質がモノマーとして残ることを可能にする必要がある。様々な分子マーカーが、転移性癌細胞の指標として提案されてきた。異なる癌タイプは、上方制御される異なる分子を有し得る。例えば、受容体、CXCR4は、転移性の乳癌で上方制御され、一方、CHD1としても知られるE-カドヘリンは、転移性の前立腺癌中でより上方制御される。

30

【0539】

これらの特定の転移マーカーに加えて、OCT4、SOX2、NANOGおよびKLF4などの多能性の典型的なマーカーは、癌が転移性になると、上方制御される。開始時の癌細胞および後の転移性癌細胞は、これらの遺伝子の発現レベルを測定するためにPCRによりアッセイできる。

【0540】

図2は、NME7_{AB}含有培地中で培養されたT47D乳癌細胞のRT-PCR測定のグラフを示す。Rhoキナーゼ阻害剤、ROCI、ROCKiまたはRiは、形質転換細胞がプレートから浮き上がるのを防ぐために添加された。種々の転移マーカーならびに多能性幹細胞マーカーの発現レベルが、親細胞およびNME7_{AB}培養細胞について測定された。結果は、浮遊細胞が、ROCIを受けた細胞と比較して、より多い量の転移および多能性マーカーを発現することを示す。本発明者らは、それが、それらの測定は形質転換しなかった細胞と形質転換した細胞の平均であったがROCIがそれらを付着しているままにさせたからであると推論した。これは、明確に図で認めることができ、そこで「-Ri」は、ROCIを受けず、したがって、浮遊した、より高い転移性の細胞と混ざり合っていない、付着した細胞を意味する。

40

【0541】

前立腺癌細胞もまた、NM23、別名NME1またはNME7_{AB}を含む培地で培養された場合、より転移性の状態に移行した。ここで、本発明者らは、ここまで試験されたす

50

すべての細胞株について、NME7_{AB}、ヒトNME1二量体、またはヒトに対して高い配列相同性を有する細菌性NME中の培養が、より転移性の状態への移行を誘導することを示した。

【0542】

図4は、2i阻害剤、NME7_{AB}のいずれかまたは両方を含む培地中で培養された乳癌細胞の転移および多能性マーカーの発現レベルのRT-PCR測定グラフを示す。図から分かるように、2i阻害剤もまた、より転移性の状態への癌細胞の移行を誘導できる。卵巣癌細胞株SK-OV3、OV-90、膵癌細胞株CAPAN-2およびPANC-1、乳癌細胞株MDA-MBはすべて、NME7_{AB}および/または2i阻害剤で培養された場合、付着性から非付着性への形態的移行を示した。

10

【0543】

図20は、NME7_{AB}中で72時間または144時間培養された様々な癌細胞株についての転移マーカーまたは多能性マーカーのRT-PCR測定グラフを示す。図20Aは、SK-OV3細胞が、NME7_{AB}中で培養された場合、転移マーカーCHD1、SOX2およびNME7-X1の発現を高めることを示す。図20Bは、OV-90細胞が、NME7_{AB}中での培養後に転移マーカーCXCR4およびNME7-X1の発現を増加させることを示す。

【0544】

実施例6 - NME7中で培養された癌細胞が転移性になることの実証

癌細胞集団が転移性かどうかの機能試験は、免疫不全マウスに非常に少ない数、例えば200個、の細胞を移植し、それらが腫瘍に進展するかどうかを確かめることである。典型的には、500~600万個の癌細胞が、免疫不全マウスで腫瘍を形成するのに必要とされる。本発明者らは、わずか50個ほどのNME誘導転移性癌細胞がマウスにおいて腫瘍を形成することを示した。さらに、試験期間中、ヒトNME7_{AB}、NME1またはNME7-X1を注入されたマウスは、遠隔転移を発生した。

20

【0545】

T47Dヒト乳癌細胞が、48時間ごとの培地交換の条件で14日間標準RPMI培地中で培養され、約75%集密度で、トリプシン処理に供された。細胞をその後、6ウェルプレートに播種し、4nMのNME7_{AB}を補充した最小幹細胞培地(実施例1を参照)中で培養した。培地は、48時間ごとに交換された。約4日目までに、いくつかの細胞は、表面から離脱し、浮遊する。培地は、これらが転移マーカーのRT-PCR測定により証拠づけられる最も高い転移能を有する細胞であるので、「浮遊物」を保持するために注意深く交換される。7日目または8日目に、浮遊物が回収されおよび計数された。試料は、RT-PCR測定のために保持された。測定されたキーマーカーは、NME7_{AB}中で短時間培養された後に、40-200倍まで上方制御されるCXCR4である。

30

【0546】

新たに回収された浮遊性転移性細胞が、90日間の徐放性エストロゲンペレットを移植されたメスnu/nu無胸腺マウスの脇腹に異種移植された。浮遊細胞は、各々10,000個、1,000個、100個、または50細胞として、異種移植された。6匹の各グループ中のマウスの半分に対しても、元の移植部位の近くに32nMのNME7_{AB}が毎日注入された。NME7_{AB}のないRPMI培地中で培養された、親T47D細胞も、600万個、10,000個、または100個が対照としてマウスへ移植された。NME7誘導浮遊性細胞を移植されたマウスは、わずか50個の細胞が移植された場合でさえ、腫瘍を生じた。浮遊細胞が移植され、かつNME7_{AB}の毎日の注射を受けたマウスも、様々な器官で遠隔の腫瘍または遠隔の転移を生じた。NME7_{AB}培養癌細胞の移植後、ヒトNME7_{AB}を注入された12匹のマウスのうちの11匹、すなわち92%が、注入部位に腫瘍を生じた。移植後ヒトNME7_{AB}を注入されなかった12匹のマウスのうちの7匹のみ、すなわち58%のみが、腫瘍を生じた。腫瘍を示し、ヒトNME7_{AB}を注入された11匹のマウスのうちの9匹(82%)が、注入部位から遠隔部で複数腫瘍を生じた。NME7_{AB}を注入されなかったいずれのマウスも、複数の目視可能な腫瘍を生じな

40

50

かった。

【0547】

殺の後、RT-PCRおよびウエスタンブロットは、NME₇を注入されたマウスの遠隔隆起が確かにヒト乳腺腫瘍だったことを示した。それらの器官の同様の分析は、遠隔隆起に加えて、マウスは、移植されたヒト乳癌細胞のヒト乳癌特性を伴って、肝臓および肺にランダムに転移したことを示した。予想通りに、600万個の細胞が注入されたマウスだけが腫瘍を増殖させた。

【0548】

上に記述されたものに類似のいくつかの実験が、実質的に同じ結果を伴って実施された。各実験では、すべての適切な対照を含む、24匹または52匹のマウスを用いた。

10

【0549】

実施例7 - それらの配列がNME7、A1、A2、B1、B2およびB3に特有であるという理由で選択されたペプチドは、MUC1*細胞外ドメインペプチドへのNME7種の結合を抑制する。

NME7ペプチドは、抗体産生用免疫化剤として選択された。NME7ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3(図9)が、ヒトNME1、ヒトNME7、およびヒトNME1またはヒトNME7に相同であるいくつかの細菌性NMEの間での配列アラインメントのプロセスを使用して選択された。すべての中で高い配列相同性を有する5つの領域が特定された。しかしながら、ヒトNME1ならびにヒトNME7を抑制し得る抗体を生じさせるペプチドの選択を防ぐために、本発明者らは、それらのペプチドがヒトNME1とは異なる配列を有する、相同の領域に隣接したNME7配列を選択する。本発明者らはELISAを行って、ペプチド其れ自体がその表面上の合成MUC1*ペプチドに結合し、固定化ペプチドへのヒトNME7またはヒトNME1の結合を抑制するかどうかをアッセイした(図11)。図11は、ペプチドが、固定化PSMGFRペプチドへのNME7およびNME1の結合を抑制したことを示す。NME7 AドメインおよびBドメインは、それぞれPSMGFRペプチドに結合できることを想起されたい。従って、NME7_{AB}のPSMGFRペプチドへの結合の完全抑制は、単一抗体またはただ1つのドメイン由来のペプチドにより達成できない。これは、ペプチドが由来するこれらの領域が、MUC1*と相互作用し、かつNME7のそれらの領域へ結合しMUC1*受容体へのその結合を抑制する抗体を生じさせ得る領域であることを示した。

20

30

【0550】

別の実験では、遊離ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3が、NME7_{AB}または2iのいずれか中で培養することによりさらに転移性の状態への移行を起こす培養物中の癌細胞に添加された。図14は、癌細胞がNME7_{AB}または2i阻害剤のいずれかの中で増殖されるときに科学者の観察の表を示し、フリーペプチドが、付着細胞から浮遊物への形態的变化を抑制することを示し、それは、乳癌細胞について、転移マーカー、特にCXCR4の発現増加に直接関連づけられる。RT-PCR測定は、NME7_{AB}ペプチドが転移マーカーCXCR4の発現の増加を抑制したことを確認する。

【0551】

図15は、転移性の形質転換に対する、各々がよりの状態へ癌細胞を形質転換する、NME7_{AB}または2i阻害剤のいずれか中で増殖されたT47D乳癌細胞のCXCR4発現のRT-PCR測定のグラフ、および転移形質転換に対する、NME7由来ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3の抑制効果を示す。図32は、図15のCXCR4のRT-PCR測定で使用された試料の記録されたRNAレベルならびにCXCR4発現および対照についてのハウスキーピング遺伝子の閾値サイクル数の表を示す。

40

【0552】

実施例8 - 抗NME7抗体は、ヒトNME7に特異的に結合するが、ヒトNME1には結合しない

標準ELISAアッセイを、NME7_{AB}ペプチドA1、A2、B1、B2、またはB3による免疫化により本発明者らが生成したNME7抗体が、NME7_{AB}に特異的に結

50

合するがヒトNME1には結合しないかどうかを決定するために実施した。理由は、それが、健康な機能を有し、抗体を用いてその機能をブロックすることはヒトに有害であり得るためである。図24~25のELISAは、ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3から生成されたNME7抗体のすべてが、ヒトNME7_{AB}に結合する(図24)が、ヒトNME1には結合しない(図25)ことを示す。これらの抗体を生成するために使用されるペプチドは、NME7_{AB}およびNME7-X1の両方に共通である。このアッセイは、ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3から生成された抗体が、NME7_{AB}に特異的に結合し、伸長によりNME7-X1に結合することを示す。

NME7Aペプチド1(Aドメイン): M L S R K E A L D F H V D H Q S (配列番号141)

NME7Aペプチド2(Aドメイン): S G V A R T D A S E S (配列番号142)

NME7Bペプチド1(Bドメイン): D A G F E I S A M Q M F N M D R V N V E (配列番号: 143)

NME7Bペプチド2(Bドメイン): E V Y K G V V T E Y H D M V T E (配列番号144)

NME7Bペプチド3(Bドメイン): A I F G K T K I Q N A V H C T D L P E D G L L E V Q Y F F (配列番号145)

【0553】

実施例9 - 抗NME7特異的抗体およびそれらを生成したペプチドは、癌細胞増殖を抑制する

ウサギがNME7ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3で免疫化され、抗体が生成、収集され、免疫化ペプチドが結合されたカラムで精製された。T47D乳癌細胞が播種され、血清が補充されたRPMI培地中でATCCプロトコルにより培養された。ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3による免疫化により生成された抗体が、図12に示された濃度で添加された。免疫化ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3ならびにMUC1*のPSMGFR細胞外ドメインペプチド(以下「FLR」)も、増殖するT47D乳癌細胞に別々に添加された。タキソールおよびE6抗MUC1*Fabは、対照として添加された。図12のグラフは、生成された抗体ならびに遊離ペプチドが、癌細胞の増殖を強力に抑制したことを示す。健康細胞および癌細胞を同様に死滅させる化学療法薬剤である、タキソールを使用した抑制との比較であることに留意されたい。また、比較のために、アミノ酸100~376からのNME7の大きなストレッチを使用して生成されたポリクローナル抗体が示される。この抗体は、癌増殖の有力な阻害剤であるが、それはNME7にもNME1にも結合できるので、非特異的効果を有し得る。

【0554】

類似の実験では、ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3、ならびにペプチドそれら自身による免疫化から生成された抗体の組み合わせが、示された濃度で、増殖する癌細胞に添加された。図13に示される細胞増殖のグラフは、抗体とペプチドの組み合わせが、強力に癌細胞の増殖を抑制したことを示す。これらの2つの実験では、細胞は、MUC1*陽性乳癌細胞であった。

【0555】

実施例10 - 抗NME7抗体は、転移性癌細胞への癌細胞の移行を抑制する

癌細胞は、よりナイーブな状態へ幹細胞を戻す薬剤の存在下で培養される場合、より転移性の状態に形質転換する。本発明者らは、NME7_{AB}、ヒトNME1二量体、細菌性NME1二量体またはMEKおよびGSK3ベータ阻害剤(「2i」と呼ぶ)中で癌細胞を培養することが、その細胞をより転移性にさせることを実証した。より転移性の状態への細胞の移行とともに、それらは非付着性になり、培養皿から浮き上がる。これらの浮遊細胞、「浮遊物」は、付着性のものから別に集められ、次のことが示された: a) 遙かに高レベルの転移性遺伝子を発現する; および、b) マウスへ異種移植された場合、非常に少ない数で移植された場合、この浮遊細胞は腫瘍を生成できた。乳癌のCXCR4、前立腺癌のCHD1などの特異的転移マーカー、およびOCT4、SOX2、NANOG、K

10

20

30

40

50

L F 4、c - M y c 他などの他の多能性幹細胞マーカーの R T - P C R 測定は、N M E 7 A B 中で培養された癌細胞で劇的に過剰発現され、ここでおよび図で「浮遊物」と呼ばれた、非付着性になった細胞で最も過剰発現された。

【 0 5 5 6 】

ここで、本発明者らは、N M E 7 由来ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3、ならびにペプチドそれ自体での免疫化により生成された N M E 7 特異的抗体が、癌細胞から転移性癌細胞への移行を抑制することを示す。これらの実験の最初では、A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3 による免疫化により生成された抗体は、N M E 7 A B、または 2 i 阻害剤中での T 4 7 D 乳癌細胞の培養により誘導される転移性への移行を抑制するそれらの能力に関して試験された。最も注目される観察は、これらの抗体とペプチドが、浮遊細胞の数を劇的に減らしたことであり、それは、これらの抗体とペプチドが転移性癌細胞への形質転換を抑制したという最初の指標であった。特に、抗体が B 3 ペプチドによる免疫化から生成された細胞は、浮遊細胞をほとんど生成しなかった。

10

【 0 5 5 7 】

図 1 4 は、どの抗体治療も受けなかった対照ウェルに対比した、各抗体についての目視可能な浮遊細胞のパーセンテージの観察記録を示す。m R N A は、浮遊性細胞および付着細胞の両方から抽出された。R T - P C R を用いて、C X C R 4 を含む転移マーカーの発現レベルを測定した。抗 N M E 7 抗体による治療は、C X C R 4 などの転移マーカーの量を大幅に減らし、抗体が転移性癌への移行を抑制することを示した。(図 1 5 を参照されたい)。特に、ペプチド B 3 による免疫化により生成された抗体、別名抗体 # 6 1 は、実質的に完全に、より転移性の状態への移行を抑制した。図 1 5 B は、N M E 7 A B ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3 を用いて単独で治療された乳癌細胞が、2 i 阻害剤含有培地中での細胞の培養により誘導されたより転移性の状態への移行を、強力に抑制できたことを示す。ペプチド B 3 は、それが生成した抗体 # 6 1 と同様に、特に有効であった。図 1 5 C は、同じグラフを示すが、転移マーカーのペプチド抑制を示すために Y 軸を拡大した。細胞の生存率と増殖を示す、m R N A の量が測定された。抗体で治療された細胞は、遙かに少ない m R N A を有し、より転移性の状態への移行を抑制することに加えて、抗 N M E 7 A B 抗体が癌細胞の増殖を抑制したことを示している。図 1 6 は、図 1 5 A で示される抑制実験で回収された R N A 量の表を示す。

20

【 0 5 5 8 】

実施例 1 1 - N M E 7 由来ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 および B 3 で生成された抗 N M E 7 抗体は、いずれの市販抗体を使用しても検出できない新規 N M E 7 種を特定した。

30

当業者に知られているように、いくつかの抗体は、標的タンパク質の直鎖部分を認識し、ウエスタンブロットアッセイで使用でき、一方、他の抗体は、非直鎖の高次構造モチーフを認識し、ブルダウンまたは免疫沈降アッセイで使用できる。本出願以前に、切断 N M E 7 またはアイソフォーム N M E 7 - X 1 が存在することは知られていなかった。本件の出願時に市販品として入手可能であった抗体の使用は、既存の抗体が、これらの重要な N M E 7 種を特異的に検出できなかったことを示す。B 9 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) は、N M E 7 アミノ酸 1 0 0 ~ 3 7 6 に対して産生されたモノクローナル抗体である。図 1 9 D ~ 1 9 F は、それのみが、完全長 4 2 k D a N M E 7 を検出することを示す。別の市販の抗体、H 2 7 8、は N M E 7 アミノ酸 1 0 0 - 3 7 6 に対して産生されたウサギポリクローナル抗体であり、それは N M E 7 に特有でないアミノ酸配列を含む。図 1 9 D ~ 1 9 F は、この抗体もまた、完全長 N M E 7 と同じ 1 7 k D a である N M E 1、および N M E 7 A B に特異的であるとは見えない他のバンドを染色することを示す。

40

【 0 5 5 9 】

N M E 7 A B ペプチド A 1、A 2、B 1、B 2 または B 3 による免疫化により生成された N M E 7 抗体は、完全長 4 2 k D a タンパク質、切断産物または選択的アイソフォームであり得る約 3 3 k D a の N M E 7 種、切断産物または選択的アイソフォームであり得る約 3 0 k D a の N M E 7 種、を含む新規 N M E 7 種を特定し、ここで約 3 0 k D a 種は、

50

NME7-X1であると思われる。図19A~Cは、ペプチドA1、B1およびB3により生成された抗体が、T47D乳癌細胞、PC3およびDU145前立腺癌細胞、HEK293胎児肝細胞および白血病細胞IM-9、K562およびMV411を含む、広範囲の癌細胞株中で、NME7、NME7_{AB}およびNME7-X1の分泌型を特定することを示す。

【0560】

実施例12 - 抗NME7抗体の生成

NME7のB3領域の配列、AIFGKTKIQNAVHCTDLPE DGLLEVQYFFCを有する合成ペプチドを使用して、ウサギを免疫化した。NME7ペプチドB3による免疫化から得られた抗体は、MUC1*陽性癌細胞の増殖を抑制し、また、癌幹細胞の形成も抑制した。癌幹細胞は、転移マーカーの上方制御、足場を独立に増殖する能力を特徴とし、200個ほどの少ない細胞から動物中で腫瘍を形成でき、一方、通常の癌細胞は典型的には、腫瘍生着のために約4万個の細胞の移植を必要とする。

10

【0561】

いくつかの事例では、NME7 B3ペプチドは、C14AまたはC14V変異を伴って作成された。この配列は、より再現性よく抗NME7抗体を生成した。

【0562】

モノクローナル抗体は、標準的な方法に従って、マウス中で、NME7 B3、C14A変異を有するB3、またはC14V変異を有するB3で免役することにより生成された。列挙された抗体は、NME7、NME7-X1、NME7_{AB}への結合能力の理由で選択されたが、重要なことにNME1に結合せず、これは、いくつかの正常細胞機能のために必要とされると考えられる。これらの抗体はまた、NME7由来ペプチドB3、C14A変異を有するB3、およびC14V変異を有するB3にも結合する。

20

【0563】

実験は、これらの抗NME7抗体が、NME7のMUC1*細胞外ドメインへの結合を抑制したが、NME1のMUC1*細胞外ドメインペプチドへの結合を阻止しなかったことを示した。さらに、これらの抗体は、癌幹細胞の形成を抑制した。

【0564】

引用文献リスト

Al-Hajj et al. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. PNAS. April 1; 100(7): 3983-3988.

30

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006) Cancer stem cells - perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cell. Cancer Res. Oct 1; 66(19): 9339-44. Epub 2006 Sep 21.

Chen K, Huang YH, Chen JL. (2013) Understanding and targeting cancer stem cells: the therapeutic implications and challenges. Acta Pharmacologica Sinica 34: 732-740; Review

Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. FASEB J 18(11): 1240-1242

40

Mahanta S, Fessler S, Park J, Bamdad C. A M

50

- inimal Fragment of MUC1 Mediates Growth of Cancer Cells, 2008 PLoS ONE 3:e2054-2065. Hikita S, Clegg O, Kosik K, Bamdad C. MUC1* Mediates the Growth of Human Pluripotent Stem Cells, 2008 PLoS ONE 3:e3312-3325. Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimmotty PA, Guerra M, Guo W, Xu X. (2012) Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*. Nov 22;31(47):4898-911. 10
- Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan X. (2013) The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular Signaling* May;25(5):1264-71. Review
- Wang ML, Chiou SH, Wu CW. (2013) Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *Onco targets and Therapy*. Sep 4;6:1207-20. Review.
- Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, et al. (2005) Basic Fibroblast Growth Factor Supports Undifferentiated Human Embryonic Stem Cell Growth Without Conditioned Medium. *STEM CELLS* 23:315-323. 20
- Fessler S, Wotkowicz M, Mahanta S, Bamdad C (2009) MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat* 118:113-124 DOI 10.1007/s10549-009-0412-3
- Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3153-61. 30
- Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shen JJ, Tang DG. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*. 2011 Sep 8;30(36):3833-45. PMID: 40
- Faber A, Goessler UR, Hoermann K, Schultz JD, Umbreit C, Stern-Straeter J. SDF-1-CXCR4 axis: cell trafficking in the cancer stem cell niche of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep*. 2013 Jun;29(6):2325-31. 50

Mukherjee D, Zhao J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res*. 2013; 3(1): 46-57. PMID: PMC3555200

Herreros-Villanueva M, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narvajás AA-M, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis*. 2013; 2:e61. PMID: PMC3759123 10

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

Smagghé, B. J. Stewart A. K., Carter M. G., Shelton L. S., Bernier K. J., Hartman E. J., Calhoun A. K., Hatzioannou V. M., Lillacci G., Kirk B. A., DiNardo B. A., Kosik K. S., Bamdad C. (2013) MUC1* Ligand, NM23-H1, Is a Novel Growth Factor That Maintains Human Stem Cells in a More Naive State. *PLoS ONE* 8(3): e58601 20

Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzl D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornrucksas S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R. (2014) Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2014 Jul 24, S1934-5909(14)00298-7. 30

Rais Y1, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AA, Caspi I, Krupalnik V, Zerbib M, Maza I, Mor N, Baran D, Weinberger L, Jaitin DA, Lara-Astiaso D, Blecher-Gonen R, Shipony Z, Mukamel Z, Hagai T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Tanay A, Amit I, Novershtern N, Hanna JH (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell*, 150(7):65-70. 40

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

Liu W, Ma Q, Wong K, Li W, Ohgi K, Zhang J, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Brd4 and JMJD6 - A 50

associated Anti - Pause Enhancers in Regulation of Transcriptional Pause Release. Cell. 2013 Dec 19; 155 (7) : 1581 - 95 . PMCID : PMC3886918 .

Silva J , Barrandon O , Nichols J , Kawaguchi J , Theunissen TW , Smith A . Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLoS Biol. 2008 Oct 21; 6 (10) : e253 . PMCID : PMC2570424

Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 (4) : 663 - 676 .

Porter D et al. (2011) Chimeric antigen receptor - modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med 365 : 725 - 733 DOI : 10.1056/NEJMoa1103849

Tiller T et al. (2013) A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. MABs 9 : 5 (3) PMID : 23571156

Webb PA , Perisic O , Mendola CE , Backer JM and Williams RL . The crystal structure of a human nucleoside diphosphate kinase , NM23 - H2 . J Mol Biol . 1995 , 251 : 574 - 587 .

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

Okabe - Kado et al. , " A new function of Nm23 / NDP kinase as a differentiation inhibitory factor , which does not require its kinase activity " , FEBS Letters 363 : 311 - 315 , 1995

Lombardi et al. , " nm23 : Unraveling Its Biological Function in Cell Differentiation " JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY 182 : 144 - 149 (2000)

Harrell et al. , Estrogen Receptor Positive Breast Cancer Metastasis : Altered Hormonal Sensitivity and Tumor Aggressiveness in Lymphatic Vessels and Lymph Nodes . Cancer Res 2006 ; 66 : (18) . September 15 , 2006 .

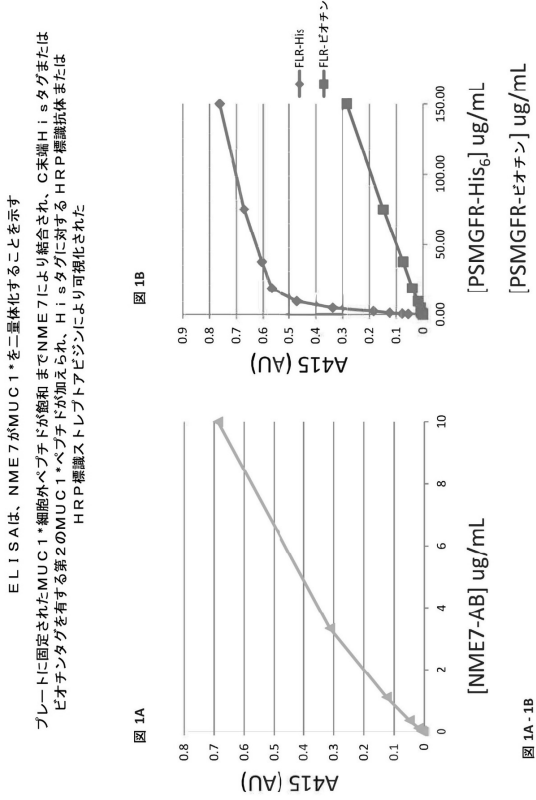
Suzuki et al. , Combined effect of dehydr oxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer . Clin Exp Metastasis (2013) 30 : 381 - 392 .

【 0 5 6 5 】

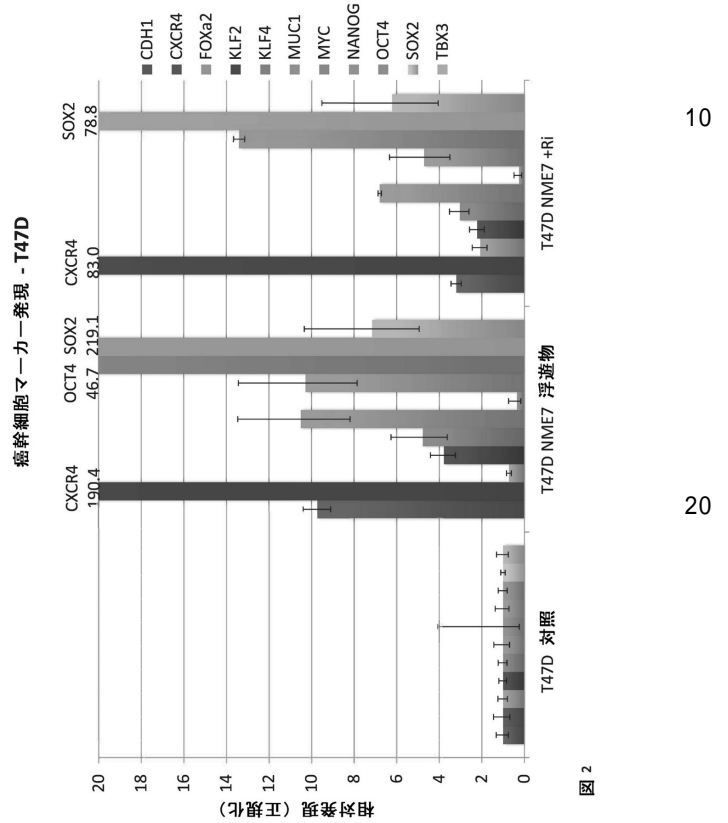
当業者なら、単に定型の実験を行うだけで、本明細書で特に記載された本発明の特定の
実施形態に対する多くの等価物を認める、または確認することができるであろう。このよ
うな等価物は、添付の特許請求の範囲内に包含されることが意図されている。

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】



10

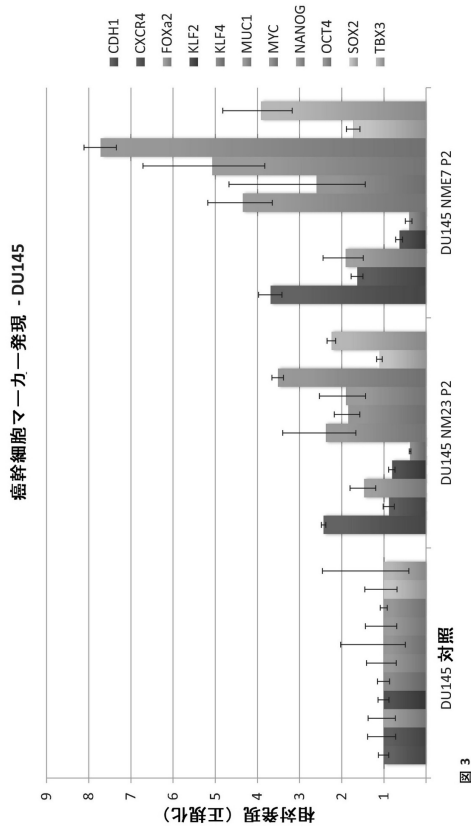
20

30

40

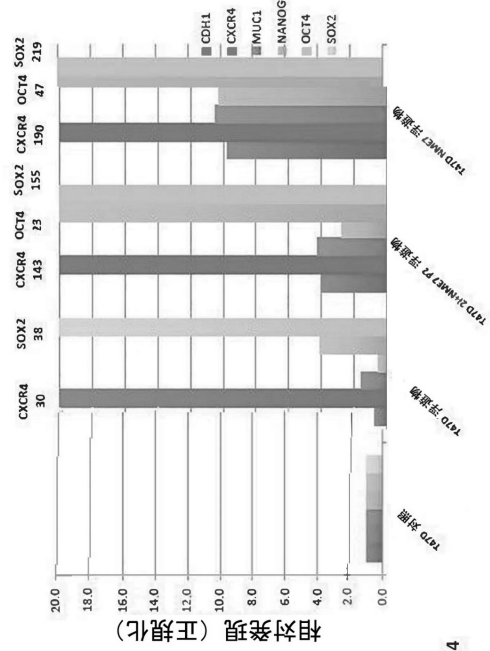
50

【 図 3 】



【 図 4 】

乳癌細胞は、2 i 阻害剤またはNME7-A Bの存在下で培養することによって転移性の状態に進行する



10

20

【 図 5 】

図 5 ヒトNME7-AおよびBドメインに対するヒトNME1の配列アラインメント

```

NME1      MANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIRKFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDLDRPF 60
NME7A     ----EKTALILKPDASK--AGEIIEILINKAGFTITLKMMLSRKEALDFHVDHQSRPF 54
          *::  ****:..:  ****: : : * : ** * *..  : : ** : **

NME1      FAGLVKYMHSQPVVAMVWEGLNVTGRVMLGETNP---ADSKPGTIRGDFCIQVGRNII 117
NME7A     FNELIQFITTTGPIIAMEILRDDAICEWKRLLGPNAGVARTDASESIRALFGTDGIRNAA 114
          * *::: : ** : **  : : : * : * . . . * : * : *

NME1      HGSDSVESAKEEIGLWFHPEELVDYTSQAQNIYE 152
NME7A     HGPDSFASAREMELFF----- 131
          **,* * * * : * :

NME1      MANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIRKFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDLK-DRP 59
NME7B     ---NCTCCIVKPHAVSEGLLGRILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVT 56
          : * : * : . * : * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

NME1      FFAGLVKYMHSQPVVAMVWEGLNVTGRVMLGETNPADS---KPGTIRGDFCIQVGRNII 116
NME7B     EYHDMVTMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA 116
          : : * . * : * * * * : * . * * * : * : * : : * : * : * : *

NME1      IHGSDSVESAKEEIGLWFHPEELVDYTSQAQNIYE 152
NME7B     VHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN----- 139
          : * : * * . * : * : :

```

【 図 6 - 1 】

図 6 癌の治療または予防のためにNME7を阻害する抗体を生成するためのNME7特異的ペプチド

以下のペプチド配列は、ヒトNME7を標的とするが、NME1を標的にしない抗体を生成する免疫原性ペプチドであるとして特定される。これらの配列は、ヒトNME1に対する配列相同性を欠くという理由で選択された。

1. LALIKPDA
2. MMMLSRKEALDFHVDHQ5
3. ALDFHVDHQ5
4. EILRDDAICEWKRL
5. FNELIQFITGP
6. RDDAICEV
7. SGVARTDASESIRALFGTDGIRNAA
8. ELFFPSSGG
9. KFTNCTCCIVKPHAVSEGLLKILMA
10. LMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVT
11. EYEVYKGVVTEYHD
12. EIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNA
13. YSGPCVAM
14. FREFCGP
15. VHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN
16. IQNAVHCTD
17. TDLPEDGLLEVQYFFKILDN
18. PEDGLLEVQYFFK
19. EIINKAGFTITK
20. MLSRKEALDFHVDHQ5
21. NELIQFIT
22. EILRDDAICEWKRL
23. SGVARTDASESIRALFGTDGI
24. SGVARTDASES

30

40

50

【 図 6 - 2 】

図 6 (続き)

- 25. ALFGTDGI
- 26. NCTCCIVKPHAVSE
- 27. LGKILMAIRDA
- 28. EISAMQMFNMDRVNVE
- 29. EVYKGVVT
- 30. EYHDMVTE
- 31. EFCGPADPEIARHLR

【 図 7 】

図 7

癌の治療または予防のためにNME 7を阻害する抗体を生成するためのNME 7特異的ペプチド

下記は、それらが構造完全性、またはMUC 1*ペプチドに対する結合にとって重要な領域である可能性があるので好ましい。各可変領域が対のそれぞれ1つに結合し得る二価の抗体が好ましい。

- 35. ICEWKRL
- 36. LGKILMAIRDA
- 37. HAVSEGLLGK
- 38. VTEMYSGP
- 39. NATKTFREF
- 40. AIRDAGFEI
- 41. AICEWKRLGPGAN
- 42. DHQSRPFF
- 43. AICEWKRLGPGAN
- 44. VDHQSRPF
- 45. PDSFAS
- 46. KAGEIIEIINKAGFTITK

10

20

【 図 8 】

図 8

下記のペプチド配列は、ヒトNME 1由来であり、ヒトNME 7へのそれらの高い相溶性 ならびにその機能を模倣できる他の細菌性NMEタンパク質へのそれらの相溶性の理由で選択された。

- 47. MANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFE
- 48. VDLKDRPF
- 49. HGSDSVESAEKEIGLWF

ヒトNME 7-AまたはBへの、またHSP 593へのそれらの高い相溶性のため特に好ましいのは

- 50. ERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFE
- 51. VDLKDRPFFAGLVKYMHSRGPVVMVWVWGLN
- 52. NIIHGSDSVESAEKEIGLWFHPEELV
- 53. KPDGVQRGLVGEI

【 図 9 】

図 9

癌の治療または予防のための抗体を生成するのに好ましいNME 7-A B特異的ペプチド

NME7A ペプチド 1
MLSRKEALDFHVDHQS

NME7A ペプチド 2
SGVARTDASES

NME7B ペプチド 1
DAGFEISAMQMFNMDRVNVE

NME7B ペプチド 2 EVYKGVVTEYHDMVTE

NME7B ペプチド 3
AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF

NME7B ペプチド 3 CysからSer への変異
AIFGKTKIQNAVHSTDLPEDGLLEVQYFF

30

40

50

【 図 1 0 】

ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3により生成した抗NME7抗体は、NME7（左）に結合するが、NME1には結合しない。C20は、NME1抗体である。

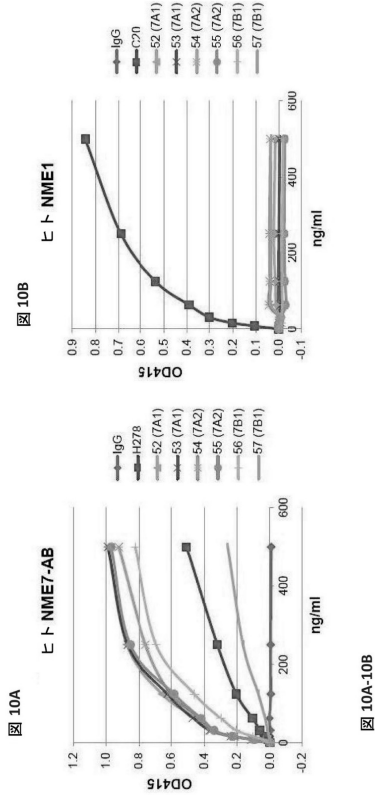


図 10A-10B

【 図 1 1 】

ELISAアッセイは、NME7-A BがMUC1*ペプチドへの結合を阻止するが、ヒトNME1二量体に対しては阻止しない能力を試験する

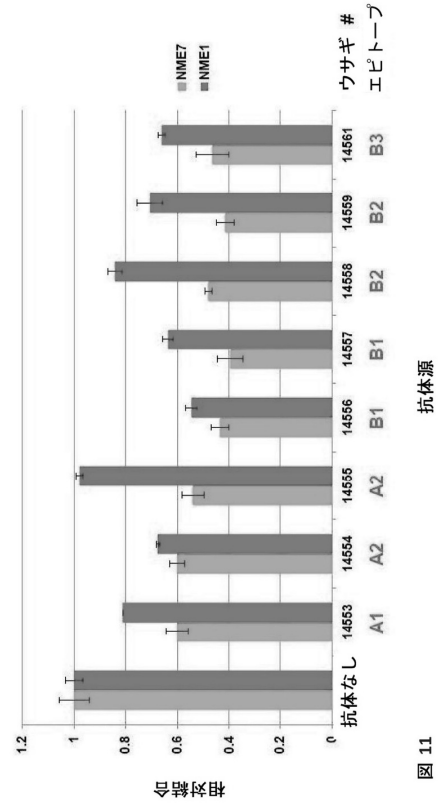


図 11

【 図 1 2 】

ペプチドA1、A2、B1、B2およびB3を用いる免疫化により生成された抗NME7抗体、ならびに免疫化ペプチド 自体は、癌細胞増殖を抑制する。

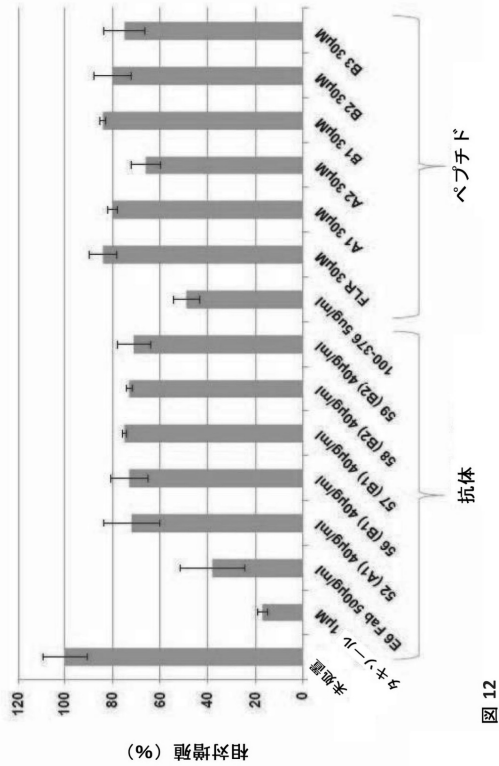


図 12

【 図 1 3 】

NME7特異的ペプチドから生成された抗体は、癌細胞増殖を抑制し、ペプチド自体も癌細胞増殖を抑制する

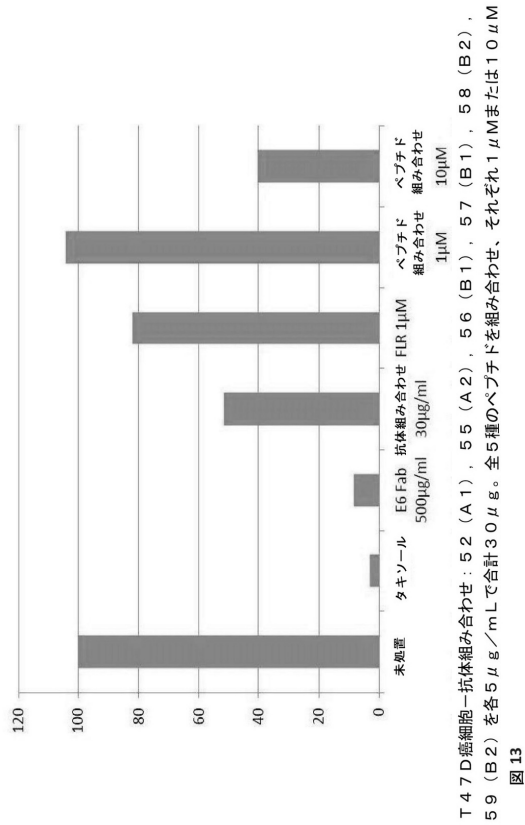


図 13

T47D癌細胞-抗体組み合わせ: 52 (A1), 55 (A2), 56 (B1), 57 (B1), 58 (B2), 59 (B2) を各5µg/mLで合計30µg。至5種のペプチドを組み合わせ、それぞれ1µMまたは10µM

【 図 1 4 】

抗NME7抗体を用いる癌細胞の処置は、「浮遊」細胞への移行を抑制し、そのPCRはCXCR4などの転移マーカーの発現を大きく増大させたことを示し、異種移植片実験は、癌端に少ないコピー数-50個-で浮遊細胞が腫瘍を形成することを示し、従って、癌幹細胞または転移性癌細胞に分類される要件を満たす。

図 14A

抗体	浮遊物観察
対照 IgG	100%
53,55,57 (A1,A2,B1)	70%
53,57 (A1,B1)	50%
61 (B3)	5%

より高発現の転移マーカーを有し、癌端に少ないコピー数で動物で腫瘍を形成する細胞である、「浮遊」細胞の数は、典型的には、7日目で播種細胞の量の20%である。ここで、本発明者は、対照抗体が添加される場合に得られる浮遊細胞の数を100%と定義する。他の浮遊細胞のパーセンテージは、対照IgG抗体が加えられた対照に対する値である。

図 14B

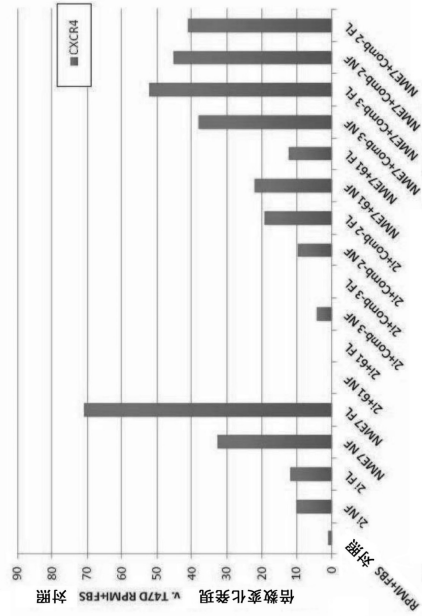
抗体	浮遊物観察
対照 IgG	100%
53,55,57 (A1,A2,B1)	65%
53,57 (A1,B1)	40%
61 (B3)	5%

図 14A-14B

VH 観察

【 図 1 5 A 】

抗NME7抗体による癌細胞の治療は、転移性癌細胞への転移を抑制する； CXCR4は、癌の転移マーカーである。



T47D乳癌細胞、2i1は、MEKおよびGSK3-γ抑制剤であり、NF=非浮遊物；FL=浮遊物；61=NME7由来のB3ペプチドで免疫されたウサギ#61、Comb-2=A1およびA2で免疫したウサギ由来の抗体の組み合わせ。図 15A Comb-3=ペプチドA1、A2およびB1で免疫したウサギ由来の抗体の組み合わせ。

10
20

【 図 1 5 B 】

抗NME7-A B抗体を用いる癌細胞の処置は、転移性癌細胞への移行を抑制する； CXCR4およびSOX2は、癌の転移マーカーである。

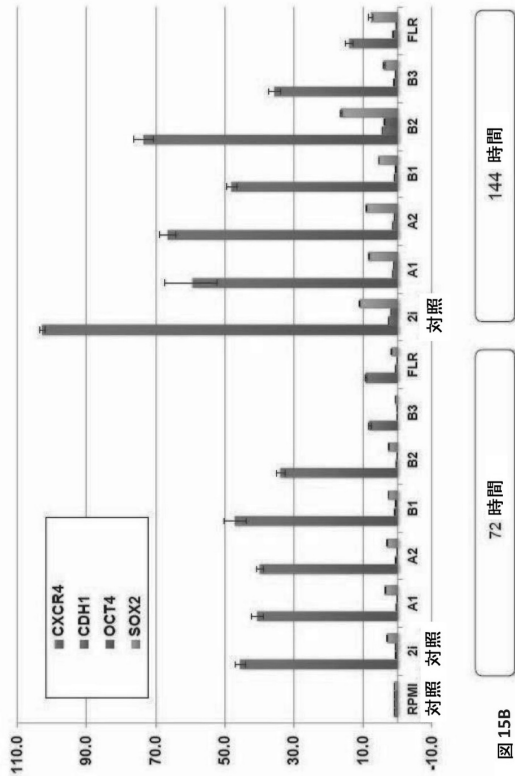


図 15B

【 図 1 5 C 】

抗NME7-A B抗体を用いる癌細胞の処置は、転移性癌細胞への移行を抑制する； CXCR4およびSOX2は、癌の転移マーカーである。

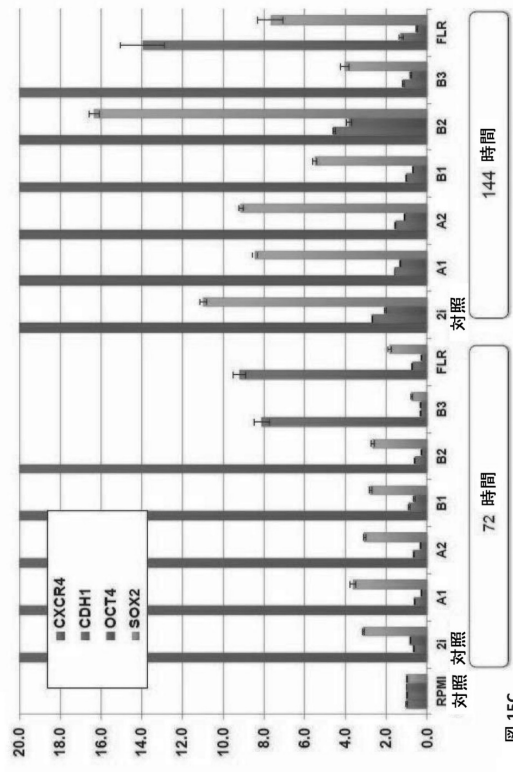


図 15C

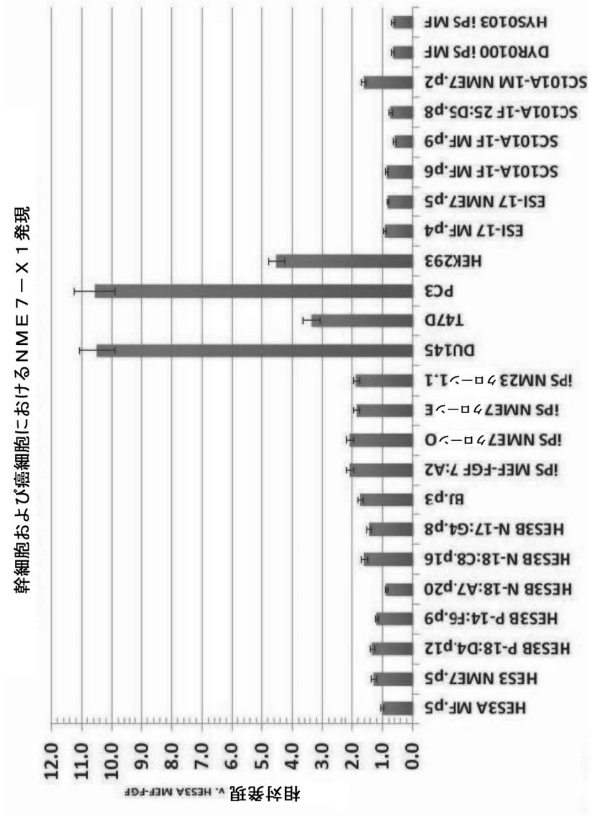
30
40
50

【 図 1 6 】

細胞株	T47D	培養	培養地	総 RNA ng/μL	取量 (μg)	EFFIAl 閾値 サイクル
対照			RPMI + 10% FBS	395.8	47.49	15.2
2i 付着			MM + 2i	387.8	11.64	14.5
2i 浮遊物			MM + 2i	234.6	7.04	14.9
NME7 付着			MM+NME7 4nM	334.8	10.04	14.7
NME7 浮遊物			MM+NME7 4nM	259.3	7.78	16.0
2i+ 抗体 B3 ウサギ 61 付着			MM + 2i	2.7	0.08	25.9
2i+ 抗体 B3 ウサギ 61 浮遊物			MM + 2i	3.6	0.11	25.0
2i+ 抗体の組み合わせ 3 付着			MM + 2i	44.7	1.34	17.0
2i+ 抗体の組み合わせ 3 浮遊物			MM + 2i	39.0	1.17	15.9
2i+ 抗体の組み合わせ 2 付着			MM + 2i	46.0	1.38	15.6
2i+ 抗体の組み合わせ 2 浮遊物			MM + 2i	77.8	2.33	16.3
NME7+ 抗体 B3 ウサギ 61 付着			MM+NME7 4nM	65.7	1.97	17.0
NME7+ 抗体 B3 ウサギ 61 浮遊物			MM+NME7 4nM	15.8	0.47	19.9
NME7+ 抗体の組み合わせ 3 付着			MM+NME7 4nM	32.1	0.96	17.0
NME7+ 抗体の組み合わせ 3 浮遊物			MM+NME7 4nM	109.3	3.28	16.1
NME7+ 抗体の組み合わせ 2 付着			MM+NME7 4nM	134.5	4.03	16.1
NME7+ 抗体の組み合わせ 2 浮遊物			MM+NME7 4nM	139.5	4.19	18.6

図 16

【 図 1 7 】



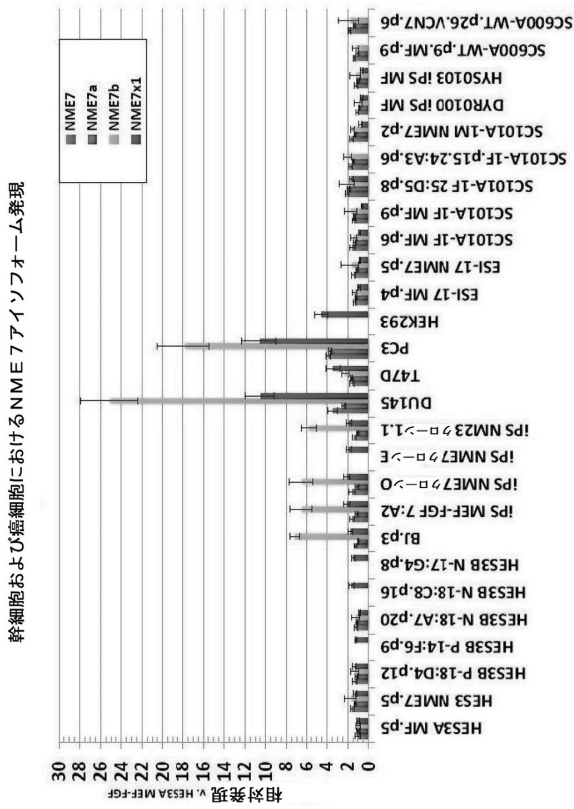
幹細胞および癌細胞における NME7-X1 発現

図 17

10

20

【 図 1 8 】



幹細胞および癌細胞における NME7 アイソフォーム発現

図 18

【 図 1 9 - 1 】

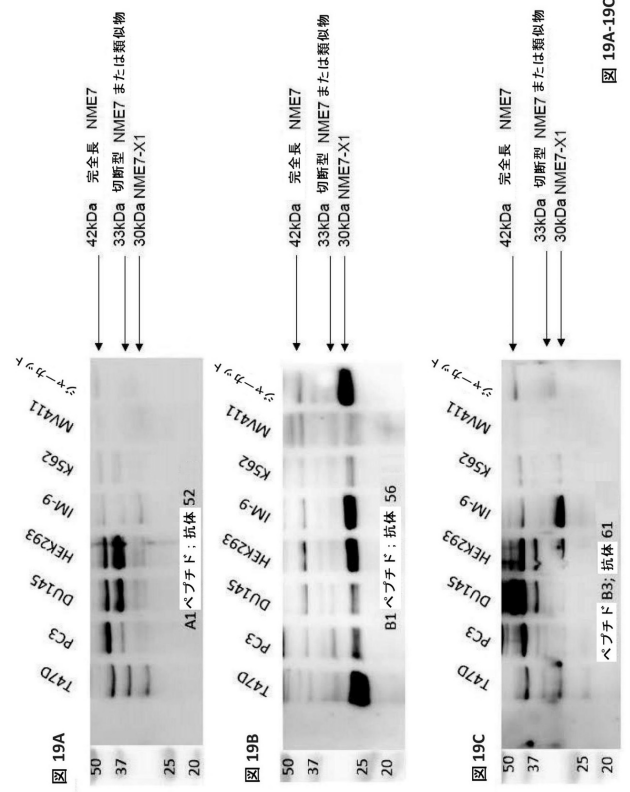


図 19A-19C

30

40

50

【 図 19 - 2 】

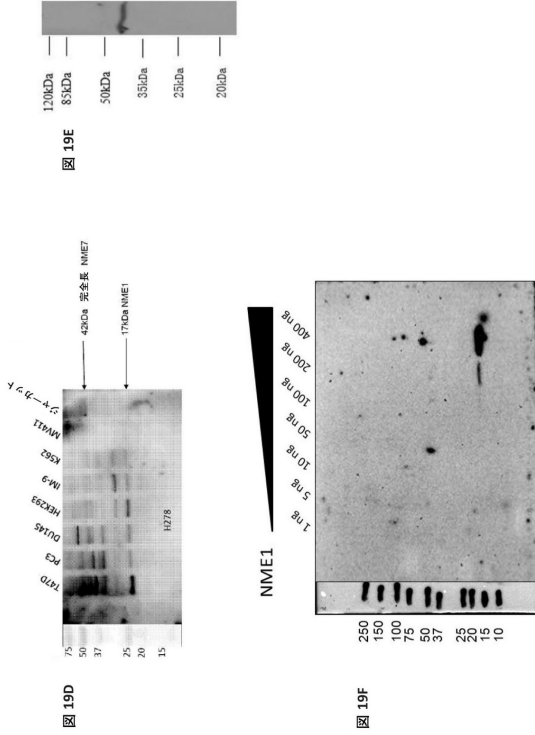


図 19D-19F

【 図 20 - 1 】

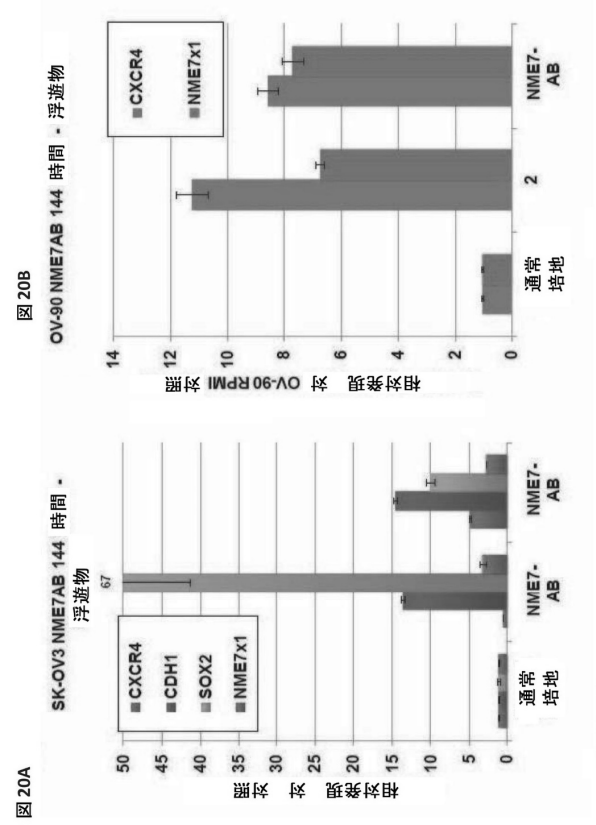


図 20A-20B

【 図 20 - 2 】

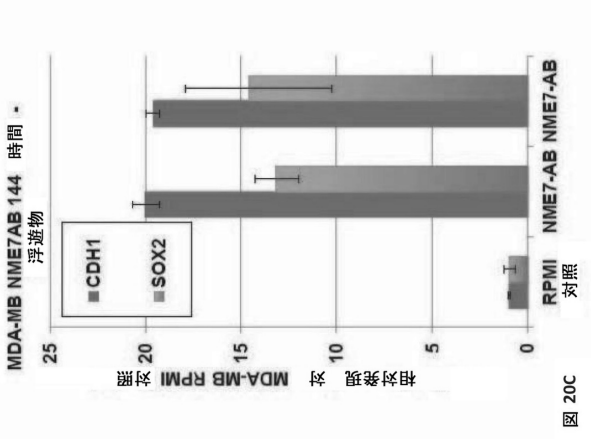


図 20C

【 図 21 - 1 】

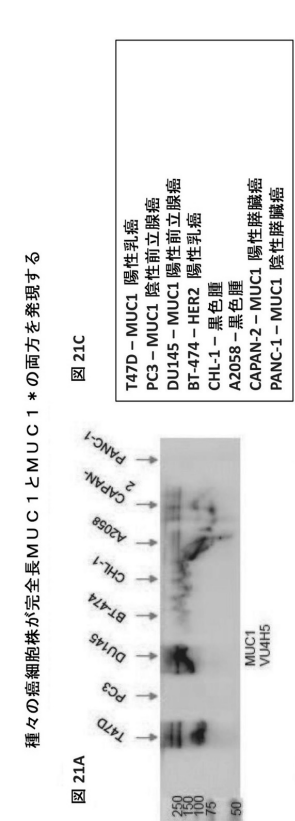


図 21A-21B

種々の癌細胞株が完全長MUC1とMUC1*の両方を発現する

【 図 2 1 - 2 】

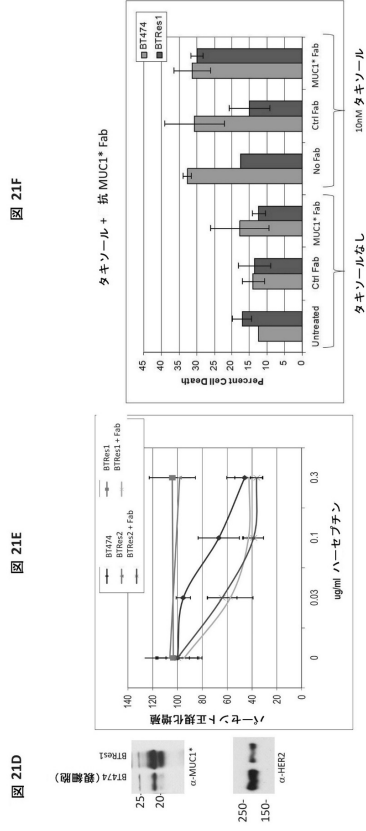
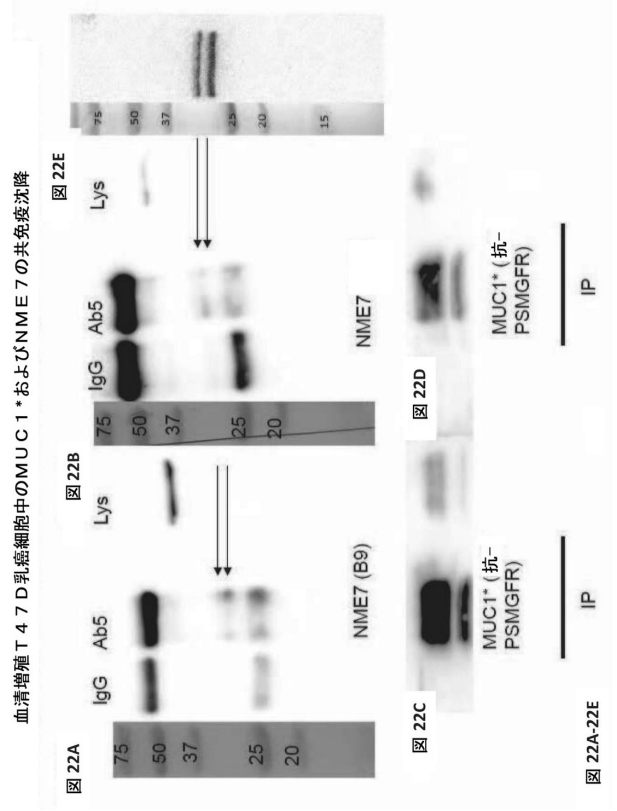
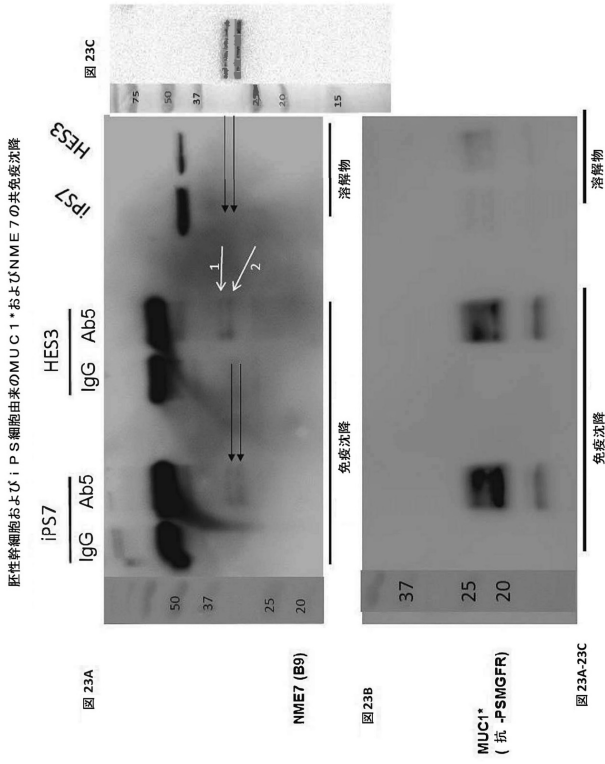


図 21D-21F

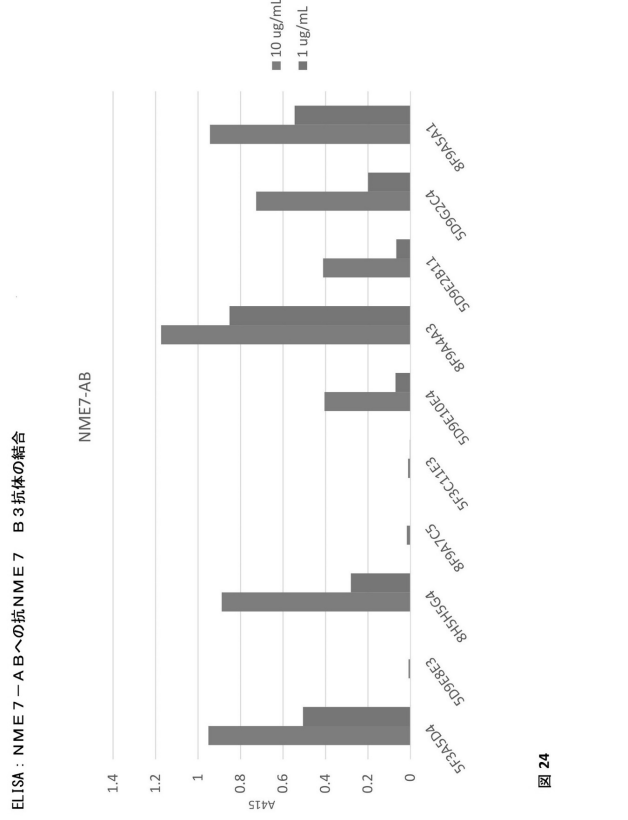
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 29 】

抗NME7 B3抗体の存在または非存在下にてNME7-A B培地中で増殖させたT47D乳癌細胞からの、細胞数の指標である、RNA収量

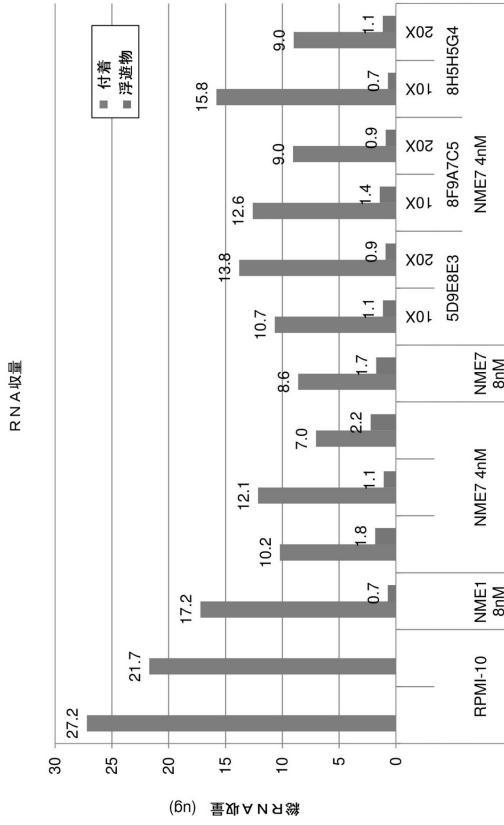


図 29

【 図 30 】

抗NME7 B3抗体の存在下または非存在下にてNME7-A B培地中で増殖させたT47D乳癌細胞中の乳癌転移マーカーのRT-PCR分析

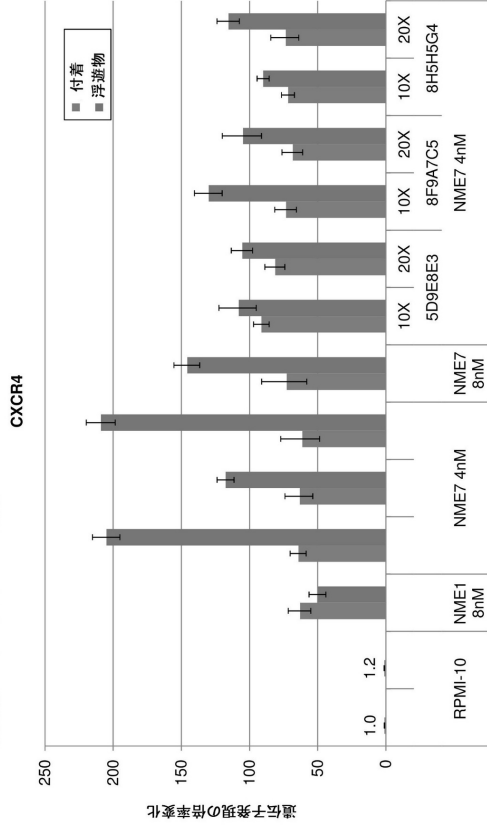


図 30

【 図 31 】

抗NME7 B3抗体の存在下または非存在下にてNME7-A B培地中で増殖させたT47D乳癌細胞中の幹細胞および転移マーカーSOX2のRT-PCR分析

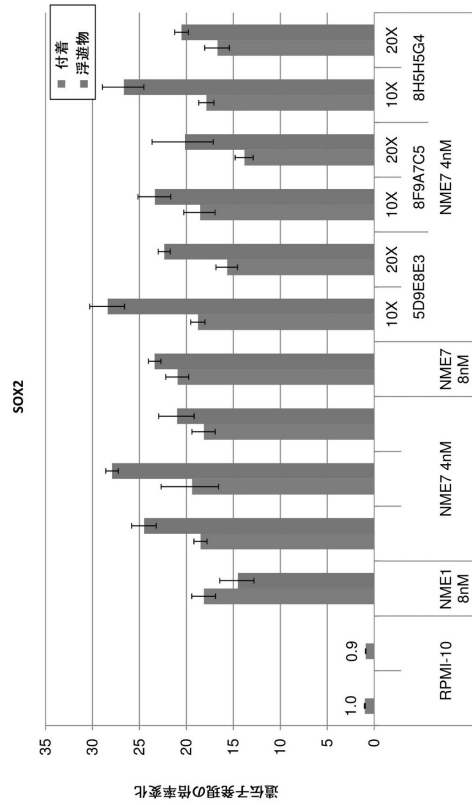


図 31

【 図 32 】

抗NME7 B3抗体の存在下または非存在下にてNME7-A B培地中で増殖させたT47D乳癌細胞中のNME7-AB同義受容体MUC1のRT-PCR分析

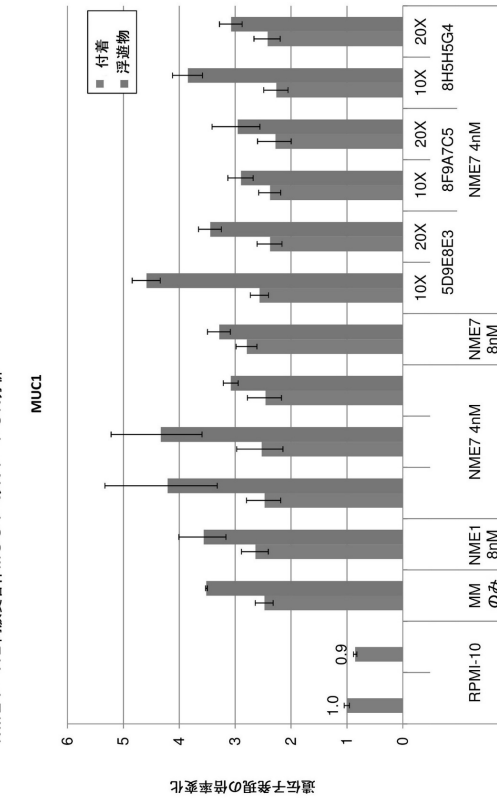


図 32

【 図 3 3 】

腫瘍一胚成長因子 (Onco-embryonic growth factor) NME7は、癌細胞を転移性癌幹細胞へと形質転換する。

6日目

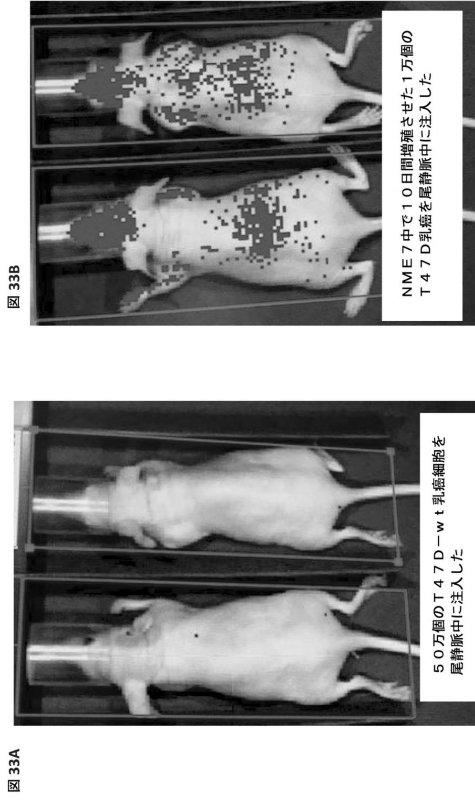


図 33A

図 33B

図 33A-33B

【 図 3 4 】

1.0日目、1万個のT47D-CSC (癌幹細胞) 対50万個の野生型T47D、+/-抗NME7処置；7日目は1回目の抗体注入であったが、NME7注入の直後に実施された。

図 34D

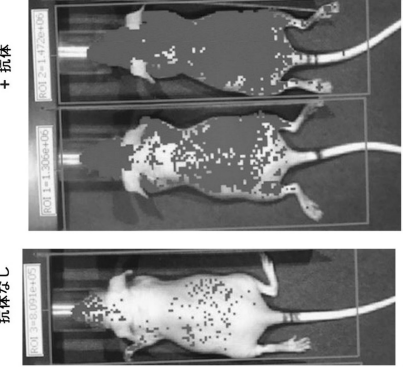
図 34C

図 34B

図 34A

T47D-wt
500K 静脈内
10日目
抗体なし

T47D-CSC
10K 静脈内
10日目
+ 抗体



実験：パイロット研究
ケージ# 箱度

Cage #	Radiance [E]
13.5 min 500K	4E3 → 5E6
T47D-CSC IV -ab1	0.1506
T47D-CSC IV +ab2	0.1477
T47D-wt IV	0.08091

Experiment: Pilot Study: αNME7 abs

図 34A-34D

10

20

【 図 3 5 】

1.2日目、1万個のT47D-CSC 対50万個の野生型T47D；CSCマウスは抗NME7処置あり；

図 35A

図 35B

図 35C

T47D-野生型
500K 静脈内
12日目
抗体なし

T47D-CSC
10K 静脈内
Day 12日目
抗体なし + 抗体

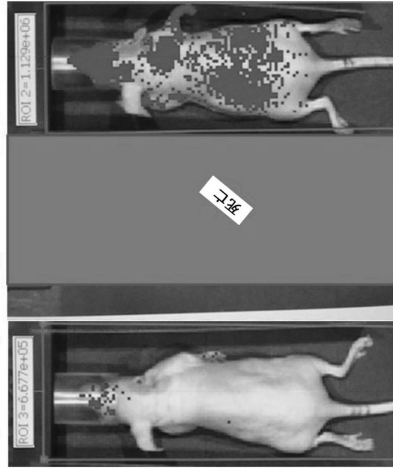


図 35A-35C

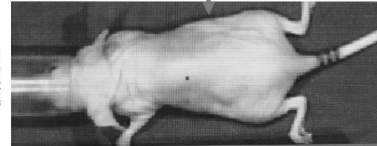
【 図 3 6 】

1.4日目、1万個のT47D-CSC 対50万個の野生型T47D；CSCマウスは3回の抗NME7を注入したが、1回目の注入はNME7注入と同時にあった

図 36A

図 36B

T47D-野生型
500K 静脈内
14日目
抗体なし



比較

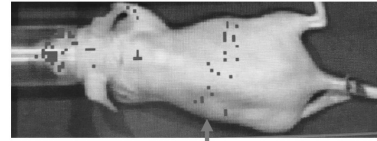


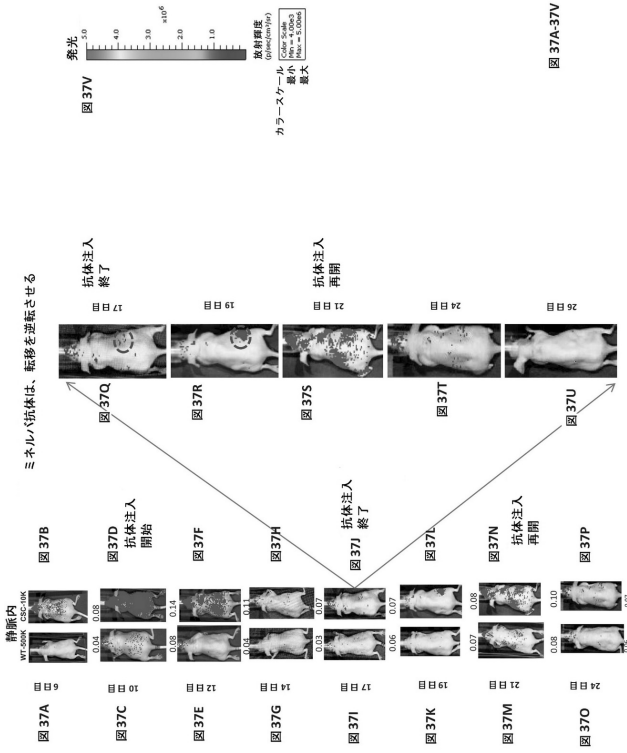
図 36A-36B

30

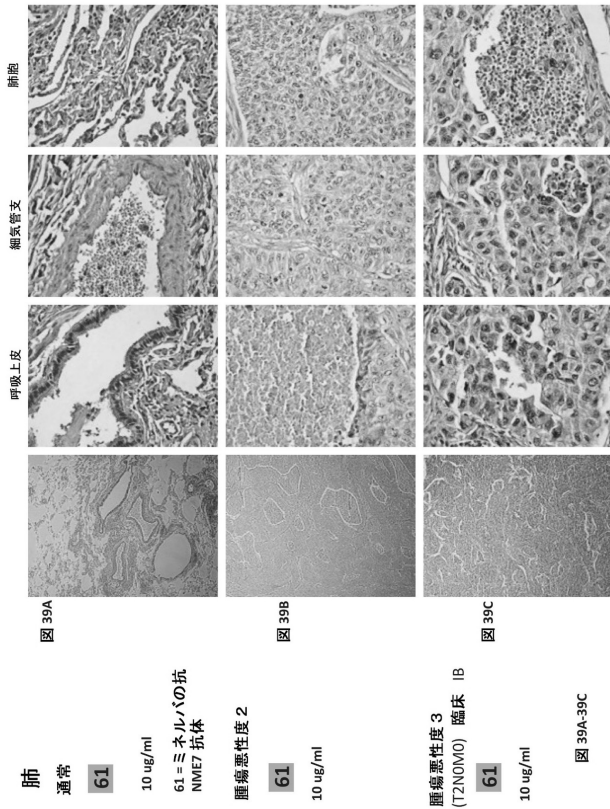
40

50

【 図 3 7 】

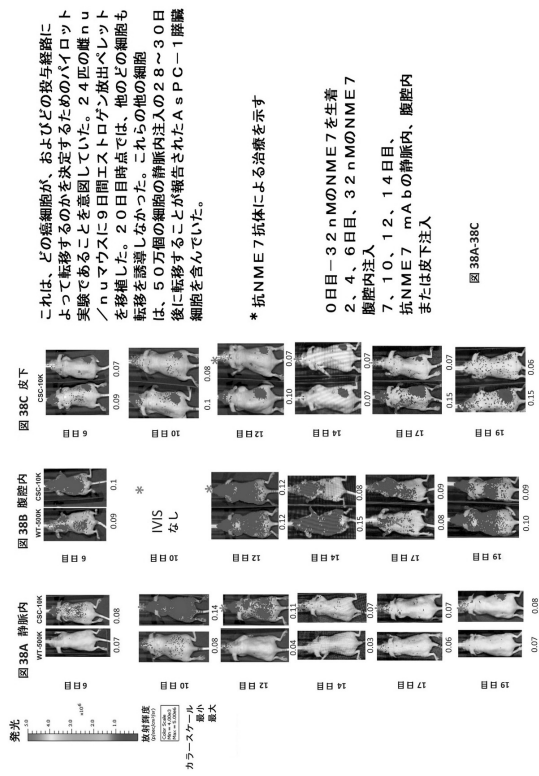


【 図 3 9 】

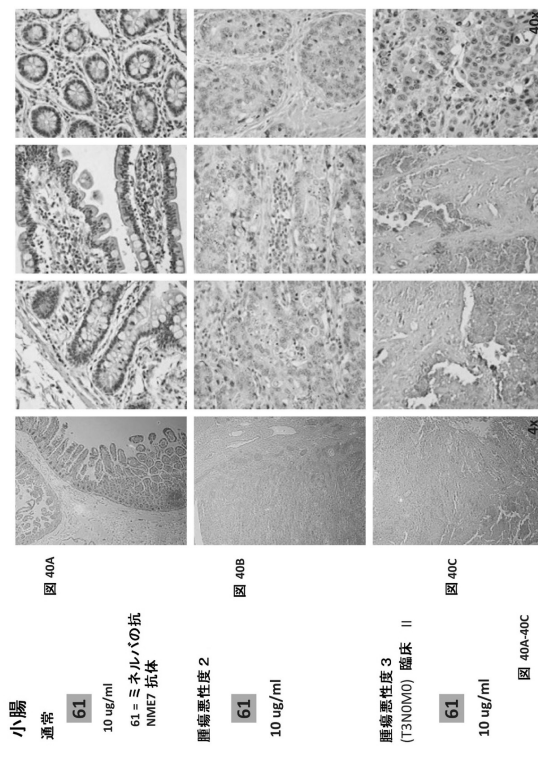


【 図 3 8 】

NME7 で 10 日間増殖させると、癌細胞は転移する；転移は、ミネルハの抗 NME7 モノクローナル抗体により 6 日目～19 日目に逆転される



【 図 4 0 】



10

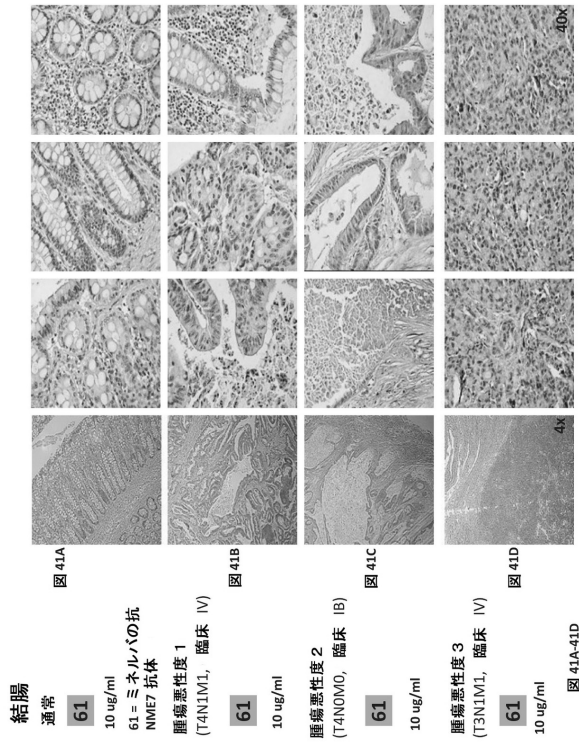
20

30

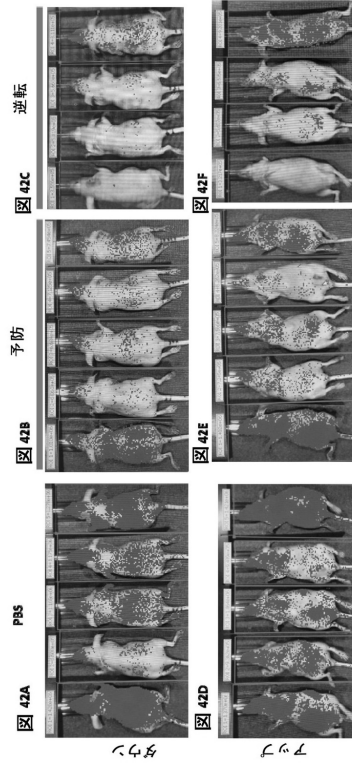
40

50

【 図 4 1 】



【 図 4 2 】



抗 NME7_{Ab} 8F9A4A3 は、転移の確立を予防し、逆転させる

抗 NME7_{Ab} 抗体 4A3 は、1.5 mg/kg 相当の用量で尾静脈中に 1 日おきに注入された

図 42A-42F

10

20

【 図 4 3 】

抗 NME7_{AB} mab の 8F9A5A1 および 5F3A5D4 は、予防モデルにおいて転移を抑制する

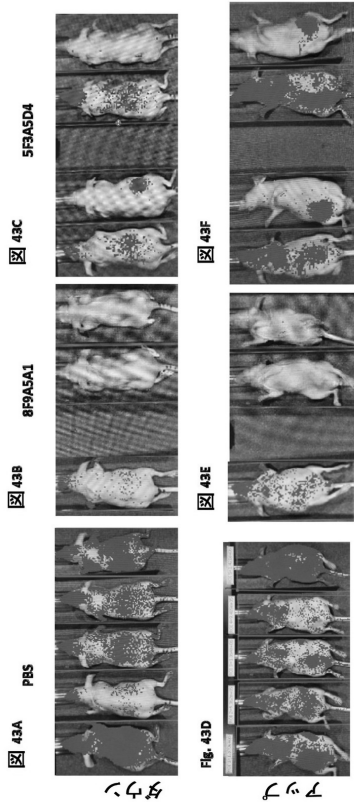


図 43A-43H

図 43A-43F 抗 NME7_{AB} 抗体は、1.5 mg/kg に相当する投与量で尾静脈に 1 日おきに注入された

【 図 4 4 】

転移逆転モデル：抗 NME7 抗体の確立された転移を逆転させる能力の濃度依存性

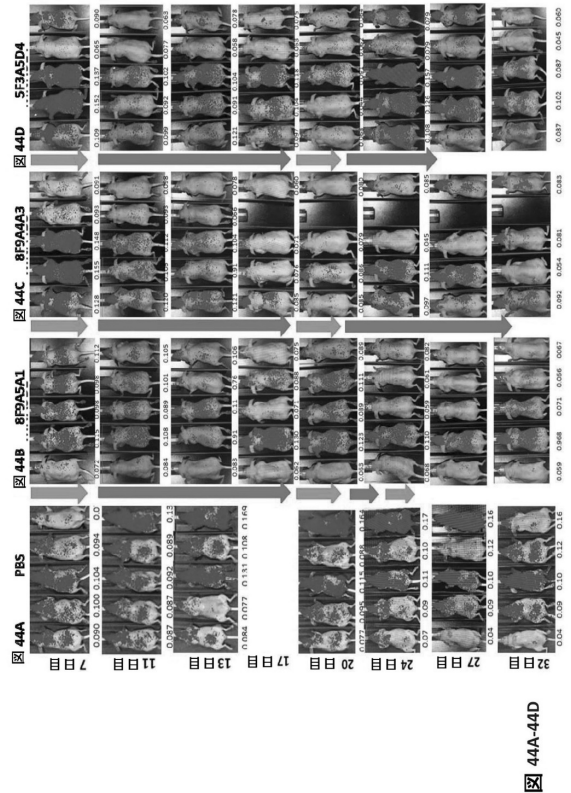


図 44A-44D

30

40

50

【 図 4 5 】

T 4 7 D C S C から構成される原発腫瘍の皮下移植；結論：抗体カウネルは、転移を抑制したが、原発腫瘍の増殖を抑制しなかった

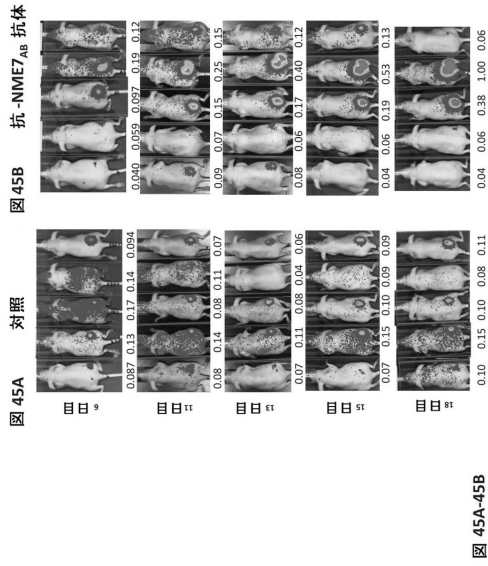


図 45A-45B

【 図 4 7 】

種々の癌細胞株を、NIME 7_{AB}の存在について免疫蛍光法により分析した

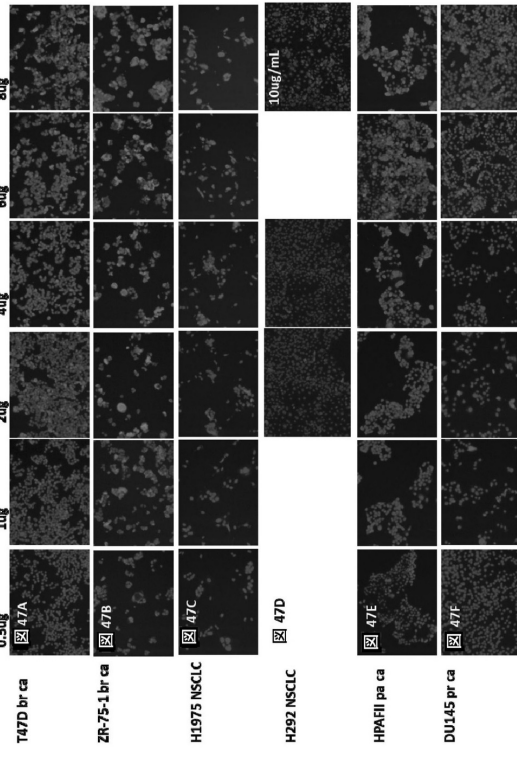


図 47A-47F

【 図 4 6 】

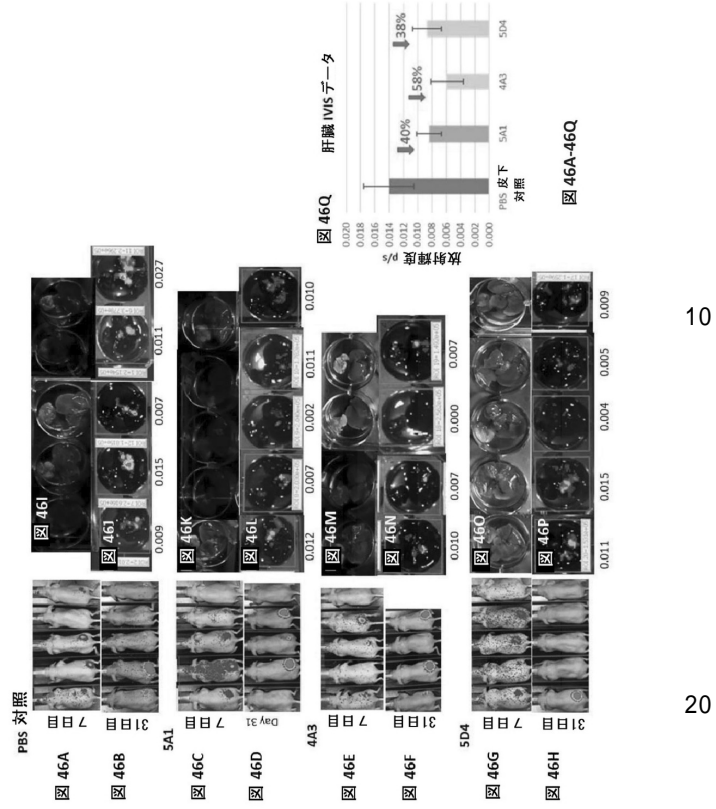


図 46A-46Q

10

20

【 図 4 8 】

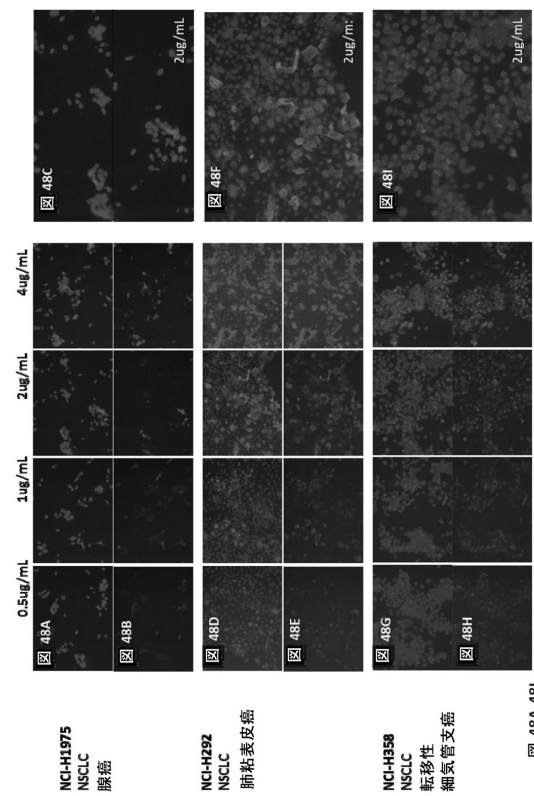


図 48A-48I

30

40

50

【 図 4 9 - 1 】

NME7_{AB}中での培養前後の種々の癌細胞株のPCR測定

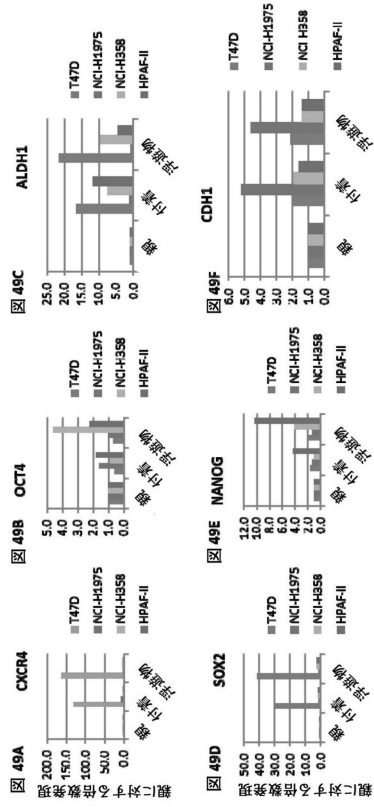


図 49A-49F

【 図 4 9 - 2 】

NME7_{AB}中での培養前後の種々の癌細胞株のPCR測定

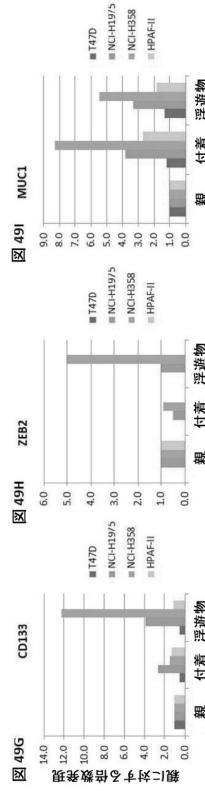


図 49G-49I

【 図 5 0 】

NME7_{AB}中で10日間培養されたNCI-H358肺癌細胞を尾静脈中に注入されたMSGマウスの6日目のIVIS写真

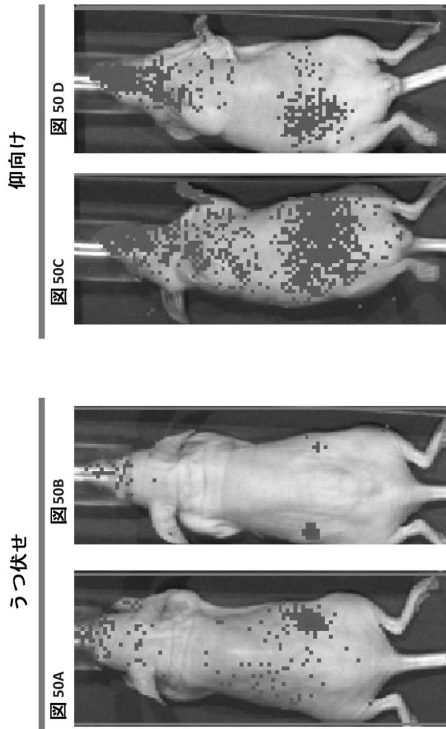


図 50

【 図 5 1 】

癌幹細胞マーカー一発現 - PC3

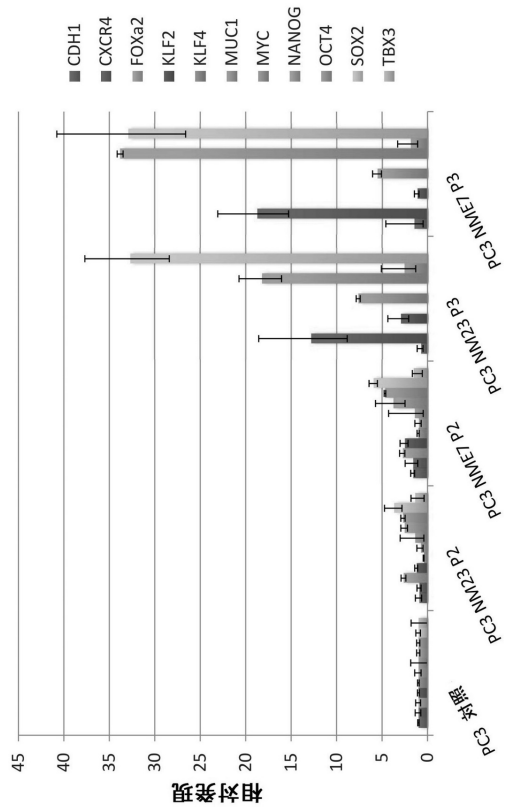


図 51

【配列表】

2023530039000001.app

10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/36500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC - INV. C07K 16/40, A61K 39/395; ADD. A61K 39/00, C07K 16/18 (2022.01)
 CPC - INV. A61K 39/00, C07K 16/28; ADD. A61K 2039/505, C07K 2317/30, C07K 2317/33, C07K 2317/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2019/0031779 A1 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 31 January 2019 (31.01.2019) para [0003]; [0090]-[0095]; SEQ ID NO: 145	1-5, 7-14, 18-20
A	US 2019/0389956 A1 (INSTITUTE OF BIOPHYSICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 26 December 2019 (26.12.2019) abstract; para [0262]; SEQ ID NO: 23	1-5, 7-14, 18-20
A	US 2020/0165354 A1 (WUXI BIOLOGICS IRELAND LIMITED) 28 May 2020 (28.05.2020) abstract; claim 6; SEQ ID NO: 38	1-5, 7-14, 18-20
A	WO 2019/104306 A1 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 31 May 2019 (31.05.2019) para [0009]-[0010]; [0407]; SEQ ID NO: 689	1-5, 7-14, 18-20
A,P	WO 2020/163325 A1 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 13 August 2020 (13.08.2020) full document	1-5, 7-14, 18-20
A,P	WO 2021/252551 A2 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 16 December 2021 (16.12.2021) full document	1-5, 7-14, 18-20

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 July 2022

Date of mailing of the international search report
AUG 03 2022

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer
Kari Rodriguez
Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/36500

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/36500

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 21-26, 43
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

--continued on extra sheet--

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-5, 7-14, 18-20, limited to 8F9A5A1 (SEQ ID NOs: 438-441, 443-446)

20

30

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/36500

--continued from Box III: unity of invention is lacking--

Group I+, claims 1-5, 7-20, directed to an NME7 specific antibody or fragment thereof, or an isolated hybridoma expressing the monoclonal antibody. The antibody, nucleic acid, and cell will be searched to the NME7 antibody encompasses 8F9A5A1, and the corresponding CDR sequences: VH CDR1-3 sequences SEQ ID NOs: 439-441, and VL CDR1-3 sequences SEQ ID NOs: 444-446, respectively. The first named invention was determined based on the first NME7 antibody CDR sequences in claim 14. This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-5, 7-14, 18-20, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the NME7 antibody encompasses 8F9A5A1, and corresponding CDR sequences SEQ ID NOs: 439-441, 444-446. Additional NME7 antibody(s) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected NME7 antibody(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be where the NME7 antibody encompasses 8F9A4A3, and the corresponding CDR sequences: VH CDR1-3 sequences SEQ ID NOs: 488-390, and VL CDR1-3 sequences SEQ ID NOs: 393-395, (claims 1-5, 7-13, 15, 18-20).

10

Group II, claims 6, 27-39, directed to an isolated nucleic acid encoding an anti-NME7 antibody, or a cell engineered to express the antibody (via expression of said nucleic acid).

Group III, claims 40-42, directed to an anti-cancer vaccine composition comprising one or more peptides derived from NME7AB.

Group IV, claims 44-45, directed to a method of generating cells (with enhanced metastatic potential) that produce anti-NME7AB antibodies.

Group V, claims 46-49, directed to a cell or a transgenic animal that expresses NME7AB or NME7-X1.

The inventions listed as Groups I+, II, III, IV, V do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

20

Special technical features

Group I+ has the special technical feature of a composition comprising or consisting of an isolated NME7 specific antibody or fragment thereof, or a hybridoma generated to express the antibody, that is not required by Groups II-V.

Group II has the special technical feature of a composition comprising or consisting of an isolated/engineered nucleic acid encoding a NME7 specific antibody, that is not required by Groups I+, III, IV, V.

Group III has the special technical feature of a composition comprising or consisting of an anti-cancer vaccine composition comprising one or more peptides derived from NME7AB (listed in Figures 6-9), that is not required by Groups I+, II, IV, V.

Group IV has the special technical feature of a method of generating cells (with enhanced metastatic potential) that produce anti-NME7AB antibodies, that is not required by Groups I+, II, III, V.

Group V has the special technical feature of a composition comprising or consisting of a cell or a transgenic animal that expresses NME7AB or NME7-X1, that is not required by Groups I+, II, III, IV.

The inventions of Group I+ each include the special technical features of a unique NME7 antibody, and is considered a distinct technical feature.

30

Common technical features

The inventions of Groups I+-V share the common technical feature of a NME7AB related peptide or antibody.

The inventions of Groups I+ and II further share the common technical feature of a cell comprising or producing a NME7AB specific antibody.

No technical features are shared between the NME7 antibody sequences of Group I+ and accordingly these groups lack unity a priori.

Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share the technical features of including: an NME7 specific antibody or fragment thereof that binds to the NME7 B3 peptide of SEQ ID NO:145 or SEQ ID NO:169; an isolated hybridoma expressing the monoclonal antibody; these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

The shared technical features are previously disclosed or made obvious by US 2019/0031779 A1 to Minerva Biotechnologies Corporation, (hereinafter "Minerva").

--continued on next sheet--

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 21/36500

--continued from previous sheet--

Minerva teaches an NME7AB specific antibody or fragment thereof that binds to the NME7 B3 peptide of SEQ ID NO:145 or SEQ ID NO:189 (para [0003] "The antibody may bind to NME7. The antibody may bind to NME7-AB...the antibody may be generated or selected for its ability to bind to a peptide selected from those listed in FIGS. 16-19 (SEQ ID NOS:88 to 145). Preferably, the peptide may be selected from those listed in FIG. 19 (SEQ ID NOS:141 to 145)"; [0090]-[0095] "The peptides used to generate these antibodies are common to both NME7-AB and NME7-X1, and are set forth as below...B3 is NME7B peptide 3 (B domain): AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF (SEQ ID NO:145)"; SEQ ID NO: 145 has 100% identity to claimed SEQ ID NO: 145). Though Minerva does not specifically teach an isolated hybridoma expressing the monoclonal antibody, Minerva does teach generation of monoclonal NME7 specific antibodies by injecting animals with antigens, and harvesting selected antibodies produced in response from the animals (para [0141]-[0144] "The antibody may be polyclonal, monoclonal, bispecific, bivalent, monovalent, single chain, scFv, or an antibody mimic that may be animal in origin, human-animal chimera, humanized or human. The antibody can be generated by inoculation or immunization with an NME7 species or fragment thereof or selected, for example from a library or a pool of antibodies, for their ability to bind to an NME7 species"). Since production of monoclonal antibodies using hybridoma technology was well known in the art of biology at the time, in order to generate large numbers of identical antibodies, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art to have used hybridomas to generate the antibodies taught by Minerva, in order to generate large numbers of identical NME7 antibodies with desired properties.

10

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Groups I+, II, III, IV, V inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

**NOTE, claim 5 is objected to for lack of antecedent basis. As drafted, claim 5 depends from claim 1, which fails to recite a "drug". For the purposes of this application, claim 5 is construed as though depending from claim 4.

**Continuation of number 4 above: claims 21-26, 43 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 39/00 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 0 1 K 67/027 (2006.01)
 C 0 7 K 16/40 (2006.01)
 C 1 2 N 5/12 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 G 0 1 N 33/574 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/00
 A 6 1 K 39/395
 A 0 1 K 67/027
 C 0 7 K 16/40
 C 1 2 N 5/12
 C 1 2 N 5/10
 G 0 1 N 33/574

テーマコード (参考)

H
 T

 A

(32)優先日 令和2年7月1日(2020.7.1)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

F ターム (参考)

4B065 AA90X AB01 AB04 BA01 CA24 CA25 CA44
 4C076 AA95 CC27 CC41 EE59
 4C085 AA03 AA14 AA21 BB01 BB11 BB41 EE01 GG02 GG04 KA04
 LL18
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA70 BA72 DA76 EA20 FA72 FA74