(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2007-501616
(P2007-501616A)
(43)公表日　平成19年2月1日(2007.2.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	4B063
C07K 16/32	(2006.01)	C07K	16/32		4B064
C12P 21/08	(2006.01)	C12P	21/08		4B065
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/00	B	4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 90 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2006-522760 (P2006-522760)
(86)(22)出願日　平成16年8月5日 (2004.8.5)
(85)翻訳文提出日　平成18年3月28日 (2006.3.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2004/025508
(87)国際公開番号　WO2005/013802
(87)国際公開日　平成17年2月17日 (2005.2.17)
(31)優先権主張番号　60/493,173
(32)優先日　平成15年8月7日 (2003.8.7)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/498,438
(32)優先日　平成15年8月28日 (2003.8.28)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　505418696
カイロン　コーポレイション
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４６０８－２９１６，　エミリービル，　ホートン　ストリート　４５６０，　エム／エス　アール３３８
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗癌治療のための標的としてのトレホイル因子３（ＴＦＦ３）

(57)【要約】
本発明は、癌（例えば、トレホイル（ｔｒｅｆｏｉｌ）因子３（ＴＦＦ３）の特異な発現（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）によって特徴づけられる癌）の治療および予防方法に関する。本発明の方法は、ＴＦＦ３の活性または発現を調節する薬剤を患者に投与する工程を包含する。本発明は、さらに、細胞の運動性またはアポトーシス耐性の阻害を含む、細胞中のＴＦＦ３発現の生理学的効果を減少に関する。ＴＦＦ３の発現または活性を調節することができるオリゴヌクレオチドおよび抗体もまた、提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌の処置または予防のための医薬の調製における、ＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項２】
前記ＴＦＦ３中和剤が核酸を含む、請求項１に記載の使用。
【請求項３】
前記癌が、乳癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、または胃癌である、請求項１および請求項２のいずれか１項に記載の使用。
【請求項４】
前記ＴＦＦ３が、前記癌の細胞中で特異的に発現される、請求項１～請求項３のいずれか１項に記載の使用。
【請求項５】
前記中和剤がアンチセンス分子を含む、請求項１に記載の使用。
【請求項６】
前記アンチセンス分子が、配列番号５～１９のいずれかの配列を含むか重複する、請求項５に記載の使用。
【請求項７】
前記中和剤がＲＮＡｉ分子を含む、請求項１に記載の使用。
【請求項８】
前記ＲＮＡｉ分子が、配列番号５～１９のいずれかに対応する配列を含むか重複する、請求項７に記載の使用。
【請求項９】
前記ＴＦＦ３中和剤が、ＴＦＦ３に特異的に結合する抗体を含む、請求項１に記載の使用。
【請求項１０】
前記癌が、結腸癌や前立腺癌でない、請求項１に記載の使用。
【請求項１１】
癌の処置または予防のための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、該薬物は従来の癌処置と組み合わせて使用される、使用。
【請求項１２】
前記従来の癌処置が化学治療である、請求項１１に記載の使用。
【請求項１３】
前記従来の癌処置がホルモンアブレーション治療である、請求項１１に記載の使用。
【請求項１４】
前記ホルモンがアンドロゲンである、請求項１３に記載の使用。
【請求項１５】
細胞におけるアポトーシスを調節するための医薬の調製における、ＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項１６】
前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項１５に記載の使用。
【請求項１７】
前記細胞が癌細胞である、請求項１５に記載の使用。
【請求項１８】
前記細胞が、胸部細胞、前立腺細胞、結腸細胞、卵巣細胞、または胃細胞である、請求項１５に記載の使用。
【請求項１９】
腫瘍成長の阻害または腫瘍体積の減少のための医薬の調製における、ＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項２０】
前記腫瘍が、ＴＦＦ３が特異的に発現される細胞を含む、請求項１９に記載の使用。

【請求項２１】
細胞中におけるＴＦＦ３の発現に関連する少なくとも１つの生理学的効果を調節するための医薬の調製における、ＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項２２】
前記生理学的効果が、細胞の運動性またはアポトーシス耐性の増加である、請求項２１に記載の使用。
【請求項２３】
細胞の移動、接着、または増殖を阻害するための医薬の調製における、ＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項２４】
癌細胞の浸潤を減少するための医薬の調製における、ＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項２５】
細胞におけるＴＦＦ３発現を調節するための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用。
【請求項２６】
生物学的サンプル中のＴＦＦ３を検出する方法であって、該方法は、該サンプルをＴＦＦ中和剤に接触させる工程、および該サンプル中の該中和剤とＴＦＦ３との間の結合を検出する工程を包含する、方法。
【請求項２７】
生物学的サンプル中の癌の存在を検出する方法であって、該方法は、該生物学的サンプルをＴＦＦ中和剤に接触させる工程および該生物学的サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現の証拠を検出する工程を包含し、ここで、ＴＦＦ３の特異な発現の証拠が癌の存在の指標となる、方法。
【請求項２８】
前記検出が、前記接触の結果とコントロールとを比較する工程を包含する、請求項２７に記載の方法。
【請求項２９】
ＴＦＦ３中和剤に対する患者の感受性を決定する方法であって、該方法は、該患者の癌サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現の証拠を検出する工程を包含し、ここで、ＴＦＦ３の特異な発現の証拠が、該ＴＦＦ３中和剤に対する患者の感受性の指標となる、方法。
【請求項３０】
前記ＴＦＦ３の特異な発現の証拠が、前記患者の癌サンプル中のＴＦＦ３の上方制御である、請求項２８に記載の方法。
【請求項３１】
前記患者の癌サンプルが、乳房組織、前立腺組織、結腸組織、卵巣組織、または胃組織に由来する、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
患者における癌の進行を評価する方法であって、該方法は、第１の時点での患者におけるＴＦＦ３発現を第２の時点でのＴＦＦ３発現と比較する工程を包含し、ここで、該第１の時点に対する該第２の時点でのＴＦＦ３発現の増加が、該癌の進行の指標となる、方法。
【請求項３３】
前記ＴＦＦ３発現の増加が、少なくとも約２５％の発現の増加である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
患者における癌の転移リスクの増加を検出する方法であって、該方法は、第１の時点での該患者のＴＦＦ３発現を第２の時点でのＴＦＦ３発現と比較する工程を包含し、ここで、該第１の時点に対する該第２の時点でのＴＦＦ３発現の増加が、該転移リスクの増加の指標となる、方法。
【請求項３５】
前記ＴＦＦ３中和剤が検出可能な標識を含む、請求項１～請求項３４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３６】
前記ＴＦＦ３中和剤が放射性標識を含む、請求項１～請求項３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記ＴＦＦ３中和剤が、抗体、核酸、アンチセンス分子、またはＲＮＡｉ分子を含む、請求項１１～請求項３６のいずれか１項に記載の使用。
【請求項３８】
ＴＦＦ３の発現を調節する、アンチセンス分子。
【請求項３９】
前記アンチセンス分子が、配列番号５～１９のいずれかの配列を含むか重複する、請求項３８に記載のアンチセンス分子。
【請求項４０】
配列番号５～１９のいずれかを含む、請求項３８に記載のアンチセンス分子。
【請求項４１】
ＴＦＦ３発現を調節する、ＲＮＡｉ分子。
【請求項４２】
前記ＲＮＡｉ分子が配列番号５～１９のいずれかの配列を含むか重複する、請求項４１に記載のＲＮＡｉ分子。
【請求項４３】
請求項３８に記載のアンチセンス分子および薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。
【請求項４４】
請求項４３に記載のＲＮＡｉ分子および薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。
【請求項４５】
単離された抗ＴＦＦ３抗体であって、該抗体が、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域を認識する、抗体。
【請求項４６】
請求項４５に記載の抗体であって、該抗体が、以下の工程：
ａ）ファージ上で抗体のライブラリーを合成する工程、
ｂ）該ファージと配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域を含む組成物と接触させることによって、前記ライブラリーをサンプルに対してパニングする工程、
ｃ）該組成物に結合するファージを単離する工程であって、該抗体が、少なくとも$10^8$１／の結合親和性で配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域に結合する能力によって特徴づけられる、工程、および
ｄ）配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域が結合するアミノ酸配列をコードする配列を決定するために、単離された該ファージを分析する工程、
を包含するプロセスによって産生される、抗体。
【請求項４７】
前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項４５に記載の抗体。
【請求項４８】
前記抗体がポリクローナル抗体である、請求項４５に記載の抗体。
【請求項４９】
前記抗体がキメラ抗体である、請求項４５に記載の抗体。

【請求項５０】
前記抗体がヒト化抗体である、請求項４５に記載の抗体。
【請求項５１】
前記抗体が単鎖抗体である、請求項４５に記載の抗体。
【請求項５２】
前記抗体がＦａｂフラグメントである、請求項４５に記載の抗体。
【請求項５３】
前記抗体が標識されている、請求項４５に記載の抗体。
【請求項５４】
前記標識が、酵素、放射性同位体、またはフルオロフォアである、請求項５３に記載の抗体。
【請求項５５】
前記抗体の結合親和性が、ＴＦＦ３以外のポリペプチドに対して約1×10^{5} Ｋａ未満である、請求項４５に記載の抗体。
【請求項５６】
請求項４５に記載の抗体を産生する、単離された細胞。
【請求項５７】
請求項４５に記載の抗体を産生する、ハイブリドーマ。
【請求項５８】
請求項４５に記載の抗ＴＦＦ３抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。
【請求項５９】
癌の処置または予防のための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、ここで、該中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項６０】
癌の処置または予防のための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、該医薬が、従来の癌処置と組み合わせて使用され、ここで、該ＴＦＦ３中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項６１】
前記従来の癌処置が化学治療である、請求項６０に記載の使用。
【請求項６２】
前記従来の癌処置がホルモンアブレーション治療である、請求項６０に記載の使用。
【請求項６３】
前記ホルモンがアンドロゲンである、請求項６２に記載の使用。
【請求項６４】
アポトーシスを誘導するための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、ここで、該中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項６５】
前記細胞が哺乳動物細胞である、請求項６４に記載の使用。
【請求項６６】
前記細胞が癌細胞である、請求項６４に記載の使用。
【請求項６７】
腫瘍体積の減少、腫瘍成長の防止または腫瘍成長の阻害のための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、該ＴＦＦ３中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項６８】
前記腫瘍が、ＴＦＦ３が特異的に発現される細胞を含む、請求項６７に記載の使用。
【請求項６９】
細胞におけるＴＦＦ３の発現に関連する少なくとも１つの生理学的効果を調節するための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、ここで、該ＴＦＦ３中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項７０】

前記生理学的効果が、細胞の運動性またはアポトーシス耐性の増加である、請求項６９に記載の使用。
【請求項７１】
細胞の移動、接着、または増殖を阻害するための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、ここで、該ＴＦＦ３中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項７２】
癌の浸潤を減少するための医薬の調製におけるＴＦＦ３中和剤の使用であって、該ＴＦＦ３中和剤が請求項４５に記載の抗体である、使用。
【請求項７３】
生物学的サンプル中のＴＦＦ３の検出方法であって、該方法は、該サンプルを請求項４５に記載の抗体に接触させる工程、および該サンプル中の該中和剤とＴＦＦ３との間の結合を検出する工程を包含する、方法。
【請求項７４】
前記ＴＦＦ３中和剤が検出可能な標識を含む、請求項７３に記載の方法。
【請求項７５】
生物学的サンプル中の癌の存在の検出方法であって、該方法は、該サンプルを請求項４５に記載の抗体に接触させる工程、および該生物学的サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現の証拠を検出する工程を包含し、ここで、該ＴＦＦ３の特異な発現の証拠が癌の存在の指標となる、方法。
【請求項７６】
前記検出が、前記接触の結果とコントロールとを比較する工程を包含する、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
前記ＴＦＦ３中和剤が検出可能な標識を含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項７８】
配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８から選択される３つまたはそれ未満のアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項７９】
前記ポリペプチドが、約８アミノ酸長～約８０アミノ酸長である、請求項７８に記載のペプチド。
【請求項８０】
前記ポリペプチドが抗ＴＦＦ３抗体に特異的に結合する、請求項７８に記載のペプチド。
【請求項８１】
サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現を検出するための抗体の使用方法であって、該方法は、以下：
ａ）抗体：ＴＦＦ３複合体を形成可能な条件下で、請求項４５に記載の抗体を該サンプルと組み合わせる工程、
ｂ）該複合体の量を測定する工程、および
ｃ）該複合体の量をコントロールと比較する工程であって、ここで、該サンプル中の複合体レベルの上昇がＴＦＦ３の特異な発現を示す、工程
を包含する、方法。
【請求項８２】
配列番号１～４のポリペプチドの、単離されたエピトープ保有フラグメント。
【請求項８３】
配列番号１～４の約６個と約２０個との間の連続アミノ酸からなる、請求項８２に記載のエピトープ保有フラグメント。
【請求項８４】
配列番号１～４の約１０個の連続アミノ酸からなる、請求項８３に記載のエピトープ保有フラグメント。

【請求項８５】
配列番号２の約６個と約２０個との間の連続アミノ酸からなる、請求項８２に記載のエピトープ保有フラグメント。
【請求項８６】
配列番号２の約１０個の連続アミノ酸からなる、請求項８３に記載のエピトープ保有フラグメント。
【請求項８７】
配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８を含む、請求項８３に記載のエピトープ保有フラグメント。
【請求項８８】
請求項８３に記載のエピトープ保有フラグメントでの、被験体の免疫化によって得られる、単離された抗ＴＦＦ３抗体。
【請求項８９】
請求項４５に記載の抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む、薬学的組成物。
【請求項９０】
前記抗体がＴＦＦ３を中和する、請求項８９に記載の薬学的組成物。
【請求項９１】
癌処置のための抗体の生成方法であって、該方法は、ＴＦＦ３に結合し、かつＴＦＦ３を中和する抗体を同定する工程、および組換え発現宿主細胞において該抗体を発現させる工程を包含する、方法。
【請求項９２】
ＴＦＦ３に結合し、かつＴＦＦ３を中和する抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む薬学的組成物であって、ここで、該抗体は、組換え宿主細胞を使用して生成される、薬学的組成物。
【請求項９３】
前記組換え宿主細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞、骨髄腫細胞、および細菌宿主細胞からなる群から選択される、請求項９２に記載の薬学的組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、米国仮出願第６０／４９３，１７３号（２００３年８月７日出願）および米国仮出願第６０／４９８，４３８号（２００３年８月２８日出願）（それぞれ、その全体が参照として本明細書中に援用される）の優先権を主張する。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、一部、トレホイル（ｔｒｅｆｏｉｌ）因子３（ＴＦＦ３）の活性または発現を調節する薬剤に関する。本発明は、さらに、癌の処置、防止、または検出におけるこれらの薬剤の使用に関する。
【背景技術】
【０００３】
（発明の背景）
トレホイル因子３（ＴＦＦ３；腸トレホイル因子（ＩＴＦ）；またはヒト腸トレホイル因子）は、通常は腸杯細胞で産生されて腸管腔に分泌されるプロテアーゼ耐性ペプチドである（非特許文献１）。ＴＦＦ３は、損傷後の上皮の回復で役割を果たし（非特許文献２および非特許文献３）、以下のいくつかの機構を介してこれを達成すると考えられている：１）アポトーシスからの上皮細胞の防御（非特許文献４）；２）境界細胞（ｂｏｒｄｅｒｉｎｇ　ｃｅｌｌ）の創傷への移動および被覆の誘導（非特許文献５）；および３）創傷を介した上皮細胞へのアクセスを増大させる血清補体系成分の沈着の遮断（非特許文献

６）。ノックアウトマウスは、その腸が損傷しない限り表現型は正常であり、この場合、ノックアウトマウスは創傷治癒の失敗によって死亡する。過敏性腸管症候群および他の腸疾患に関連する治療法で使用する組換えＴＦＦ３が提案されている（例えば、特許文献１、特許文献２および特許文献３を参照のこと）。現在、ＴＦＦ３受容体は知られていない。

【０００４】

腸管細胞におけるＴＦＦ３の生理学的効果は、癌細胞の成長、増殖、および転移に対して有利であると見なすことができる。例えば、　アポトーシスに対する耐性、移動の誘導、および補体活性化からの防御は、癌細胞が成長の制御を回避し、周囲の正常組織に侵入し、そして転移するか、免疫系の監視を回避する機構であると考えられている。臨床的追跡データにより、ＴＦＦ３の発現が胃癌の不十分な予後と相関し得ることが示唆されている（非特許文献７）。

【０００５】

癌の診断および治療の標的として有用である他のタンパク質およびタンパク質をコードする核酸が報告されている（例えば、特許文献４、特許文献５、特許文献６、特許文献７および特許文献８を参照のこと）。本明細書中に記載の組成物および方法は、癌および関連疾患のための新規且つより有効な治療のための現在の要求を満たすのに役立つ。

【特許文献１】米国特許第６，０６３，７５５号明細書
【特許文献２】米国特許第６，３１６，２１８号明細書
【特許文献３】米国特許出願公開第２００１／００５２４８３号明細書
【特許文献４】米国特許第６，２６１，５６２号明細書
【特許文献５】米国特許第６，３３７，１９５号明細書
【特許文献６】米国特許第６，４６５，６１１号明細書
【特許文献７】米国特許第６，４７６，２０７号明細書
【特許文献８】米国特許出願公開第２００２／０１９２６９９号明細書
【非特許文献１】Ｔｈｉｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９５，３４，４７５７
【非特許文献２】Ｍａｓｈｉｍｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９６，２７４，２６２
【非特許文献３】Ｗｏｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９９５，３４，４７５７
【非特許文献４】Ｔａｕｐｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，２０００，９７，７９９
【非特許文献５】Ｄｉｇｎａｓｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．，１９９４，９４，３７６
【非特許文献６】Ａｎｄｏｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．，２００１，１６７，３８８７
【非特許文献７】Ｙａｍａｃｈｉｋａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，２００２，８，１０９２

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【０００６】

（発明の要旨）

本発明は、癌を罹患しているか素因を有する哺乳動物に治療有効量のＴＦＦ３中和剤を投与する工程と、前記ＴＦＦ３中和剤がアンチセンス分子、ＲＮＡｉ分子、リボザイム、または低分子であることとを含む、癌の処置または防止方法を提供する。

【０００７】

いくつかの実施形態では、癌は、乳癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、または胃癌である。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３は、癌細胞中で特異的に（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ）発現される。

【０００８】
いくつかの実施形態では、中和剤は、配列番号５～１９のいずれかに対応する配列を含むか重複するアンチセンス分子である。いくつかの実施形態では、中和剤は、配列番号５～１９のいずれかに対応する配列を含むか重複するＲＮＡｉ分子である。いくつかの実施形態では、中和剤は、ＴＦＦ３に特異的に結合する抗体である。
【０００９】
本発明はまた、癌を罹患しているか素因を有する哺乳動物に治療有効量のＴＦＦ３中和剤を投与する工程と、前記哺乳動物に伝統的癌処置を提供する工程とを含む、癌の処置方法を提供する。いくつかの実施形態では、伝統的癌処置は化学治療である。いくつかの実施形態では、伝統的癌処置はホルモンアブレーション治療である。いくつかの実施形態では、ホルモンはアンドロゲンである。
【００１０】
本発明は、さらに、細胞をＴＦＦ３中和剤に接触させる工程を含む、細胞中のアポトーシスの誘導方法を提供する。いくつかの実施形態では、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、乳癌細胞、前立腺癌細胞、結腸癌細胞、卵巣癌細胞、または胃癌細胞である。
【００１１】
さらなる実施形態では、本発明は、腫瘍をＴＦＦ３中和剤に接触させる工程を含む、腫瘍体積の減少方法、腫瘍成長の遅延方法、または腫瘍成長の防止方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、ＴＦＦ３が特異的に発現される細胞を含む。
【００１２】
本発明は、細胞をＴＦＦ３中和剤に接触させる工程を含む、細胞中のＴＦＦ３の発現に関連する少なくとも１つの生理学的効果を調節する方法を提供する。いくつかの実施形態では、生理学的効果は、細胞の運動性またはアポトーシス耐性の増加である。
【００１３】
本発明はまた、細胞をＴＦＦ３中和剤に接触させる工程を含む、細胞の移動、接着、または増殖の阻害方法を提供する。
【００１４】
いくつかの実施形態では、細胞をＴＦＦ３中和剤に接触させる工程を含む、癌細胞の浸潤の減少方法を提供する。
【００１５】
本発明は、さらに、細胞をＴＦＦ３中和剤に接触させる工程を含む、細胞中のＴＦＦ３発現の調節方法を提供する。
【００１６】
さらなる実施形態では、本発明は、サンプルをＴＦＦ３中和剤に接触させる工程と、前記サンプル中の前記中和剤とＴＦＦ３との間の結合を検出する工程とを含む、生物学的サンプル中のＴＦＦ３の検出方法を提供する。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３中和剤は検出可能な標識を含む。
【００１７】
また、本発明は、生物学的サンプルをＴＦＦ３中和剤に接触させる工程と、前記生物学的サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）の証拠を検出する工程を含む、生物学的サンプル中の癌の存在の検出方法を提供する。ＴＦＦ３の特異な発現の証拠は、癌の存在の指標となる。
【００１８】
いくつかの実施形態では、「検出する工程」は、接触の結果とコントロールとを比較することを含む。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３中和剤は、検出可能な標識を含む。
【００１９】
本発明はまた、患者の癌サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現の証拠を検出する工程を含む、ＴＦＦ３中和剤に対する患者の感受性を決定する方法を提供する。ＴＦＦ３の特異な発現の証拠は、ＴＦＦ３中和剤に対する患者の感受性の指標となる。いくつかの実施形態

では、ＴＦＦ３の特異な発現の証拠は、患者の癌サンプル中のＴＦＦ３の下方制御である。いくつかの実施形態では、患者の癌サンプルは、乳房組織、前立腺組織、結腸組織、卵巣組織、または胃組織である。

【００２０】

いくつかの実施形態では、第１の時点での患者におけるＴＦＦ３発現を第２の時点でのＴＦＦ３発現と比較する工程を含む、患者の癌の進行を評価する方法を提供する。第１の時点と比較した前記第２の時点でのＴＦＦ３発現の増加は、癌の進行の指標となる。いくつかの実施形態では、「ＴＦＦ３発現の増加」は、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、または少なくとも約９０％の発現の増加である。

【００２１】

本発明はまた、第１の時点での患者のＴＦＦ３発現を第２の時点でのＴＦＦ３発現と比較する工程を含む、患者の癌の転移リスクの増加を検出する方法を提供する。第１の時点と比較した第２の時点でのＴＦＦ３発現の増加は、転移リスクの増加の指標となる。

【００２２】

本発明はまた、ＴＦＦ３の発現を調節するアンチセンス分子を提供する。いくつかの実施形態では、アンチセンス分子は、配列番号５～１９の配列を含むか重複する。いくつかの実施形態では、アンチセンス分子は、配列番号５～１９のいずれかを含む。

【００２３】

本発明はまた、ＴＦＦ３発現を調節するＲＮＡｉ分子を提供する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子は、配列番号５～１９の配列を含むか重複する。いくつかの実施形態では、ＲＮＡｉ分子は、配列番号５～１９のいずれかを含む。

【００２４】

本発明はまた、アンチセンス分子および／またはＲＮＡｉ分子ならびに薬学的に許容可能なキャリアを含む組成物を提供する。

【００２５】

本発明はまた、抗体が配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域を認識する、単離抗ＴＦＦ３抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、

ａ）ファージ上で抗体ライブラリーを合成する工程と、

ｂ）前記ファージと配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域を含む組成物との接触によって、前記ライブラリーをサンプルに対してパニングする工程と、

ｃ）前記組成物に結合するファージを単離する工程と、前記抗体を、少なくとも$10^8$１／の結合親和性で配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域に結合する能力によって特徴づけることと、

ｄ）配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８に対応するＴＦＦ３配列の少なくとも１つの領域が結合するアミノ酸配列をコードする配列を決定するために単離した前記ファージを分析する工程と、

を含むプロセスによって産生される。

【００２６】

いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体、またはＦａｂフラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体は標識されている。いくつかの実施形態では、標識は、酵素、放射性同位体、またはフルオロフォアである。いくつかの実施形態では、抗体の結合親和性は、ＴＦＦ３以外のポリペプチドに対して約1×10^5 Ｋａ未満である。

【００２７】

本発明は、さらに、本発明の抗体を産生する単離細胞およびハイブリドーマを提供する。

【００２８】

本発明はまた、配列番号１３、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、または２８から選択される３つまたはそれ未満のアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは、約８アミノ酸長から約８０アミノ酸長までである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは抗ＴＦＦ３抗体に特異的に結合する。

【００２９】

本発明はまた、抗体：ＴＦＦ３複合体を形成する条件下で、本発明の抗体をサンプルと組み合わせる工程と、前記複合体の量を測定する工程と、前記複合体の量をコントロールと比較する工程とを含む、サンプル中のＴＦＦ３の特異な発現を検出ための抗体の使用方法を提供する。サンプル中の複合体レベルの上昇はＴＦＦ３の特異な発現を示す。

【００３０】

本発明はまた、配列番号１～４のポリペプチドの単離エピトープ保有フラグメントを提供する。いくつかの実施形態では、フラグメントは、配列番号１～４の約６個と約２０個との間の連続アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、フラグメントは、配列番号１～４の約１０個の連続アミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは配列番号２である。いくつかの実施形態では、フラグメントは、配列番号２０、配列番号２１、配列番号２２、配列番号２３、配列番号２４、配列番号２５、配列番号２６、配列番号２７、または配列番号２８を含む。

【００３１】

また、本発明は、本発明のエピトープ保有フラグメントでの被験体の免疫化によって得られる単離抗ＴＦＦ３抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、１つまたは複数の薬学的に許容可能なキャリアを含む薬学的組成物中の単離抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、ＴＦＦ３を中和する。

【００３２】

本発明はまた、ＴＦＦ３に結合して中和する抗体を同定する工程と、組換え発現宿主細胞中で前記抗体を発現する工程とを含む、癌処置のための抗体の生成方法を提供する。

【００３３】

さらに、組換え宿主細胞を使用して抗体が生成される、ＴＦＦ３に結合して中和する抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む薬学的組成物を提供する。いくつかの実施形態では、換え宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞、骨髄腫細胞、および細菌宿主細胞からなる群から選択される。

【発明を実施するための最良の形態】

【００３４】

（実施形態の詳細な説明）

本発明は、特に、ＴＦＦ３中和剤、ならびにこれらの薬剤を使用した癌の防止方法、治療方法、および検出方法を提供する。ＴＦＦ３ポリペプチドを、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、胃癌、および結腸癌などに関連する多数の癌組織および癌細胞株で（例えば、タンパク質またはｍＲＮＡレベルで）特異的に発現することができる。本明細書中で例示するように、ＴＦＦ３発現のノックダウン（オリゴヌクレオチドベースの技術などの使用による）により、細胞傷害性および足場依存性成長の阻害を引き起こし得る。したがって、適切な中和剤を使用した細胞におけるＴＦＦ３ポリペプチド活性の阻害またはＴＦＦ３ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド発現のノックアウトは、例えば、ＴＦＦ３の発現によって特徴づけられる癌の予防または治療に役立ち得る。いくつかの実施形態では、癌細胞は、ＴＦＦ３を特異的に発現することができる（例えば、ＴＦＦ３の上方制御または下方制御を示す）。

【００３５】

本明細書中で使用される、句「特異的に発現される」は、一般に、癌細胞中でより高い

レベルまたはより低いレベルで発現するポリペプチドまたはポリヌクレオチドをいい、例えば、ｍＲＮＡは、癌細胞ではない同一の細胞型の細胞（正常細胞）と比較した場合、癌細胞中で、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％～約７５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約１．５倍、少なくとも約２倍、少なくとも約５倍、少なくとも約１０倍、または少なくとも約５０倍またはそれ以上異なる（例えば、より高いまたはより低い）。例えば、一方がｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成または組織中の細胞型間の幾らか区別す別のアッセイ方法を使用する場合、２つの組織を比較することができる。その組織供給源から取り出した細胞を比較することもできる。ＴＦＦ３は、結腸癌、乳癌、前立腺癌、および他の癌で特異的に発現されることが示されている遺伝子である。いくつかの実施形態では、通常の発現よりも高い特異な発現が認められる。特定の細胞で特異的に発現されるポリペプチドおよびポリヌクレオチドの決定方法は、米国特許公開公報２００２０１９２６９９号および米国特許第６，４７６，２０７号にさらに記載されている。癌性前立腺細胞中で特異的に発現された遺伝子産物は、米国特許出願番号１０／３１０，６７３号に記載されている。

【００３６】

本明細書中で使用される、用語「約」は、値の＋／－１０％をいう。

【００３７】

（ＴＦＦ３ポリペプチド）

本明細書中で使用される、「ＴＦＦ３」または「ＴＦＦ３ポリペプチド」は、ヒトトレホイル因子３と実質的に相同なタンパク質（ポリペプチド）またはそのフラグメント（配列番号１～４、ＧｅｎＢａｎｋ　ｇｉ：４５０７４５３、Ｑ０７６５４、ＮＰ＿００３２１７、ＡＡＨ１７８５９、ＢＡＡ９５５３１、ＢＡＢ１３７３１）をいう。本発明によって意図されるポリペプチドには、開示のＴＦＦ３ポリヌクレオチド（配列番号５～８、ＧｅｎＢａｎｋ　ｇｉ：４５０７４５２、ＢＣ０１７８５９、ＡＦ４３２２６５）によってコードされるポリペプチドならびに遺伝コードの縮重によって開示のＴＦＦ３ポリヌクレオチドと配列場同一ではない核酸が含まれる。したがって、本発明は、本明細書中で提供したポリヌクレオチド配列の任意の１つの配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたはその改変体はその範囲内に含まれる。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３は、配列番号１～４のアミノ酸配列を含む。いくつかの好ましい実施形態では、ＴＦＦ３は、配列番号２のアミノ酸配列を含む。

【００３８】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸の重合形態をいい、コードアミノ酸および非コードアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導されたアミノ酸、ならびに修飾ペプチド骨格を有するポリペプチドが含まれ得る。この用語には、融合タンパク質（異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、Ｎ末端メチオニン残基を有するか有さない異種リーダー配列と相同リーダー配列との融合物が含まれるが、これらに限定されない）および免疫学的にタグ化されたタンパク質などが含まれる。この用語には、２アミノ酸長から３０アミノ酸長までのポリペプチドである「ペプチド」も含まれる。ポリペプチドは、引用されたポリヌクレオチド（ＴＦＦ３ポリヌクレオチド）によってコードされた全長ポリペプチドおよび引用されたポリヌクレオチドによって示される遺伝子によってコードされるポリペプチドの両方、ならびのその一部またはフラグメントをいうことができる。

【００３９】

「ポリペプチド」には、天然に存在するタンパク質の改変体も含まれ、このような改変体は、天然に存在するタンパク質と同一または異なる種の供給源（例えば、引用されたポリペプチドを天然に発現するヒト、マウス、またはいくつかの他の種、通常、哺乳動物種）に由来し得る。一般に、変異ＴＦＦ３ポリペプチドは、例えば、デフォルトパラメーターを使用したＢＬＡＳＴによって測定することができる、本明細書中に記載される特異的に発現されるポリペプチドと少なくとも８０％、通常では少なくとも約９０％、より通常では少なくとも約９５％またはそれ以上（すなわち、９６％、９７％、９８％、または９

９％）の配列が同一な配列を有する。変異ポリペプチドを、天然または非天然にグリコシル化することができる（すなわち、ポリペプチドは、対応する天然に存在するタンパク質中で見出されるグリコシル化パターンと異なるグリコシル化パターンを有する）。

【００４０】

本発明はまた、ＴＦＦ３ポリペプチド（またはそのフラグメント）を含み、ホモログが他の種から単離された場合、天然に存在するグリコシル化ＴＦＦ３には、異なグリコシル化パターンを示し得る正常細胞および新生物細胞（すなわち、他の動物種または植物種（このようなホモログである場合、通常は哺乳動物種（例えば、マウス、ラットなどのげっ歯類；家畜（例えば、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ）；およびヒト））によって産生されたグリコシル化ＴＦＦ３が含まれる。「ホモログ」は、例えば、デフォルトパラメーターを使用したＢＬＡＳＴアルゴリズムを使用して配列同一性を決定した場合、上記で同定した特定のタンパク質と少なくとも約３５％、通常では少なくとも約４０％、より通常では少なくとも約６０％のアミノ酸が同一なポリペプチドを意味する。

【００４１】

一般に、天然に存在しない環境下（例えば、その天然に存在する環境から単離された状態）で本発明のＴＦＦ３ポリペプチドを提供する。特定の実施形態では、本発明のタンパク質は、コントロールと比較してタンパク質が富化されている組成物中に存在する。したがって、精製ポリペプチドを提供し、それにより、「精製された」は、タンパク質が他のポリペプチドを実質的に含まない組成物中に存在することを意味し、それにより、「実質的に含まない」は、組成物の約９０％未満、通常は約６０％未満、より通常では５０％未満が他のポリペプチドで構成されていることを意味する。

【００４２】

改変体も本発明の範囲内であり、ポリペプチドの改変体には、変異体、フラグメント、および融合物が含まれる。変異体には、アミノ酸の置換物、付加物、または欠失物が含まれ得る。アミノ酸置換物は、保存的アミノ酸置換物または非必須アミノ酸を排除するため（グルコシル化部位、リン酸化部位、またはアセチル化部位を変化させるためなど）もしくは機能に必要ない１つまたは複数のシステイン残基の置換または欠失による誤折りたたみを最小にするための置換物であり得る。保存的アミノ酸置換物は、置換されたアミノ酸の全体的な電荷、疎水性／親水性、および／または立体構造のかさが保存された置換物である。タンパク質の特定の領域（例えば、ポリペプチドがタンパク質ファミリーのメンバーである機能的ドメインおよび／またはコンセンサス配列に関連する領域）の生物活性を保持するか増強された生物活性を有するように改変体をデザインすることができる。改変体産生のためのアミノ酸の変化の選択は、アミノ酸の到達性（ａｃｃｅｓｓｉｂｉｌｉｔｙ）（内部対外部）（例えば、Ｇｏ ｅｔ ａｌ，Ｉｎｔ．Ｊ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｒｅｓ．（１９８０）１５：２１１を参照のこと）、変異ポリペプチドの熱安定性（例えば、Ｑｕｅｒｏｌ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．（１９９６）９：２６５（その全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）、所望のグリコシル化部位（例えば、Ｏｌｓｅｎ ａｎｄ Ｔｈｏｍｓｅｎ，Ｊ Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（１９９１）１３７：５７９を参照のこと）、所望のジスルフィド架橋（たとえば、Ｃｌａｒｋ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９３）３２：４３２２；ａｎｄ Ｗａｋａｒｃｈｕｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．（１９９４）７：１３７９を参照のこと）、所望の金属結合部位（たとえば、Ｔｏｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ（１９９１）３０：９７，ａｎｄ Ｈａｅｚｅｒｂｒｏｕｃｋ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．（１９９３）６：６４３を参照のこと）、およびプロリンチューブ内の所望の置換基（例えば、Ｍａｓｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ａｐｐｌ．Ｅｎｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．（１９９４）６０：３５７９（その全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）に基づき得る。システイン枯渇ムテインを、米国特許第４，９５９，３１４号（その全体が本明細書中で参考として援用される）に開示のように産生することができる。

【００４３】

改変体には、本明細書中に開示のポリペプチドのフラグメント、特に、生物活性フラグメントおよび／または機能的ドメインに対応するフラグメントも含まれ得る。目的のフラグメントは、典型的には、少なくとも約１０アミノ酸長～少なくとも約１５アミノ酸長、少なくとも約５０アミノ酸長であり、３００アミノ酸長またはそれ以上もの長さであり得るが、いくつかの実施形態では、約１０００アミノ酸長を超えず、フラグメントが本明細書中に提供したポリヌクレオチドの任意の１つの配列を有するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドまたはそのホモログと同一のアミノ酸長を有する。本明細書中に記載のタンパク質改変体は、本発明の範囲内であるポリヌクレオチドによってコードされる。遺伝コードを使用して、対応する改変体を構築するための適切なコドンを選択することができる。特に、フラグメントには、ＴＦＦ３タンパク質の特異的ドメインまたはエピトープを含むフラグメントが含まれる。

【００４４】

（ＴＦＦ３ポリヌクレオチド）

いくつかの実施形態では、本発明は、いくつかの癌（例えば、前立腺癌、乳癌、卵巣癌、または結腸癌など）で特異的に発現されるＴＦＦ３をコードするＴＦＦ３ポリヌクレオチドの阻害または検出に関する。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３は、配列番号５～８のヌクレオチド配列を含む核酸によってコードされる。いくつかの好ましい実施形態では、ＴＦＦ３は、配列番号７のヌクレオチド配列を有する核酸によってコードされる。

【００４５】

本明細書中に記載の方法で有用なポリヌクレオチド組成物に関する本発明の範囲には、本明細書中に記載のポリヌクレオチド配列の任意の１つに記載の配列を有するポリヌクレオチド（配列番号２）；ストリンジェントな条件下（特に、高ストリンジェンシー条件下）でのハイブリッド形成によって本明細書中に記載の生体物質または生物供給源（特に、ヒト供給源）から得たポリヌクレオチド；提供されたポリヌクレオチドに対応する遺伝子；提供されたポリヌクレオチドの改変体およびその対応する遺伝子、特に、コードされた遺伝子産物の生物活性（例えば、遺伝子産物のタンパク質ファミリーへの割り当ておよび／または遺伝子産物中に存在する機能的ドメインの同定の結果として提供されたポリヌクレオチドに対応する遺伝子産物に帰する生物活性）を保持した改変体が含まれるが、これらに限定されない。本発明によって意図され、且つ本発明の範囲内にある他の核酸組成物は、本明細書中で開示されている場合、当業者に容易に自明である。組成物の核酸に関して本明細書中で使用される、「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、特に示されない限り、核酸の長さまたは構造に制限されることを意図しない。

【００４６】

ＴＦＦ３ポリヌクレオチドを、ヒトの前立腺組織、乳房組織、および結腸組織などのヒト癌組織で発現することができる。特に目的とされる本明細書中に記載の核酸組成物は、本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列またはその同定配列の任意の１つに記載の配列を含む。「同定配列」は、ポリヌクレオチド配列を固有に同定する（例えば、約２０ｎｔを超える任意の連続ヌクレオチド配列に対して９０％未満、通常約８０％未満～約８５％の配列同一性を示す）少なくとも１０ｎｔ長～約２０ｎｔ長、通常は少なくとも約５０ｎｔ長～約１００ｎｔ長の残基の連続配列である。したがって、本発明の核酸組成物には、本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列の任意の１つ由来の連続ヌクレオチドの同定配列を含む全長ｃＤＮＡまたはｍＲＮＡが含まれる。

【００４７】

本明細書中に記載の方法で有用なポリヌクレオチドには、天然のＴＦＦ３　ＤＮＡと配列が類似しているか同一のポリヌクレオチドも含まれる。これには、５’および３’の非翻訳配列、プロモーター配列、およびエンハンサー配列、ならびにセンスまたはアンチセンス方向の配列が含まれる。配列が類似する核酸を、低ストリンジェンシー条件下（例えば、５０℃で１０×ＳＳＣ（０．９Ｍ生理食塩水／０．０９ｍクエン酸ナトリウム））でのハイブリッド形成および５５℃で１×ＳＳＣでの洗浄に供した場合の結合の保持によって検出する。配列同一性を、ストリンジェントな条件下（例えば、５０℃またはそれ以上

で０．１×ＳＳＣ（９０ｍＭ生理食塩水／０．９Ｍクエン酸ナトリウム））でのハイブリッド形成によって決定することができる。ハイブリッド形成の方法および条件は当該分野で周知であり、例えば、米国特許第５，７０７，８２９を参照のこと。提供されたポリヌクレオチド配列と実質的に同一の核酸（例えば、対立遺伝子改変体、遺伝子操作バージョンなど）は、ストリンジェントなハイブリッド形成条件下で提供したポリヌクレオチド配列に結合する。プローブ（特に、ＤＮＡ配列の標識されたプローブ）の使用により、相同遺伝子または関連遺伝子を単離することができる。相同遺伝子の供給源は、任意の種（例えば、霊長類（特にヒト）；ラットおよびマウスなどのげっ歯類；イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、酵母、線虫など）であり得る。

【００４８】

１つの実施形態では、少なくとも１つの本明細書中で提供したポリヌクレオチド配列の少なくとも１５個の連続ヌクレオチド（ｎｔ）を使用してハイブリッド形成を行う。すなわち、開示のポリヌクレオチド配列の１つの少なくとも１５個の連続ｎｔをプローブとして使用する場合、プローブは相補配列を含む核酸と優先的にハイブリッド形成し、選択されたプローブと固有にハイブリッド形成する核酸を同定および検索することが可能である。本明細書中に提供した１つを超えるポリヌクレオチド配列由来のプローブは、由来するｃＤＮＡが１つのｍＲＮＡに対応する場合に、同一の核酸とハイブリッド形成することができる。１５個のｎｔを超えるプローブを使用することができる（例えば、約１８ｎｔ、２５ｎｔ、５０ｎｔ、７５ｎｔ、または１００ｎｔの範囲内のサイズのプローブであるが、一般に、約１５ｎｔで固有の同定に十分な配列を示す）。

【００４９】

本発明によって意図されるポリヌクレオチドには、ヌクレオチド配列の天然に存在する改変体（例えば、縮重改変体、対立遺伝子改変体など）も含まれる。本発明によって意図されるポリヌクレオチドの改変体を、本明細書中に開示のヌクレオチド配列との推定改変体のハイブリッド形成、好ましくはストリンジェントな条件下でのハイブリッド形成によって同定する。例えば、適切な洗浄条件の使用により、対立遺伝子改変体が選択されたポリヌクレオチドプローブと比較して最大で約２５～３０％の塩基対（ｂｐ）ミスマッチを示す本明細書中に記載のポリヌクレオチドの改変体を同定することができる。一般に、対立遺伝子改変体は、約１５％～約２５％のｂｐミスマッチを含み、約５～１５％、約２～５％、または約１～２％のｂｐミスマッチ、さらに、単一のｂｐミスマッチしか含み得ない。

【００５０】

本発明はまた、本明細書中に提供したＴＦＦ３ポリヌクレオチド配列に対応するホモログを含み、ホモログ遺伝子の供給源は、任意の哺乳動物種（例えば、霊長類（特にヒト）；ラットなどのげっ歯類；イヌ、ネコ、ウシ、ヒツジ、ウマ、酵母、線虫など）であり得る。哺乳動物種間（例えば、ヒトとマウスとの間）で、ホモログは、一般に、ＴＦＦ３遺伝子またはその一部と実質的な配列類似性（例えば、ヌクレオチド配列間で少なくとも７５％の配列同一性、少なくとも９０％、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の配列同一性など）を有する。より大きな配列のサブセット、好ましくは細胞外コード配列（例えば、保存モチーフ、コード領域の一部、隣接領域など）であり得る基準配列に基づいて配列類似性を計算する。基準配列は、通常、少なくとも約１８個の連続ｎｔ長、より通常では少なくとも約３０ｎｔ長であり、比較される完全配列まで伸長することができる。Ａｌｔｓｃｈｕｌ，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．（１９９７）２５：３３８９－３４０２に記載のデフォルトパラメーターを使用したギャップ挿入ＢＬＡＳＴなどの配列分析のためのアルゴリズムは当該分野で公知である。

【００５１】

一般に、本明細書中に記載のＴＦＦ３ポリヌクレオチドの改変体は、ＭＰＳＲＣＨプログラム（Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ）で実行されるＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズムによって決定したところ、少なくとも約６５％超、好ましくは少なくとも約７５％、より好ましくは少なくとも８５％の配列同一性を有し、少なくとも

約９０％、９５％、９６％、９８％、９９％またはそれを超え得る。同一率の計算方法の例は、以下を使用したＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムである：以下の検索パラメーターを使用したアフィンギャップ検索を使用してＭＰＳＲＣＨプログラム（Ｏｘｆｏｒｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ）で実行されるＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎ相同性検索アルゴリズムによって決定した６５％を超える大域的ＤＮＡ配列同一性：ギャップオープンペナルティ１２およびギャップ伸長ペナルティ１。

【００５２】

本発明の核酸は、ｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡおよびそのフラグメント、特に、生物学的に活性な遺伝子産物をコードし、そして／または本明細書中に開示の方法（例えば、目的の特異的に発現される遺伝子の固有の同定物として診断で）で有用であるフラグメントであり得る。本明細書中で使用される、用語「ｃＤＮＡ」は、配列エレメントがエクソンであり、且つ３’および５’非コード領域である、天然の成熟ｍＲＮＡ種で見出される配列エレメントの配置を共有する全ての核酸が含まれることを意図する。通常、ｍＲＮＡ種は、介在イントロンと共に連続エクソンを有し、介在イントロンが存在する場合、核ＲＮＡスプライシングによって除去されて、ポリペプチドをコードする連続読み取り枠が作製される。ｍＲＮＡ種はまた、エクソンおよびイントロンの両方と共に存在することができ、選択的スプライシングによってイントロンを除去することができる。さらに、同一のゲノム配列によってコードされる異なるｍＲＮＡ種が細胞中で種々のレベルで存在することができ、これらの種々のレベルのｍＲＮＡ種の検出が細胞中のコードされた遺伝子産物の特異な発現の指標となり得ることに留意すべきである。

【００５３】

目的のゲノム配列は、列挙した配列中で定義された開始コドンと終止コドンとの間に存在する核酸を含み、天然の染色体中に通常存在する全イントロンが含まれる。さらに、成熟ｍＲＮＡ中で見出される３’および５’非翻訳領域が含まれ得る。さらに、転写領域の５’および３’末端のいずれかに約１ｋｂ（場合により、それを超える）の隣接ゲノムＤＮＡを含むプロモーター、エンハンサーなどの特定の転写および翻訳調節配列が含まれ得る。ゲノムＤＮＡを、１００ｋｂｐまたはそれ未満のフラグメントおよび隣接染色体配列を実質的に含まないフラグメントとして単離することができる。３’および５’のいずれかでコード領域に隣接するゲノムＤＮＡまたはイントロン中で時折見出される内部調節配列は、適切な組織特異的発現、病期特異的発現、または病態特異的発現に必要な配列を含む。

【００５４】

本発明の核酸は、本発明のＴＦＦ３ポリペプチドの全部または一部をコードすることができるか、例えば、遺伝子の５’または３’非コード領域由来の非コード配列を含み得る。記載のように、これらのＤＮＡまたはＲＮＡは、センス方向またはアンチセンス方向であり得る。従来の方法（制限酵素消化、ＰＣＲ増幅など）によるオリゴヌクレオチドの化学合成によって、ＤＮＡ配列から二本鎖または一本鎖のフラグメントを得ることができる。本発明によって意図される単離ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチドフラグメントは、本明細書中に提供したポリヌクレオチドから選択された少なくとも約１０個、約１５個、約２０個、約３５個、約５０個、約１００個、約１５０個～約２００個、約２５０個～約３００個、または約３５０個の連続ｎｔを含む。ほとんどの部分について、フラグメントは、少なくとも１５ｎｔ、通常では少なくとも１８ｎｔまたは２５ｎｔ、少なくとも５０個までの連続するｎｔ長またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチド分子は、本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列の任意の１つから選択された少なくとも１２ｎｔの連続配列を含む。

【００５５】

ＴＦＦ３ポリヌクレオチドに特異的なオリゴヌクレオチドプローブを、本明細書中に開示のＴＦＦ３ポリヌクレオチド配列を使用して生成することができる。プローブは、好ましくは、本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列の任意の１つの対応連続配列の少なくとも約１２ｎｔ、１５ｎｔ、１６ｎｔ、１８ｎｔ、２０ｎｔ、２２ｎｔ、２４ｎｔ、ま

たは２５ｎｔのフラグメントであり、２ｋｂ長、１ｋｂ長、０．５ｋｂ長、０．１ｋｂ長、または０．０５ｋｂ長未満であり得る。プローブを化学合成することができるか、制限酵素を使用してより長いポリヌクレオチドから生成することができる。プローブを、例えば、放射性タグ、ビオチン化タグ、または蛍光タグで標識することができる。好ましくは、本明細書中に提供したポリヌクレオチド配列の任意の１つの同定配列に基づいてプローブをデザインする。より好ましくは、配列に対して低複雑性（ｌｏｗ　ｃｏｍｐｌｗｘｉｔｙ）をマスキングするためのマスキングプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴ）の適用後にマスクされないままである本発明のポリヌクレオチドの１つの連続配列に基づいてプローブをデザインする（すなわち、マスキングプログラムによって生成されたマスキング配列のポリｎストレッチの外側のポリヌクレオチドによって示される非マスキング領域が選択される）。

【００５６】

本発明のＴＦＦ３ポリヌクレオチドを、単離し、実質的に純粋な、一般に、インタクトな染色体以外の形態で得ることができる。典型的には、実質的に他の天然に存在する核酸配列を含まないＤＮＡまたはＲＮＡのいずれかとしてのポリヌクレオチドを得ることができ、一般に、少なくとも約５０％、通常では少なくとも純度約９０％であり、典型的には「組換え」られている（例えば、天然に存在する染色体に通常会合しない１つまたは複数のヌクレオチドに隣接している）。

【００５７】

線状分子としてか環状分子内に本明細書中に記載のＴＦＦ３ポリヌクレオチドを提供することができ、自律複製分子（ベクター）内または複製配列を含まない分子内で提供することができる。ポリヌクレオチドの発現を、ポリヌクレオチド自体または当該分野で公知の他の調節配列によって調節することができる。ポリヌクレオチドを、当該分野で利用可能な種々の技術（トランスフェリンポリカチオン媒介ＤＮＡ導入、裸またはカプセル化された核酸でのトランスフェクション、リポソーム媒介ＤＮＡ導入、ＤＮＡコーティングラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、エレクトロポレーション、遺伝子銃、およびリン酸カルシウム媒介トランスフェクションなど）を使用して、適切な宿主細胞に移入することができる。

【００５８】

本明細書中に記載の核酸組成物を使用して、例えば、生物学的サンプル中にポリヌクレオチドのさらなるコピーを生成するため、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを生成するためのｍＲＮＡの検出用プローブとして、および一本鎖ＤＮＡプローブまたは三本鎖形成オリゴヌクレオチドとしてのポリペプチド（抗ＴＦＦ３抗体を得るために使用することができる）を産生することができる。本明細書中に記載のプローブを使用して、例えば、サンプル中の本明細書中に提供したポリヌクレオチドの任意の１つまたはその改変体の存在または非存在を決定することができる。これらおよび他の使用を、以下にさらに詳述する。

【００５９】

本明細書中で使用される、用語「重複」は、１つを超えるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを共有する配列の領域をいう。例えば、さらなるオリゴヌクレオチドを重複するオリゴヌクレオチドは、さらなるオリゴヌクレオチド中の配列の領域に実質的に対応する配列の領域を有する。いくつかの実施形態では、重複は、少なくとも約３、少なくとも約４、少なくとも約５、少なくとも約６、少なくとも約７、少なくとも約８、少なくとも約９、少なくとも約１０、少なくとも約１５、少なくとも約２０、少なくとも約５０、少なくとも約１００、またはそれ以上のヌクレオチド長であり得る。

【００６０】

（中和剤）

本発明の方法および製造品は、細胞中でのＴＦＦ３の活性または発現を調節するＴＦＦ３中和剤を使用するか組み込む。本明細書中で使用される、用語「調節」は、細胞内、細胞外、または細胞表面上に存在する遺伝子、タンパク質、または任意の分子の質または量

の変化をいう。変化は、分子の発現またはレベルの増減であり得る。用語「調節する」には、生物学的機能／活性の質または量の変化（例えば、増幅、分泌、接着、アポトーシス、および細胞間のシグナル伝達など）も含まれる。いくつかの実施形態では、活性または発現の調節は、約１０％超、約２０％超、約３０％長、約４０％超、または約５０％超であり得る。

【００６１】

低分子、ペプチド、抗体、アンチセンス分子、リボザイム、およびＲＮＡｉ分子などの種々の中和剤が本明細書中で意図される。

【００６２】

（低分子）

中和剤は、任意選択的に細胞傷害薬（本明細書中に記載の細胞傷害薬など）に融合しているか抱合した低分子を含み得る。抗原に結合する低分子を同定するために、低分子のライブラリーをＴＦＦ３またはＴＦＦ３発現細胞に対してスクリーニングすることができる。低分子を、周知の方法にしたがって、その拮抗性または中和性についてさらにスクリーニングし、そして／または細胞傷害薬と抱合することができる。

【００６３】

（ペプチド）

中和剤はまた、合理的デザインまたはファージディスプレイによって生成されたペプチドであり得る（例えば、ＷＯ９８／３５０３６号を参照のこと）。１つの実施形態では、最適な分子は、抗体のＣＤＲに基づいてデザインされた「ＣＤＲ模倣物」または抗体アナログであり得る。このようなペプチドがそれ自体によって拮抗性を示し得る一方で、ペプチドを任意選択的に細胞傷害薬に融合して、ペプチドの拮抗性を付加または増強することができる。ペプチドは、２～約２０、２～約１５、または２～約１０アミノ酸を含み得る。

【００６４】

（アンチセンスオリゴヌクレオチド）

特定の環境下では、細胞中のＴＦＦ３の発現量を調節する（例えば、減少させる）ことが望ましい。したがって、本発明の別の態様では、ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドを作製することができ、細胞によるＴＦＦ３の発現レベルの減少のために使用する方法は、１つまたは複数のＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与する工程を含む。句「ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、ＴＦＦ３の発現が減少するようにＴＦＦ３発現に関与する相補核酸配列と塩基対合によって相互作用するヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドをいう。好ましくは、ＴＦＦ３発現に関与する特異的核酸配列は、ＴＦＦ３をコードするゲノムＤＮＡ分子またはｍＲＮＡ分子である。このゲノムＤＮＡ分子は、ＴＦＦ３遺伝子の調節配列および／または成熟ＴＦＦ３タンパク質のコード配列を含み得る。

【００６５】

ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその方法の文脈中での用語「相補的な」は、このような配列が細胞中（すなわち、生理学的条件下で）で配列とハイブリッド形成するのに十分に相補的であることを意味する。ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約８ヌクレオチドから約１００ヌクレオチドまでを含む配列を含み、より好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、約１５ヌクレオチドから約３０ヌクレオチドまでまたは約１８ヌクレオチドから約２６ヌクレオチドまでを含む。

【００６６】

ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、核酸分解酵素分解に対する耐性を付与する種々の修飾（例えば、修飾されたヌクレオチド間結合（Ｕｈｌｍａｎｎ ａｎｄ Ｐｅｙｍａｎ，Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｖｉｅｗｓ ９０：５４３－５４８（１９９０）；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ ａｎｄ Ｂａｎｎｅｒ，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．３１：３３５，（１９９０））、５，９５８，７７３号および本明細書中に開示の特許に開示の修飾核酸塩基、および／または糖など）を含み得る。修飾オリゴヌクレオチドを以下

でさらに説明する。

【００６７】

アンチセンステクノロジーに広範に適用可能である当該分野で公知のアンチセンス分子の任意の修飾物またはバリエーションは、本発明の範囲内に含まれる。このような修飾には、米国特許第５，５３６，８２１号；同第５，５４１，３０６号；同第５，５５０，１１１号；同第５，５６３，２５３号；同第５，５７１，７９９号；同第５，５８７，３６１号、同第５，６２５，０５０号、および同第５，９５８，７７３号に開示のリン含有結合の調製が含まれる。修飾オリゴヌクレオチドを以下でさらに説明する。

【００６８】

本発明のアンチセンス化合物には、修飾塩基が含まれ得る。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、アンチセンスオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増強するための１つまたは複数の部分または抱合物へのオリゴヌクレオチドの化学結合によって修飾することもできる。このような部分または抱合物には、米国特許第５，５１４，７５８号、同第５，５６５，５５２号、同第５，５６７，８１０号、同第５，５７４，１４２号、同第５，５８５，４８１号、同第５，５８７，３７１号、同第５，５９７，６９６号、および同第５，９５８，７７３号に開示のコレステロールなどの脂質、コール酸、チオエーテル、脂肪族鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、パルミチル部分などが含まれる。修飾塩基およびアンチセンスオリゴヌクレオチド抱合物を、以下でさらに説明する。

【００６９】

アンチセンス技術では、特定の標的に至適なアンチセンス分子を選択するために一定程度の日常的実験を行うことができる。そのデザインでは、アンチセンス分子を、到達可能または曝露した標的ＲＮＡ分子の一部にターゲティングすることができる。細胞中のｍＲＮＡレベルを、ｍＲＮＡの逆転写およびｃＤＮＡレベルのアッセイによって処置細胞およびコントロール細胞中で測定することができる。生物学的効果を、当該分野で公知の細胞成長または生存性の測定によって日常的に決定することができる。

【００７０】

ｃＤＮＡレベルのアッセイおよび分析によるアンチセンス活性の特異性の測定は、アンチセンスの結果についての当該分野で認識されている立証方法である。例えば、処置細胞およびコントロール細胞由来のＲＮＡを逆転写し、得られたｃＤＮＡ集団を分析することができる（Ｂｒａｎｃｈ，Ａ．Ｄ．，Ｔ．Ｉ．Ｂ．Ｓ．２３：４５－５０（１９９８））。

【００７１】

本発明のアンチセンス分子には、配列番号５～８のヌクレオチド配列を有する核酸などのＴＦＦ３ポリヌクレオチド領域またはその一部に相補的なオリゴヌクレオチドが含まれる。単独または組み合わせで細胞中のＴＦＦ３発現を減少させることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドのいくつかの例には、以下の表１に提供した配列を有するものまたはそのフラグメントが含まれる。

【００７２】

【表１】

表１：ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの例

配列番号	配列
配列番号 ：9	5’-TCCTTGGCTGGCACGGCACACT-3’
配列番号 ：10	5’-CGGGAGCAAAGGGACAGAAAAGC-3’
配列番号 ：11	5’-GAAGAACTGTCCTCGGGTGGAGC-3’
配列番号 ：12	5’-TCAGAAAGTCTCAGGCACGAAGAAC-3’
配列番号 ：13	5’-GCAGCAGAAATAAAGCACAACCTCA-3’
配列番号 ：14	5’-AACAGTAGCGAGAGTGGTTGTGAAA-3’
配列番号 ：15	5’-CGGCACGGCACACTGGTTTGCA-3’
配列番号 ：16	5’-GGTGCATTCTGTCTTCCTAGTCAGG-3’
配列番号 ：17	5’-GGCTCCAGATATGAACTTTCAGCAG-3’
配列番号 ：18	5’-GGTGGAGCATGGGACCTTTATTCGT-3’
配列番号 ：19	5’-TGGCACGGCACACTGGTTTGCA-3’

アンチセンスの特異性および感受性は、当業者によって治療用途のために役立てられている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、動物およびヒトの病状の治療における治療部分として使用されている。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトに安全且つ有効に投与されているが、多数の臨床試験が現在進行中である。したがって、オリゴヌクレオチドが細胞、組織、および哺乳動物（ヒトが含まれる）の治療のための治療計画で有用でありうる有用な治療方法であり得ることが確立されている。

【００７３】

本発明で有用なアンチセンス化合物のいくつかの例には、修飾骨格または非天然ヌクレオシド間結合を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。修飾骨格を有するオリゴヌクレオチドには、骨格中にリン原子を保持するものおよび骨格中にリン原子を持たないものが含まれる。本明細書および時折当該分野で参照される目的のために、そのヌクレオシド間骨格中にリン原子を持たない修飾オリゴヌクレオチドをオリゴヌクレオシドと見なすこともできる。

【００７４】

修飾オリゴヌクレオチド骨格の例には、例えば、ホスホロチオエート、キラルホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロトリエステル、アミノアルキルホスホトリエステル、メチルおよび他のアルキルホスホネート（３’－アルキレンホスホネートおよびキラルホスホネートが含まれる）、ホスフィネート、ホスホラミデート（３’－アミノホスホラミデートおよびアミノアルキルホスホラミデートが含まれる）、チオノホスホラミデート、チオノアルキルホスホネート、チオノアルキルホスホトリエステル、通常の３’－５’結合を有するボラノホスフェート、これらの２’－５’連結アナログ、ならびにヌクレオシド単位の隣接対が３’－５’から５’－３’または２’－５’から５’－２’に連結した逆極性を有する骨格が含まれる。種々の塩、混合塩、および遊離酸の形態も含まれる。

【００７５】

上記リン含有結合の調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第３，６８７，８０８号；同第４，４６９，８６３号；同第４，４７６，３０１号；同第５，０２３，２４３号；同第５，１７７，１９６号；同第５，１８８，８９７号；同第５，２６４，４２３

号；同第５，２７６，０１９号；同第５，２７８，３０２号；同第５，２８６，７１７号；同第５，３２１，１３１号；同第５，３９９，６７６号；同第５，４０５，９３９号；同第５，４５３，４９６号；同第５，４５５，２３３号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７６，９２５号；同第５，５１９，１２６号；同第５，５３６，８２１号；同第５，５４１，３０６号；同第５，５５０，１１１号；同第５，５６３，２５３号；同第５，５７１，７９９号；同第５，５８７，３６１号；および同第５，６２５，０５０号が含まれるが、これらに限定されない。

【００７６】

リン原子を含まない修飾オリゴヌクレオチド骨格のいくつかの例には、短鎖アルキルまたはシクロアルキルヌクレオシド間結合、混合ヘテロ原子およびアルキルもしくはシクロアルキルヌクレオシド結合、または１つまたは複数の短鎖ヘテロ原子もしくは複素間ヌクレオシド間結合によって形成された骨格を有する。これらには、モルホリノ結合（ヌクレオシドの糖部分から一部形成される）；シロキサン骨格；スルフィド、スルホキシド、およびスルホン骨格；ホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；メチレンホルムアセチルおよびチオホルムアセチル骨格；アルケン含有骨格；スルファメート骨格；メチレンイミノおよびメチレンヒドラジノ骨格；スルホネートおよびスルホンアミド骨格；アミド骨格；および混合Ｎ、Ｏ、Ｓ、およびCH_2成分を有する他の骨格を有する骨格が含まれる。

【００７７】

上記オリゴヌクレオシドの調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第５，０３４，５０６号；同第５，１６６，３１５号；同第５，１８５，４４４号；同第５，２１４，１３４号；同第５，２１６，１４１号；同第５，２３５，０３３号；同第５，２６４，５６２号；同第５，２６４，５６４号；同第５，４０５，９３８号；同第５，４３４，２５７号；同第５，４６６，６７７号；同第５，４７０，９６７号；同第５，４８９，６７７号；同第５，５４１，３０７号；同第５，５６１，２２５号；同第５，５９６，０８６号；同第５，６０２，２４０号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６０２，２４０号；同第５，６０８，０４６号；同第５，６１０，２８９号；同第５，６１８，７０４号；同第５，６２３，０７０号；同第５，６６３，３１２号；同第５，６３３，３６０号；同第５，６７７，４３７号；および同第５，６７７，４３９号が含まれるが、これらに限定されない。

【００７８】

他のオリゴヌクレオチド模倣物では、ヌクレオチド単位の糖およびヌクレオシド結合（すなわち、骨格）の両方を、新規の基で置換する。塩基単位を、適切な核酸標的化合物とのハイブリッド形成のために保持することができる。１つのこのようなオリゴマー化合物（優れたハイブリッド形成特性を有することが示されているオリゴヌクレオチド模倣物）を、ペプチド核酸（ＰＮＡ）という。ＰＮＡ化合物では、オリゴヌクレオチドの糖－骨格を、アミド含有骨格（特にアミノエチルグリシン骨格）と置換する。核酸塩基を保持し、骨格のアミド部分のアザ窒素原子に直接または間接的に結合する。ＰＮＡ化合物の調製を教示した米国特許には、米国特許第５，５３９，０８２号；同第５，７１４，３３１号；および同第５，７１９，２６２号（それぞれ本明細書中で参考として援用される）が含まれるが、これらに限定しない。ＰＮＡ化合物のさらなる教示を、Ｎｉｅｌｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，１９９１，２５４，１４９７－１５００に見出すことができる。

【００７９】

本発明のさらなる実施形態は、米国特許第５，４８９，６７７号および米国特許第５，６０２，２４０号などで提供されたホスホロチオエート骨格を有するオリゴヌクレオチドおよびヘテロ原子骨格を有するオリゴヌクレオシドである。上記で参照した米国特許第５，０３４，５０６号のモルホリノ骨格構造を有するオリゴヌクレオチドも提供する。

【００８０】

修飾オリゴヌクレオチドはまた、１つまたは複数の置換糖部分を含み得る。例えば、オ

リゴヌクレオチドは、２’位に以下のうちの１つを含み得る：ＯＨ；Ｆ；Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキル；Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルケニル；Ｏ－、Ｓ－、またはＮ－アルキニル；またはＯ－アルキル－Ｏ－アルキル（式中、アルキル、アルケニル、およびアルキニルは、置換または非置換C_1～C_{10}アルキルまたはC_2～C_{10}アルケニルおよびアルキニルであり得る）。類似の修飾を、オリゴヌクレオチド上の他の位置、特に３’末端ヌクレオチド上の糖の３’位または２’－５’連結オリゴヌクレオチド、および５’末端ヌクレオチドの５’位で行うこともできる。オリゴヌクレオチドはまた、ペントフラノース糖の代わりにシクロブチル部分などの糖模倣物を有することができる。このような修飾糖構造の調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第４，９８１，９５７号；同第５，１１８，８００号；同第５，３１９，０８０号；同第５，３５９，０４４号；同第５，３９３，８７８号；同第５，４４６，１３７号；同第５，４６６，７８６号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５１９，１３４号；同第５，５６７，８１１号；同第５，５７６，４２７号；同第５，５９１，７２２号；同第５，５９７，９０９号；同第５，６１０，３００号；同第５，６２７，０５３号；同第５，６３９，８７３号；同第５，６４６，２６５号；同第５，６５８，８７３号；同第５，６７０，６３３号；および同第５，７００，９２０号（それぞれその全体が本明細書中で参考として援用される）が含まれるがこれらに限定されない。

【００８１】

オリゴヌクレオチドには、核酸塩基（当該分野でしばしば簡単に「塩基」という）の修飾物または置換物も含まれ得る。本明細書中で使用される、「未修飾」または「天然の」核酸塩基には、プリン塩基であるアデニン（Ａ）およびグアニン（Ｇ）ならびにピリミジン塩基であるチミン（Ｔ）、シトシン（Ｃ）、およびウラシル（Ｕ）が含まれる。修飾核酸塩基には、５－メチルシトシン（５－ｍｅ－Ｃ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、キサンチン、ヒポキサンチン、２－アミノアデニン、アデニンおよびグアニンの６－メチルおよび他のアルキル誘導体、アデニンおよびグアニンの２－プロピルおよび他のアルキル誘導体、２－チオウラシル、２－チオチミン、および２－チオシトシン、５－ハロウラシルおよびシトシン、５－プロピニルウラシルおよびシトシン、６－アゾウラシル、シトシン、およびチミン、５－ウラシル（シュードウラシル）、４－チオウラシル、８－ハロ、８－アミノ、８－チオ、８－チオアルキル、８－ヒドロキシル、および他の８置換アデニンおよびグアニン、５－ハロ（特に、５－ブロモ）、５－トリフルオロメチル、および他の５置換ウラシルおよびシトシン、７－メチルグアニンおよび７－メチルアデニン、８－アザグアニンおよび８－アザアデニン、７－デアザグアニンおよび７－デアザアデニン、ならびに３－デアザグアニンおよび３－デアザアデニンなどの他の合成および天然の核酸塩基が含まれる。特定の上記修飾核酸塩基および他の修飾核酸塩基の調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第３，６８７，８０８ならびに米国特許第４，８４５，２０５号；同第５，１３０，３０２号；同第５，１３４，０６６号；同第５，１７５，２７３号；同第５，３６７，０６６号；同第５，４３２，２７２号；同第５，４５７，１８７号；同第５，４５９，２５５号；同第５，４８４，９０８号；同第５，５０２，１７７号；同第５，５２５，７１１号；同第５，５５２，５４０号；同第５，５８７，４６９号；同第５，５９４，１２１，５，５９６，０９１号；同第５，６１４，６１７号；同第５，６８１，９４１号、および５，７５０，６９２号（それぞれその全体が本明細書中で参考として援用される）が含まれるが、これらに限定されない。

【００８２】

本発明のオリゴヌクレオチドの別の修飾は、オリゴヌクレオチドへのオリゴヌクレオチドの活性、細胞分布、または細胞取り込みを増大させる１つまたは複数の部分または抱合物の化学結合を含む。このような部分には、コレステロール部分などの脂質部分、コール酸、チオエーテル（例えば、ヘキシル－Ｓ－トリチルチオール）、チオコレステロール、脂肪族鎖（例えば、ドデカンジオール残基またはウンデシル残基）、リン脂質（例えば、ジヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロールもしくはトリエチル－アンモニウム１，２－ジ－Ｏ－ヘキサデシル－ｒａｃ－グリセロ－３－Ｈ－ホスホネート）、ポリアミンもしくはポ

リエチレングリコール鎖、アダマンタン酢酸、パルミチル部分、またはオクタデシルアミンもしくはヘキシルアミノ－カルボニル－オキシコレステロール部分が含まれるが、これらに限定されない。このようなオリゴヌクレオチド抱合物の調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第４，８２８，９７９号；同第４，９４８，８８２号；同第５，２１８，１０５号；同第５，５２５，４６５号；同第５，５４１，３１３号；同第５，５４５，７３０号；同第５，５５２，５３８号；同第５，５７８，７１７，５，５８０，７３１号；同第５，５８０，７３１号；同第５，５９１，５８４号；同第５，１０９，１２４号；同第５，１１８，８０２号；同第５，１３８，０４５号；同第５，４１４，０７７号；同第５，４８６，６０３号；同第５，５１２，４３９号；同第５，５７８，７１８号；同第５，６０８，０４６号；同第４，５８７，０４４号；同第４，６０５，７３５号；同第４，６６７，０２５号；同第４，７６２，７７９号；同第４，７８９，７３７号；同第４，８２４，９４１号；同第４，８３５，２６３号；同第４，８７６，３３５号；同第４，９０４，５８２号；同第４，９５８，０１３号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，０８２，８３０号；同第５，１１２，９６３号；同第５，２１４，１３６号；同第５，２４５，０２２号；同第５，２５４，４６９号；同第５，２５８，５０６号；同第５，２６２，５３６号；同第５，２７２，２５０号；同第５，２９２，８７３号；同第５，３１７，０９８号；同第５，３７１，２４１，５，３９１，７２３号；同第５，４１６，２０３，５，４５１，４６３号；同第５，５１０，４７５号；同第５，５１２，６６７号；同第５，５１４，７８５号；同第５，５６５，５５２号；同第５，５６７，８１０号；同第５，５７４，１４２号；同第５，５８５，４８１号；同第５，５８７，３７１号；同第５，５９５，７２６号；同第５，５９７，６９６号；同第５，５９９，９２３号；同第５，５９９，９２８、および同第５，６８８，９４１号（それぞれ本明細書中で参考として援用される）が含まれるが、これらに限定されない。

【００８３】

所与の化合物の全ての位置が均一に修飾されている必要はなく、実際、１つを超える上記修飾を、単一の化合物中またはオリゴヌクレオチド内の単一のヌクレオシドにさえも組み込むことができる。

【００８４】

本発明はまた、キメラ化合物であるアンチセンス化合物を含む。本発明の文脈において、「キメラ」アンチセンス化合物または「キメラ」は、２つまたはそれ以上の化学的に異なる領域を含み、それぞれが少なくとも１つの単量体単位（すなわち、オリゴヌクレオチド化合物の場合、ヌクレオチド）から構成されるアンチセンス化合物、特に、オリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは、典型的には、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ分解耐性の増加、細胞取り込みの増加、および／または標的核酸に対する結合親和性の増加を付与するためにオリゴヌクレオチドが修飾された少なくとも１つの領域を含む。オリゴヌクレオチドのさらなる領域は、ＲＮＡ：ＤＮＡまたはＲＮＡ：ＲＮＡハイブリッドを切断することができる酵素の基質として役立ち得る。例として、ＲＮアーゼＨは、ＲＮＡ：ＤＮＡ二重鎖のＲＮＡ鎖を切断する細胞エンドヌクレオアーゼである。したがって、ＲＮアーゼＨの活性化により、ＲＮＡ標的が切断され、それによって遺伝子発現のオリゴヌクレオチド阻害の有効性が非常に増強される。したがって、キメラオリゴヌクレオチドを使用した場合、同一の標的領域とハイブリッド形成するホスホロチオエートデオキシオリゴヌクレオチドと比較して、より短いオリゴヌクレオチドを使用してしばしば類似の結果を得ることができる。ゲル電気泳動および必要な場合に当該分野で公知の関連核酸ハイブリッド形成技術によって、ＲＮＡ標的の切断を日常的に検出することができる。

【００８５】

本発明のキメラアンチセンス化合物を、上記の２つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオシド、および／またはオリゴヌクレオチド模倣物の複合物（ｃｏｍｐｏｓｉｔｅ）構造として形成することができる。このような化

合物は、当該分野でハイブリッドまたはギャップマー（ｇａｐｍｅｒ）とも呼ばれている。このようなハイブリッド構造の調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第５，０１３，８３０号；同第５，１４９，７９７号；同第５，２２０，００７号；同第５，２５６，７７５号；同第５，３６６，８７８号；同第５，４０３，７１１号；同第５，４９１，１３３号；同第５，５６５，３５０号；同第５，６２３，０６５号；同第５，６５２，３５５号；同第５，６５２，３５６号；および同第５，７００，９２２号（それぞれその全体が本明細書中で参考として援用される）が含まれるが、これらに限定されない。

【００８６】

本発明で使用されるアンチセンス化合物を、周知の固相合成技術によって都合良く且つ日常的に作製することができる。このような合成のための装置は、いくつかの販売者（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，Ｃａｌｉｆ））によって販売されている。当該分野で公知のこのような合成のための任意の他の手段を付加的または代替的に使用することができる。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などのオリゴヌクレオチドを調製するための類似の技術を使用することが周知である。

【００８７】

本発明のアンチセンス化合物をｉｎ　ｖｉｖｏで合成することができる。本発明の化合物を、取り込み、分布、および／または吸収を支援するために、他の分子、分子構造、または化合物の混合物（例として、リポソーム、受容体ターゲティング分子、経口、直腸、局所、または他の処方物）と混合、カプセル化、抱合、または会合することもできる。このような取り込み、分布、および／または吸収を支援する処方物の調製を教示した代表的な米国特許には、米国特許第５，１０８，９２１号；同第５，３５４，８４４号；同第５，４１６，０１６号；同第５，４５９，１２７号；同第５，５２１，２９１号；同第５，５４３，１５８号；同第５，５４７，９３２号；同第５，５８３，０２０号；同第５，５９１，７２１号；同第４，４２６，３３０号；同第４，５３４，８９９号；同第５，０１３，５５６号；同第５，１０８，９２１号；同第５，２１３，８０４号；同第５，２２７，１７０号；同第５，２６４，２２１号；同第５，３５６，６３３号；同第５，３９５，６１９号；同第５，４１６，０１６号；同第５，４１７，９７８号；同第５，４６２，８５４号；同第５，４６９，８５４号；同第５，５１２，２９５号；同第５，５２７，５２８号；同第５，５３４，２５９号；同第５，５４３，１５２号；同第５，５５６，９４８号；同第５，５８０，５７５号；および同第５，５９５，７５６号（それぞれ本明細書中で参考として援用される）が含まれるが、これらに限定されない。

【００８８】

本発明のアンチセンス化合物は、さらに、動物（ヒトが含まれる）への投与時に生物学的に活性な代謝産物またはその残渣を（直接または間接的に）得ることができる任意の薬学的に許容可能な塩、エステル、もしくはこのようなエステルの塩、または任意の他の化合物を含む。したがって、例えば、開示から本発明のアンチセンス化合物の薬学的に許容可能な塩、このようなプロドラッグの薬学的に許容可能な塩、および他の生物学的等価物も導かれる。

【００８９】

本発明のアンチセンス化合物を、診断、治療、予防、および試薬などとして使用することができる。治療のために、ＴＦＦ３発現の調節によって治療することができる疾患または障害を有する疑いのある動物（好ましくは、ヒト）を、本発明のアンチセンス化合物の投与によって治療する。本発明の化合物を、適切な薬学的に許容可能な希釈剤またはキャリアへの有効量のアンチセンス化合物の添加によって薬学的組成物中で使用することができる。本発明のアンチセンス化合物および方法の使用も、例えば、腫瘍の形成または転移を防止または遅延するために予防的に有用であり得る。

【００９０】

本発明のアンチセンス化合物は、これらの化合物がＴＦＦ３をコードする核酸とハイブリッド形成し、この事実を活用するためにサンドイッチアッセイおよび他のアッセイを容易に構築することができるので、研究および診断に有用である。本発明のアンチセンスオ

リゴヌクレオチドとＴＦＦ３をコードする核酸とのハイブリッド形成を、当該分野で公知の手段によって検出することができる。このような手段には、酵素とオリゴヌクレオチドとの抱合、オリゴヌクレオチドの放射性標識、または任意の他の適切な検出手段が含まれ得る。サンプル中のＴＦＦ３レベル検出用のこのような検出手段を使用したキットも調製することができる。

【００９１】

本発明はまた、本発明のアンチセンス化合物を含む薬学的組成物および処方物を含む。いくつかの実施形態では、アンチセンス分子を含む組成物を、乳濁液として調製および処方することができる。乳濁液は、典型的には、通常は直径０．１μｍを超える液滴の形態で一方の液体が他方の液体に分散された不均一系である。乳濁液は、しばしば、十分に混合されて互いに分散している２つの不混和性液相を含む二相系である。一般に、乳濁液は、水－油型（ｗ／ｏ）または油－水型（ｏ／ｗ）のいずれかであり得る。水相が細かく分画されて微小な液滴としてかさ高い油相に分散されている場合、得られた組成物を水－油型（ｗ／ｏ）乳濁液と呼ぶ。あるいは、油相が細かく分画されて微小な液滴としてかさ高い水相に分散されている場合、得られた組成物を油－水型（ｏ／ｗ）乳濁液と呼ぶ。乳濁液は、分散相および水相もしくは油相のいずれかに溶液としてまたはそれ自体に個別の相として存在し得る実薬に加えてさらなる成分を含み得る。乳化剤、安定剤、色素、および抗酸化剤などの薬学的賦形剤も必要に応じて乳濁液中に存在し得る。薬学的乳濁液はまた、例えば、油－水－油型（ｏ／ｗ／ｏ）および水－油－水型（ｗ／ｏ／ｗ）乳濁液の場合などの２つを超える相から構成される多相乳濁液であり得る。このような複雑な処方物は、しばしば、単純な二相乳濁液では得られない特定の利点が得られる。ｏ／ｗ乳濁液の各油滴が小さな水滴に封入されている多相乳濁液は、ｗ／ｏ／ｗ乳濁液を構成する。同様に、油性連続相（ｏｉｌｙ－ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ）中で安定化された水の小球に封入された油滴の系により、ｏ／ｗ／ｏ乳濁液が得られる。

【００９２】

別の関連する実施形態では、本発明の方法および組成物は、第１の核酸にターゲティングされた１つまたは複数のアンチセンス分子および第２の核酸標的にターゲティングされた１つまたは複数のさらなるアンチセンス化合物を含み得る。２つまたはそれ以上の組み合わせ化合物を、互いにまたは連続的に使用することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのターゲティングされた核酸は、ＴＦＦ３をコードする。

【００９３】

（リボザイム）

中和剤はまた、例えば、ＴＦＦ３発現を阻害するリボザイムであり得る。リボザイムは、典型的には、相補領域を有するｍＲＮＡなどの一本鎖核酸を除去することができるリボ核酸活性を有する触媒ＲＮＡ分子である。リボザイムは酵素であるので、単一のリボザイム分子は、多数の標的ＲＮＡ分子を切断することができる。さらに、リボザイムは、典型的には、標的ＲＮＡへの結合の塩基対合機構だけでなく、標的ＲＮＡ切断機構に依存する阻害特異性を有する非常に特異的なインヒビターである。標的遺伝子であるｍＲＮＡ転写物を触媒的に切断するようにデザインされたリボザイム分子を使用して、標的遺伝子であるｍＲＮＡの翻訳を防止し、それによって標的遺伝子産物の発現を防止することもできる。（例えば、ＷＯ９０／１１３６４号およびＳａｒｖｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４７，１２２２－１２２５を参照のこと）。

【００９４】

リボザイムを、標的ＲＮＡ中の種々の部位にアニーリングするようにデザインすることができる。結合アームは、ＴＦＦ３ポリヌクレオチドなどの標的部位に相補的であり得る。リボザイムを化学合成することができる。例示的合成方法は、Ｕｓｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８７　Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，１０９，７８４５－７８５４およびＳｃａｒｉｎｇｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９０　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，１８，５４３３－５４４１に記載の通常のＲＮＡ合成手順に従うことができ、５’末端でのジメトキシトリチルおよび３’末端でのホスホラミダイトなどの一般的な核酸保護基および

結合基を使用することができる。平均的な段階的カップリングによる収率は９８％超であり得る。ヘアピンリボザイムを２つの部分で合成し、活性リボザイムを再構築するためにアニーリングすることもできる（Ｃｈｏｗｒｉｒａ ａｎｄ Ｂｕｒｋｅ，１９９２ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２０，２８３５－２８４０）。リボザイムを、ヌクレアーゼ耐性基（例えば、２’－アミノ、２’－Ｃ－アリル、２’－フルオロ、２’－ｏ－メチル、２’－Ｈ）での修飾によって安定性を増強するために修飾することができる（例えば、Ｕｓｍａｎ ａｎｄ Ｇｅｄｅｒｇｒｅｎ，１９９２ ＴＩＢＳ １７，３４（本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【００９５】

リボザイムを、ゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィ（ＨＰＬＣ）などの当該分野で公知の方法によって精製することができる。

【００９６】

リボザイム活性を、血清リボヌクレアーゼによるその分解を防止する修飾を有するリボザイムの化学合成によって至適化することができる。（例えば、それぞれ本明細書中で参考として援用され、酵素ＲＮＡ分子の糖部分に対する種々の化学修飾を記載したＥｃｋｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ ９２／０７０６５；Ｐｅｒｒａｕｌｔ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，１９９０，３４４：５６５；Ｐｉｅｋｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９１，２５３：３１４；Ｕｓｍａｎ ａｎｄ Ｃｅｄｅｒｇｒｅｎ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．１９９２，１７：３３４；Ｕｓｍａｎ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ ９３／１５１８７；およびＲｏｓｓｉ ｅｔ ａｌ．，ＷＯ ９１／０３１６２，ａｎｄ Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，６５２，０９４を参照のこと）。

【００９７】

したがって、リボザイム（例えば、ヘアピン、ハンマーヘッド、またはＲＮアーゼＰリボザイム、ならびにミニザイム（ｍｉｎｉｚｙｍｅ）（ＭｃＣａｌｌ，Ｍ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：５７１０－５７１４））、または他の触媒ＲＮＡ分子）を使用して、ＴＦＦ３転写物を触媒的に除去し、それによってＴＦＦ３ ｍＲＮＡの翻訳を阻害することができる。ＴＦＦ３特異性を有するリボザイムを、ＴＦＦ３のヌクレオチド配列（例えば、本明細書中に提供したヒトＴＦＦ３ ＤＮＡ配列または関連ポリヌクレオチド）に基づいてデザインすることができる。リボザイムの合成方法は、Ｃｅｃｈ ｅｔ ａｌに付与された米国特許第４，９８７，０７１号および同第５，１１６，７４２号に開示されている。あるいは、ＴＦＦ３ ｍＲＮＡを使用して、ＲＮＡ分子プールから特異的リボ核酸活性を有する触媒ＲＮＡを選択することができる（例えば、Ｂａｒｔｅｌ ａｎｄ Ｓｔｏｓｔａｋ，Ｊ．Ｗ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１２６１：１４１１－１４１８（１９９３）を参照のこと）。

【００９８】

あるいは、ＴＦＦ３発現を、ＴＦＦ３の調節領域（プロモーター、エンハンサー）に相補的なヌクレオチド配列のターゲティングによって阻害して、標的細胞中での転写を阻害する三重らせん構造を形成することができる（例えば、Ｈｅｌｅｎｅ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎａｌ．ＮＹＡｃａｄ Ｓｃｉ．６６０：２７－３６（１９９２）を参照のこと）。

【００９９】

いくつかの実施形態によれば、中和剤はハンマーヘッドリボザイムである。ハンマーヘッドリボザイムは、標的ＭＲＮＡと相補的塩基対を形成する隣接領域によって決定づけられる位置でｍＲＮＡを切断すると考えられている。ハンマーヘッドリボザイム使用の特徴は、標的ｍＲＮＡが以下の２塩基配列を有することである：５’－ＵＧ－３’。ハンマーヘッドリボザイムの構築および産生は当該分野で周知であり、Ｍｙｅｒｓ，１９９５，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ａ Ｃｏｍｐｒｅｈｅｎｓｉｖｅ Ｄｅｓｋ Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ，ＶＣＨ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（特に、８３３頁図４を参照のこと）およびＨａｓｅｌｏｆｆ ａｎｄ Ｇｅｒｌａｃｈ，１９８８，Ｎａｔｕｒｅ，３３４：５８５－５９１．に記載されている。

【０１００】
いくつかの実施形態によれば、例えば、有効性を増大し、且つ非機能的ｍＲＮＡ転写物の細胞内蓄積を最小にするために、切断認識部位が標的遺伝子ｍＲＮＡの５’末端付近に位置づけられるようにリボザイムを操作する。
【０１０１】
本発明のリボザイムには、テトラヒメナ・サーモフィラにおいて天然に生じるリボザイム（ＩＶＳまたはＬ－１９ＩＶＳ　ＲＮＡとして公知）などのＲＮＡエンドリボヌクレアーゼ（以後、「チェック（Ｃｅｃｈ）型リボザイム」）も含まれ、これらは、Ｔｈｏｍａｓ　Ｃｅｃｈ　ａｎｄ　ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｏｒｓ（Ｚａｕｇ，ｅｔ　ａｌ．，１９８４，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２４：５７４－５７８；Ｚａｕｇ　ａｎｄ　Ｃｅｃｈ，１９８６，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３１：４７０－４７５；Ｚａｕｇ，ｅｔ　ａｌ．，１９８６，Ｎａｔｕｒｅ，３２４：４２９－４３３；Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐａｔｅｎｔｓ　Ｉｎｃ．の国際公開特許出願番号ＷＯ８８／０４３００号；Ｂｅｅｎ　ａｎｄ　Ｃｅｃｈ，１９８６，Ｃｅｌｌ，４７：２０７－２１６）に広範に記載されている。チェック型リボザイムは、典型的には、標的ＲＮＡ配列とハイブリッド形成してその後に標的ＲＮＡが切断される８つの塩基対活性部位を有する。
【０１０２】
リボザイムを直接添加するか、リポソーム内にパッケージングしたカチオン性脂質と複合体を形成するか、標的細胞に送達させることができる。ＲＮＡまたはＲＮＡ複合体を、生体高分子中に組み込むか組み込まないで、注射、エアゾール吸入、注入ポンプまたはステントによって関連組織にｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで局所的に投与することができる。
【０１０３】
リボザイムを、当業者に公知の種々の方法（リポソームのカプセル化、イオン導入法、またはヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセル、および生体接着性ミクロスフェアなどの他の賦形剤への組み込みが含まれるが、これらに限定されない）によって細胞に投与することができる。いくつか示すために、リボザイムを、上記賦形剤と共にｅｘ　ｖｉｖｏで細胞または組織に直接送達させることができる。あるいは、ＲＮＡ／賦形剤組み合わせを、直接注射またはカテーテル、注入ポンプ、もしくはステントの使用によって局所的に送達させることができる。他の送達経路には、静脈内、筋肉内、皮下、または関節への注射、エアゾール吸入、経口（錠剤またはピルの形態）、局所、全身、眼内、腹腔内、および／または鞘内送達が含まれるが、これらに限定されない。リボザイムの送達および投与のより詳細な説明は、Ｓｕｌｌｉｖａｎ，ｅｔ　ａｌ．のＷＯ　９４／０２５９５号（その全体が本明細書中で参考として援用される）で提供されている。
【０１０４】
細胞内への高濃度のリボザイムの別の蓄積方法は、ＤＮＡ発現ベクターへのリボザイムコード配列の組み込みを含み得る。リボザイム配列の転写を、真核生物ＲＮＡポリメラーゼＩ（ｐｏｌＩ）、ＲＮＡポリメラーゼＩＩ（ｐｏｌＩＩ）、またはＲＮＡポリメラーゼＩＩＩ（ｐｏｌＩＩＩ）のプロモーターから駆動することができる。ｐｏｌＩＩまたはｐｏｌＩＩＩプロモーター由来の転写物を、細胞中に高レベルで発現することができ、所与の細胞型中の所与のｐｏｌＩＩプロモーターレベルは、近接して存在する遺伝子調節配列（エンハンサー、サイレンサーなど）の性質に依存する。原核生物ＲＮＡポリメラーゼ酵素が適切な細胞中で発現される場合、原核生物ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを使用することもできる（Ｅｌｒｏｙ－Ｓｔｅｉｎ，Ｏ．ａｎｄ　Ｍｏｓｓ，Ｂ．，１９９０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８７，６７４３－７；Ｇａｏ，Ｘ．ａｎｄ　Ｈｕａｎｇ；Ｌ．，１９９３，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．，２１，２８６７－７２；Ｌｉｅｂｅｒ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．，１９９３，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２１７，４７－６６；Ｚｈｏｕ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，１９９０，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，１０，４５２９－３７）。このようなプロモーターから発現したリボザイムが哺乳動物細胞中で機能することができることを証明している研究者もいる（例

えば、（Ｋａｓｈａｎｉ－Ｓａｂｅｔ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ａｎｔｉｓｅｎｓｅ Ｒｅｓ．Ｄｅｖ．，２，３－１５；Ｏｊｗａｎｇ，Ｊ．Ｏ．，ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９，１０８０２－６；Ｃｈｅｎ，Ｃ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，１９９２，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２０，４５８１－９；Ｙｕ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０，６３４０－４；Ｌ’Ｈｕｉｌｌｉｅｒ，Ｐ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，１９９２１，ＥＭＢＯ Ｊ．，１１，４４１１－８；Ｌｉｓｚｉｅｗｉｃｚ，Ｊ．，ｅｔ ａ．，１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，９０，８０００－４））。上記リボザイム転写単位を、哺乳動物細胞への移入のための種々のベクター（プラスミドＤＮＡベクター、ウイルスＤＮＡベクター（アデノウイルスまたはアデノ随伴ウイルスベクターなど）、またはウイルスＲＮＡベクター（レトロウイルス、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルスベクターなど）が含まれるが、これらに限定されない）に組み込むことができる。

【０１０５】

いくつかの実施形態によれば、標的ＲＮＡ（例えば、ＴＦＦ３ ｍＲＮＡ）を切断するヘアピンリボザイムを発現する転写単位を、プラスミドＤＮＡベクターまたはアデノウイルスもしくはアデノ随伴ＤＮＡウイルスベクターに挿入することができる。両ウイルスベクターを使用して、遺伝子を肺に導入し、両ベクターを一過性に発現させることができる（Ｚａｂｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９３ Ｃｅｌｌ ７５，２０７；Ｃａｒｔｅｒ，１９９２ Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．３，５３３）。アデノウイルスベクターを、組換えアデノウイルス粒子として送達させる。ＤＮＡを単独で送達させるか、送達体（ｖｅｈｉｃｌｅ）と複合体形成することができる（上記ＲＮＡについて記載）。ＤＮＡ、ＤＮＡ／送達体複合体、または組換えアデノウイルス粒子を、例えば、注射カテーテル、ステント、または注入ポンプの使用によって治療部位に局所投与することができるか、ｅｘ ｖｉｖｏで細胞または組織に直接添加する。

【０１０６】

（ＲＮＡｉ分子）

ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、最初に線虫であるエレガンス線虫の研究で発見された進化的に保存された遺伝子サイレンシング機構である（Ｌｅｅ ｅｔ ａｌ，Ｃｅｌｌ ７５：８４３（１９９３）；Ｒｅｉｎｈａｒｔ ｅｔａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４０３：９０１（２０００））。この機構は、適切な分子機構を発現する細胞へのｄｓＲＮＡ（二本鎖ＲＮＡ）の移入によって誘発され、その後に対応する内因性ｍＲＮＡが分解されると考えられている。この機構は、ｄｓＲＮＡのリボヌクレアーゼを相同なｍＲＮＡ標的に指向させる短いＲＮＡへの変換を含む（Ｒｕｖｋｕｎ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２９４：７９７（２００１）（本明細書中で参考として援用される）にまとめられている）。このプロセスは、ウイルスに対する正常な防御およびトランスポゾンの動員に関連する。ｄｓＲＮＡでの処置は、遺伝子機能生物（ｇｅｎｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｒｇａｎｉｓｍ）のより一般的な分析方法となっている。ＲＮＡ干渉、すなわち「ＲＮＡｉ」は、二本鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）が線虫に移入された場合に遺伝子発現を遮断することができることを説明するためにＦｉｒｅ ａｎｄ ｃｏ－ｗｏｒｋｅｒｓによって最初に造語された用語である（Ｆｉｒｅ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｎａｔｕｒｅ ３９１，８０６－８１１）。

【０１０７】

遺伝子発現のＲＮＡｉ媒介調節を実施するために使用されるＲＮＡｉ分子は、１つまたは複数の重合リボヌクレオチド鎖を含み得る。ＲＮＡｉ分子は、アンチセンス分子についての上記などに記載の任意の非常に多数の修飾（安定性または結合親和性を増強するためのリン酸塩－糖骨格、糖、または核酸塩基に対する修飾が含まれる）を含み得る。例えば、天然ＲＮＡのホスホジエステル結合を、少なくとも１つの窒素または硫黄ヘテロ原子を含むように修飾することができる。ＲＮＡ構造の修飾を、特異的に遺伝子を阻害しながらｄｓＲＮＡによって得られるいくつかの生物における一般的パニック応答を回避するように調節することができる。同様に、アデノシンデアミナーゼ活性を遮断するように塩基を

修飾することができる。ＲＮＡを、酵素または部分的／全体的有機合成によって産生することができる。任意の修飾リボヌクレオチドを、ｉｎ ｖｉｔｒｏ酵素合成または有機合成によってＲＮＡに組み込むことができる。ＲＮＡｉ分子は、ｄｓＲＮＡ分子であり得る。

【０１０８】

使用することができるＲＮＡｉ分子のサイズは、本発明のポリヌクレオチドのサイズによって変化し、ポリヌクレオチドの発現が抑制されて細胞中での本発明のポリヌクレオチドの発現の減少に有効となるほど十分に長い。一般に、ＲＮＡは、少なくとも約１０～約１５ヌクレオチド長である。特定の適用では、ＲＮＡは、約２０、２１、２２、２３、２４、または２５ヌクレオチド長未満である。他の例では、ＲＮＡは、少なくとも約５０、１００、１５０、または２００ヌクレオチド長である。さらに特定の他の適用では、ＲＮＡはより長くても良い（少なくとも約３００、４００、５００、または６００ヌクレオチドなど）。典型的には、ＲＮＡは、約３０００ヌクレオチド未満である。当業者は、任意の特定の本発明のポリヌクレオチドの至適サイズを、過度に実験することなく、合成様式でのＲＮＡサイズの変更および選択したサイズが本発明のポリヌクレオチド発現の干渉に有効であるかどうかの決定によって決定することができる。

【０１０９】

ＲＮＡｉ分子を、細胞あたり少なくとも１つのコピーを送達させる量で移入することができる。二本鎖材料の用量が高いほど（例えば、細胞あたり少なくとも５、１０、１００、５００、または１０００コピー）、より有効に阻害することができ、より低い用量も特定の適用に有用であり得る。ＲＮＡの二重鎖領域に対応するヌクレオチド配列を遺伝子阻害についてターゲティングするという点で、阻害は配列特異的である。利用可能な検出方法を使用して標的遺伝子発現を検出可能に変化させる（候補遺伝子が実際にＲＮＡを移入する細胞中で発現すると仮定する）ために十分なＲＮＡを組織に移入する。したがって、いくつかの例では、ＲＮＡが移入されていない細胞と比較して候補遺伝子発現を少なくとも５％～約１０％減少させるのに十分なＲＮＡを移入する。他の例では、阻害は、少なくとも約２０、３０、４０、または５０％である。さらに他の例では、阻害は、少なくとも約６０、７０、８０、９０、または９５％である。いくつかの例では、発現は、本質的に検出不可能なレベルまで完全に阻害される。

【０１１０】

ＲＮＡの移入量は、使用した投与様式、ＲＮＡのサイズ、ＲＮＡを投与する細胞数、ｄｓＲＮＡが動物に移入される場合の動物の年齢およびサイズなどの種々の要因に依存する。当業者は、例えば、いくつかの異なる濃度でＲＮＡを最初に投与することによって適量を決定することができる。ＲＮＡを細胞培養物に移入する特定の例では、細胞へのＲＮＡの移入量は、約０．５μｇ／10^6細胞から３μｇ／10^6細胞まで変化し得る。

【０１１１】

候補遺伝子発現の干渉を検出するため（すなわち、候補遺伝子サイレンシングを検出するため）に多数の選択肢を利用可能である。一般に、発現の阻害を、候補遺伝子によってコードされるタンパク質レベルの減少の検出、遺伝子から転写されたｍＲＮＡレベルの決定、および／または候補遺伝子発現に関連する表現型の変化の検出によって検出する。

【０１１２】

標的遺伝子（例えば、ＴＦＦ３ポリヌクレオチド）の一部と実質的に同一のヌクレオチド配列を含むＲＮＡを、ＲＮＡ阻害に使用することができる。標的配列が挿入、欠失、および単一の点変異を受けたＲＮＡ配列も阻害に有効であり得る。したがって、当該分野で周知なように、配列同一性を、例えば、デフォルトパラメーターを使用したＢＥＳＴＦＩＴソフトウェアプログラムで実行されるＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズム（例えば、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｃｏｍｐｕｔｉｎｇ Ｇｒｏｕｐ）による配列比較およびアラインメントアルゴリズムならびにヌクレオチド配列間の相違率の計算によって至適化することができる。いくつかの実施形態では、阻害ＲＮＡと標的遺伝子の一部との間で９０％超、さらに約１００％の配列が同一で

ある。あるいは、ＲＮＡの二重鎖領域を、標的遺伝子転写物の一部とハイブリッド形成する（例えば、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、４０ｍＭ　ＰＩＰＥＳ（ｐＨ６．４）、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、５０℃または７０℃で１２～１６時間のハイブリッド形成およびその後の洗浄）ことができるヌクレオチド配列と機能的に定義することができる。ＲＮＡヌクレオチド配列の長さは、少なくとも約１５、２０、２５、５０、１００、２００、３００、または４００塩基であり得る。

【０１１３】

本明細書中に開示されるように、ＲＮＡと標的遺伝子との間の配列が１００％同一であることは本発明の実施に必要ない。したがって、本発明は、遺伝子の変異、鎖の多型、または進化による相違に起因すると予想される配列のばらつきを許容することができるという利点を有する。しかし、いくつかの実施形態によれば、阻害ＲＮＡと標的遺伝子の一部との間の配列は１００％同一である。さらに、約７０％、８０％、９０％、または９５％を超える配列が同一なＲＮＡを本発明で使用することができるので、遺伝子の変異、鎖の多型、または進化による相違に起因すると予想される配列のばらつきを許容することができる。

【０１１４】

ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏでＲＮＡを合成することができる。細胞の内因性ＲＮＡポリメラーゼは、ｉｎ　ｖｉｖｏで転写を媒介することができるか、クローン化したＲＮＡポリメラーゼをｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏでの転写に使用することができる。ｉｎ　ｖｉｖｏでの導入遺伝子または発現構築物からの転写のために、調節領域（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー、スプライスドナーおよびアクセプター、ポリアデニル化）を使用して、ＲＮＡ鎖を転写することができる。器官、組織、または細胞型における特異的転写；活況条件の刺激（例えば、感染、ストレス、温度、化学的インデューサー）；および／または発生段階または年齢での転写の操作によって、阻害をターゲティングすることができる。ＲＮＡ鎖を任意選択的にポリアデニル化することができ、ＲＮＡ鎖は、任意選択的に、細胞の翻訳装置によってポリペプチドへ翻訳することができる。ＲＮＡを、手動または自動化反応によってさらに化学合成または酵素合成することができる。ＲＮＡを、細胞ＲＮＡポリメラーゼまたはバクテリオファージＲＮＡポリメラーゼ（例えば、Ｔ３、Ｔ７、ＳＰ６）によって合成することができる。発現構築物の使用および産生は当該分野で公知である（例えば、ＷＯ９７／３２０１６；米国特許第５，５９３，８７４号、同第５，６９８，４２５号、同第５，７１２，１３５号、同第５，７８９，２１４号、および同第５，８０４，６９３号を参照のこと）。化学的またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ酵素合成によって合成される場合、細胞への移入前にＲＮＡを精製することができる。例えば、溶媒または樹脂での抽出、沈殿、電気泳動、クロマトグラフィ、またはその組み合わせによって、混合物からＲＮＡを精製することができる。あるいは、サンプル処理による喪失を回避するために、ＲＮＡを精製しないか最小限に精製することができる。保存のために、ＲＮＡを乾燥させるか水溶液に溶解することができる。溶液は、二重鎖のアニーリングおよび／または安定化を促進するための緩衝液または塩を含み得る。

【０１１５】

本発明によれば、ＴＦＦ３ポリヌクレオチド配列の領域に類似するか実質的に同一な配列を有するＲＮＡを使用して、ＲＮＡ干渉機構などを介した細胞中のＴＦＦ３ポリヌクレオチドの発現を調節することができる。ＴＦＦ３発現のアンチセンス調節について上記で考察された任意の基準にしたがって、ターゲティングされた配列領域を選択することができる。いくつかの実施形態では、ＲＮＡは、任意の配列番号５から１９と実質的に同一であるか実質的に相補的な配列を含み得る。ＲＮＡはまた、任意の配列番号５～１９に対応する配列の一部または相補物と重複する配列を有し得る。

【０１１６】

アンチセンス分子の投与について本明細書中に記載のように、ＲＮＡを生物または患者に投与することができる。いくつかの実施形態によれば、ＲＮＡを細胞に直接移入するか

（すなわち、細胞内）、腔、間質腔、生物の循環系、経口に細胞外で移入するか、ＲＮＡを含む溶液中への生物の浸漬（ｂａｔｈｉｎｇ）によって移入することができる。経口移入法には、ＲＮＡと生物の食物との混合および食物として使用される種をＲＮＡが発現されるように操作し、その後罹患生物に供給する操作アプローチが含まれる。核酸の物理的移入方法（例えば、細胞への直接注射または生物への細胞外注射）も使用することができる。血管または血管外循環、血液またはリンパ系、師部、根、および脳脊髄液は、ＲＮＡを移入することができる部位である。組換え構築物からＲＮＡを発現するトランスジェニック生物を、適切な生物由来の接合体、胚幹細胞、または別の多能性細胞への構築物の移入よって産生することができる。

【０１１７】

核酸の物理的移入方法には、ＲＮＡを含む溶液の注射、ＲＮＡを被覆した粒子による粒子銃、ＲＮＡ溶液中への細胞または生物の浸漬、またはＲＮＡの存在下での細胞膜のエレクトロポレーションが含まれる。ウイルス粒子にパッケージングしたウイルス構築物によって、細胞への発現構築物の有効な移入および発現構築物によってコードされるＲＮＡの転写を行うことができる。脂質媒介キャリア輸送、化学物質媒介輸送（リン酸カルシウムなど）などの当該分野で公知の他の細胞への核酸の移入方法を使用することができる。したがって、ＲＮＡを、１つまたは複数の以下の活動を行う成分と共に移入することができる：細胞によるＲＮＡ取り込みの増強、二重鎖のアニーリングの促進、アニーリングした鎖の安定化、または他の標的遺伝子の増加阻害。

【０１１８】

標的遺伝子の発現阻害を、標的遺伝子（例えば、特異的抗体または当業者に公知の他の技術によってこれを検出することができる）および／もしくは標的遺伝子由来のｍＲＮＡ産物（例えば、ハイブリッド形成研究によってこれを検出することができる）によってコードされるタンパク質レベルならびに／または遺伝子発現に関連する表現型の非存在または観察可能な減少の観察または検出によって検証することができる。医学的治療の文脈では、標的遺伝子の発現阻害の検証を、病態の症状の軽減、寛解、変化などの被験体の病態の変化の観察によって行うことができる。いくつかの実施形態によれば、病態の変化は、腫瘍成長の遅延、腫瘍体積の減少、細胞移動性の減少、および細胞浸潤の減少などであり得る。好ましくは、阻害は特異的である（すなわち、標的遺伝子の発現を細胞の他の遺伝子に明らかに影響を与えることなく阻害する）。

【０１１９】

遺伝子阻害に有効な哺乳動物へのＲＮＡの投与量は、広範な種々の要因（投与経路、哺乳動物の年齢、サイズ、および条件、阻害される遺伝子、治療される疾患または障害などが含まれる）によって変化し得る。いくつかの実施形態によれば、ｄｓＲＮＡを、各細胞中に０．１～４００ｐｇ、好ましくは１～４０ｐｇ、最も好ましくは１～２０ｐｇとなるように投与することができる。

【０１２０】

ｉｎ ｖｉｖｏでの外因性付加または転写のいずれかにおけるＲＮＡｉの使用方法は、当該分野で公知である（Ｓｃｈｕｂｉｇｅｒ ａｎｄ Ｅｄｇａｒ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ（１９９４）４４：６９７－７１３およびＰＣＴ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ ＷＯ ９９／３２６１９（その全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。例えば、エレガント線虫において、ＲＮＡｉは、外陰前駆体細胞において腫瘍抑制遺伝子をノックアウトすることが示されている（Ｌｕ ａｎｄ Ｈｏｒｖｉｔｚ，Ｃｅｌｌ（１９９８）９５：９８１－９９１（その全体がその全体が本明細書中で参考として援用される））。

【０１２１】

ＲＮＡｉを使用した特定の遺伝子産物の発現の減少または抑制方法は、米国特許第６，５０６，５５９号および米国特許公開公報２００３００２７７８３号（哺乳動物における遺伝子発現阻害に関する）（それぞれその全体がその全体が本明細書中で参考として援用される）でさらに提供されている。

【０１２２】
（抗体）
中和剤はまた、ＴＦＦ３タンパク質に結合する抗体などの免疫グロブリンまたはそのフラグメントであり得る。免疫グロブリンには、抗体および抗原特異性を欠く他の抗体様分子が含まれる。後者のポリペプチド種を、例えば、リンパ系によって低レベルで産生するか、骨髄腫によって高レベルで産生する。
【０１２３】
「天然の抗体および免疫グロブリン」は、通常は、２つの同一の軽（Ｌ）鎖および２つの同一の重（Ｈ）鎖から構成される約１５０，０００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は、１つの共有結合性ジスルフィド結合によって重鎖と連結している一方で、ジスルフィド結合数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重鎖および軽鎖はまた、規則正しい空隙のある鎖内ジスルフィド結合を有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン（ＶＨ）を有し、その後に多数の定常ドメインを有する。
【０１２４】
任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、κおよびλと呼ばれる２つの明らかに異なる型のうちの１つに割り当てることができる。その重鎖の定常領域のアミノ酸配列に依存して、インタクトな抗体を、異なる「クラス」に割り当てることができる。
【０１２５】
各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン（ＶＬ）および他方の末端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは重鎖の定常ドメインと並行しており、軽鎖可変領域は重鎖可変領域と並行している。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間に接合部分を形成すると考えられている（Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１８６：６５１（１９８５；Ｎｏｖｏｔｎｙ ａｎｄ Ｈａｂｅｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．３０ ８２：４５９２（１９８５）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３（１９８９））。
【０１２６】
用語「抗体」を最も広い意味で使用し、完全にアセンブリされたポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体ならびに抗原に結合することができる抗体フラグメント（例えば、Ｆａｂ’、Ｆ’（ａｂ）$_2$、Ｆｖ、単鎖抗体、二重特異性抗体）を対象とする。
【０１２７】
本明細書中で使用される、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同種の抗体の集団から得た抗体をいう（すなわち、この集団を含む各抗体は、少量で存在し得る天然に存在する可能性のある変異以外は同一である）。
【０１２８】
本発明で使用される抗体中和剤の産生のための例示的技術に関して以下で説明する。
【０１２９】
１）抗体が閾値レベルの結合活性を示す場合、および／または２）抗体が公知の関連ポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、抗体は、「特異的に結合する」といわれる。当業者は、抗体の結合親和性を、例えば、Ｓｃａｔｃｈａｒｄ分析によって容易に決定することができる（Ｓｃａｔｃｈａｒｄ，Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．５１：６６０－６７２，１９４９）。いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、ＴＦＦ３に関連する他のタンパク質の少なくとも10^3倍、より好ましくは少なくとも10^4倍、より好ましくは少なくとも10^5倍、さらにより好ましくは少なくとも10^6倍でＴＦＦ３に結合する。
【０１３０】
いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、例えば、標準的なウェスタンブロット分析（Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．）を使用して抗体がＴＦＦ３ポリペプチドに結合するが、公知の関連ポリペプチドに結合しない場合、公知の関連ポリペプチド分子に特異的に結合しない（または認識しない）。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３ポリペプチドに特異

的に結合する抗体集団を単離するために、公知の関連ポリペプチドに対して抗体をスクリーニングすることができる。例えば、ＴＦＦ３ポリペプチドに対して特異的な抗体を、適切な緩衝液条件下で不溶性マトリクスに付着したＴＦＦ３ファミリーポリペプチド（ＴＦＦ３以外）を含むカラムに通過せる。このようなスクリーニングにより、密接に関連するポリペプチドに交差反応性を示さないポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が単離される（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（ｅｄｓ．），Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，１９８８；Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｃｏｏｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，１９９５）。特異的抗体のスクリーニングおよび単離は当該分野で周知である（Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｐａｕｌ（ｅｄｓ．），Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，１９９３；Ｇｅｔｚｏｆｆ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ．ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．４３：１－９８，１９８８；Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｇｏｄｉｎｇ，Ｊ．Ｗ．（ｅｄｓ．），Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ Ｌｔｄ．，１９９６；Ｂｅｎｊａｍｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：６７－１０１，１９８４を参照のこと）。このようなアッセイの代表的な例には、同時免疫電気泳動、放射性免疫アッセイ（ＲＩＡ）、放射性免疫沈降、免疫吸着アッセイ（ＥＲＩＳＡ）、ドットブロットまたはウェスタンブロットアッセイ、阻害または競合アッセイ、およびサンドイッチアッセイが含まれる。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、公知の関連ファミリーメンバーの少なくとも約１０００倍、少なくとも約１０，０００倍のＴＦＦ３に対する親和性を有する。いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３以外の関連ポリペプチドに対する本発明の抗体の結合親和性は、約1×10^{5} K_a未満、約1×10^{4} K_a未満、好ましくは約1×10^{3} K_a未満である。

【０１３２】

（ポリクローナル抗体）

ポリクローナル抗体を、関連抗原およびアジュバントの複数回の皮下（ｓｃ）注射、腹腔内（ｉｐ）注射、または筋肉内（ｉｍ）注射によって動物中で惹起することができる。二官能性薬剤または誘導体形成剤（ｄｅｒｉｖａｔｉｚｉｎｇ ａｇｅｎｔ）（例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基によって抱合）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リジン残基による）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、$SOCl_2$、または$R^1N=C=NR$（式中、ＲおよびＲ^{1}は異なるアルキル基である））を使用した免疫化すべき種中の免疫原性タンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビター）への関連抗原の抱合に有用であり得る。動物を、例えば、１００ｐｇのタンパク質または結合体（ウサギまたはマウス用）と３体積のフロイント完全アジュバントとの組み合わせおよび複数の部位への溶液の皮内注射によって抗原、免疫原性結合体、または誘導体に対して免疫化する。１ヶ月後、複数部位への皮下注射によって、動物を元の量の１／５～１／１０のペプチドまたは結合体を含むフロイント完全アジュバントで追加免疫を行う。７～１４日後、動物を交配し、抗体力価について血清をアッセイする。力価がプラトーに達するまで動物に追加免疫を行う。好ましくは、動物を、同一抗原であるが、異なるタンパク質と抱合しており、そして／または異なる架橋試薬を使用した結合体を使用して追加免疫する。結合体を、タンパク質融合物として組換え細胞培養物中で作製することもできる。また、ミョウバンなどの凝固剤を適切に使用して免疫応答を増強する。

【０１３３】

（モノクローナル抗体）

モノクローナル抗体は、実質的に同種の抗体の集団から得られる（すなわち、この集団

を含む各抗体は、少量で存在し得る天然に存在する可能性のある変異以外は同一である）。したがって、修飾語句である「モノクローナル」は、異なる抗体の混合物ではない抗体の特徴を示す。例えば、モノクローナル抗体を、Ｋｏｈｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）に最初に記載のハイブリドーマ法を使用して作製することができるか、組換えＤＮＡ法（米国特許第４，８１６，５６７号）によって作製することができる。

【０１３４】

ハイブリドーマ法では、マウスまたはウサギもしくはハムスターなどの他の適切な宿主動物を、免疫化のために使用されるタンパク質と特異的に結合する抗体を産生するか産生することができるリンパ球を誘発するために上記のように免疫化する。あるいは、リンパ球をｉｎ　ｖｉｔｒｏで免疫化することができる。次いで、ポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を使用してリンパ球を骨髄腫細胞と融合して、ハイブリドーマ細胞を形成する（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ．Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，ｐｐ．５９－１０３（Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，１９８６））。

【０１３５】

このようにして調製したハイブリドーマ細胞を、好ましくは、非融合の親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する１つまたは複数の物質を含む適切な培養培地中に播種して成長させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（ＨＧＰＲＴまたはＨＰＲＴ）を欠く場合、ハイブリドーマ用培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン（ＨＡＴ培地）（これらの物質はＨＧＰＲＴ欠損細胞の成長を防止する）を含む。

【０１３６】

例示的骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、ＨＡＴ培地などの培地に感受性を示す骨髄腫細胞であり、マウス骨髄腫株などの骨髄腫細胞株（Ｓａｌｋ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ　Ｃｅｎｔｅｒ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ　ＵＳＡから利用可能なＭＯＰＣ－２１およびＭＰＣ－１１マウス腫瘍由来の骨髄腫細胞が含まれる）、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ　ＵＳＡから利用可能なＳＰ－２細胞、ＮＺ０細胞、またはＸ６３－Ａｇ８－６５３細胞が含まれる。ヒトモノクローナル抗体産生のためのヒト骨髄腫細胞株およびマウスヒトヘテロミエローマ（ｈｅｔｅｒｏｍｙｅｌｏｍａ）細胞株も記載されている（Ｋｏｚｂｏｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１３３：３００１（１９８４）；Ｂｒｏｄｅｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　ａｎｄＡｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，ｐｐ．５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，１９８７））。

【０１３７】

ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地を、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）などのｉｎ　ｖｉｔｒｏ結合アッセイまたは放射性免疫アッセイ（ＲＩＡ）によって必要な特異性を有するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。抗体を発現する細胞の位置を、ＦＡＣＳによって検出することができる。その後、ハイブリドーマクローンを、限界希釈手順によってサブクローン化し、標準的な方法によって成長させることができる（Ｇｏｄｉｎｇ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ（１９８６）ｐｐ．５９－１０３）。この目的のために適切な培養培地には、例えば、ＤＭＥＭまたはＲＰＭＩ－１６４０培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞を、動物の腹水腫瘍としてｉｎ　ｖｉｖｏで成長させることができる。

【０１３８】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体を、従来の免疫グロブリン精製手順（例えば、プロテインＡ－Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ、ハイドロキシアパタイトクロマトグラ

フィ、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティクロマトグラフィなど）によって培養培地、腹水、または血清から適切に分離する。

【０１３９】

従来の手順（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブの使用による）を使用して、モノクローナル抗体をコードするＤＮＡを容易に単離し、配列決定する。ハイブリドーマ細胞は、このようなＤＮＡの供給源として役立つ。一旦単離されると、ＤＮＡを、発現ベクター中に配置し、免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルＣＯＳ細胞、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、または骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞中でモノクローナル抗体を合成する。抗体をコードするＤＮＡの細菌中での組換え発現に関する総論には、Ｓｋｅｒｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．，５：２５６－２６２（１９９３）およびＰｈｉｃｋｔｈｕｎ，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖｓ．，１３０：１５１－１８８（１９９２）が含まれる。

【０１４０】

さらなる実施形態では、抗体または抗体フラグメントを、ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４８：５５２－５５４（１９９０）に記載の技術を使用して作製した抗体ファージライブラリーから単離する。Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）およびＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２２：５８１－５９７（１９９１）は、ファージライブラリーを使用したマウス抗体およびヒト抗体の単離を記載している。その後の刊行物は、鎖シャフリング（Ｍａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１０：７７９－７８３（１９９２）（その全体が本明細書中で参考として援用される）ならびに組み合わせ感染および非常に巨大なファージライブラリーの構築ストラテジー（Ｗａｔｅｒｈｏｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．，２１：２２６５－２２６６（１９９３）（その全体が本明細書中で参考として援用される）による高親和性（ｎＭレンジ）ヒト抗体の産生を記載している。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための伝統的なモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術に対する実行可能な代替技術である。

【０１４１】

例えば、相同マウス配列の代わりに重鎖および軽鎖の構築物ドメインをコード配列に置換することか（米国特許第４，８１６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎ，ｅｔ ａｄ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｚ．ＵＳＡ，８１：６８５１（１９８４）（その全体が本明細書中で参考として援用される））または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全部または一部への免疫グロブリンコード配列の共有結合によってＤＮＡを修飾することもできる。典型的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドに抗体の定常領域を置換するか、抗体のある抗原組み合わせ部位の可変ドメインを置換して、抗原特異性を有するある抗原組み合わせ部位および異なる抗原に対する特異性を有する別の抗原組み合わせ部位を含む二価のキメラ抗体を作製する。

【０１４２】

さらに、例えば、種々の特許に記載のように、トランスジェニック動物中でＴＦＦ３に対する組換え抗体を産生することができる。例えば、米国特許第５，８７７，３９７号、同第５，８７４，２９９号、同第５，８１４，３１８号、同第５，７８９，６５０号、同第５，７７０，４２９号、同第５，６６１，０１６号、同第５，６３３，４２５号、同第５，６２５，１２６号、同第５，５６９，８２５号、同第５，５４５，８０６号、同第６，１６２，９６３号、同第６，１５０，５８４号、同第６，１３０，３６４号、同第６，１１４，５９８号、同第６，０９１，００１号、同第５，９３９，５９８号のいずれかに開示のように、組換え抗体をトランスジェニック動物（例えば、げっ歯類）で発現することができる。あるいは、米国特許第５，８４９，９９２号または同第５，８２７，６９０号で考察するように、組換え抗体を、トランスジェニック動物のミルク中で発現すること

ができる。

【０１４３】

（ヒト化抗体）

非ヒト抗体のヒト化方法は、当該分野で説明されている。好ましくは、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に移入された１つまたは複数のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基を、しばしば「移入」残基といい、典型的には、「移入」可変ドメインから受け継いでいる。Ｗｉｎｔｅｒ ａｎｄ ｃｏ－ｗｏｒｋｅｒｓの方法（Ｊｏｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３２１：５２２－５２５（１９８６）；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎ ｅｔ ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ，３３２：３２３－３２７（１９８８）；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎ ｅｔ ａｌ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２３９：１５３４－１５３６（１９８８））にしたがって、ヒト抗体の対応する配列の超可変領域配列への置換によってヒト化することができる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、キメラ抗体であり（米国特許第４，８１６，５６７号）、実質的にインタクト未満のヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応配列に置換されている。実際には、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかの超可変領域の残基およびおそらくいくつかのＦＲ残基がげっ歯類抗体中の類似の部位由来の残基に置換されたヒト抗体である。

【０１４４】

ヒト化抗体の作製で使用されるヒト可変ドメイン（軽鎖および重鎖の両方）の選択は抗原性に影響を与える。いわゆる「ベストフィット（ｂｅｓｔ－ｆｉｔ）」法にしがって、げっ歯類抗体の可変ドメインを、公知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリーに対してスクリーニングする。げっ歯類の配列に最も近いヒト配列は、ヒト化抗体のヒトフレームワーク領域（ＦＲ）として許可されている（Ｓｉｍｓ ｅｔａｌ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ，１５１：２２９６（１９９３）；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ，１９６：９０１（１９８７））。別の方法は、軽鎖または重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列由来の特定のフレームワーク領域を使用する。同一のフレームワークを、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用することができる（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｄ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９：４２８５（１９９２）；Ｐｒｅｓｔａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ：Ｉｍｍｕｎｏｌ，１５１：２６２３（１９９３））。

【０１４５】

抗原に対する高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持した抗体をヒト化することができる。この目的を達成するために、いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体を、親配列およびヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列および種々の概念ヒト化生成物の分析過程によって調製する。三次元免疫グロブリンモデルは市販されており、当業者に周知である。選択された候補免疫グロブリン配列の推定三次元立体構造を例示および標示するコンピュータプログラムを利用可能である。これらの表示の検討により、候補免疫グロブリン機能における残基の見込みのある役割を分析可能である（すなわち、候補免疫グロブリンのその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基を分析可能である）。この方法では、標的抗原に対する親和性の増加などの所望の抗体特性が達成されるように、レシピエント配列および移入配列からＦＲ残基を選択して組み合わせることができる。一般に、超可変領域の残基は、抗原結合への影響に直接且つ最も実質的に関与する。

【０１４６】

（ヒト抗体）

ヒト化の代替法として、ヒト抗体を生成することができる。上記で考察されるように、トランスジェニック動物における抗体（特に、ヒト抗体）の産生が公知である。例えば、免疫化の際に内因性免疫グロブリンを産生することなくヒト抗体の全レパートリーを産生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を産生することができる。例えば、キメラマウスおよび生殖系列変異マウスにおける抗体重鎖連結部（ＪＨ）遺伝子のホモ接合性欠失によって内因性抗体産生が完全に阻害されることが記載されている。このような生殖系列変異マウスへのヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子の導入により、抗原

の攻撃誘発時にヒト抗体が産生される。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｍａｄ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：２５５１（１９９３）；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３６２：２５５－２５８（１９９３）；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｎｉｍｕｎｏ．，７：３３（１９９３）；および米国特許第５，５９１，６６９号、どう第５，５８９，３６９号、および５，５４５，８０７号を参照のこと。あるいは、ファージディスプレイテクノロジー（ＭｃＣａｆｆｅｒｔｙ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３４８：５５２－５５３（１９９０）（その全体が本明細書中で参考として援用される））を使用して、非免疫化ドナー由来の免疫グロブリン可変（Ｖ）ドメイン遺伝子レパートリーからｉｎ ｖｉｔｒｏでヒト抗体および抗体フラグメントを産生することができる。この技術によれば、抗体Ｖドメイン遺伝子を、インフレームでＭ１３またはｆｄなどの糸状バクテリオファージの巨大（ｍａｊｏｒ）または微小な（ｍｉｎｏｒ）コートタンパク質のいずれかにクローン化し、ファージ粒子表面上の機能的抗体フラグメントとしてディスプレイする。糸状粒子がファージゲノムの一本鎖ＤＮＡコピーを含むので、抗体の機能特性に基づいた選択により、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子が選択される。したがって、ファージは、Ｂ細胞のいくつかの特性を模倣する。種々の形式でファージディスプレイを行うことでき、概説として、例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｋｅｖｉｎ Ｓ．ａｎｄ Ｃｈｉｓｗｅｌｌ，Ｄａｖｉｄ Ｊ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ ３：５６４－５７１（１９９３）を参照のこと。Ｖ遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイに使用することができる。Ｃｌａｃｋｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３５２：６２４－６２８（１９９１）では、免疫化マウスの脾臓由来のＶ遺伝子の小さな無作為の組合わせライブラリーから多様な抗オキサゾロン抗体系列が単離されている。非免疫化ヒトドナー由来のＶ遺伝子のレパートリーを構築することができ、多様な抗原系列（自己抗原が含まれる）に対する抗体を、本質的にＭａｒｋｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１－５９７（１９９１），ｏｒ Ｇｒｉｆｆｉｔｈ ｅｔａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１２：７２５－７３４（１９９３）に記載の技術にしたがって単離することができる。米国特許第５，５６５，３３２号および同第５，５７３，９０５号も参照のこと。ヒト抗体を、ｉｎ ｖｉｔｒｏ活性化Ｂ細胞によって生成することもできる（米国特許第５，５６７，６１０号および同第５，２２９，２７５号を参照のこと）。

【０１４７】

（抗体フラグメント）

抗体フラグメントの種々の産生技術が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントを、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化によって誘導した（例えば、Ｍｏｒｉｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ ａｎｄ Ｂｉｏｐｈｙｓｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４：１０７－１１７（１９９２）およびＢｒｅｎｎａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）を参照のこと）。しかし、これらのフラグメントを、組換え宿主細胞によって直接産生することもできる。例えば、フラグメントを、上記で考察した抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨフラグメントを、大腸菌から直接回収し、化学的にカップリングしてＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを形成することができる（Ｃａｒｔｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：１６３－１６７（１９９２）（その全体が本明細書中で参考として援用される））。別のアプローチによれば、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントを、組換え宿主細胞培養物から直接単離することができる。他の抗体フラグメントの他の産生技術は、当業者に明らかである。他の実施形態では、最適な抗体は、単鎖Ｆｖフラグメント（ｓｃＦｖ）である。ＷＯ９３／１６１８５；米国特許第５，５７１，８９４号；および米国特許第５，５８７，４５８号を参照のこと。例えば、米国特許第５，６４１，８７０号に記載のように、抗体フラグメントはまた、「直鎖抗体（ｌｉｎｅａｒ ａｎｔｉｂｏｄｙ）」であり得る。このような線状抗体フラグメントは、単一特異性または二重特異性であり得る。さらに、ファージディスプレイライブラリーで同定

された抗体フラグメントをコードする核酸を、クローン化し、配列決定し、任意のアイソタイプの原寸の抗体をコードして発現することができる核酸の一部であるように操作することができる。

【０１４８】

（二重特異性抗体）

二重特異性抗体の作製方法は、当該分野で公知である。全長二重特異性抗体の伝統的な産生は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づき、この２つの鎖は異なる特異性を有する（Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３０５：５３７－５３９（１９８３）（その全体が本明細書中で参考として援用される）。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の無作為な組合わせのために、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、１０個の異なる抗体分子の潜在的な混合物を産生し、そのうちの１つのみが正確な二重特異性構造を有する。アフィニティクロマトグラフィ工程によって行うことができる正確な分子の精製はむしろ煩雑であり、産生収率が低い。類似の手順は、ＷＯ９３／０８８２９号およびＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ，１０：３６５５－３６５９（１９９１）に開示されている。

【０１４９】

異なるアプローチによれば、所望の結合親和性を有する抗体可変ドメイン（抗体－抗原組合わせ部位）を、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合する。好ましくは、ヒンジ領域、ＣＨ２領域、およびＣＨ３領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインと融合する。いくつかの実施形態では、軽鎖結合に必要な部位を含む第１の重鎖定常領域（ＣＨ１）が、少なくとも１つの融合物に存在する。免疫グロブリン重鎖融合をコードするＤＮＡおよび所望ならば免疫グロブリン軽鎖を個別の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に同時トランスフェクトする。構築物中で使用された３つのポリペプチド鎖の比率が等しくないことにより最適な収率が得られる実施形態では、これにより、３つのポリペプチドフラグメントの相互比率の調節が非常に柔軟になる。しかし、少なくとも２つの同一の比率のポリペプチドの発現によって収率が高くなるか、比率が特に重要ではない場合、１つの発現ベクター中の３つのポリペプチド鎖のうちの２つまたは全てのコード配列を挿入することが可能である。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、一方のアーム中に第１の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖および他方のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖軽鎖対（第２の結合特異性をが得られる）を含む。二重特異性分子のたった半分における免疫グロブリン軽鎖の存在によって容易な分離方法が得られる場合、この非対称の構造により、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離が容易になることも見出された。このアプローチは、ＷＯ９４／０４６９０号に開示されている。二重特異性抗体生成のさらなる詳細については、例えば、Ｓｕｒｅｓｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，１２１：２１０（１９８６）を参照のこと。

【０１５１】

米国特許第５，７３１，１６８号に記載の別のアプローチによれば、抗体分子対間の接合部分を、組換え細胞培養から回収したヘテロ二量体の比率を最大にするように操作することができる。いくつかの実施形態では、接合部分は、抗体定常ドメインのＣＨ３ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第１の抗体分子の接合部分由来の１つまたは複数の小アミノ酸側鎖を、巨大な側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）に置換する。巨大アミノ酸鎖のより小さなアミノ酸鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）への置換によって、巨大側鎖と同一または類似のサイズの代償性の「空洞」を、第２の抗体分子の接合部分に作製する。これにより、ホモ二量体などの他の望ましくない最終産物を超えるヘテロ二量体の収率の増加機構が得られる。

【０１５２】

二重特異性抗体には、架橋抗体または「ヘテロ結合体」抗体が含まれる。例えば、ヘテ

ロ結合体中の一方の抗体をアビジンと結合し、他方をビオチンと結合させることができる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞の望ましくない細胞へのターゲティング（米国特許第４，６７６，９８０号）およびＨＩＶ感染の治療（ＷＯ９１／００３６０号およびＷＯ　９２／２００３７３号）が提案されている。任意の都合の良い架橋法を使用して、ヘテロ抱合抗体を作製することができる。適切な架橋剤は当該分野で周知であり、多数の架橋技術と共に米国特許第４，６７６，９８０号に開示されている。

【０１５３】

抗体フラグメント由来の二重特異性抗体の生成技術も文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体を、化学結合を使用して調製することができる。Ｂｒｅｎｎａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２２９：８１（１９８５）は、インタクトな抗体をタンパク質分解によって切断してＦ（ａｂ’）$_2$フラグメントを生成する手順を記載する。これらのフラグメントを、ジチオール錯化剤の存在下で還元して隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防止する。次いで、生成されたＦａｂ’フラグメントを、チオニトロベンゾエート（ＴＮＢ）誘導体に変換する。次いで、一方のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体を、メルカプトエチルアミンでの還元によってＦａｂ’－チオールに再変換し、同量の他方のＦａｂ’－ＴＮＢ誘導体と混合して、二重特異性抗体を形成する。産生された二重特異性抗体を、抗体の選択的固定のための試薬として使用することができる。

【０１５４】

最近の進歩により大腸菌からのＦａｂ－ＳＨフラグメントの直接回収が容易になり、このフラグメントを化学的に結合させて二重特異性抗体を形成することができる。Ｓｈａｌａｂｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１７５：２１７－２２５（１９９２）は、十分にヒト化された二重特異性抗体Ｆ（ａｂ’）$_2$分子の産生を記載している。各Ｆａｂ’フラグメントを、大腸菌から個別に分泌させ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの直接化学結合に供して二重特異性抗体を形成する。このようにして形成された二重特異性抗体は、ＥｒｂＢ２受容体および通常のヒトＴ細胞を過剰発現し、ヒト乳癌標的に対するヒト細胞傷害性リンパ球の溶解活性を誘発することができた。

【０１５５】

組換え細胞培養物由来の二重特異性抗体フラグメントの種々の作製および単離技術も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Ｋｏｓｔｅｌｎｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ；Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１４８（５）：１５４７－１５５３（１９９２）。ＦｏｓおよびＪｕｎタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドを、遺伝子融合によって２つの異なる抗体のＦａｂ’部分に結合した。抗体ホモ二量体のヒンジ領域を還元して単量体を形成し、再酸化して抗体ヘテロ二量体を形成した。この方法を、抗体ホモ二量体の産生に使用することもできる。Ｈｏｌｌｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９０：６４４４－６４４８（１９９３）によって記載された「ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）」テクノロジーにより、二重特異性抗体フラグメントの別の機構が得られた。フラグメントは、短すぎて同一鎖上の２つのドメイン間を対合できないリンカーによって軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）に連結した重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。

【０１５６】

したがって、一方のフラグメントのＶＨおよびＶＬドメインを別のフラグメントの相補的ＶＬドメインおよびＶＨドメインに強制的に対合させ、それによって２つの抗原結合部位を形成させる。単鎖Ｆｖ（ｓＦｖ）二量体の使用による二重特異性抗体フラグメント作製のための別のストラテジーも報告した。Ｇｒｕｂｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ；Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：５３６８（１９９４）を参照のこと。２つを超える結合価を有する抗体が意図される。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Ｔｕｔｔ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：６０（１９９１）。

【０１５７】

（結合体および中和剤の他の修飾）

本方法で使用されるか、本明細書中に記載の製造品に含まれる中和剤を、任意選択的に

、細胞傷害薬または治療薬に抱合することができる。例には、化学治療薬が含まれる。このような化学治療薬は、特定の癌の処置において確立された有効性を有し得る。

【０１５８】

中和剤と１つまたは複数の低分子である毒素（カリケアミシン（Ｃａｌｉｃｈｅａｍｉｃｉｎ）、マイタンシン（米国特許第５，２０８，０２０号）、トリコテンおよびＣＣ１０６５など）との結合体も本明細書中で意図される。いくつかの実施形態によれば、中和剤を、１つまたは複数のマイタンシン分子と抱合する（例えば、中和剤分子あたり約１～約１０個のマイタンシン分子）。マイタンシンを、例えば、Ｍａｙ－ＳＳ－Ｍｅに変換することができ、これを、Ｍａｙ－ＳＨ３に還元し、修飾中和剤と反応させて（Ｃｈａｒｉ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：１２７－１３１（１９９２））マイタンシノイド－中和剤結合体を生成することができる。

【０１５９】

あるいは、中和剤を、１つまたは複数のカリケアミシン分子に抱合する。抗生物質のカリケアミシンファミリーは、ピコモル以下の濃度で二本鎖ＤＮＡ破壊物（ｂｒｅａｋｓ）を産生することができる。カリケアミシンの構造アナログも公知である。（Ｈｉｎｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：３３３６－３３４２（１９９３）およびＬｏｄｅ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５８：２９２５－２９２８（１９９８））。

【０１６０】

使用することができる酵素活性毒素およびそのフラグメントには、ジフテリアＡ毒素、ジフテリア毒素の非結合活性フラグメント、外毒素Ａ鎖（緑膿菌由来）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデクシン（ｍｏｄｅｃｃｉｎ）Ａ鎖、α－サルシン、ジアンシン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、ヨウシュヤマゴボウタンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ニガウリインヒビター、クルシン（ｃｕｒｃｉｎ）、クロシン、サパロナリア・オフィシナリス（ｓａｐａｏｎａｒｉａ ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）インヒビター、ゲロニン（ｇｅｌｏｎｉｎ）、ミトゲリン（ｍｉｔｏｇｅｌｌｉｎ）、レストリクトシン（ｒｅｓｔｒｉｃｔｏｃｉｎ）、フェノマイシン（ｐｈｅｎｏｍｙｃｉｎ）、エノマイシン（ｅｎｏｍｙｃｉｎ）、およびトリコテシンが含まれる。例えば、ＷＯ９３／２１２３２号を参照のこと。

【０１６１】

本発明は、さらに、核酸分解活性を有する化合物（例えば、リボヌクレアーゼまたはデオキシリボヌクレアーゼ（ＤＮアーゼ）などのＤＮＡエンドヌクレアーゼ）と抱合した中和剤を意図する。種々の放射性同位体を、放射性抱合中和剤の産生で利用可能である。例には、Y^{90}、At^{211}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、およびＬｕの放射性同位体が含まれる。中和剤と細胞傷害薬との結合体を、種々の二官能性タンパク質カップリング剤（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピネート（ＳＰＤＰ）、スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート、イミノチオラン（ＩＴ）など）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートＨＣＬなど）、活性エステル（ジスクシンイミジル基質など）、アルデヒド（ａｉｄｅｈｙｄｅｓ）（グルタルアルデヒドなど）、ビスアゾ化合物（ビス（ｐ－アジドベンゾイル）ヘキサンジアミンなど）、ビス－ジアゾニウム誘導体（ビス－（ｐ－ジアゾニウムベンゾイル）－エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トリエン（ｔｏｌｙｅｎｅ）２，６－ジイソシアネートなど）、およびビス－活性フッ素化合物（１，５－ジフルオロ－２，４－ジニトロベンゼンなど）を使用して作製することができる。例えば、Ｖｉｔｅｔｔａ ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３８：１０９８（１９８７）に記載のように、リシン免疫毒素を調製することができる。^{14}Ｃ標識１－イソチオシアナトベンジル－３－メチルジエチレントリアミン五酢酸（ＭＸ－ＤＴＰＡ）は、放射性ヌクレオチドの中和剤への抱合のための例示的キレート剤である。例えば、Ｗ０９４／１１０２６号を参照のこと。リンカーは、細胞中の細胞傷害薬の放出を促進する「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受

性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー（Ｃｈａｒｉ ｅｔａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５２：１２７－１３１（１９９２））を使用することができる。あるいは、中和剤および細胞傷害薬を含む融合タンパク質を、例えば、組換え技術またはペプチド合成によって作製することができる。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、中和剤を、腫瘍プレターゲティング（ｐｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ）での使用のための「受容体」（ストレプトアビジンなど）に抱合することができ、中和剤－需要体結合体を、患者に投与し、その後透徹剤を使用して循環から非結合結合体を除去し、細胞傷害薬（例えば、放射性ヌクレオチド）に抱合した「リガンド」（例えば、アビジン）を投与する。本発明の中和剤を、プロドラッグ（例えば、ペプチジル化学治療薬、Ｗ０８１／０１１４５号を参照のこと）を抗癌薬に変換するプロドラッグ活性化酵素と抱合することもできる。例えば、ＷＯ８８／０７３７８号および米国特許第４，９７５，２７８号を参照のこと。

【０１６３】

このような結合体の酵素成分には、プロドラッグをより活性の高い細胞傷害形態に変換するような方法でプロドラッグに作用することができる任意の酵素が含まれる。本発明の方法で有用な酵素には、リン酸塩含有プロドラッグの遊離薬への変換に有用なアルカリホスファターゼ；硫酸塩含有プロドラッグの遊離薬への変換に有用なアリールスルファターゼ；非毒性５－フルオロシトシンの抗癌薬（５－フルオロウラシル）への変換に有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有プロドラッグの遊離薬への変換に有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、およびカテプシン（カテプシンＢおよびＬなど）などのプロテアーゼ；Ｄ－アミノ酸置換基を含むプロドラッグの変換に有用なＤ－アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシル化プロドラッグの遊離薬への変換に有用なβ－ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素；３－ラクタムで誘導体化した薬物の遊離薬への変換に有用な３－ラクタマーゼ；ならびにそのアミン窒素でフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基にてそれぞれ誘導体化された薬物の遊離薬への変換に有用なペニシリンＶアミダーゼまたはペニシリンＧアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、当該分野で「アブザイム」としても公知の酵素活性を有する抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離活性薬に変換することができる（例えば、Ｍａｓｓｅｙ，Ｎａｔｕｒｅ ３２８：４５７－４５８（１９８７）を参照のこと。アブザイムの腫瘍細胞集団への送達のために、中和剤－アブザイム結合体を本明細書に記載のように調製することができる。

【０１６４】

上記で考察したヘテロ二官能性架橋試薬の使用などの当該分野で周知の技術によって、酵素をＴＴＦＦ３中和剤に共有結合することができる。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能活性部分に連結した本発明の中和剤の少なくとも抗原結合部位を含む融合タンパク質を、当該分野で周知の組換えＤＮＡ技術を使用して構築することができる（例えば、Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３１２：６０４－６０８（１９８４）を参照のこと）。

【０１６５】

本明細書中で中和剤の他の修飾を意図する。例えば、中和剤を、種々の非タンパク質性ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレングリコールとプロピレングリコールとのコポリマー）の１つに結合することができる。本明細書中に記載の中和剤を、リポソームとして処方することができる。中和剤を含むリポソームを、Ｅｐｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｍａｄ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８２：３６８８（１９８５）；Ｈｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，７７：４０３０（１９８０）；米国特許第４，４８５，０４５号および同第４，５４４，５４５号；ならびにＷ０９７／３８７３１号などに記載の当該分野で公知の方法によって調製する。循環時間が延長されたリ

ポソームは、米国特許第５，０１３，５５６号に開示されている。

【０１６６】

特に有用なリポソームを、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびＰＥＧ誘導化ホスファチジルエタノールアミン（ＰＥＧ－ＰＥ）を含む脂質組成物を使用した逆相エバポレーション法によって生成することができる。定義した孔サイズのフィルターを介してリポソームを押し出し、それにより所望の直径のリポソームが得られる。本発明の抗体のＦａｂ’フラグメントを、ジスルフィド鎖間反応によって、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：２８６－２８８（１９８２）に記載のようにリポソームに抱合することができる。Ｇａｂｉｚｏｎ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．８１（１９）１４８４（１９８９）を参照のこと。本明細書中に記載のタンパク質またはペプチド中和剤のアミノ鎖配列の修飾を意図する。例えば、中和剤の結合親和性および／または他の生物学的性質を改善することが望ましい可能性がある。

【０１６７】

中和剤のアミノ酸配列を、中和剤の核酸への適切なヌクレオチド変化の移入またはペプチド合成によって調製する。このような修飾には、中和剤のアミノ酸配列内の残基の欠失および／または挿入および／または置換が含まれるが、これらに限定されない。最終構築物が所望の特徴を有するならば、正式な構築物に到達するように欠失、挿入、および置換の任意の組み合わせを行う。アミノ酸の変化により、中和剤の翻訳後プロセシングが変化し得る（グリコシル化部位の数または位置の変化など）。

【０１６８】

Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４４：１０８１－１０８５（１９８９）に記載のように、変異誘発のための位置である中和剤の特定の残基または領域の有用な同定方法を、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ぶ。ここで、残基または標的残基の群を同定し（例えば、ａｒｇ、ａｓｐ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、およびｇｌｕ）、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を与えるために中性または負電荷のアミノ酸（最も好ましくは、アラニンまたはポリアラニン）と置換する。次いで、置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸の位置を、置換部位または置換部位のためのさらなるまたは他の改変体の移入によって改良する。したがって、アミノ酸配列変異の移入部位を予め決定する一方で、変異の性質自体は予め決定する必要はない。例えば、所用の部位での変異のパフォーマンスを分析するために、標的コドンまたは領域でａｌａスキャニングまたはランダム変異誘発を行い、発現した中和剤改変体を所望の活性についてスクリーニングする。

【０１６９】

アミノ酸配列の挿入には、１残基から１００個またはそれ以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および／またはカルボキシ末端融合物ならびに１つまたは複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、Ｎ末端メチオニル残基を有する中和剤または細胞傷害性ポリペプチドに融合された中和剤が含まれる。中和剤分子の他の挿入改変体には、酵素中和剤のＮ末端またはＣ末端への融合または中和剤の血清半減期を増加させるポリペプチドが含まれる。

【０１７０】

改変体の別の型は、アミノ酸置換改変体である。これらの改変体は、異なる残基で置換された中和剤分子中に少なくとも１つのアミノ酸残基を有する。抗体中和剤の置換変異誘発の最も興味深い部位には超可変領域が含まれるが、ＦＲの変更も意図される。

【０１７１】

中和剤の生物学的性質の実質的改変を、（ｉ）例えば、シートまたはヘリックス立体構造としての置換領域中のポリペプチド骨格の構造、（ｉｉ）標的部位での分子の電荷または疎水性、または（ｉｉｉ）側鎖のかさ高さの維持に対するその効果が有意に異なる置換の選択によって行う。天然に存在する残基は、共通の側鎖の性質に基づいて以下の群に分類されている：

疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；

中性で親水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；
酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；
塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；
鎖の配向に影響を与える残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；および
芳香族：ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【０１７２】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを別のクラスのメンバーの交換を伴う。保存的置換は、同一クラス内のアミノ酸の交換を含む。

【０１７３】

中和剤の適切な立体構造の保持に関与しない任意のシステイン残基を、一般に、セリンに置換して、分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止することもできる。逆に、システイン結合を中和剤に付加して、その安定性を改善することができる（特に、中和剤がＦｖフラグメントなどの抗体フラグメントである場合）。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、置換改変体の型は、親抗体の１つまたは複数の超可変領域残基を含む。一般に、さらなる開発のために選択された得られた改変体は、改変体を生成した親抗体と比較して生物学的性質が改良されている。このような置換改変体の都合の良い生成方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟である。簡単に述べれば、いくつかの超可変領域部位（例えば、６～７部位）を変異させて、各部位で全てのアミノ置換を可能にする。このようにして生成された抗体改変体は、１価の様式で、各粒子内にパッケージングされたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物との融合物として糸状ファージ粒子からディスプレイされる。次いで、本明細書中に開示のように、ファージディスプレイされた改変体を、その生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。修飾のための候補超可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング変異誘発を行って、有意に抗原結合に寄与する超可変領域残基を同定することができる。あるいは、またはさらに、抗体と抗原の接点を同定するために抗原－抗体複合体の結晶構造を分析することが有利であり得る。このような接触残基および隣接残基は、本明細書中に詳述した技術による置換のための候補である。一旦そのような改変体が生成されると、改変体のパネルを、本明細書中に記載のスクリーニングに供し、１つまたは複数の関連アッセイにおいて優れた性質を有する抗体をさらなる開発のために選択することができる。

【０１７５】

本明細書中に記載の中和剤のアミノ酸改変体の別の型により、中和剤の元のグリコシル化パターンが変化する。「変化する」は、中和剤中に見出される１つまたは複数の炭水化物部分の欠失および／または中和剤中に存在しない１つまたは複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

【０１７６】

ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、Ｎ結合またはＯ結合である。Ｎ結合は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列であるアスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニン（式中、Ｘはプロリン以外の任意のアミノ酸）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合のための認識配列である。したがって、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。Ｏ結合グリコシル化は、糖であるＮ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの１つのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはトレオニンへの結合をいうが、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリジンも使用することができる。中和剤へのグリコシル化部位の付加を、アミノ酸配列が１つまたは複数の上記トリペプチド配列を含むようなアミノ酸配列の変更によって行う（Ｎ結合グリコシル化部位のため）。元の中和剤の配列への１つまたは複数のセリンまたはトレオニン残基の付加または置換によっても変更することができる（Ｏ結合グリコシル化部位）。

【０１７７】

中和剤のアミノ酸配列改変体をコードする核酸分子を、当該分野で公知の種々の方法によって調製する。これらの方法には、天然の供給源からの単離（天然に存在するアミノ酸配列改変体の場合）または前に調製された中和剤の改変体または非改変体バージョンのオリゴヌクレオチド媒介（または部位特異的）変異誘発、ＰＣＲ変異誘発、およびカセット変異誘発による調製が含まれるが、これらに限定されない。

【０１７８】

いくつかの実施形態では、例えば、中和剤の抗原依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）および／または補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の中和剤を修飾することが望ましいかもしれない。抗体中和剤のＦｃ領域中の１つまたは複数のアミノ酸置換の移入によってこれを行うことができる。あるいは、またはさらに、Ｆｃ領域中にシステイン残基を移入し、それによりこの領域中に鎖間ジスルフィド結合を形成することができる。このようにして生成されたホモ二量体抗体は、内在化能力が改善され、そして／または補体媒介性細胞死および抗体依存性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）が増大し得る。Ｃａｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１７６：１１９１－１１９５（１９９２）およびＳｈｏｐｅｓ，Ｂ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：２９１８－２９２２（１９９２）を参照のこと。Ｗｏｌｆｆ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ５３：２５６０－２５６５（１９９３）に記載のように、抗腫瘍活性が増大したホモ二量体抗体を、ヘテロ二官能性（ｈｅｔｅｒｏｂｉｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ）架橋剤を使用して調製することもできる。あるいは、２つのＦｃ領域を有し、それによって補体溶解およびＡＤＣＣ能力が増大し得る抗体を操作することができる。Ｓｔｅｖｅｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ａｎｔｉ－Ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ ３：２１９－２３０（１９８９）を参照のこと。

【０１７９】

例えば、米国特許第５，７３９，２７７号に記載のように、中和剤の血清半減期を増加させるために、サルベージ受容体結合エピトープを、中和剤に組み込むことができる。本明細書中で使用される、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、ＩｇＧ分子のｉｎ ｖｉｖｏ血清半減期の増加を担うＩｇＧ分子（例えば、ＩｇＧｌ、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４）のＦｃ領域のエピトープいう。

【０１８０】

本発明はまた、望ましい治療特性または診断特性を有する抗ＴＦＦ３抗体のスクリーニングを提供する。スクリーニングには、腫瘍細胞の増殖および／または接着、ＡＤＣＣ活性、またはＣＤＣ活性に影響を及ぼす抗ＴＦＦ３抗体を同定するアッセイ、抗アポトーシスアッセイ、細胞周期チェックポイントアッセイ、およびトランスジェニック非ヒト動物（例えば、マウスおよび他のげっ歯類）のｉｎ ｖｉｖｏアッセイに影響が含まれる。本発明はまた、前述の所望のタンパク質部分に結合し、所望の性質（例えば、カルシウム結合の遮断、二量体形成の遮断、鎖形成の遮断、および／またはＴＦＦ３ドメインアラインメントの干渉）を有する抗体を同定するためのスクリーニングを意図する。このような抗体を、ＴＦＦ３タンパク質またはそのフラグメントに対して得られる抗体集団について同定することができる。

【０１８１】

（他の中和剤形態）

中和剤は、プロドラッグの形態でもあり得る。用語「プロドラッグ」は、内因性の酵素もしくは他の化学物質の作用および／または条件によって体内またはその細胞内で活性形態（すなわち、薬物）に変換される不活性形態で調製された治療薬をいう。特に、核酸含有中和剤（アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、およびＲＮＡｉ分子などなど）のプロドラッグバージョンを、ＷＯ９３／２４５１０号またはＷＯ ９４／２６７６４号および米国特許第５，７７０，７１３号に開示の方法にしたがって、ＳＡＴＥ（（Ｓ－アセチル－２－チオエチル）ホスホネート）として調製することができる。

【０１８２】

中和剤はまた、薬学的に許容可能な塩の形態であり得る。用語「薬学的に許容可能な塩

」は、本発明の化合物の生理学的および薬学的に許容可能な塩（すなわち、親化合物の所望の生物活性を保持し、且つ望ましくない毒物学的影響を付与しない塩）をいう。核酸含有中和剤（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、およびＲＮＡｉ分子など）について、薬学的に許容可能な塩のいくつかの例には、（ａ）ナトリウム、カリウム、アンモニウム、マグネシウム、カルシウム、ならびにスペルミンおよびスペルミジンなどのポリアミンなどのカチオンで形成された塩；（ｂ）無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、および硝酸など）で形成された酸付加塩；（ｃ）有機酸（例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、安息香酸、パルミチン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンスルホン酸、メタンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、およびポリガラクツロン酸などなど）で形成された塩；および（ｄ）塩素、臭素、および要素などの元素アニオンから形成された塩が含まれる。

【０１８３】

（ポリヌクレオチド構築物）

ＴＦＦ３、ＴＦＦ３フラグメント、または抗体などのＴＦＦ３中和剤をコードするポリヌクレオチド分子を、ポリヌクレオチド構築物（ＤＮＡ構築物またはＲＮＡ構築物）に挿入することができる。本発明のポリヌクレオチド分子を、例えば、発現構築物中で使用して、宿主細胞中でタンパク質、改変体、融合タンパク質、または単鎖抗体の全部または一部を発現することができる。発現構築物は、選択した宿主細胞中で機能的なプロモーターを含む。当業者は、当該分野で公知であり、且つ使用されている非常に多数の細胞型特異的プロモーターか適切なプロモーターを容易に選択することができる。発現構築物はまた、宿主細胞中で機能的な転写ターミネーターを含み得る。発現構築物は、所望のタンパク質の全てまたは一部をコードするポリヌクレオチドセグメントを含む。ポリヌクレオチドセグメントは、プロモーターの下流に存在する。ポリヌクレオチドセグメントの転写は、プロモーターで開始される。発現構築物は、線状または環状であってよく、所望ならば、自律複製のための配列を含み得る。

【０１８４】

（宿主細胞）

ＴＦＦ３およびＴＦＦ３中和剤をコードする発現構築物を、宿主細胞に移入することができる。発現構築物を含む宿主細胞は、任意の適切な原核細胞または真核細胞であり得る。細菌の発現系には、Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２７５：６１５（１９７８）；Ｇｏｅｄｄｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２８１：５４４（１９７９）；Ｇｏｅｄｄｅｌ ｅｔａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．８：４０５７（１９８０）欧州特許第３６，７７６号；米国特許第４，５５１，４３３号；ｄｅＢｏｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８０：２１－２５（１９８３）；およびＳｉｅｂｅｎｌｉｓｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ２０：２６９（１９８０）に記載の発現系が含まれる。

【０１８５】

酵母発現系には、Ｈｉｎｎｎｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７５：１９２９（１９７８）；Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ １５３：１６３（１９８３）；Ｋｕｒｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：１４２（１９８６）；Ｋｕｎｚｅ ｅｔａｌ．，Ｊ Ｂａｓｉｃ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２５：１４１（１９８５）；Ｇｌｅｅｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ：Ｇｅｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１３２：３４５９（１９８６），Ｒｏｇｇｅｎｋａｍｐ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｇｅｎ．Ｇｅｎｅｔ．２０２：３０２（１９８６））；Ｄａｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５８：１１６５（１９８４）；Ｄｅ Ｌｏｕｖｅｎｃｏｕｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．１５４：７３７（１９８３），Ｖａｎ ｄｅｎ Ｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ８：１３５（１９９０）；Ｋｕｎｚｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂａｓｉｃ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２５：１４１（１９８５）；Ｃｒｅｇｇ ｅｔａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．５：３３

７６（１９８５）；米国特許第４，８３７，１４８号；米国特許第４，９２９，５５５号；Ｂｅａｃｈ ａｎｄ Ｎｕｒｓｅ，Ｎａｔｕｒｅ ３００：７０６（１９８１）；Ｄａｖｉｄｏｗ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．１０：３８０（１９８５）；Ｇａｉｌｌａｒｄｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．１０：４９（１９８５）；Ｂａｌｌａｎｃｅ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．１１２：２８４－２８９（１９８３）；Ｔｉｌｂｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ２６：２０５－２２（１９８３）；Ｙｅｌｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ，Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１：１４７０－１４７４（１９８４）；Ｋｅｌｌｙ ａｎｄ Ｈｙｎｅｓ，ＥＭＢＯ Ｊ．４：４７５４７９（１９８５）；欧州特許第２４４，２３４号；およびＷＯ９１／００３５７号に記載の発現系が含まれる。

【０１８６】

昆虫における異種遺伝子発現を、米国特許第４，７４５，０５１号；Ｆｒｉｅｓｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６）”Ｔｈｅ Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｂａｃｕｌｏｖｉｒｕｓ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ”ｉｎ：ＴＨＥ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ ＯＦ ＢＡＣＵＬＯＶＩＲＵＳＥＳ（Ｗ．Ｄｏｅｒｆｌｅｒ，ｅｄ．）；欧州特許第１２７，８３９号；欧州特許第１５５，４７６号；Ｖｌａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｇｅｎ．Ｖｉｒｏｌ．６９：７６５－７７６（１９８８）；Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．４２：１７７（１９８８）；Ｃａｒｂｏｎｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ７３：４０９（１９８８）；Ｍａｅｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：５９２－５９４（１９８５）；Ｌｅｂａｃｑ－Ｖｅｒｈｅｙｄｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．８：３１２９（１９８８）；Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：８４０４（１９８５）；Ｍｉｙａｊｉｍａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ ５８：２７３（１９８７）；およびＭａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，ＤＮＡ ７：９９（１９８８）に記載のように行うことができる。多数のバキュロウイルス株および改変体ならびに宿主由来の対応する許容昆虫宿主は、Ｌｕｃｋｏｗ ｅｔ ａｌ．，ＢｉｏｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（１９８８）６：４７－５５，Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔａｌ．，ｉｎ ＧＥＮＥＴＩＣ ＥＮＧＩＮＥＥＲＩＮＧ（Ｓｅｔｌｏｗ，Ｊ．Ｋ．ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．），Ｖｏｌ．８，ｐｐ．２７７－２７９（Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，１９８６）；およびＭａｅｄａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３１５：５９２－５９４（１９８５）に記載されている。

【０１８７】

哺乳動物発現を、Ｄｉｊｋｅｍａ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．４：７６１（１９８５）；Ｇｏｒｍａｎｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７９：６７７７（１９８２ｂ）；Ｂｏｓｈａｒｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ４１：５２１（１９８５）；および米国特許第４，３９９，２１６号に記載のように行うことができる。哺乳動物発現の他の特徴を、Ｈａｍ ａｎｄ Ｗａｌｌａｃｅ，Ｍｅｔｈ Ｅｎｚ．５８：４４（１９７９）；Ｂａｒｎｅｓ ａｎｄ Ｓａｔｏ，Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１０２：２５５（１９８０）；米国特許第４，７６７，７０４号；米国特許第４，６５７，８６６号；米国特許第４，９２７，７６２号；米国特許第 ４，５６０，６５５号；ＷＯ９０／１０３４３０号、ＷＯ８７／００１９５号、および米国特許再発行第３０，９８５号に記載のように促進することができる。

【０１８８】

発現構築物を、当該分野で公知の任意の技術を使用して宿主細胞に移入することができる。これらの技術には、トランスフェリン－ポリカチオン媒介ＤＮＡ導入、裸の核酸またはカプセル化核酸でのトランスフェクション、リポソーム媒介性細胞融合、ＤＮＡコーティングラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、エレクトロポレーション、「遺伝子銃」、およびリン酸カルシウム媒介性トランスフェクションが含まれる。

【０１８９】

（薬学的処方物）

凍結乾燥処方物または水溶液の形態の保存用の本発明のＴＦＦ３中和剤の治療処方物を、所望の純度の中和剤と任意選択的な薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））との混合によって調製することができる。許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、使用される投薬量および濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、および他の有機酸などの緩衝液；抗酸化剤（アスコルビン酸およびメチオニンが含まれる）；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；およびｍ－クレゾールなど）；低分子量（１０残基未満）のポリペプチド；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなど）；単糖類、二糖類、および他の炭水化物（グルコース、マンノース、またはデキストリンが含まれる）；キレート剤（ＥＤＴＡなど）；糖類（スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトールなど）；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；金属錯塩（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯塩）；および／または非イオン性界面活性剤（ＴＷＥＥＮ（登録商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）など）が含まれる。許容可能なキャリア、賦形剤、または安定剤は、中和剤の活性をさらに妨害しない。

【０１９０】

処方物はまた、１つを超える活性化合物を含み得る。いくつかの実施形態では、活性化合物は、互いに悪影響を与えない相補的活性を有する。例えば、細胞傷害薬、化学治療薬、またはサイトカインをさらに提供することが望ましいかも知れない。有効量のこのような他の薬剤は、処方物中の中和剤の存在量、癌処置の型、および上記で考察されている他の要因に依存する。これらを、一般に、本明細書中で使用した同じ用量および投与経路または前述の使用投薬量の約１～９９％を使用する。

【０１９１】

有効成分を、例えば、コアセルベーション技術または界面重合（例えば、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン－マイクロカプセルおよびポリ（エチルメタクリレート）マイクロカプセル）によって調製したマイクロカプセル、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルション、ナノ粒子、およびナノカプセル）、またはマクロエマルションに補足することもできる。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０）に介意持されている。

【０１９２】

徐放性調製物を調製することもできる。徐放性調製物の適切な例には、中和剤を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、このマトリクスは、造形品（例えば、フィルムまたはマイクロカプセル）の形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とエチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレンビニルアセテート、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー（ＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（登録商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射用ミクロスフェア）など）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸などが含まれる。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、滅菌注射用薬学的組成物の使用によって投与することができる。本明細書中で使用される、用語「注射用薬学的組成物」またはその改変体は、「注射用」についてのＵＳＰ要件（すなわち、滅菌、無発熱物質および無微粒子、特定のｐＨ値、および等張性）を満たす薬学的組成物をいう。濾過滅菌膜での濾過によって溶液処方物

を滅菌することができる。

【０１９４】

（中和剤での治療）

治療有効量のＴＦＦ３中和剤の癌を罹患しているか素因のある哺乳動物（例えば、ヒト）への投与によって、癌の処置または防止を行うことができる。同様に、類似の手段によって、腫瘍体積の減少方法、腫瘍成長の遅延方法、および／または腫瘍成長の防止方法を行うことができる。

【０１９５】

用語「治療」、「治療すること」、および「治療する」などを、本明細書中で、一般に、所望の薬理学的効果および／または物理学的効果の獲得をいうために使用される。効果は、疾患またはその症状の完全または部分的防止の点からすると予防効果であり、そして／または疾患の部分的もしくは完全な安定化もしくは治癒の点からすると治療効果であり、そして／または疾患に寄与する場合副作用であり得る。本明細書中で使用される、用語「治療」は、哺乳動物（特に、ヒト）の疾患の任意の治療を対象とし、（ａ）疾患または症状にかかりやすいが、以前として罹患していると診断されていない被験体由来の疾患または症状の防止、（ｂ）疾患の症状の抑制（すなわち、発症の停止）または疾患の症状の緩和（すなわち、結腸癌または別の消化器癌（例えば、胃癌）肝臓癌、乳癌、卵巣癌、または前立腺癌）などの疾患または症状の後退）が含まれる。

【０１９６】

用語「個体」、「被験体」、「宿主」、および「患者」は交換可能に使用され、診断、処置、または治療することが望ましい任意の哺乳動物被験体（特に、ヒト）をいう。他の被験体には、ウシ、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、およびウマなどが含まれ得る。

【０１９７】

ＴＦＦ３中和剤（例えば、抗体、ペプチド、アンチセンス分子、ＲＮＡｉ分子、リボザイム、または低分子）を含む組成物を、処方し、投与し、良好な医療行為と一致する様式で投与することができる。例えば、ＴＦＦ３中和剤は、ＴＦＦ３の活性を阻害するヒト抗体、キメラ抗体、または抗ＴＦＦ３抗体のｓｃＦｖ、抗体フラグメント、ペプチド、または低分子；またはＴＦＦ３発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド、ＲＮＡｉ分子、またはリボザイムである。この状況で検討される要因には、治療を受ける特定の癌処置をうける特定の哺乳動物、各患者の臨床症状、疾患または障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医師に公知の他の要因が含まれる。治療有効量の投与される中和剤を、このような検討材料によって支配され得る。

【０１９８】

中和剤の治療有効量は、中和剤で治療した患者の疾患または障害に関連する症状を改善または低減するのに十分な量である。いくつかの実施形態では、治療有効量は、腫瘍成長の防止、腫瘍成長の遅延、腫瘍体積の減少、癌細胞の浸潤性の減少、癌細胞の移動、接着、および／または増殖の阻害などによって癌の症状を低減することができる中和剤の量である。中和剤の治療有効量の決定方法および治療効果の評価方法は、当該分野で公知であり、本明細書中にさらに記載されている。

【０１９９】

投与あたりの非経口投与された治療有効量は、例えば、約０．１～３０ｍｇ／ｋｇ患者体重／日の範囲であり得るが、典型的な中和剤の初期使用範囲は、約２～１０ｍｇ／ｋｇの範囲である。しかし、上記のように、これらの示唆される中和剤の量は、治療上の判断に大きく委ねられ得る。上記のように、適切な用量および投与計画の選択要因は、得られた結果である。例えば、進行中および急性の疾患の治療のために、最初に比較的高い用量が必要であり得る。最も有効な結果を得るために、疾患または障害に依存して、中和剤を、疾患または障害の第１の徴候、診断、出現、または発症にできるだけ近づけて投与するか、疾患または障害の寛解時に投与する。

【０２００】

中和剤を、任意の適切な手段（非経口、皮下、腹腔内、肺内、および鼻腔内、局所免疫抑制薬治療が望ましい場合、病変内への投与が含まれる）によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下への投与が含まれる。

【０２０１】

さらに、中和剤を、例えば、漸減用量の中和剤のパルス注入によって適切に投与することができる。好ましくは、投与が短期間または慢性のいずれであるかに依存して、注射、最も好ましくは静脈内注射または皮下注射によって投与する。

【０２０２】

本明細書中に記載の中和剤と共に他の化合物（細胞傷害薬、化学治療薬、免疫抑制薬、および／またはサイトカインなど）を投与することができる。組合わせ投与には、個別の処方物または単一の薬学的処方物を使用した同時投与、いずれかの順序での連続投与が含まれるが、活性成分（ａｃｔｉｖｅ　ａｇｅｎｔ）の両方（または全部）がその生物活性を同時に発揮する期間が好ましい。

【０２０３】

核酸（アンチセンス分子、ＲＮＡｉ分子、またはリボザイム（任意選択的にベクター中に含まれる）など）の患者の細胞へのｉｎ　ｖｉｖｏおよびｅｘ　ｖｉｖｏでの挿入のためのアプローチは当該分野で多数存在する。ｉｎ　ｖｉｖｏ送達のために、核酸を通常は患者の中和剤が必要な部位に直接注射することができる。ｅｘ　ｖｉｖ治療のために、患者の細胞を取り出し、核酸をこれらの単離した細胞に移入し、改変された細胞を患者に直接投与するか、例えば、多孔質膜内にカプセル化して患者に移植する（例えば、米国特許第４，８９２，５３８号および同第５，２８３，１８７号を参照のこと）。生細胞への核酸の移入に利用可能な種々の技術が存在する。技術は、核酸がｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養細胞に導入されるか、ｉｎ　ｖｉｖｏで意図する宿主の細胞に導入するかによって変化する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの哺乳動物への核酸の導入に適切な技術には、リポソーム、エレクトロポレーション、微量注入、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などが含まれる。遺伝子のｅｘ　ｖｉｖｏ送達のために一般的に使用されるベクターは、レトロウイルスである。核酸を、水力学的送達（血管内注射の圧力を増加させる）によって投与することもできる。

【０２０４】

ｉｎ　ｖｉｖｏ核酸導入技術の例には、ウイルスベクター（アデノウイルス、単純ヘルペスウイルスＩ、またはアデノ随伴ウイルスなど）を使用したトランスフェクションおよび脂質ベースの系（例えば、遺伝子の脂質媒介導入のための有用な脂質はＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、およびＤＣ－Ｃｈｏｌである）が含まれる。いくつかの状況では、標的細胞をターゲティングする薬剤（細胞膜タンパク質または標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上の受容体のリガンドなど）と共に核酸供給源を提供することが望ましい。リポソームを使用する場合、エンドサイトーシスに関連する細胞膜タンパク質を使用して、例えば、特定の細胞型に向性を示すキャプシドタンパク質またはそのフラグメント、循環で内在化を受けるタンパク質に対する抗体、および細胞内局在化をターゲティングし、細胞内半減期を増強するタンパク質のターゲティングおよび／または取り込みを促進することができる。受容体媒介性エンドサイトーシス技術は、例えば、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）；およびＷａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８７：３４１０－３４１４（１９９０）に記載されている。

【０２０５】

本発明によれば、治療には、併用治療も含まれる。本明細書中で使用される、「併用治療」は、薬物を必要とする患者を、中和剤と組み合わせた疾患のための別の薬物で治療するか投与することを意味する。この併用治療は、患者を最初に１つまたは複数薬物で治療し、その後別の薬物で治療するか、２つまたはそれ以上の薬物を同時に投与する連続的治療であり得る。併用治療で使用することができる薬物のいくつかの例には、化学治療薬（シスプラチン、ドキソルビシン、ダヌルビシン（ｄａｎｕｒｕｂｉｃｉｎ）、タモキシフ

ェン、タキソール、メトトレキセートなど）、アロマターゼインヒビター、血管形成インヒビターの投与、特異的および非特異的免疫調節薬、生物反応修飾物質（ＢＲＭ）、コロニー刺激因子（ＣＳＦ）、インターフェロン、インターロイキン、自家腫瘍細胞ワクチン、ならびにホルモンなどが含まれる。好ましくは、組み合わせて投与される薬物または他の薬剤は、中和剤の治療活性を妨害しない。

【０２０６】

いくつかの実施形態では、中和剤の投与を、伝統的な癌処置と組み合わせることができる。好ましくは、伝統的癌処置は、中和剤の有効性を妨害も減少もしない。伝統的な癌処置のいくつかの例には、手術（例えば、冷凍外科手術、区域切除術、根治的前立腺摘除、腫瘍切除、乳房切除など）、化学治療、放射線治療（例えば、内部放射線治療、遠隔照射治療）、近接照射治療（例えば、元の腫瘍部位への直接的放射線送達および乳癌処置を行うための単一カテーテルを使用した照射時間の減少）、ならびにホルモンアブレーション治療（ホルモンレベルの減少）などが含まれる。

【０２０７】

本発明は、さらに、ＴＦＦ３中和剤への腫瘍の接触による、腫瘍体積の減少方法、腫瘍成長の遅延方法、および／または腫瘍成長の防止方法を提供する。接触をｉｎ　ｖｉｖｏで行い、任意の適切な手段によってＴＦＦ３中和剤に腫瘍を曝露することができる。例えば、腫瘍にＴＦＦ３中和剤を含む組成物を直接注射するかコーティングすることができるか、腫瘍を有する被験体または患者にＴＦＦ３中和剤を投与することができる。腫瘍体積および成長速度を、当該分野で公知の方法によって容易に測定することができる。

【０２０８】

さらに、組織または細胞におけるＴＦＦ３中和剤の生理学的効果（過剰発現ＴＦＦ３）を、患者へのＴＦＦ３中和剤の投与または細胞のＴＦＦ３中和剤との接触によって調節することができる。ＴＦＦ３の過剰発現に起因するいくつかの生理学的効果は上記で考察されており、例えば、細胞運動性（移動能力）の増加およびアポトーシス耐性が含まれる。

【０２０９】

細胞の運動性、移動、および潜在的浸潤性を、細胞のコンフルエントプレートに傷をつけることおよび創傷への細胞の移動の測定（例えば、低速度ビデオ顕微鏡または創傷を満たす時間）を含むアッセイによって評価することができる。２つの他のアッセイは、トランスウェルフィルターを使用し、細胞を多孔質トランスウェルのインサートの上部に入れ、下部のウェルまたはフィブロネクチンコーティングフィルターの底面への細胞の移動数を計数する。これらの後者の２つのアッセイは、「ボイデンチャンバー」アッセイの修正形態である。走化性（化学誘引物質を下部のウェルに入れることによる）、化学運動性（上部および下部の両方に運動性誘導化学物質を入れることによる）、および侵入（再構築した細胞外基質（マトリゲル）でのウェルのコーティングによる）を測定するために、トランスウェルアッセイをさらに修正することができる。

【０２１０】

アポトーシスまたはアポトーシス耐性を、任意の一般的な細胞傷害性アッセイによって測定することができる。細胞形態学、アガロースゲル上の特徴的な１８０ｂｐのＤＮＡラダーバンディングパターンの出現、ＴＵＮＥＬ（ＴｄＴ媒介ｄＵＴＰニック末端標識）アッセイ、フローサイトメトリー、ＤＮＡフラグメントＥＬＩＳＡ、および細胞膜の生物物理学摘性質の変化などの多数の方法が当該分野で公知である。システインプロテアーゼのカスパーゼ活性も細胞自殺経路の共通のメディエーターとして同定されており、カスパーゼ活性アッセイをアポトーシス検出に使用する方法に加えられている。乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）漏出アッセイを使用して、アポトーシスを検出または測定することもできる。多数のこのような方法を実施するためのキットが市販されている。

【０２１１】

細胞（ＴＦＦ３を特異的に発現する細胞など）を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｖｉｖｏ、またはｅｘ　ｖｉｖｏでＴＦＦ３中和剤に接触させることができる。本明細書中に記載の任意の処方／投与法または、例えば、ＴＦＦ３中和剤を含む培地への細胞の曝露によっ

て接触させることができる。例えば、細胞を、ＴＦＦ３中和剤が少なくとも部分的に細胞膜に浸透し、細胞中でＴＦＦ３ポリペプチドまたはＴＦＦ３ポリヌクレオチドと接触するのに十分な時間溶液または寒天培地で洗浄し、インキュベートし、または懸濁することができる。

【０２１２】

（処方、投薬量、薬学的組成物）

本発明の薬学的組成物を、局所治療または全身治療のいずれか望ましいかまたは治療領域に依存して多数の方法で投与することができる。投与は局所的（眼内および粘膜（膣および直腸送達が含まれる））、肺（例えば、粉末またはエアゾールの吸入または吹送（ネブライザーが含まれる））、気管内、鼻腔内、上皮、および経皮、経口、または非経口であり得る。非経口投与には、静脈内、動脈内、皮下、腹腔内、筋肉内への注射もしくは注入、または頭蓋内（例えば、鞘内または脳室内）への投与が含まれる。

【０２１３】

局所投与のための薬学的組成物および処方物には、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴薬、座剤、スプレー、液体、および粉末が含まれる。従来の薬学的キャリア、水性、粉末、油性の基剤、および増粘剤などが必要であるか望ましい。コーティングされたコンドームおよびグローブなども有用であり得る。

【０２１４】

経口投与のための組成物および処方物には、粉末もしくは顆粒、水性もしくは非水性媒体の懸濁液もしくは溶液、カプセル、サシェ、または錠剤が含まれる。増粘剤、香味物質、希釈剤、乳化剤、分散助剤、または結合剤が望ましい。

【０２１５】

非経口、鞘内、または脳室内投与のための組成物および処方物には、緩衝液、希釈剤、および他の適切な添加物（浸透増強剤、キャリア化合物、および他の薬学的に許容可能なキャリアまたは賦形剤などであるが、これらに限定されない）も含み得る滅菌水溶液が含まれ得る。

【０２１６】

本発明の薬学的組成物には、溶液、乳濁液、およびリポソーム含有処方物が含まれるが、これらに限定されない。これらの組成物を、種々の成分（予め形成された液体、自己乳化固体、および自己乳化半固体）から生成することができる。

【０２１７】

単位投薬形態で都合良く存在し得る本発明の薬学的処方物を、製薬産業で周知の従来の技術にしたがって、調製することができる。このような技術には、有効成分を薬学的キャリアまたは賦形剤と組み合わせる工程が含まれる。一般に、有効成分の液体キャリアまたは微粉化固体キャリアまたはその両方との均一且つ密接な組み合わせおよびその後の必要に応じた生成物の成形によって処方物を調製する。

【０２１８】

本発明の組成物を、任意の多数の可能な投薬形態（錠剤、カプセル、カプレット、液体シロップ、軟ゲル、座剤、および浣腸剤などであるが、これらに限定されない）に処方することができる。本発明の組成物を、水性、非水性、または混合媒体の懸濁液として処方することができる。水性懸濁液は、さらに、懸濁液の粘度を増大させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および／またはデキストラン）を含み得る。懸濁液は、安定剤も含み得る。

【０２１９】

いくつかの実施形態では、薬学的組成物をフォームとして処方し、使用することができる。薬学的フォームには、乳濁液、マイクロエマルション、クローム、ゼリー、およびリポソームなどの処方物が含まれるが、これらに限定されない。これらの処方物は基本的に性質が類似している一方で、処方物は、最終生成物の成分および稠度が異なる。このような組成物および処方物の調製は、一般に、薬学および製剤分野の当業者に公知であり、本発明の組成物の処方に適用することができる。

【０２２０】
「薬学的キャリア」または「賦形剤」は、１つまたは複数の核酸を動物に送達させるための薬学的に許容可能な溶媒、懸濁剤、または任意の他の薬学的に不活性な溶剤である。賦形剤は、液体でも固体でも良く、核酸と投与した薬学的組成物の他の成分とが組み合わせされた場合に、所望のかさ、稠度が得られるように、計画した投与様式を考慮して選択する。典型的な薬学的キャリアには、結合剤（例えば、アルファ化トウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドン、またはヒドロキシプロピルメチルセルロースなど）；充填剤（例えば、ラクトースおよび他の糖類、微結晶性セルロース、ペクチン、ゼラチン、リュ酸カルシウム、エチルセルロース、ポリアクリレート、またはリン酸水素カルシウムなど）；潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、シリカ、コロイド状二酸化ケイ素、ステアリン酸、金属ステアリン酸塩、硬化植物油、コーンスターチ、ポリエチレングリコール、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウムなど）；崩壊剤（例えば、デンプン、デンプングリコール酸ナトリウムなど）；および湿潤剤（例えば、ラウリル硫酸ナトリウムなど）が含まれるが、これらに限定されない。

【０２２１】
核酸と有害に反応しない非経口投与に適切な薬学的に許容可能な有機賦形剤または無機無形剤を使用して、本発明の組成物を処方することもできる。適切な薬学的に許容可能なキャリアには、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、およびポリビニルピロリドンなどが含まれるが、これらに限定されない。

【０２２２】
核酸の局所投与のための処方物には、滅菌および非滅菌水溶液、アルコールなどの一般的溶媒の非水性溶液、または液体または固体油性基剤の核酸溶液が含まれ得る。溶液はまた、緩衝液、希釈剤、および他の適切な添加物を含み得る。核酸と有害に反応しない非経口投与に適切な薬学的に許容可能な有機または無機賦形剤を使用することができる。

【０２２３】
適切な薬学的に許容可能な賦形剤には、水、塩溶液、アルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、ラクトース、アミロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、ヒドロキシメチルセルロース、およびポリビニルピロリドンなどが含まれるが、これらに限定されない。

【０２２４】
本発明の組成物は、さらに、その技術が確立された利用レベルで薬学的組成物中で従来どおり見出された他の副成分を含み得る。したがって、例えば、組成物は、さらなる適合性を示す薬学的に活性な材料（例えば、止痒薬、収斂剤、局所麻酔薬、または抗炎症薬など）を含み得るか、本発明の組成物の種々の投薬形態の物理的処方に有用なさらなる材料（色素、香味物質、防腐剤、抗酸化剤、乳白剤、増粘剤、および安定剤など）を含み得る。しかし、このような材料は、添加した場合、本発明の組成物の成分の生物活性を過度に妨害しないはずである。処方物を安定化し、所望ならば、処方物の核酸と有害に相互作用しない佐剤（例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を与える塩、緩衝液、色素、香味物質、および／または芳香剤など）と混合することができる。

【０２２５】
水性懸濁液は、懸濁液の粘度を増大させる物質（例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および／またはデキストラン）を含み得る。懸濁液は、安定剤も含み得る。

【０２２６】
本発明のいくつかの実施形態は、（ａ）１つまたは複数のアンチセンス化合物、（ｂ）非アンチセンス機構によって機能する１つまたは複数の他の化学治療薬を含む薬学的組成物を提供する。このような化学治療薬の例には、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラム

ブシル、メルファラン、シクロホスファミド、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン（ＣＡ）、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）、フロクスウリジン（５－ＦＵｄＲ）、メトトレキセート（ＭＴＸ）、コルヒチン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド、テニポシド、シスプラチン、およびジエチルスチルベストロール（ＤＥＳ）などの抗癌薬が含まれるが、これらに限定されない。一般に、Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，１５ｔｈ Ｅｄ．，Ｂｅｒｋｏｗ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９８７，Ｒａｈｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，ｐａｇｅｓ １２０６－１２２８を参照のこと。抗炎症薬（非ステロイド系抗炎症薬およびコルチコステロイドが含まれるが、これらに限定されない）および抗ウイルス薬（リビビリン（ｒｉｂｉｖｉｒｉｎ）、ビダラビン、アシクロビル、およびガンシクロビルが含まれるが、これらに限定されない）も本発明の組成物で組み合わせることができる。一般に、Ｔｈｅ Ｍｅｒｃｋ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ，１５ｔｈ Ｅｄ．，Ｂｅｒｋｏｗ ｅｔ ａｌ．，ｅｄｓ．，１９８７，Ｒａｈｗａｙ，Ｎ．Ｊ．，ｐａｇｅｓ ２４９９－２５０６および４６－４９をそれぞれ参照のこと。他の非アンチセンス化学治療薬も本発明の範囲内である。２つまたはそれ以上の組み合わせ化合物を同時または連続して使用することができる。

【０２２７】

（診断、予後、治療の評価（セラメトリクス（ｔｈｅｒａｍｅｔｒｉｃｓ））、および癌の管理）

本明細書中に記載のＴＦＦ３ポリヌクレオチドおよびその遺伝子産物は、発癌経路に沿った最も早期の変化を検出することができ、そして／または種々の治療および予防的介入の有効性をモニタリングするための遺伝子マーカーまたは生化学マーカーとしてさらに興味深い。例えば、ＴＦＦ３の発現レベルは、予後の悪さを示し得るので、患者はより積極的な化学治療または放射線治療を必要とし、逆もまた同様である。治療に応答した新規の代理（ｓｕｒｒｏｇａｔｅ）腫瘍に特異的な性質の患者の治療の応答および結果との相関は、腫瘍の分子プロフィールに基づいてオーダーメイド治療をデザイン可能な予後指標を定義することができる。これらの治療には、抗体ターゲティング、中和剤（例えば、低分子）、および遺伝子治療が含まれる。ＴＦＦ３発現の測定および患者のプロフィールと正常組織および疾患改変体における既知の発現との比較により、治療の特異性および患者の快適度の治療に関して患者に最良で可能な治療を決定することができる。ポリヌクレオチド発現などの代理腫瘍マーカーを使用して、より良好に分類し、それにより、癌の異なる形態および病状を診断および治療することもできる。本明細書中に記載のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現レベルの同定から恩恵を受けることができる腫瘍学で広範に使用されている２つの分類は、癌性障害の病期分類および癌組織の性質の悪性度分類である。

【０２２８】

ＴＦＦ３発現の測定は、全体的な形態学的レベルで検出可能である前に分子レベルで潜在的に悪性事象を検出するための癌を罹患しているか癌に感受性を示す患者のモニタリングに有用であり得る。さらに、ＴＦＦ３ポリヌクレオチドおよびこのようなポリヌクレオチドに対応する遺伝子は、例えば、治療前、治療中、および治療後に患者の全身腫瘍組織量を評価するためにポリヌクレオチドまたはそのコードされた遺伝子産物の使用によって治療有効性を評価するためのセラメトリクスとして有用であり得る。

【０２２９】

さらに、一方の癌型で特異的に発現される遺伝子に対応すると同定されたポリヌクレオチドはまた、例えば、ポリヌクレオチドが種々の癌型の間で特異的に発現される遺伝子を示す場合、他方の癌型の発症が予測されるか、発症リスクを有し得る。したがって、例えば、転移結腸癌が臨床的に予測される遺伝子に対応するポリヌクレオチドの発現により、胃癌または子宮内膜癌も臨床的に予測され得る。

【０２３０】

（病期分類）

病期分類は、患者の癌の状態がいかにして進行しているかを説明するために医師によって使用される過程であり、病期分類は、医師の予後の決定、治療計画、およびこのような治療の結果の評価を補助する。病期分類システムは、癌の型によって異なるが、一般に、以下の「ＴＮＭ」システムを含む：腫瘍の型（Ｔで示す）、癌が隣接するリンパ節に転移しているかどうか（Ｎで示す）、および癌がより離れた身体各部に転移しているかどうか（Ｍで示す）。一般に、癌がいかなるリンパ節にも広がらずに原発性病変領域のみで検出可能な場合、病期Ｉと呼ばれる。癌が最も近いリンパ節まで広がっている場合、病期ＩＩと呼ばれる。病期ＩＩＩでは、一般に、癌が原発性病変部位から近位のリンパ節まで広がっている。肝臓、骨、脳、または他の部位などの体内の離れた部位に広がっている癌は、病期ＩＶであり、最も進行している病期である。

【０２３１】

本明細書中に記載のポリヌクレオチドは、癌の浸襲性（例えば、転移可能性）および体内の異なる領域における存在のマーカーの同定によって病期分類過程の微調節を容易にすることができる。したがって、転移可能性の高い癌を示すポリヌクレオチドを有する病期ＩＩの癌を使用して、病期ＩＩの腫瘍と病期ＩＩＩとの境界を変更し、より積極的な治療を示すことができる。逆に、低い転移可能性を示すポリヌクレオチドの存在により、腫瘍の病期分類をより控えることが可能である。

【０２３２】

（癌の悪性度分類）

悪性度は、腫瘍がその同一の型の正常組織といかにして密接に類似しているかを説明するために使用される用語である。腫瘍の顕微鏡による外観を使用して、細胞形態学、細胞組織化、および他の分化マーカーなどのパラメーターに基づいて腫瘍悪性度を同定する。一般的な規則として、腫瘍の悪性度は、その成長または増殖速度に対応し、未分化または高悪性度の腫瘍は一般に十分に分化しているか低悪性度の腫瘍よりも浸襲性が高い。腫瘍の悪性度分類のために以下のガイドラインが一般に使用されている：１）ＧＸ：悪性度を評価することができない；２）Ｇ１：十分に分化している；Ｇ２：中程度に十分分化している；３）Ｇ３：分化が不十分である；４）Ｇ４：未分化。本発明によって意図されるポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドが腫瘍細胞の分化状態を補助することができるだけでなく、腫瘍の浸襲性（転移可能性など）で有益な分化以外の要因も同定することができるので、腫瘍の悪性度分類の決定で特に有益であり得る。

【０２３３】

（癌の検出）

ＴＦＦ３の発現パターンを使用して、被験体の癌、特に、結腸癌、乳癌、および前立腺癌を検出することができる。結腸直腸癌は、ヒトにおける最も一般的な新生物の１つであり、おそらく、最も頻繁な遺伝性新形成型である。結腸直腸癌の制御および治癒において予防および早期発見が重要な要因である。結腸直腸癌は、ポリープから出発し、これは、結腸の内層で形成される小さく良性の細胞成長である。数年にわたり、いくつかのこれらのポリープがさらなる変異を蓄積し、癌化する。複数の家族性結腸直腸癌障害が同定されており、以下にまとめる：１）家族性腺腫性ポリポーシス（ＦＡＰ）；２）ガードナー症候群；３）遺伝性非ポリポーシス結腸癌（ＨＮＰＣＣ）；および４）アシュケナージ系ユダヤ人における家族性結腸直腸癌。適切なポリヌクレオチドの発現を、癌の診断、予後、および管理で使用することができる。ＴＦＦ３配列のみまたは他の遺伝子と組み合わせたＴＦＦ３の発現レベルを使用して、癌の検出を測定することができる。結腸癌の浸襲性および／または転移可能性を、本明細書中に記載のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の１つまたは複数の遺伝子産物レベルの比較および癌組織中で変化することが公知の別の配列（例えば、ｐ５３、ＤＣＣ、ｒａｓ、ＦＡＰの発現）の全レベルの比較によって測定することができる（例えば、Ｆｅａｒｏｎ ＥＲ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ（１９９０）６１（５）：７５９；Ｈａｍｉｌｔｏｎ ＳＲ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ（１９９３）７２：９５７；Ｂｏｄｍｅｒ Ｗ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｇｅｎｅｔ．（１９９４）４（３）：２１７；Ｆｅａｒｏｎ ＥＲ，Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．（１９９５）

７６８：１０１）を参照のこと）。例えば、癌の発症を、本明細書中に記載のポリヌクレオチドに対応するＴＦＦ３の発現レベルと癌遺伝子（例えば、ｒａｓ）または腫瘍抑制遺伝子（例えば、ＦＡＰまたはｐ５３）のレベルとの比較によって検出することができる。したがって、特異的マーカーのポリヌクレオチドの発現を使用して、正常結腸組織と癌性結腸組織とを区別するか、元の細胞が異なる癌を区別するか、異なる潜在的転移速度を有する癌を区別することができる。癌マーカーの概説については、例えば、Ｈａｎａｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｃｅｌｌ　１００：５７－７０（その全体が本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

【０２３４】

（癌の処置）

本発明は、ＴＦＦ３発現によって特徴づけられた癌細胞の成長を阻害する方法および／または癌の接着、移動、および／または転移の調節方法を提供する。その例には、消化器癌（結腸癌、胃癌など）、肝臓癌、他の癌（肺癌、乳癌、卵巣癌、および前立腺癌など）が含まれる。いくつかの実施形態では、癌は、異なるＴＦＦ３発現を示す。さらなる実施形態では、ＴＦＦ３は、癌で上方制御される。なおさらなる実施形態では、癌は、結腸癌以外であり、他の実施形態では、癌は前立腺癌以外である。

【０２３５】

本発明は、ＴＦＦ３中和剤の投与によって癌細胞成長、癌細胞移動、癌細胞の接着および／または転移の少なくとも１つが調節（例えば、阻害）される任意の癌の処置を含む。実施例に示すように、ＴＦＦ３中和剤が、癌細胞の接着および癌細胞の増殖を阻害することを証明した。接着阻害は、癌細胞が接着して元の腫瘍と異なる部位に腫瘍を発症する能力の阻害による転移に対する調節効果を有し得る。一般に、方法は、癌細胞を、（１）ＴＦＦ３に対応するポリヌクレオチドの発現、または（２）ＴＦＦ３ポリペプチドのレベルおよび／または活性を調節する分子に接触させる工程を含む。方法は、癌細胞中のＴＦＦ３発現の減少またはＴＦＦ３レベルの減少および／またはＴＦＦ３活性の減少を提供する。この阻害により、癌細胞の増殖、移動、および／または接着、腫瘍成長の減少、腫瘍体積の減少、および腫瘍浸潤性の減少などが起こり得る。

【０２３６】

「腫瘍または癌細胞の成長の減少」には、癌（または腫瘍）細胞増殖の減少、非癌細胞の癌細胞への罹患の減少が含まれるが、これらに限定されない。癌細胞成長が減少したかどうかを、任意の公知のアッセイ（［^{3}Ｈ］－チミジン組み込み、長期間にわたる細胞の計数；結腸癌に会合したマーカー（例えば、ＣＥＡ、ＣＡ１９－９、およびＬＡＳＡ）の検出および／または測定などが含まれるが、これらに限定されない）を使用して容易に決定することができる。

【０２３７】

本発明は、特に、癌細胞成長を減少させて癌を治療するのに十分な量で、癌細胞成長を減少させる物質を必要とする個体に投与する工程を含む、結腸癌、乳癌、および／または前立腺癌などのＴＦＦ３関連癌の処置方法を提供する。物質または物質の特定の量が患者の癌処置に有用であるかどうかを、任意の種々の公知の癌診断アッセイ（Ｓ状結腸鏡検査法、直腸鏡検査法、直腸検査、生検を使用した結腸鏡検査、造影剤によるＸ線検査、ＣＡＴスキャン、血管造影法、および個体の血液中の結腸癌に会合する腫瘍マーカーの検出が含まれるが、これらに限定されない）を使用して評価することができる。基質を、全身または局所に投与することができる。局所投与は、例えば、固形腫瘍の治療に有用であり得る。

【０２３８】

（ＴＦＦ３の検出を含む診断および他の方法）

本発明は、診断のための本明細書中に記載のＴＦＦ３中和剤、ＴＦＦ３ポリペプチド、およびＴＦＦ３ポリヌクレオチドの使用方法および他の方法を提供する。特定の非限定的実施形態では、本方法は、ＴＦＦ３関連癌細胞（結腸癌細胞、乳房癌細胞、卵巣癌細胞、胃癌細胞、および前立腺癌細胞など）の検出、被験体の癌および癌の重症度（例えば、腫

瘍の悪性度および全身腫瘍細胞量など）の診断の円滑化、被験体の予後の決定の円滑化、被験体の治療に対する応答の評価（例えば、化学治療の投与計画中またはその後の全身腫瘍細胞量の評価による治療効果の測定による）に有用である。検出は、細胞（例えば、結腸癌細胞）中のＴＦＦ３レベルの検出および／または癌細胞中のＴＦＦ３ポリペプチドの検出に基づき得る。本発明の検出方法を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏもしくはｉｎ　ｖｉｖｏ、単離細胞上、または全組織もしくは体液（例えば、血液、結晶、血清、および尿など）中で行うことができる。

【０２３９】

したがって、本発明は、サンプルの接触およびサンプル中のＴＦＦ３の異なる発現の証拠の検出による、生物学的サンプル中のＴＦＦ３の検出方法および生物学的サンプル中の癌の存在の検出方法を提供する。証拠は、サンプル中のＴＦＦ３中和剤とＴＦＦ３との結合の形態であり得る。結合レベルの多数の検出方法および測定方法は当該分野で公知であり、例えば、およびＥＬＩＳＡベースのアレイなどである。結合レベルを標準サンプルと比較して、ＴＦＦ３発現が正常なサンプルよりも低いか高いかを示すことができる。いくつかの実施形態では、正常なＴＦＦ３発現を超える検出は、癌の存在を示す。

【０２４０】

本発明は、さらに、患者の癌サンプル中の異なるＴＦＦ３発現の証拠の検出による、ＴＦＦ３中和剤に対する患者の感受性の決定方法を提供する。本明細書中で使用される、用語「感受性」は、ＴＦＦ３中和剤の投与が許容される治療方法である患者を説明することができる（すなわち、この用語は、ＴＦＦ３中和剤への治療に正に応答する可能性が高い患者を説明する）。本発明の治療方法に感受性を示す癌患者は、例えば、罹患組織で、治療に感受性を示さない患者と比較して、異なるＴＦＦ３発現を示すことができる。

【０２４１】

本発明の検出方法を、キットの一部として提供することができる。したがって、本発明は、さらに、生物学的サンプル中の癌細胞中で発現されたＴＦＦ３（例えば、関心のある発現量の異なる遺伝子にコードされたｍＲＮＡの検出によって）および／またはコードされるポリペプチドの存在および／またはレベルの検出用キットを提供する。これらのキットを使用した手順を、臨床検査室、実験室、開業医、または個人で実施することができる。結腸癌細胞で特異的に発現されたポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドを検出するための本発明のキットは、ポリペプチドに特異的に結合する部分を含み、この部分は、特異抗体、アンチセンス分子、ＲＮＡｉ分子、リボザイム、または低分子であり得る。癌細胞中で特異的に発現されたポリヌクレオチドを検出するための本発明のキットは、このようなポリヌクレオチドと特異的にハイブリッド形成する部分を含む。キットは、任意選択的に、手順で有用なさらなる構成要素（緩衝液、現像試薬、標識、反応表面、検出手段、コントロールサンプル、標準、説明書、および説明用情報が含まれるが、これらに限定されない）を提供することができる。

【０２４２】

（癌細胞中のＴＦＦ３ポリペプチドの検出）

いくつかの実施形態では、ＴＦＦ３細胞の過剰発現の検出によるＴＦＦ３関連癌細胞の検出方法を提供する。任意の種々の公知の方法を検出に使用することができ、この方法には、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）および放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）などの免疫アッセイによるコードされたポリペプチドに特異的な抗体を使用した免疫アッセイならびにコードされたポリペプチドの機能アッセイ（例えば、結合活性または酵素活性）が含まれるが、これらに限定されない。

【０２４３】

例えば、免疫蛍光アッセイを、コードされたポリペプチドを最初に単離することなく、細胞に対して行うことができる。細胞を、最初に顕微鏡用スライドまたはマイクロタイターウェルなどの固体支持体上に固定する。この固定工程により、細胞膜を透過化することができる。細胞膜の透過化により、ポリペプチドが特異的抗体に結合することが可能となる。次に、固定化細胞を、コードされたポリペプチドに特異的な抗体に曝露する。アッセ

イの感度を増加させるために、固定化細胞を、標識されており、第１の抗体に結合し、コードされたポリペプチドに特異的な第２の抗体にさらに曝露することができる。典型的には、二次抗体を、例えば、蛍光マーカーを使用して検出可能に標識する。コードされたポリペプチドを発現する細胞を蛍光標識し、顕微鏡で容易に観察する。例えば、Ｈａｓｈｉｄｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｌｚｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍ．１８７：１２４１－１２４８を参照のこと。

【０２４４】

本明細書を読みことによって当業者に容易に明らかなように、本明細書中に記載の検出方法および他の方法を容易に変化させることができる。このような変形形態は、本発明の意図する範囲内である。例えば、上記検出スキームでは、検出用プローブを固体支持体に固定し、サンプルを固定したプローブと接触させることができる。次いで、プローブへの試験サンプルの結合を、種々の方法（例えば、試験サンプル固定化プローブ複合体の検出を容易にするための試験サンプルに結合した検出可能な標識の検出による）で検出することができる。

【０２４５】

本発明は、さらに、ＴＦＦ３に特異的な抗体を使用した生物学的サンプル中のＴＦＦ３ポリペプチドの存在の検出方法および／またはレベルの測定方法を提供する。本方法は、一般に、ａ）サンプルをＴＦＦ３に特異的な抗体に接触させる工程と、ｂ）抗体とサンプル分子との間の結合を検出する工程とを含む。

【０２４６】

適切なコントロールと比較したＴＦＦ３に特異的な抗体の特異的結合は、ＴＦＦ３がサンプル中に存在することを示す。適切なコントロールには、ＴＦＦ３を含むことが知られているサンプルおよびコードされたポリペプチドに特異的ではない抗体（例えば、抗イディオタイプ抗体）が含まれる。特異的抗体－抗原相互作用を検出するための種々の検出方法は当該分野で公知であり、本方法で使用することができ、この検出方法には、標準的な免疫組織学的方法、免疫沈降、および酵素免疫アッセイ、および放射免疫アッセイが含まれるが、これらに限定されない。一般に、特異的抗体は、直接または間接的に検出可能に標識されている。直接標識には、放射性同位体；生成物を検出可能な酵素（例えば、ルシフェラーゼおよびガラクトシダーゼなど）；蛍光標識（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、およびフィコエリトリンなど）；ＥＤＴＡなどの金属キレート基を介して抗体に結合した蛍光発光金属（例えば、１５２Ｅｕまたはランタノイド系の他の金属）；化学発光化合物（例えば、ルミノール、イソルミノール、およびアクリジニウム塩など）；生体発光化合物（例えば、ルシフェリン、エクオリン（緑色蛍光タンパク質））などが含まれる。抗体を、ポリスチレンプレートまたはビーズなどの不溶性支持体に結合（カップリング）することができる。間接的標識には、コードされたポリペプチド（「第１の特定抗体」）に特異的な抗体に特異的であり、上記のように標識された第２の抗体および特異的結合対（例えば、ビオチン－アビジン）などが含まれる。生物学的サンプルを接触させ、細胞、細胞粒子、または可溶性タンパク質を固定することができるニトロセルロースなどの固体支持体またはキャリア上に固定することができる。次いで、支持体を、適切な緩衝液で洗浄し、その後検出可能に標識された第１の特異的抗体と接触させることができる。検出方法は当該分野で公知であり、必要に応じて検出可能な標識によって発せられるシグナルに対して選択される。一般に、適切なコントロールおよび適切な標準と比較して検出する。

【０２４７】

いくつかの実施形態では、本方法を、例えば、ＴＦＦ３関連癌細胞が存在する部位を位置づけるか同定するためにｉｎ　ｖｉｖｏ用に適合させる。これらの実施形態では、（例えば、注射によって）個体に投与されたＴＦＦ３に特異的な検出可能に標識された部分（例えば、抗体）および標識された細胞を、標準的な画像化技術（磁気共鳴映像法およびコンピュータ断層撮影が含まれるが、これらに限定されない）を使用して位置づける。この様式では、ＴＦＦ３発現細胞を特異的に標識する。

【０２４８】
（癌細胞中のＴＦＦ３ポリペプチドの検出）
癌細胞中のＴＦＦ３転写物の細胞中の発現の検出によるＴＦＦ３癌細胞の検出方法を提供する。任意の種々の公知の方法を検出に使用することができ、方法には、ＴＦＦ３ポリヌクレオチドとハイブリッド形成するポリヌクレオチドとのハイブリッド形成による転写物の検出；特定のオリゴヌクレオチドプライマーを使用したポリメラーゼ連鎖反応による転写物の検出；結腸癌細胞中で特異的に発現される遺伝子とハイブリッド形成するポリヌクレオチドをプローブとして使用する細胞のｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成が含まれるが、これらに限定されない。本方法を使用して、癌細胞中に発現されたＴＦＦ３遺伝子をｍＲＮＡレベルで検出および／または測定することができる。いくつかの実施形態では、本方法は、ａ）ハイブリッド形成させる条件下でサンプルをＴＦＦ３ポリヌクレオチドに接触させる工程と、ｂ）存在する場合、ハイブリッド形成を検出する工程とを含む。
【０２４９】
適切なコントロールと比較した場合の差分ハイブリッド形成の検出は、癌細胞中で特異的に発現されるポリヌクレオチドサンプル中の存在を示す。適切なプロトコールには、例えば、ＴＦＦ３ポリヌクレオチドを含まないことが知られているサンプルが含まれる。ハイブリッド形成条件は当該分野で公知である。適切に標識されたポリヌクレオチドを使用した任意の公知の方法（ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成、ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）、ＲＴ－ＰＣＲ（逆転写ＰＣＲ）、および「ノーザン」もしくはＲＮＡブロッティング、またはこのような技術の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない）によって検出することもできる。種々の標識およびポリヌクレオチドの標識方法は当該分野で公知であり、本発明のアッセイ方法で使用することができる。特異的ハイブリッド形成を、適切なコントロールとの比較によって測定することができる。
【０２５０】
一般に、少なくとも１２個の連続ｎｔのＴＦＦ３ポリヌクレオチドを含む本明細書中に提供したポリヌクレオチドを、結腸癌細胞中で特異的に発現されたポリヌクレオチドの検出および／または転写レベルの測定のためのプローブなどの種々の目的のために使用することができる。本明細書中に開示のポリヌクレオチドと特異的にハイブリッド形成するプローブにより、他の無関係の配列で得られるバックグラウンドハイブリッド形成よりも少なくとも５倍、１０倍、または２０倍のシグナルが検出される。本明細書中で使用される、「プローブ」が試験サンプル中のＴＦＦ３遺伝子産物を検出するために使用されるポリヌクレオチド配列をいうことを意味することに留意すべきである。当業者に認識されるように、プローブを検出可能に標識し、例えば、試験サンプルから得た固定化ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）を含むアレイと接触させることができる。あるいは、プローブをアレイおよび検出可能に標識された試験サンプル上に固定することができる。これらおよび本発明の方法の他の変形形態は十分に当業者の範囲内であり、本発明の範囲内に含まれる。
【０２５１】
ヌクレオチドプローブを使用して、提供されたポリヌクレオチドに対応する発現を検出することができる。ノーザンブロットでは、ｍＲＮＡを、電気泳動によって分離し、プローブに接触させた。特定のサイズのｍＲＮＡ種とのハイブリッド形成物としてプローブを検出する。ハイブリッド形成量を定量して、例えば、特定の条件下での相対的発量を決定することができる。プローブを細胞とのｉｎ　ｓｉｔｕハイブリッド形成のために使用して、発現を検出する。プローブを、ハイブリッド形成配列の診断的検出のためにｉｎ　ｖｉｖｏで使用することもできる。プローブを、典型的には、放射性同位体で標識する。発色団、フルオロフォア、および酵素などの検出可能な標識の他の型を使用することができる。ヌクレオチドハイブリッド形成アッセイの他の例は、Ｗ０９２／０２５２６号および米国特許第５，１２４，２４６号に記載されている。
【０２５２】
ＰＣＲは、少量の標的核酸の別の検出手段である（例えば、Ｍｕｌｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ

．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．（１９８７）１５５：３３５；米国特許第４，６８３，１９５号および同第４，６８３，２０２号を参照のこと）。標的核酸とハイブリッド形成する２つのプライマーポリヌクレオチドを使用して、反応を開始させる。プライマーは、本明細書中に開示のポリヌクレオチド内またはそれに対して３’および５’に配列を含み得る。あるいは、プライマーがこれらのポリヌクレオチドに対して３’および５’である場合、プライマーはこれらのポリヌクレオチドまたは相補物とハイブリッド形成する必要はない。熱安定性ポリマーでの標的の増幅後、増幅された標的核酸を、当該分野で公知の方法（例えば、サザンブロット）によって検出することができる。ｍＲＮＡまたはｃＤＮＡを、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，”Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”（Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８９）に記載の伝統的なブロッティング技術（例えば、サザンブロット、ノーザンブロットなど）（例えば、ＰＣＲ増幅なし）によって検出することもできる。一般に、ｍＲＮＡまたはポリメラーゼ酵素を使用してｍＲＮＡから生成したｃＤＮＡを、ゲル電気泳動を使用して精製および分離し、ニトロセルロースなどの固相に移すことができる。固相を標識されたプローブに曝露し、洗浄して任意の非ハイブリッド形成プローブを除去し、標識プローブを含む二重鎖を検出する。

【０２５３】

１つの細胞由来のＤＮＡに対してＰＣＲ増幅を使用した方法を実施することができるが、少なくとも約10^5個の細胞を使用することが都合がよい。ポリメラーゼ連鎖反応の使用は、Ｓａｉｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３９：４８７に記載されており、現在の技術の概説を、Ｓａｍｂｒｏｏｋ，ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＣＳＨ Ｐｒｅｓｓ １９８９，ｐｐ．１４．２－１４．３３（それぞれ本明細書中で参考として援用される）に見出すことができる。検出可能な標識を、増幅反応に含めることができる。適切な検出可能な標識には、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、ローダミン、テキサスレッド、フィコエリトリン、アロフィコシアニン、６－カルボキシフルオレセイン（６－ＦＡＭ）、２’，７’－ジメトキシ－４’，５’－ジヒドロ－６－カルボキシフルオレセイン、６－カルボキシ－Ｘ－ローダミン（ＲＯＸ）、６－カルボキシ－２’，４’，７’，４，７－ヘキサクロロフルオレセイン（ＨＥＸ）、５－カルボキシフルオレセイン（５－ＦＡＭ）、またはＮ，Ｎ，Ｎ’，Ｎ’－テトラメチル－６－カルボキシローダミン（ＴＡＭＲＡ））および放射性標識（例えば、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{3}Ｈなど）などが含まれる。標識は、二段系であり、この系は、ポリヌクレオチドが高親和性結合パートナー（例えば、アビジン、特異的抗体）を有するビオチン、ハプテンなどと抱合し、結合パートナーが検出可能な標識と抱合している。標識を、プライマーの一方および両方に抱合することができる。あるいは、増幅産物に標識を組み込むために、増幅で使用したヌクレオチドのプールを標識する。

【０２５４】

（アレイ）

ポリヌクレオチドアレイは、サンプル中の多数のポリヌクレオチドまたはポリペプチドをアッセイすることができる高処理技術を提供する。このテクノロジーを、特異な発現を試験するためのツールとして使用することができる。種々のアレイ産生方法およびこれらの方法の変形形態が当該分野で公知であり、本発明での使用が意図される。例えば、結合したプローブを有する二次元行列またはアレイ中の基板（例えば、ガラス、ニトロセルロースなど）上へのポリヌクレオチドプローブのスポッティングによってアレイを作製することができる。共有結合または非特異的相互作用（疎水性相互作用など）によってプローブを基質に結合させることができる。ポリヌクレオチドサンプルを、検出可能に標識し（例えば、放射性標識または蛍光標識を使用）、プローブとハイブリッド形成させることができる。一旦プローブであるポリヌクレオチドに結合した標識サンプルポリヌクレオチドを含む二本鎖ポリヌクレオチドを検出することができると、サンプルの非結合部分を洗浄して除去する。あるいは、試験サンプルのポリヌクレオチドをアレイ上に固定し、プロー

ブを検出可能に標識することができる。アレイの構築技術およびこれらのアレイの使用方法は、例えば、Ｓｃｈｅｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．９３（２０）：１０６１４－９；Ｓｃｈｅｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７０（５２３５）：４６７－７０；Ｓｈａｌｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．６（７）：６３９－４５、米国特許第５，８０７，５２２号、欧州特許第７９９ ８９７号；ＷＯ９７／２９２１２号；ＷＯ９７／２７３１７号；ＥＰ７８５ ２８０号；ＷＯ９７／０２３５７号；米国特許第５，５９３，８３９号；米国特許第５，５７８，８３２号；欧州特許第７２８ ５２０号；米国特許第５，５９９，６９５号；欧州特許第７２１ ０１６号；米国特許第５，５５６，７５２号；ＷＯ９５／２２０５８号；および米国特許第５，６３１，７３４号に記載されている。

【０２５５】

アレイを使用して、例えば、遺伝子の特異な発現を試験し、アレイを使用して遺伝子機能を決定することができる。例えば、アレイを使用して、試験細胞とコントロール細胞の間（例えば、癌細胞と正常細胞との間）で発現を比較したＴＦＦ３遺伝子の特異な発現を検出することができる。例えば、対応する正常細胞で認められない癌細胞における特定のメッセージの高発現は、癌特異的遺伝子産物を示すことができる。アレイ使用の例は、例えば、Ｐａｐｐａｌａｒａｄｏ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｍ．Ｒａｄｉａｔｉｏｎ Ｏｎｃｏｌ．（１９９８）８：２１７；およびＲａｍｓａｙ Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．（１９９８）１６：４０にさらに記載されている。さらに、アレイを使用した検出方法の多数の変形形態は十分に当業者の範囲内であり、且つ本発明の範囲内である。例えば、固体支持体へのプローブのハイブリッド形成よりもむしろ、試験サンプルを固体支持体上に固定し、その後プローブと接触させることができる。

【０２５６】

（製造品）

本発明の他の実施形態では、本明細書中に記載の疾患または障害の治療に有用なＴＦＦ３中和剤を含む製造品を提供する。製造品は、コンテナおよびラベルまたはコンテナに記載しているか添付した説明書を含む。適切なコンテナには、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが含まれる。コンテナを、グラスまたはプラスチックなどの種々の材料から形成することができる。コンテナは、選択した疾患または障害の治療に有効である組成物が保持されているか含み、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、コンテナは、皮下注射ニードルによって貫通することができるストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも１つの活性成分は、ＴＦＦ３アンチセンス分子、ＲＮＡｉ分子、リボザイム、低分子、または抗体などのＴＦＦ３中和剤である。ラベルまたは説明書は、癌（例えば、結腸癌、乳癌、または前立腺癌）を罹患しているか素因を示す患者の治療のために組成物を使用することを示す。製造品は、さらに、注射用静菌剤水溶液（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液などの薬学的に許容可能な希釈緩衝液を含む第２のコンテナを含むことができる。さらに、商業的および使用者の立場から望ましい他の材料（他の緩衝液、希釈剤、充填剤、フィルター、ニードル、およびシリンジが含まれる）を含むことができる。

【０２５７】

本発明のさらなる詳細を、以下の非限定的な実施例によって例示する。明細書中の全ての引例の開示は、明確にその全体が本明細書中で参考として援用される。

【実施例】

【０２５８】

以下の実施例は、当業者に本発明をどのように作製および使用するかについての完全な開示および説明を提供するために記載されており、本発明者らの本発明に関する範囲を制限することを意図せず、且つ以下の実験は実施される全てまたは唯一の実験を示すことを意図しない。使用した数値（例えば、量、温度など）に関して正確であるように努めたが、実験誤差および偏差がいくらか存在するはずである。他で記載しない限り、単位は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧または大気圧付

近である。

【０２５９】

（実施例１：生体物質の供給源。）

本発明の実験で使用した生体物質を以下に記載する。

【０２６０】

（患者の組織サンプルの供給源）

正常組織および癌組織を、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション（ＬＣＭ）技術を使用して患者から採取し、この技術は当該分野で周知である（例えば、Ｏｈｙａｍａ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２９：５３０－６；Ｃｕｒｒａｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０００）Ｍｏｌ．Ｐａｔｈｏｌ．５３：６４－８；Ｓｕａｒｅｚ－Ｑｕｉａｎｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　２６：３２８－３５；Ｓｉｍｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ　１４：２７２－６；Ｃｏｎｉａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｌａｂ．Ａｎａｌ．１１：２８－３８；Ｅｍｍｅｒｔ－Ｂｕｃｋ　ｅｔ　ａｌ．（１９９６）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７４：９９８－１００１を参照のこと）。以下の表２は、前立腺組織サンプルを単離した各患者に関する情報を提供し、以下の情報が含まれる：１）「患者ＩＤ」（識別目的のために患者に割り当てた数字）、２）「組織型」、および３）腫瘍の「グリーソングレード」。全原発性腫瘍の組織病理学は、腫瘍が腺癌であることを示した。

【０２６１】

【表２】

表２．前立腺患者のデータ

患者ＩＤ	組織型	グリーソングレード	患者ＩＤ	組織型	グリーソングレード
93	前立腺癌	3+4	391	前立腺癌	3+3
94	前立腺癌	3+3	420	前立腺癌	3+3
95	前立腺癌	3+3	425	前立腺癌	3+3
96	前立腺癌	3+3	428	前立腺癌	4+3
97	前立腺癌	3+2	431	前立腺癌	3+4
100	前立腺癌	3+3	492	前立腺癌	3+3
101	前立腺癌	3+3	493	前立腺癌	3+4
104	前立腺癌	3+3	496	前立腺癌	3+3
105	前立腺癌	3+4	510	前立腺癌	3+3
106	前立腺癌	3+3	511	前立腺癌	4+3
138	前立腺癌	3+3	514	前立腺癌	3+3
151	前立腺癌	3+3	549	前立腺癌	3+3
153	前立腺癌	3+3	552	前立腺癌	3+3
155	前立腺癌	4+3	858	前立腺癌	3+4
171	前立腺癌	3+4	859	前立腺癌	3+4
173	前立腺癌	3+4	864	前立腺癌	3+4
231	前立腺癌	3+4	883	前立腺癌	4+4
232	前立腺癌	3+3	895	前立腺癌	3+3
251	前立腺癌	3+4	901	前立腺癌	3+3
282	前立腺癌	4+3	909	前立腺癌	3+3
286	前立腺癌	3+3	921	前立腺癌	3+3
294	前立腺癌	3+4	923	前立腺癌	4+3
351	前立腺癌	5+4	934	前立腺癌	3+3
361	前立腺癌	3+3	1134	前立腺癌	3+4
362	前立腺癌	3+3	1135	前立腺癌	3+3
365	前立腺癌	3+2	1136	前立腺癌	3+4
368	前立腺癌	3+3	1137	前立腺癌	3+3
379	前立腺癌	3+4	1138	前立腺癌	4+3
388	前立腺癌	5+3			

（実施例２：アレイを使用した特異な発現の検出）

ｃＤＮＡプローブを、上記実施例１に記載の患者細胞から単離した総ＲＮＡから調製した。ＬＣＭにより特定の細胞型を単離して実質的に均一な細胞サンプルが得られるので、これにより、同様に純粋なＲＮＡサンプルが得られる。

【０２６２】

総ＲＮＡを、最初に、Ｔ７　ＲＮＡポリメラーゼプロモーターを含むプライマーを使用してｃＤＮＡに転写し、その後第２のＤＮＡ鎖を合成した。次いで、Ｔ７プロモーター媒介発現を使用してｃＤＮＡをｉｎ　ｖｉｔｒｏで転写し、それによりアンチセンスＲＮＡを産生し（例えば、Ｌｕｏ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄ　５：１１

７－１２２を参照のこと）、アンチセンスＲＮＡをｃＤＮＡに変換した。第２のｃＤＮＡ組を、Ｔ７プロモーターを使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏで再度転写し、それによりアンチセンスＲＮＡを得た。任意選択的に、ＲＮＡを再度ｃＤＮＡに変換し、第３ラウンドまでのＴ７媒介増幅を行ってより多数のアンチセンスＲＮＡを産生した。したがって、２ラウンドまたは３ラウンドのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写を行う手順により、蛍光標識のために使用される最終ＲＮＡを産生した。

【０２６３】

アンチセンスＲＮＡ混合物へのコントロールＲＮＡの第１の添加によって蛍光プローブを生成し、ＲＮＡ出発物質から蛍光標識ｃＤＮＡを産生した。腫瘍ＲＮＡサンプルから調製した蛍光標識ｃＤＮＡを、正常細胞のＲＮＡサンプルから調製した蛍光標識ｃＤＮＡと比較した。例えば、正常細胞由来のｃＤＮＡプローブを、Ｃｙ３蛍光色素（緑色）で標識し、腫瘍細胞から調製したｃＤＮＡプローブをＣｙ５蛍光色素（赤色）で標識し、その逆も同様に行った。

【０２６４】

使用した各アレイは、同一の空間レイアウトおよびコントロールスポット組を有していた。各マイクロアレイを２つの領域に分割し、各領域は、半分に３２×１２スポットの１２集団を有し、各アレイ上に全部で約９，２１６スポットを有する。２つの領域に同一のスポッティングを行い、アレイあたり少なくとも２つの各クローンの複製物が得られる。

【０２６５】

アレイ上で使用するためのポリヌクレオチドを、公的に利用可能な供給源および上記の選択された細胞株および患者組織から生成したｃＤＮＡライブラリーから得た。これらの供給源から増幅した約０．５ｋｂ～２．０ｋｂのＰＣＲ産物を、製造者の指示にしたがってＭｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　Ｇｅｎ　ＩＩＩスポッターを使用してアレイ上にスポッティングした。アレイ上の各２４領域の第１行は、約３２個のコントロールスポット（４個のネガティブコントロールスポットおよび８個の試験ポリヌクレオチド）を有していた。試験ポリヌクレオチドを、各サンプルにスパイクし、その後２～６００ｐｇ／スライドの濃度範囲および１：１の比の標識反応を行った。各アレイデザインのために、２つのスライドを、標識反応で逆標識した試験サンプルとハイブリッド形成させた。これにより、各クローンについて約４つの２連の測定値（各サンプルについて一方の色素について２つおよび他方の色素について２つ）が得られた。

【０２６６】

同一患者の腫瘍細胞および正常細胞由来の等量のプローブの混合によって特異な発現アッセイを行った。アレイを、５×ＳＳＣ／０．２％ＳＤＳ／１ｍＭ　ＥＤＴＡにおける６０℃で２時間のインキュベーションによってプレハイブリッド形成を行い、その後水で３回洗浄し、イソプロパノールで２回洗浄した。アレイのプレハイブリッド形成後、プローブ混合物を、高ストリンジェンシー条件下で（５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ、および０．２％ＳＤＳ中にて４２℃で一晩）アレイとハイブリッド形成させた。ハイブリッド系生後、アレイを、以下のように５５℃で３回洗浄した：１）１×ＳＳＣ／０．２％ＳＤＳでの第１の洗浄、２）０．１×ＳＳＣ／０．２％ＳＤＳでの第２の洗浄、３）０．１×ＳＳＣでの第３の洗浄。

【０２６７】

次いで、アレイを、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ　Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ　ＩＩＩデュアルカラーレーザースキャナ／検出器を使用して、緑色蛍光および赤色蛍光についてスキャンした。ＢｉｏＤｉｓｃｏｖｅｒｙ　Ａｕｔｏｇｅｎｅソフトウェアを使用して画像を処理し、各スキャン組由来のデータを正規化して正常に対する発現の比を得た。マイクロアレイ実験由来のデータを、Ｅ．Ｊ．Ｍｏｌｅｒ，Ｍ．Ａ．Ｂｏｙｌｅ，ａｎｄ　Ｆ．Ｍ．Ｒａｎｄａｚｚｏによって２０００年１１月２０日に提出された発明の名称が「Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ａｎｄ　ａｃｃｕｒａｃｙ　ｉｎ　ｃＤＮＡ　ｍｉｃｒｏａｒｒａｙ　ｄａｔａ」である米国特許出願第６０／２５２，３５８号（本出願は特に本明細書中で参考として援用される）に記載のアルゴリズムにしたがって分析した。

【０２６８】
実験を繰り返し、この時に２つのプローブを反対色で標識し、両方の「カラーディレクション（ｃｏｌｏｒ　ｄｉｒｅｃｔｉｏｎ）」においてアッセイを行った。アレイ上の各配列の蛍光レベルを、８つの反復スポットの相乗平均／４つのアレイ由来の遺伝子の比または４つの反復スポット／２つのアレイまたはいくつかの他の順列由来の遺伝子の比として示した。各２連の領域中に存在するスパイクしたポジティブコントロールを使用してデータを正規化し、各有意差の最終決定にこの正規化の精度が含まれた。各スポットの蛍光強度を、各２連の領域中のネガティブコントロールと比較し、それによりどのスポットが各サンプル中の有意な発現レベルを検出するのかを判断した。

【０２６９】
蛍光強度の統計分析を、２連のスポットの各組に適用して各示差測定（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ｍｅａｓｕｒｅｍｅｎｔ）の精度および有意性を評価し、得られたｐ値で各患者の腫瘍サンプルおよび正常サンプルの間で発現レベルの差は存在しないという帰無仮説を試験した。マイクロアレイの最初の分析時に、$p > 10^{-3}$である場合に仮説は受け入れられ、スポットの示差比（ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ　ｒａｔｉｏ）を１．０００に設定した。他の全スポットは、腫瘍サンプルと正常サンプルとの間の発現に有意差がある。腫瘍サンプルが検出可能な発現を有し、正常サンプルが有さない場合、正常サンプルの発現についての値がおそらく０であり、比はおそらく数学的に有用な値ではない（例えば、無限大）ので、比を１０００で切り捨てる。正常サンプルが検出可能な発現を有し、腫瘍サンプルが有さない場合、腫瘍サンプルの発現についての値がおそらく０であり、比はおそらく数学的に有用な値ではない（例えば、無限大）ので、比を０．００１で切り捨てる。これらの後者の２つの状況を、本明細書中で「オン／オフ」という。

【０２７０】
（実施例３：細胞におけるＴＦＦ３の発現）
（癌におけるＴＦＦ３ｍＲＮＡの上方制御）
腫瘍サンプル由来の癌細胞および隣接する正常細胞を、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって各癌患者サンプルから採取した（組織サンプルの供給源については実施例１を参照のこと）。標識プローブを各サンプルのＲＮＡから調製し、これを使用してｃＤＮＡマイクロアレイチップを探索した（実施例２を参照のこと）。各マイクロアレイチップを、各患者の正常プローブおよび癌プローブと同時にハイブリッド形成させた（正常および癌を異なる蛍光試薬で標識した）。発現レベルを、各患者サンプルの正常細胞での発現に対する癌での発現の比として決定した。表３は、正常な上皮細胞に対する癌の発現の比が、試験した患者の２倍超（＞２×）、５倍超（＞５×）、または半分未満（＜０．５×）、少なくとも２０％である患者の比率を示す。

【０２７１】
【表３】

表３：癌におけるＴＦＦ３　ｍＲＮＡの上方制御

癌	患者数	>2x	>5x	<0.5x
前立腺癌	102	~40%	~27%	~15%
乳癌	23	~40%	~27%	~30%
結腸癌	77	~20%	~6%	~30%
結腸転移物	33	~22%	~2%	~20%

（正常組織のＴＦＦ３発現）
全組織（例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションによるサンプルではなく、組織サンプル中の全細胞型を示す）、正常（Ｎ）および癌（Ｃ）の両方におけるＴＦＦ３　ｍＲＮＡ発現を、実時間定量ＰＣＲによって測定した。結果を図１に示し、値を全

組織中のＨＰＲＴに正規化する。ｙ軸上のｍＲＮＡの発現レベルの値は、正規化コントロールとしてＨＰＲＴを使用した相対数である。癌サンプルは、８人の各患者由来の腫瘍サンプルのプールを示す（生体物質の供給源については、実施例１を参照のこと）。用語「３＋３」は、グリーソングレード６をいい、「４＋３」はグリーソングレード７をいう。正常な肺（結腸など）では、ＴＦＦ３は杯細胞によって発現し、粘液を分泌することも留意する（例えば、Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ　Ｍｅｄ．，１９９９，１５９，１３３０を参照のこと）。

【０２７２】

（癌患者におけるＴＦＦ３の免疫組織化学（ＩＨＣ）検出）

各乳癌、結腸癌、卵巣癌、および前立腺癌（ＣＡ）患者および正常な組織の対応物（ＮＬ）の組織サンプル片（組織の総数）を、ヒトＴＦＦ３に対する免疫アフィニティ精製ウサギポリクローナル抗体で染色した。さらに、いくつかの生きた正常器官のサンプルを染色した。各カテゴリーにおけるＴＦＦ３陽性サンプルの比率に加えて、ＴＦＦ３の存在について陰性（－）および陽性（＋）であるサンプル数も表４に示す。

【０２７３】

【表４－１】

表４：ＩＨＣのまとめ

組織カテゴリー	総組織数	(-)サンプル	(+)サンプル	%陽性率
乳房　CA	77	21	56	72.7%
乳房　NL	20	15	5	25.0%
結腸　CA	45	16	29	64.4%
結腸　NL	32	1	31	96.9%
卵巣　CA	31	25	6	19.4%
卵巣　NL	25	25	0	0.0%
前立腺　CA	67	24	43	64.2%
前立腺　NL	18	17	1	5.6%
副腎　　NL	4	0	4	100.0%
脳　　NL	8	8	0	0.0%
心臓　NL	10	10	0	0.0%
腎臓　　NL	7	6	1	14.3%

【０２７４】

【表４－２】

肝臓　NL	8	8	0	0.0%
膵臓　　NL	7	7	0	0.0%

（細胞株におけるＴＦＦ３発現）

特定の細胞株におけるＴＦＦ３　ｍＲＮＡの発現を、実時間定量ＰＣＲによって測定した。結果を、図２に示す。発現レベルについての値は、正規化コントロールとしてβ－アクチンを使用した相対数である。ｙ軸は対数スケールであり、ＴＦＦ３発現の変化は細胞株によって非常に大きいということも留意のこと。細胞株は、ＨＵＶＥＣ（ヒト臍静脈内

皮細胞）、ＢＭＥＣ－１（脳微小血管内皮細胞）、Ｄｕ１４５（ヒト前立腺癌細胞）、ＰＣ３（ヒト前立腺癌細胞）、ＬｎＣａｐ（ヒト前立腺癌細胞）、ＭＤＡＰｃａ２Ｂ（ヒト前立腺癌細胞）、２２ｒＶ１（ヒト前立腺癌細胞）、ＨＰＶ７（ヒト前立腺癌細胞）、ＨＰＶ１０（ヒト前立腺癌細胞）、ＲＷＰＥ－１（ヒト前立腺上皮細胞）、ＲＷＰＥ－２（悪性ヒト前立腺上皮細胞）、ＰｒＥＣ（ヒト前立腺上皮細胞）、ＮＩＨ　３Ｔ３（線維芽細胞）、ＨＴ２９（ヒト結腸癌）、ＳＷ６２０（ヒト結腸癌）、Ｃｏｌｏ３２０（ヒト結腸癌）、ＭＤＡ２３１（乳癌）、ＭＤＡ４３５（乳癌）、およびＭＣＦ７（乳癌）を含んでいた。

【０２７５】

（実施例４：遺伝子発現のアンチセンス調節）

癌細胞中のポリヌクレオチドによって示される特異的に発現される遺伝子の発現を、腫瘍形成における遺伝子産物の役割および機能（例えば、転移表現型の促進）を確認するためのアンチセンスノックアウトテクノロジーを使用して分析することができる。

【０２７６】

本明細書中で同定された特異的に発現される遺伝子によって生成されるｍＲＮＡに相補的な多数の異なるオリゴヌクレオチドを、潜在的アンチセンスオリゴヌクレオチドとしてデザインし、遺伝子発現を抑制する能力について試験することができる。各候補標的に特異的なアンチセンスオリゴマー組を、特異的に発現する遺伝子に対応するポリヌクレオチド配列およびソフトウェアプログラムＨＹＢｓｉｍｕｌａｔｏｒ　Ｖｅｒｓｉｏｎ　４（Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）　９５／Ｗｉｎｄｏｗｓ（登録商標）　ＮＴまたはＰｏｗｅｒ　Ｍａｃｉｎｔｏｓｈで利用可能、ＲＮＡｔｕｒｅ，Ｉｎｃ．１００３　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｒｏａｄ，Ｗｅｓｔ，Ｉｒｖｉｎｅ，ＣＡ　９２６１２　ＵＳＡ）を使用してデザインする。アンチセンスオリゴヌクレオチドのデザイン時に考慮される要因には、１）オリゴヌクレオチドの二次構造、２）標的遺伝子の二次構造、３）他の発現遺伝子とのクロスハイブリッド形成が全くないか最小である特異性、４）安定性、５）長さ、６）末端ＧＣ含量が含まれる。アンチセンスオリゴヌクレオチドを、生理学的温度（例えば、細胞中でハイブリッド形成させるための培養における細胞の至適温度（例えば、約３７℃））での高ストリンジェンシー条件下でその標的配列とハイブリッド形成するが、ホモ二量体形成が最小であるようにデザインする。

【０２７７】

オリゴマー組およびＨＹＢｓｉｍｕｌａｔｏｒプログラムを使用して、各候補ｍＲＮＡ転写物についての３～１０個のアンチセンスオリゴヌクレオチドおよびその逆コントロールをデザインおよび合成し、転写物を目的の標的ポリヌクレオチド配列に対応する遺伝子から得た。一旦合成および定量されると、オリゴマーを、癌細胞株のパネルにおける転写物ノックアウトの有効性についてスクリーニングする。ノックアウトの有効性を、ライトサイクラー定量化を使用したｍＲＮＡレベルの分析によって決定する。最も高い転写ノックアウトレベル（このレベルは、少なくとも約５０％、好ましくは約８０～９０％、９５％までまたはそれ以上、検出不可能なメッセージまで）が得られるオリゴマーを、細胞ベースの増殖アッセイ、足場独立性成長アッセイ、およびアポトーシスアッセイで使用するために選択する。

【０２７８】

デザインした各アンチセンスオリゴヌクレオチドが遺伝子発現を阻害する能力を、ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５前立腺癌細胞へのトランスフェクションを介して試験することができる。各トランスフェクション混合物のために、キャリア分子（脂質、脂質誘導体、脂質様分子、コレステロール、コレステロール誘導体、またはコレステロール様分子など）を、水で０．５ｍＭの作業濃度（ｗｏｒｋｉｎｇ　ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ）に調製し、超音波処理して均一な溶液が得られ、０．４５μのＰＶＤＦメンブレンで濾過する。次いで、滅菌Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ水にて１００μＭの作業濃度のアンチセンスまたはコントロールオリゴヌクレオチドを調製する。オリゴヌクレオチドを、微量遠心管中にてＯｐｔｉＭＥＭ（登録商標）（Ｇｉｂｃｏ／

ＢＲＬ）で２μＭ（すなわち、約２０μｇのオリゴ／ｍｌのＯｐｔｉＭＥＭ（登録商標））にさらに希釈する。個別の微量遠心管中で、典型的には、約１．５～２ｎｍｏｌのキャリア／μｇアンチセンスオリゴヌクレオチドの量を、オリゴヌクレオチドの希釈で使用される同体積のＯｐｔｉＭＥＭ（登録商標）に希釈する。希釈されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを、直ちに希釈したキャリアに添加し、ピペットの上下によって混合する。最終濃度３０ｎＭのオリゴヌクレオチドを細胞に添加する。

【０２７９】

トランスフェクトされた細胞中の目的の標的遺伝子に対応する標的ｍＲＮＡレベルを、Ｒｏｃｈｅ　ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ（登録商標）実時間ＰＣＲ装置またはＰｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ　ＧｅｎｅＡｍｐ装置を使用して癌細胞株中で定量する。標的ｍＲＮＡの値を、内部コントロール（例えば、β－アクチン）に対して正規化する。各２０μｌの反応のために、抽出ＲＮＡ（一般に、全部で０．２～１μｇ）を、滅菌０．５または１．５ｍｌ微量遠心管に入れ、水を総体積１２．５μｌまで添加する。各チューブに、２．５μｌ　Ｈ２Ｏ、２．０μｌ　１０×反応緩衝液、１０μｌ　オリゴｄＴ（２０ｐｍｏｌ）、１．０μｌ　ｄＮＴＰミックス（各１０ｍＭ）、０．５μｌ　ＲＮＡｓｉｎ（登録商標）（２０ｕ）（Ａｍｂｉｏｎ，Ｉｎｃ．，Ｈｉａｌｅａｈ，ＦＬ）、および０．５μｌ　ＭＭＬＶ逆転写酵素（５０ｕ）（Ａｍｂｉｏｎ，Ｉｎｃ．）の（列挙の順序での）混合によって調製した７．５μｌの緩衝液／酵素混合物を添加する。内容物をピペットの上下によって混合し、反応混合物を４２℃で１時間インキュベートする。各チューブの内容物を増幅前に遠心分離する。

【０２８０】

増幅混合物を、以下の順序での混合によって調製する：１×ＰＣＲ緩衝液ＩＩ、３ｍＭ　$MgCl_2$、１４０μＭ　各ｄＮＴＰ、０．１７５ｐｍｏｌ　各オリゴ、１：５０，０００倍希釈のＳＹＢＲＯ　Ｇｒｅｅｎ、０．２５　ｍｇ／ｍｌ　ＢＳＡ、１単位のＴａｑポリメラーゼ、および２０μｌにする水（ＰＣＲ緩衝液ＩＩは、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ，Ｎｏｒｗａｌｋ，ＣＴから１０濃縮物で市販されている）。１倍濃度では、混合物は、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ（ｐＨ　８．３）および５０ｍＭＫＣｌを含む。ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）は、二本鎖ＤＮＡと結合した場合に蛍光を発する色素である。増幅時に二本鎖ＰＣＲ産物が産生されるので、ＳＹＢＲ（登録商標）Ｇｒｅｅｎ由来の蛍光が増加する。各２０μｌアリコートの増幅混合物に、２μｌのテンプレートＲＴを添加し、標準的なプロトコールにしたがって増幅を行う。結果を、非トランスフェクション細胞、送達体のみをトランスフェクトした（偽トランスフェクション）細胞、または逆コントロールオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした細胞と比較した対応する遺伝子産物の発現の減少率として示す。

【０２８１】

（実施例５：ＴＦＦ３発現のアンチセンス修飾）

（アンチセンスオリゴヌクレオチド）

実施例４に記載の手順にしたがって、いくつかのアンチセンス（ＡＳ）オリゴヌクレオチドを、デザインし、調製し、ＳＷ６２０細胞（高レベルのＴＦＦ３を発現する結腸癌細胞株）でのＴＦＦ３ｍＲＮＡレベルを調節する能力について試験した。オリゴヌクレオチドを前記の表１に示す。比較的高いノックアウト活性を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号９、１０、１５、１６、１７、および１８を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。これらのそれぞれについて、逆配列を有するオリゴヌクレオチドを、アンチセンス特異性を示すためのコントロール（ＲＣ）として使用するために合成した。

【０２８２】

（ＡＳを使用したＴＦＦ３ｍＲＮＡのノックダウン）

ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性を、ＳＷ６２０細胞への各オリゴヌクレオチドのトランスフェクションおよび実時間定量ＰＣＲを使用したトランスフェクションから約３６時間後の残存ＴＦＦ３ｍＲＮＡレベルの測定によって試験した。

【０２８３】
図３は、配列番号９～１８に対応するＡＳオリゴヌクレオチドの最初のスクリーニングの結果を示す。配列番号９および１０に対応するＡＳオリゴヌクレオチドが最も有効なようであった。コントロール１およびコントロール２と命名したＡＳオリゴヌクレオチドは、無関係なＡＳ配列を示し、ＴＦＦ３ｍＲＮＡの特異的ノックダウンを評価するためのコントロールとして役立つ。
【０２８４】
図４および５は、配列番号９、１０、および１５に対応するＡＳオリゴヌクレオチドとその逆コントロール（ＲＣ）との比較の結果を示す。認められるように、ＡＳオリゴヌクレオチドは、所望の特異性で作用するようである。
【０２８５】
図６は、ＴＦＦ３ｍＲＮＡ発現のノックダウンにおける配列番号１０、１５、１７、および１８に対応するＡＳオリゴヌクレオチドの有効性をさらに示す。用語「ＵＴ」は、非トランスフェクションＳＷ６２０を示す。
【０２８６】
（実施例６：増殖に対する発現の効果）
細胞増殖阻害に対する遺伝子発現の効果を、転移性乳癌細胞株（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（「２３１」））；ＳＷ６２０結腸直腸癌細胞；ＳＫＯＶ３細胞（ヒト卵巣癌細胞株）；またはＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、もしくはＤＵ１４５前立腺が細胞で評価することができる。
【０２８７】
細胞を、９６ウェルプレート中で約６０～８０％コンフルエンシーにプレートする。アンチセンスまたは逆コントロールオリゴヌクレオチドを、ＯｐｔｉＭＥＭ（登録商標）で２μＭに希釈する。次いで、オリゴヌクレオチド－ＯｐｔｉＭＥＭ（登録商標）を、送達体に添加することができ、アッセイで使用される特定の細胞型に最適となるように送達体を選択することができる。次いで、オリゴ／送達体混合物を、細胞上で血清を含む培地でさらに希釈する。全実験用オリゴヌクレオチドの最終濃度は、約３００ｎＭであり得る。
【０２８８】
アンチセンスオリゴヌクレオチドを、上記のように調製する（実施例５および５を参照のこと）。細胞を３７℃で一晩トランスフェクトし、翌朝にトランスフェクション混合物を新鮮な培地で置換する。上記実施例４および５のようにトランスフェクションを行う。
【０２８９】
ＳＷ６２０細胞の増殖を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対応する遺伝子が結腸癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たすことを示す。ＳＫＯＶ３遺伝子の増殖を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、乳癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たす遺伝子を示す。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞の増殖を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対応する遺伝子が、卵巣癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たすことを示す。ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５細胞の増殖を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、前立腺癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たすことを示す。
【０２９０】
（実施例７：ｍＲＮＡの欠失によるポリペプチドの枯渇に対する細胞死の誘導）
細胞死の際の標的メッセージの枯渇の効果を評価するために、ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５細胞または目的の癌由来の他の細胞を、増殖アッセイのためにトランスフェクトすることができる。シスプラチン（ｃｉｓ）の存在下での細胞傷害効果について、同一のプロトコールに従ったが、細胞を２μＭの薬物の存在下で静置する。毎日、細胞傷害性を、膜の損傷に起因する培地に放出されたＬＤＨ酵素量の測定によってモニタリングする。Ｒｏｃｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓの細胞傷害性検出キットを使用して、ＬＤＨの活性を測定する。同一の時点および処理でのウェル中に存在する総ＬＤＨに対する倍地中に放出されたＬＤＨの比

（ｒＬＤＨ／ｔＬＤＨ）としてデータを提供する。ＢＣＬ２（公知の抗アポトーシス遺伝子）のアンチセンスおよび逆コントロールオリゴヌクレオチドを使用したポジティブコントロールが含まれる；ＢＣＬ２メッセージの喪失により、コントロールオリゴヌクレオチドでの処理（トランスフェクションに起因するバックグラウンド細胞傷害性）と比較して細胞死が増加する。

【０２９１】

（実施例８：ＴＦＦ３アンチセンスの細胞傷害活性および高増殖活性）

（癌細胞への効果）

ＳＷ６２０細胞におけるＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞傷害効果および抗増殖効果を、実施例６および７の手順にしたがって、ＡＳおよびＲＣオリゴヌクレオチドのトランスフェクション後の異なる時点で試験した（実施例４および５）。細胞傷害性を、全ＬＤＨに対する培養培地に放出されたＬＤＨ（乳酸デヒドロゲナーゼ）の比の測定によって決定した。増殖を、インタクトな接着細胞中のＬＤＨレベルによって示した。ポジティブコントロールとして、Ｂｃｌ－２特異的アンチセンスもトランスフェクトした。Ｂｃｌ－２は公知の抗アポトーシスタンパク質であり、この遺伝子発現の遮断によってアポトーシスが増加する。結果を図７に示す。

【０２９２】

異なる培養条件で、前立腺癌細胞（Ｐｃａ２Ｂ）にも細胞傷害効果が認められた。結果を図８に示す。前立腺癌細胞株ＣＵ１４５および２２Ｒｖ１で類似の結果を得た。ＰＣ３細胞およびＬＮＣａＰ細胞でより低い効果が認められた。ＴＦＦ３およびその逆配列の配列を阻害することが公知のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、コントロールとして役立つ。

【０２９３】

（正常細胞）

ＴＦＦ３を発現しない正常線維芽細胞（ＭＲＣ９）および正常乳房上皮細胞（１８４Ｂ５）を、ＡＳオリゴヌクレオチドの非特異的細胞傷害効果を試験するためのコントロール細胞として使用した。結果を図９に示す。これらの効果は、ＴＦＦ３　ＡＳの効果がＴＦＦ３を発現する細胞に特異的であり、ＡＳオリゴヌクレオチドの一般毒性に起因しない。

【０２９４】

（実施例９：細胞移動に対する遺伝子発現の効果）

細胞移動の阻害に対する遺伝子発現の効果を、静的（ｓｔａｔｉｃ）内皮細胞結合アッセイ、非静的内皮細胞結合アッセイ、および遊出（ｔｒａｎｓｍｉｇｒａｔｉｏｎ）アッセイを使用して、ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５前立腺癌細胞で評価することができる。

【０２９５】

静的内皮細胞結合アッセイのために、アンチセンスオリゴヌクレオチドを上記のように調製する（実施例５および５を参照のこと）。上記のように、使用２日前に、前立腺癌細胞（ＣａＰ）をプレートし、アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトする（実施例４および５を参照のこと）。使用前日に、培地を新鮮な培地に置換し、使用当日に、培地を、２μＭ　ＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ　ｇｒｅｅｎ　ＣＭＦＤＡ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．）を含む新鮮な培地に置換し、細胞を３０分間インキュベートする。インキュベーション後、ＣａＰ培地を新鮮な培地（ＣＭＦＤＡなし）に置換し、細胞をさらに３０～６０分間インキュベートする。ＣＭＦ　ＰＢＳ／２．５ｍＭ　ＥＤＴＡまたはトリプシンを使用してＣａＰ細胞を剥離し、遠心分離し、ＤＭＥＭ／１％　ＢＳＡ／１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．０）に懸濁する。最後に、ＣａＰ細胞を計数し、1×10^{6}細胞／ｍｌの濃度に再懸濁する。

【０２９６】

内皮細胞（ＥＣ）を、使用３日前に９６ウェルプレート上で４０～５０％コンフルエンスにプレートする。使用当日に、ＥＣをＰＢＳで１回洗浄し、５０λＤＭＤＭ／１％ＢＳＡ／ｌＯｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７）を各ウェルに添加する。次いで、各ウェルに５０Ｋ

（５０λ）ＣａＰ細胞を含むＤＭＥＭ／１％ＢＳＡ／１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７）を添加する。プレートをさらに３０分間インキュベートし、Ca^{++}およびMg^{++}を含むＰＢＳで５回洗浄する。最終洗浄後、１００μＬ ＰＢＳを各ウェルに添加し、蛍光プレートリーダー（Ａｂ４９２／Ｅｍ ５１６ｎｍ）で蛍光を読み取る。

【０２９７】

非静的内皮細胞結合アッセイのために、上記のようにＣａＰを調製する。ＥＣを、使用３日前に２４ウェルプレート上で３０～４０％コンフルエンスにプレートする。使用当日に、ＥＣのサブセットを、サイトカインで６時間処理し、ＰＢＳで２回洗浄する。次いで、ウェルに１５０～２００Ｋ ＣａＰ細胞を含むＤＭＥＭ／１％ＢＳＡ／１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（ｐＨ ７）を添加する。プレートを、回転震盪器（７０ＲＰＭ）に３０分間置き、Ca^{++}およびMg^{++}を含むＰＢＳで３回洗浄する。最終洗浄後、５００μＬ ＰＢＳを各ウェルに添加し、蛍光プレートリーダー（Ａｂ４９２／Ｅｍ ５１６ｎｍ）で蛍光を読み取る。

【０２９８】

遊出アッセイのために、ＣａＰを上記のように調製したが、以下の変更を加えた。使用当日に、ＣａＰ培地を、５μＭ ＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ ｇｒｅｅｎ ＣＭＦＤＡ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｃ．）を含む新鮮な培地に交換し、細胞を、３０分間インキュベートする。インキュベーション後、ＣａＰ培地を新鮮な培地（ＣＭＦＤＡなし）に置換し、細胞をさらに３０～６０分間インキュベートする。ＣＭＦ ＰＢＳ／２．５ｍＭ ＥＤＴＡまたはトリプシンを使用してＣａＰ細胞を剥離し、遠心分離し、ＥＧＭ－２－ＭＶに懸濁する。最後に、ＣａＰ細胞を計数し、1×10^{6}細胞／ｍｌの濃度に再懸濁する。

【０２９９】

ＥＣを、使用５～７日前にＦｌｕｏｒＢｌｏｋトランスウェル（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）上で３０～４０％コンフルエンスにプレートする。使用３日前および使用当日に、培地を新鮮な培地に交換する。次いで、各トランスウェルに、５０Ｋ標識ＣａＰを添加する。第１の蛍光読み取りの３０分前に、１０μｇのＦＩＴＣ－デキストラン（１０ＫＭＷ）をＥＣプレートフィルターに添加する。次いで、蛍光プレートリーダー（Ａｂ４９２／Ｅｍ ５１６ｎｍ）で蛍光を読み取る。

【０３００】

ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５前立腺癌細胞の内皮細胞への結合を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対応する遺伝子が前立腺癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たす可能性が高いことを示す。ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５前立腺癌細胞による内皮細胞遊出を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対応する遺伝子が前立腺癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たす可能性が高いことを示す。

【０３０１】

（実施例１０：コロニー形成に対する遺伝子発現の効果）

ＳＷ６２０細胞、ＳＫＯＶ３細胞、ＭＤ－ＭＢＡ－２３１細胞、ＬＮＣａＰ細胞、ＰＣ３細胞、２２Ｒｖｌ細胞、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ細胞、およびＤＵ１４５細胞のコロニー形成に対する遺伝子発現の効果を、軟寒天アッセイで試験することができる。細胞上の重層から数時間以内に新たにプレートした２ｍｌの０．６％寒天を含む培地の底層の最初の確立によって、軟寒天アッセイを行う。０．０５％トリプシンを使用したプレートからの上記のようにトランスフェクトした細胞の除去および培地での２回の洗浄によって、底層上に細胞層を形成させる。Ｃｏｕｌｔｅｒカウンターで細胞を計数し、培地で10^{6}／ｍｌに再懸濁する。１０μｌアリコートを、９６ウェルプレート中に培地と共に入れるか（ＷＳＴ１でのチェック計数）、軟寒天アッセイのためにさらに希釈する。２０００個の細胞を、０．６％寒天底層上に８００μｌの０．４％寒天を含む２連のウェルに入れる。細胞層寒天の固化後、２ｍｌの培地を上部に滴らせ、アンチセンスまたは逆コントロールオリゴ（実施例３に記載のように産生）を送達体を使用せずに添加する。３～４日毎に新鮮

な培地およびオリゴを添加する。１０日～３週間でコロニーが形成される。コロニーのフィールドを目視にて計数した。Ｗｓｔ－１代謝値を使用して、出発細胞数との小さな相違を補正する。

【０３０２】

ＳＷ６２０細胞のコロニー形成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対応する遺伝子が結腸癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たすことを示す。ＳＫＯＶ３細胞のコロニー形成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、乳癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たす遺伝子を示す。ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞のコロニー形成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、対応する遺伝子が、卵巣癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たすことを示す。ＬＮＣａＰ、ＰＣ３、２２Ｒｖ１、ＭＤＡ－ＰＣＡ－２ｂ、またはＤＵ１４５細胞のコロニー形成を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、前立腺癌細胞の癌表現型の産生または維持で役割を果たすことを示す。

【０３０３】

（実施例１１：癌細胞の足場独立性成長のアンチセンス阻害）

前立腺癌細胞株ＭＤＡ　Ｐｃａ－２ｂを、ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトした（図１０に示す；アンチセンス調製の説明については実施例４および５を参照のこと）。ウェルあたり１０００個および５００個の細胞（図１０に示す）を、９６ウェルプレート中で培養し、培地を含む軟寒天中で７日間懸濁液中にて成長させる。軟寒天細胞コロニーの成長を、細胞によるＡｌａｍａｒ　ｂｌｕｅ取り込みによって測定した。結果は、コントロールＡＳ（Ｃ７９－７）およびＴＦＦ３　ＡＳオリゴヌクレオチド（しかし、代表的なＲＣオリゴヌクレオチドではない）は共にこの前立腺癌細胞株の足場独立性成長を有意に阻害することを示す。前立腺癌細胞株ＰＣ３から類似の結果を得た。

【０３０４】

（実施例１２：患者の前立腺癌で特異的に発現される遺伝子産物の機能分析）

癌細胞中で特異的に発現される遺伝子配列の遺伝子産物（ＴＦＦ３など）を、腫瘍形成における遺伝子産物の役割および機能（例えば、転移表現型発生の促進または阻害）を確認するためにさらに分析することができる。例えば、本明細書中で定義した遺伝子に対応する遺伝子産物の機能を、細胞中の遺伝子産物の機能の遮断によって評価することができる。例えば、遺伝子産物が細胞膜を分泌するかこれに会合する場合、遮断抗体を生成し、細胞に添加して、例えば、細胞の癌細胞（特に、転移表現型）への形質転換との関連における細胞表現型に対する影響を試験することができる。抗体を生成するために、選択した遺伝子産物に対応するクローンを選択し、部分的または完全なコード配列を示す配列を得る。得られたクローンを発現させ、産生されたポリペプチドを単離し、抗体を生成する。次いで、抗体を細胞と組み合わせ、腫瘍形成に対する効果を評価する。

【０３０５】

本明細書中で同定された特異的に発現される遺伝子の遺伝子産物が公知の機能のタンパク質（例えば、特定のキナーゼまたはプロテアーゼ）および／または公知の機能のタンパク質ファミリー（例えば、プロテアーゼファミリーまたはキナーゼファミリーに存在するドメインまたは他のコンセンサス配列を含む）に配列相同性を示す場合、腫瘍形成における遺伝子産物の役割および遺伝子産物の活性を、対応するタンパク質またはタンパク質ファミリーの機能を示すか増強する低分子を使用して試験することができる。

【０３０６】

さらなる機能アッセイには、細胞周期および細胞移動に対する対応する遺伝子発現効果を分析するアッセイが含まれるが、必ずしもこれらに限定されない。

【０３０７】

（実施例１３：コンティグアセンブリおよびさらなる遺伝子の特徴づけ）

本発明で提供されるポリヌクレオチド配列（たとえば、ＴＦＦ３）を使用して、ポリペプチドが対応する遺伝子（例えば、本明細書中に記載のポリヌクレオチド配列を有する遺

伝子、遺伝子によってコードされるｍＲＮＡ）の配列情報を拡大することができる。この拡大された配列情報を使用して、対応する遺伝子をさらに特徴づけ、遺伝子産物の性質についてさらなる情報（遺伝子産物の通常の機能）が提供される。さらなる情報は、治療標的としての遺伝子産物の使用のさらなる証拠を提供し、その活性を調節することができる薬剤の型に関するさらなるガイダンスを提供するのに役立つ。

【０３０８】

１つの例では、クローン中に存在する本発明のポリヌクレオチド配列を使用してコンティグをアセンブリする。「コンティグ」は、重複している（例えば、共有しているか実質的に類似の）配列情報を有する核酸配列からアセンブリされたヌクレオチドの連続配列である。公的に利用可能なＥＳＴ（発現配列タグ）の配列およびＣｈｉｒｏｎで合成されたいくつかのｃＤＮＡライブラリー由来の種々のクローンの配列をコンティグアセンブリで使用することができる。

【０３０９】

コンティグを、製造者の説明書にしたがってソフトウェアプログラムＳｅｑｕｅｎｃｈｅｒ（バージョン４．０５）を使用してアセンブリし、コンティグされた（ｃｏｎｔｉｇｅｄ）配列の概観（ｏｖｅｒｖｉｅｗ）アラインメントを作製する。次いで、コンティグアセンブリで得られた配列情報を使用し、Ｓｅｑｕｅｎｃｈｅｒプログラムを使用してコンティグ由来のコンセンサス配列を得ることができる。コンセンサス配列を、公的データベース中の全てのＥＳＴおよび非冗長配列を含むＤＧＴＩ　ＤｏｕｂｌｅＴｗｉｓｔ　Ｇｅｎｅ　Ｉｎｄｅｘ（ＤｏｕｂｌｅＴｗｉｓｔ，Ｉｎｃ．，Ｏａｋｌａｎｄ，ＣＡ）のＴｅｒａＢＬＡＳＴＮ検索でのクエリー配列として使用する。

【０３１０】

コンティグアセンブリおよび相同性検索ソフトウェアプログラムの使用により、本明細書中に適用した配列情報を、本発明に記載されたポリヌクレオチド配列を有する遺伝子を確認するか予想される遺伝子を容易に確認することができる。得られたさらなる情報を使用して、本明細書中に記載のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の遺伝子産物の機能を同定することができる。本発明の実施に必要ないが、対応遺伝子の機能の同定により、その活性を調節して癌表現型を調節する（例えば、転移および増殖を抑制するなど）ための遺伝子をターゲティングする治療薬のデザインにおけるガイダンスを得ることができる。

【０３１１】

（実施例１４：ＴＦＦ３中和剤のｉｎ　ｖｉｖｏ試験）

薬物候補の前臨床評価のために、ＴＦＦ３中和剤を、当該分野で公知の手順によって動物モデルの抗腫瘍活性について試験することができる。適切な動物モデルには、前立腺癌についてはＴＲＡＭＰマウス（ＮＣＩ－Ｆｒｅｄｅｒｉｃｋ　Ｍｏｕｓｅ　Ｍｏｄｅｌｓ　ｏｆ　Ｈｕｍａｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｏｎｓｏｒｔｉｕｍ　Ｒｅｐｏｓｉｔｏｒｙ　ｏｒ　Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから利用可能）および結腸癌についてはＭｉｎマウス（Ｔｈｅ　Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから利用可能）が含まれる。他の癌の動物モデルは当該分野で周知である。

【０３１２】

（実施例１５：ＴＦＦ３エピトープ）

抗体認識および調製のためのＴＦＦ３の線状エピトープを、当該分野で公知の任意の多数の方法によって同定することができる。方法のいくつかの例には、抗原のアミノ酸配列由来のペプチドの抗体結合能力の探索が含まれる。ＢＩＡＣＯＲＥまたはＥＬＩＳＡ法の使用によって結合を評価することができる。他の技術には、抗体への平面固体支持体（「チップ」）上のペプチドライブラリーの曝露および固相スクリーニングで使用される任意の複数の方法による結合の検出が含まれる。さらに、ファージディスプレイを使用し、数ラウンドのバイオパニング後のエピトープ選択を使用して、ペプチドライブラリーをスクリーニングすることができる。本発明の適切な抗体中和剤は、線状もしくは高次構造のエピトープまたはその組み合わせを認識することができる。

【０３１３】

以下の表５は、抗ＴＦＦ３抗体による認識に適切な洗浄エピトープとして同定されたＴＦＦ３領域を提供する。

【０３１４】

【表５－１】

表５

ＥＣＤ名	マッピングしたアミノ酸配列の位置	マッピングしたエピトープの位置	長さ	配列番号	配列
TFF3#1	27-34	27-33	8-マー	20	AVPAKDRV
TFF3#1	27-34	28-34	8-マー	21	VPAKDRVD
TFF3#1	27-34	27-34	9-マー	22	AVPAKDRVD

【０３１５】

【表５－２】

TFF3#2	36-44	36-43	8-マー	23	GYPHVTPK
TFF3#2	36-44	37-44	8-マー	24	YPHVTPKE
TFF3#2	36-44	36-44	9-マー	25	GYPHVTPKE
TFF3#3	63-71	63-70	8-マー	26	FKPLQEAE
TFF3#3	63-71	64-71	8-マー	27	KPLQEAEC
TFF3#3	63-71	63-71	9-マー	28	FKPLQEAEC

（実施例１６：ＴＦＦ３のポリクローナル抗体は、腫瘍細胞成長を阻害する）

（Ａ．ポリクローナル抗体の作製）

ニュージーランド白ウサギを麻酔し、ヒトＴＦＦ３をコードするＤＮＡ発現ベクターを使用して０日目および２８日目に免疫化した。詳細には、各免疫化のために、ウサギあたり０．６ｍｇのＤＮＡ発現ベクターを筋肉内注射し、注射部位に弱電流を短時間印可して、この領域中の筋細胞によるＤＮＡの取り込みを刺激した。次いで、ＭＦ－５９アジュバントまたはフロイント不完全アジュバントのいずれかに乳化した組換えヒトＴＦＦ３タンパク質の筋肉内注射によってウサギに毎月追加免疫を行った。各免疫化から１４日後に血液サンプルを採取し、血液サンプルから生成した血清を、ＥＬＩＳＡアッセイで試験して、組換えヒトＴＦＦ３タンパク質に対する抗体応答の力価を測定した。次いで、血清を、プロテインＡカラムでのクロマトグラフィによって分画し、各サンプル中のＩｇＧ抗体成分を精製した。

【０３１６】

（Ｂ．ＳＷ６２０増殖アッセイ）

ウサギポリクローナル抗体が癌細胞の生存に影響を与えることができるかどうかを試験するために、免疫化ウサギから得た精製ＩｇＧの連続希釈物を、ウェスタンブロッティングによってＴＦＦ３タンパク質を分泌することが示された癌細胞株（ＳＷ６２０）に添加した。この試験のために、ＳＷ６２０細胞を、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含む成長培地を含む９６ウェルプレートに６００細胞／ウェルの密度で最初に播種した。２４時間後（０日目）、培地を除去し、１％ＦＢＳおよび免疫化または免疫前ウサギ由来の種々の濃度のＩｇＧを含む新鮮な成長培地を添加した。各ＩｇＧ濃度を、４連のウェルで試験した。４日目に、プレートから培地を再度除去し、１％ＦＢＳおよび各ＩｇＧ画分のアリコートを含む新鮮な培地をウェルに再度添加した。「細胞力価１液細胞増殖アッセイ（Ｃｅ

ｌｌ Ｔｉｔｅｒ Ｏｎｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ Ｃｅｌｌ Ｐｒｏｌｉｆｅｒａｔｉｏｎ Ａｓｓａｙ）」（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、０、１、４、５、６、および７日目に各ウェル中の相対細胞数を測定した。

【０３１７】

免疫化ウサギ（ウサギ７０７）のうちの１匹から得たＩｇＧ抗体についての１つのこのような試験の結果を図１１に示す。グラフは、第１の免疫化前（「免疫前」）または数ラウンドの免疫化後（「免疫１５６日目」）のいずれかでウサギから採取したＩｇＧを含むウェルで７日目に検出された増殖量を比較する。「免疫１５６日目」のＩｇＧを含むウェルは、「免疫前」ＩｇＧを含むウェルよりも増殖が有意に少なかった。

【０３１８】

本発明を本発明の特定の実施形態を参照して記載しているが、本発明の精神および範囲を逸脱することなく変化させることができ、等価物に置換することができることが当業者に理解される。さらに、特定の状況、材料、合成物、過程、過程段階を本発明の目的、精神、および範囲に適合するための多数の修正形態を作製することができる。全てのこのような修正形態は、本明細書に添付した特許請求の範囲の範囲内に含まれることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【０３１９】

【図１】図１は、異なる全組織中のＴＦＦ３ｍＲＮＡのバリエーションを示す。

【図２】図２は、異なる細胞株中でのＴＦＦ３の発現レベルのバリエーションを示す。

【図３】図３は、結腸癌細胞中でのＴＦＦ３ｍＲＮＡ発現レベルのノックダウンにおける異なるＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの種々の有効性を示す。

【図４】図４は、ＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの特異性を示す。

【図５】図５は、さらなるＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの特異性を示す。

【図６】図６は、癌細胞中でのＴＦＦ３ｍＲＮＡ発現レベルのノックダウンにおけるアンチセンスオリゴヌクレオチドの有効性を示す。

【図７】図７は、結腸癌細胞中でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞傷害効果および抗増殖効果を示す。

【図８－１】図８Ａおよび８Ｂは、前立腺癌細胞中でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞傷害効果および抗増殖効果を示す。

【図８－２】図８Ａおよび８Ｂは、前立腺癌細胞中でのアンチセンスオリゴヌクレオチドの細胞傷害効果および抗増殖効果を示す。

【図９】図９は、正常細胞中でのＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチドの非傷害性を示す。

【図１０】図１０は、前立腺癌細胞についての軟寒天培地中でのコロニー成長のＴＦＦ３アンチセンスオリゴヌクレオチド阻害を示す。

【図１１】図１１は、抗ＴＦＦ３抗体を使用した細胞増殖の阻害を示す。抗ＴＦＦ３ポリクローナル抗血清から単離したＩｇＧ画分を、１％ＦＢＳを含む成長培地で５０μｇ／ｍｌの最終濃度まで希釈し、増殖アッセイの０日目および４日目に４連のウェルに添加した。７日目に細胞増殖度をスコアリングした。

【図１】

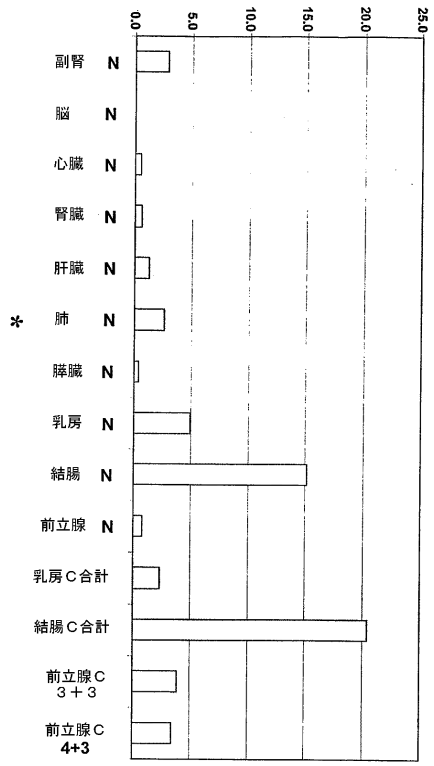


FIGURE 1

ＴＦＦ３の正常な組織発現（総組織中にＨＰＲＴに対して正規化）

【図２】

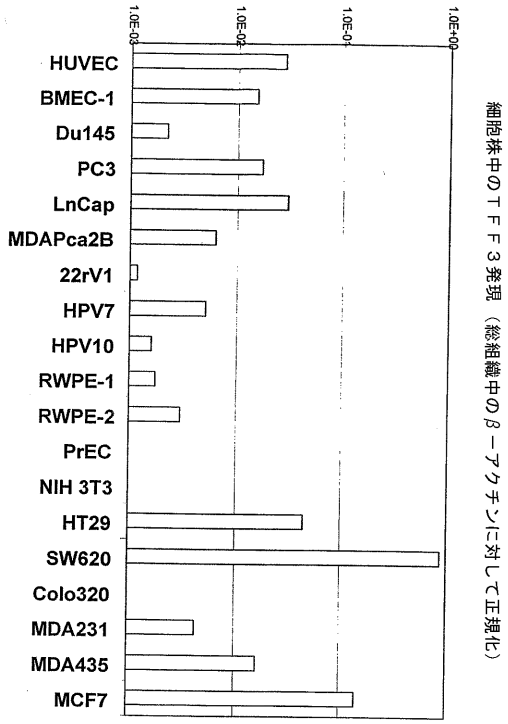


FIGURE 2

細胞株中のＴＦＦ３発現（総組織中のβ－アクチンに対して正規化）

【図８－２】

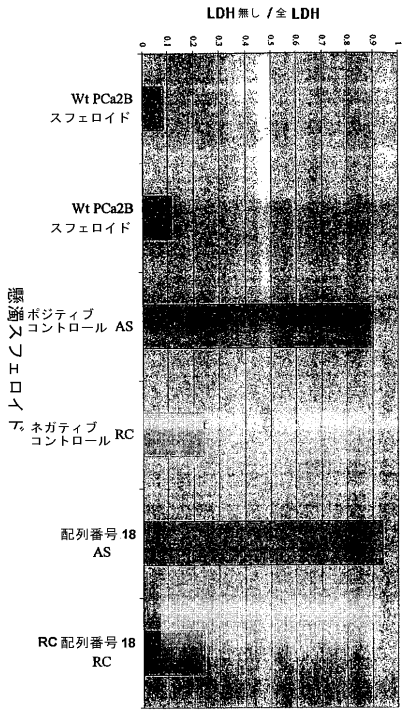


FIGURE 8B

ＴＦＦ３　ＡＳで処置したＰＣａ２Ｂスフェロイド

【図３】

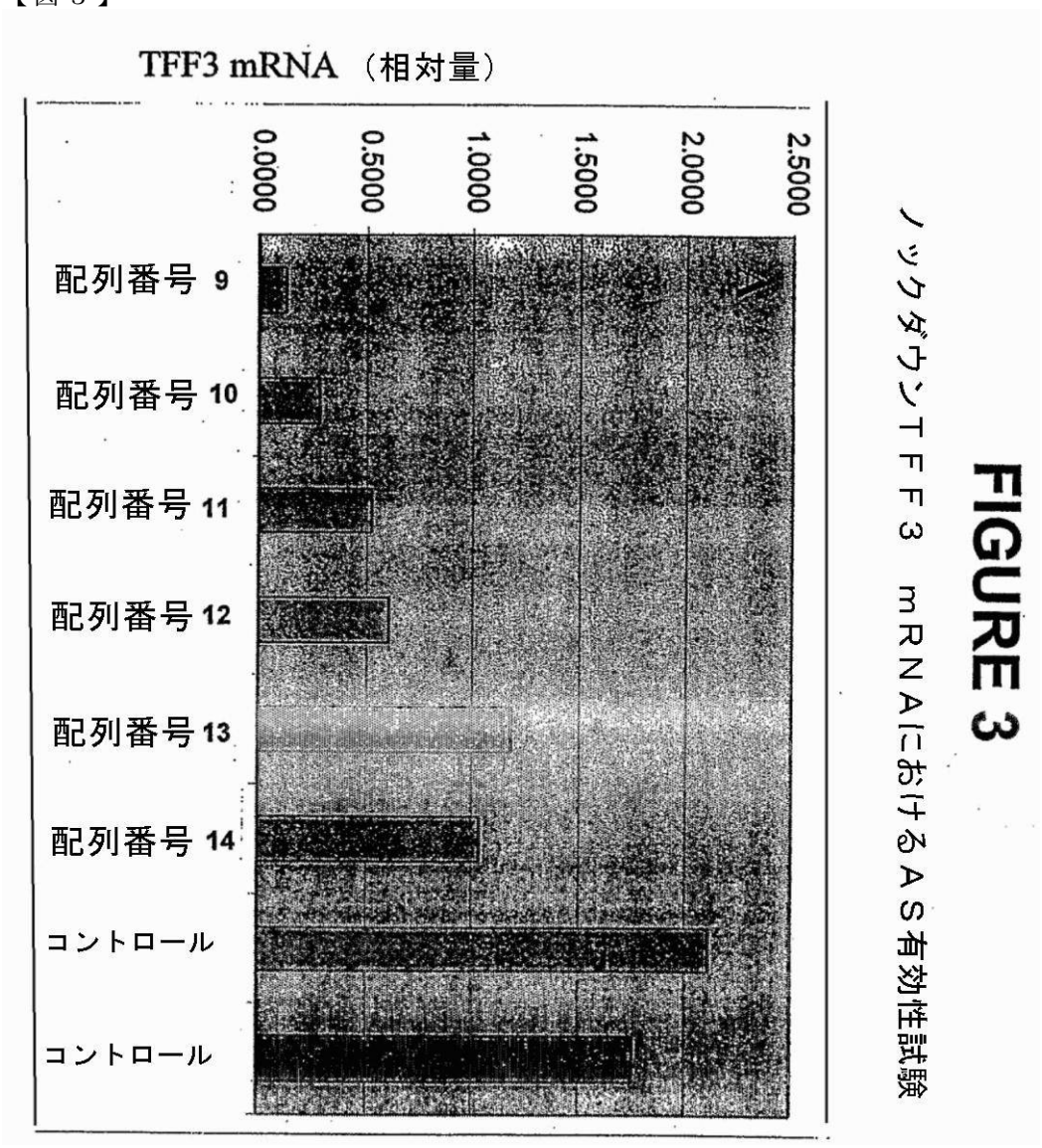


FIGURE 3

ノックダウンＴＦＦ３　ｍＲＮＡにおけるＡＳ有効性試験

【図４】

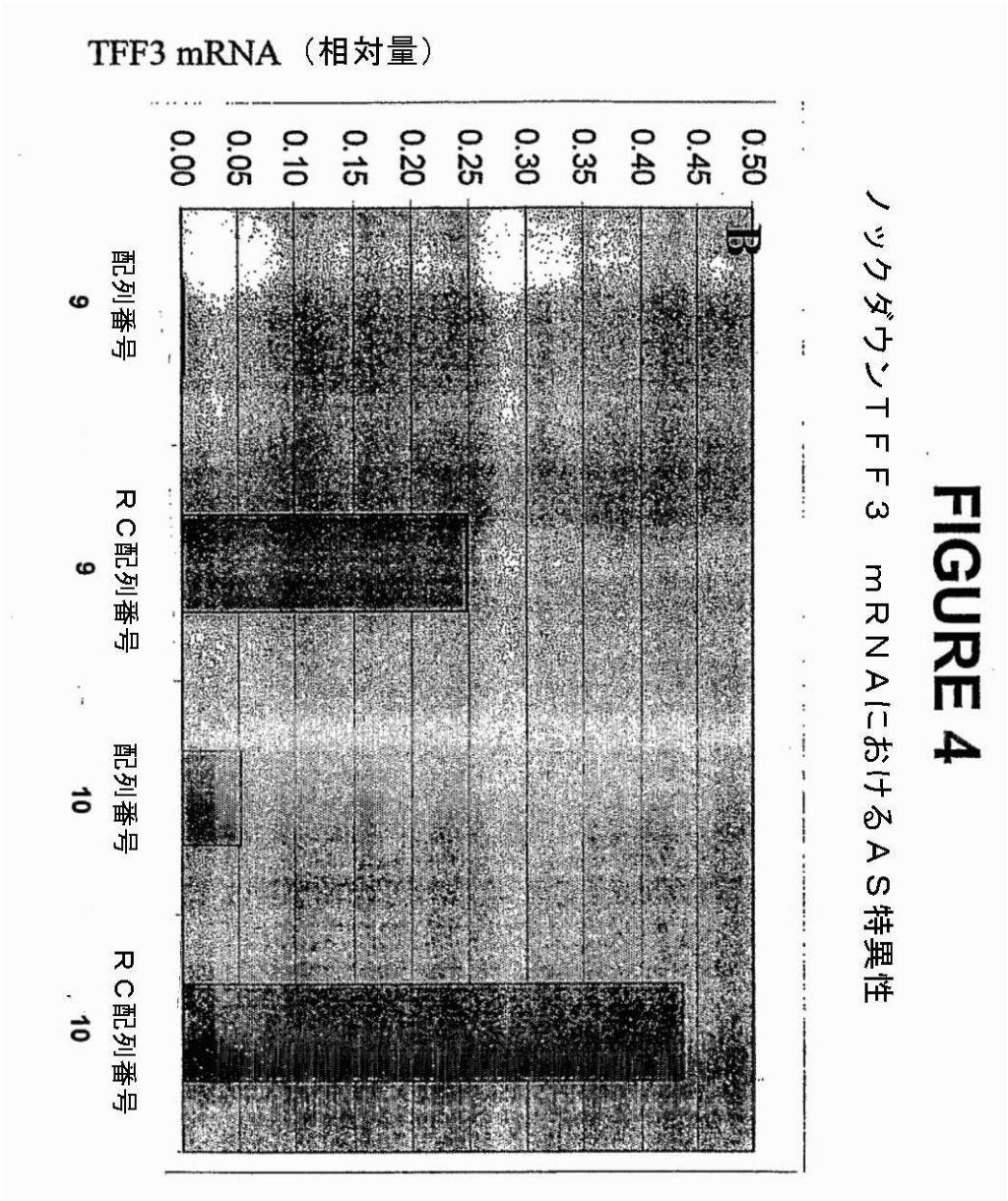


FIGURE 4

ノックダウンＴＦＦ３　ｍＲＮＡにおけるＡＳ特異性

【図５】

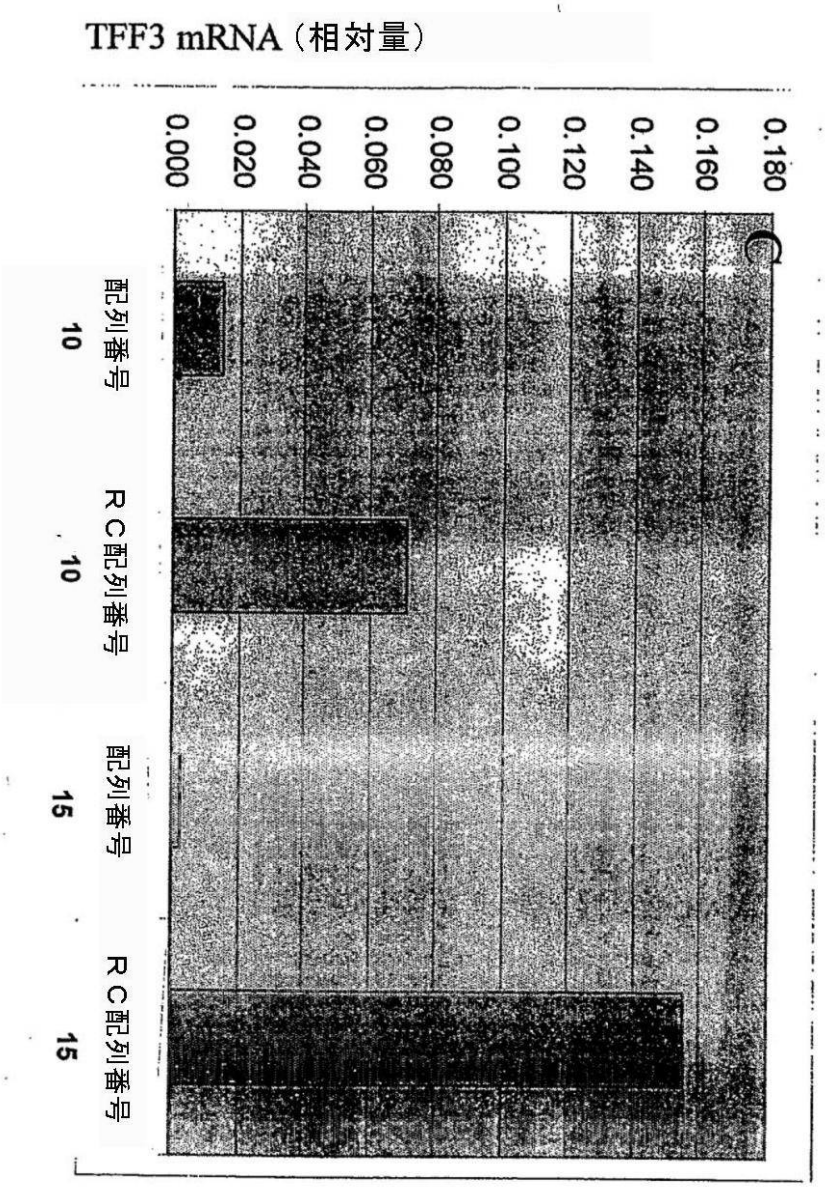


FIGURE 5

ノックダウンＴＦＦ３ ｍＲＮＡにおけるＡＳ特異性

【図６】

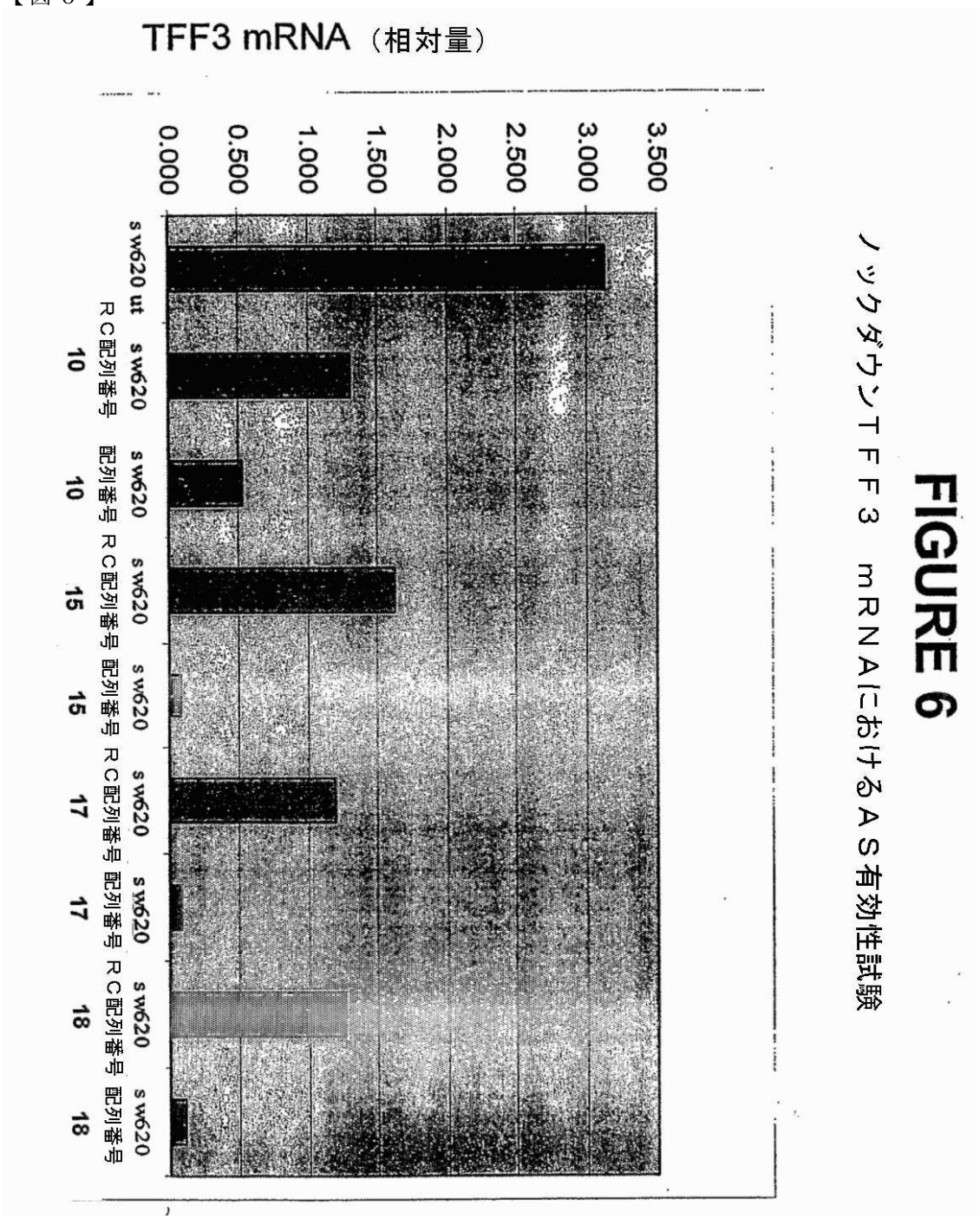


FIGURE 6

ノックダウンＴＦＦ３　ｍＲＮＡにおけるＡＳ有効性試験

【図７】

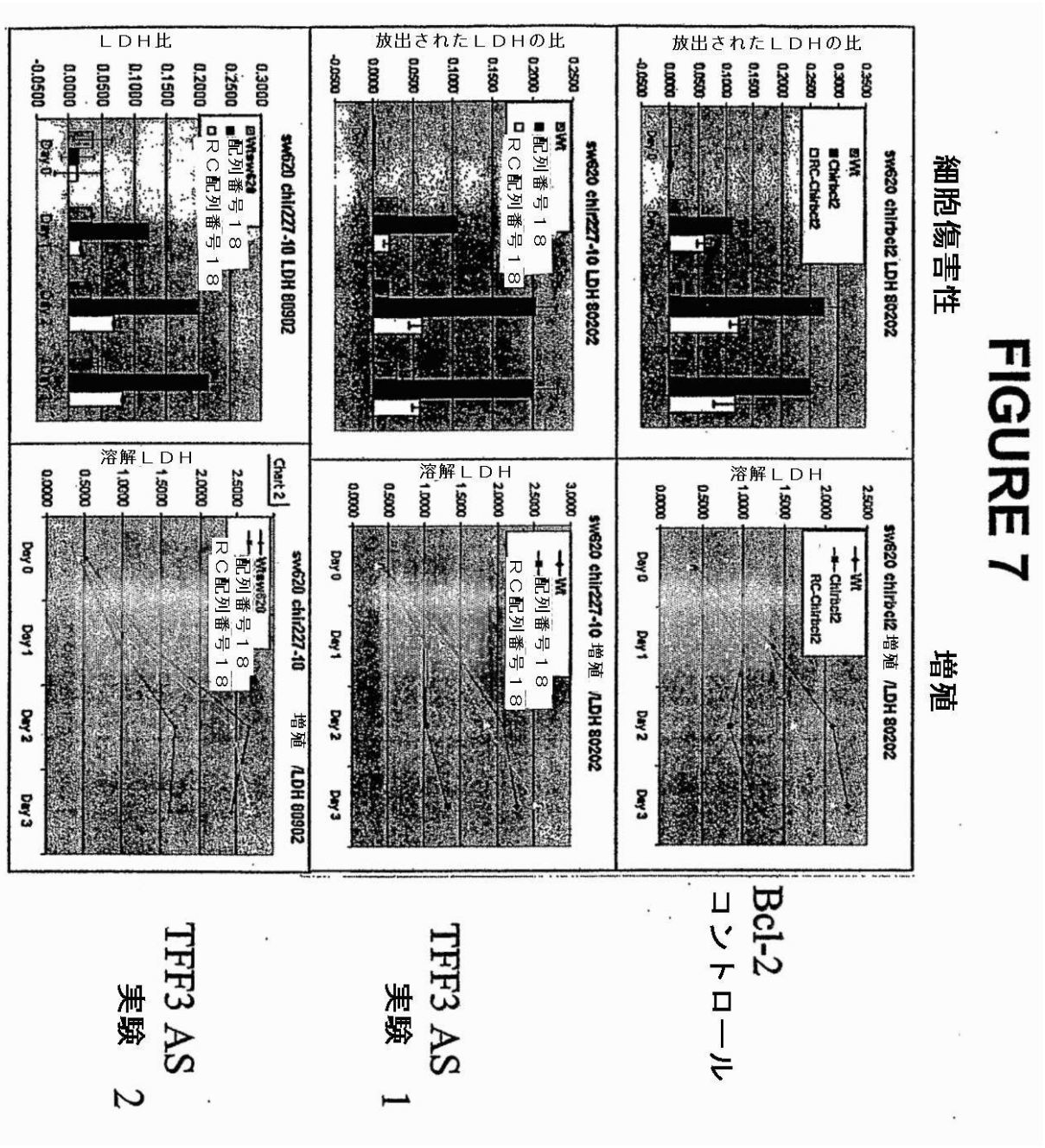


FIGURE 7
細胞傷害性
増殖
Bcl-2
コントロール
TFF3 AS
実験 1
TFF3 AS
実験 2
放出されたＬＤＨの比
溶解ＬＤＨ
ＬＤＨ比
Wt
Chirbcl2
RC-Chirbcl2
配列番号１８
ＲＣ配列番号１８
sw620 chirbcl2 LDH 80202
sw620 chirbcl2 増殖 /LDH 80202
sw620 chir227-10 LDH 80202
sw620 chir227-10 増殖 /LDH 80202
sw620 chir227-10 LDH 80902
sw620 chir227-10 増殖 /LDH 80902
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3

【図８－１】

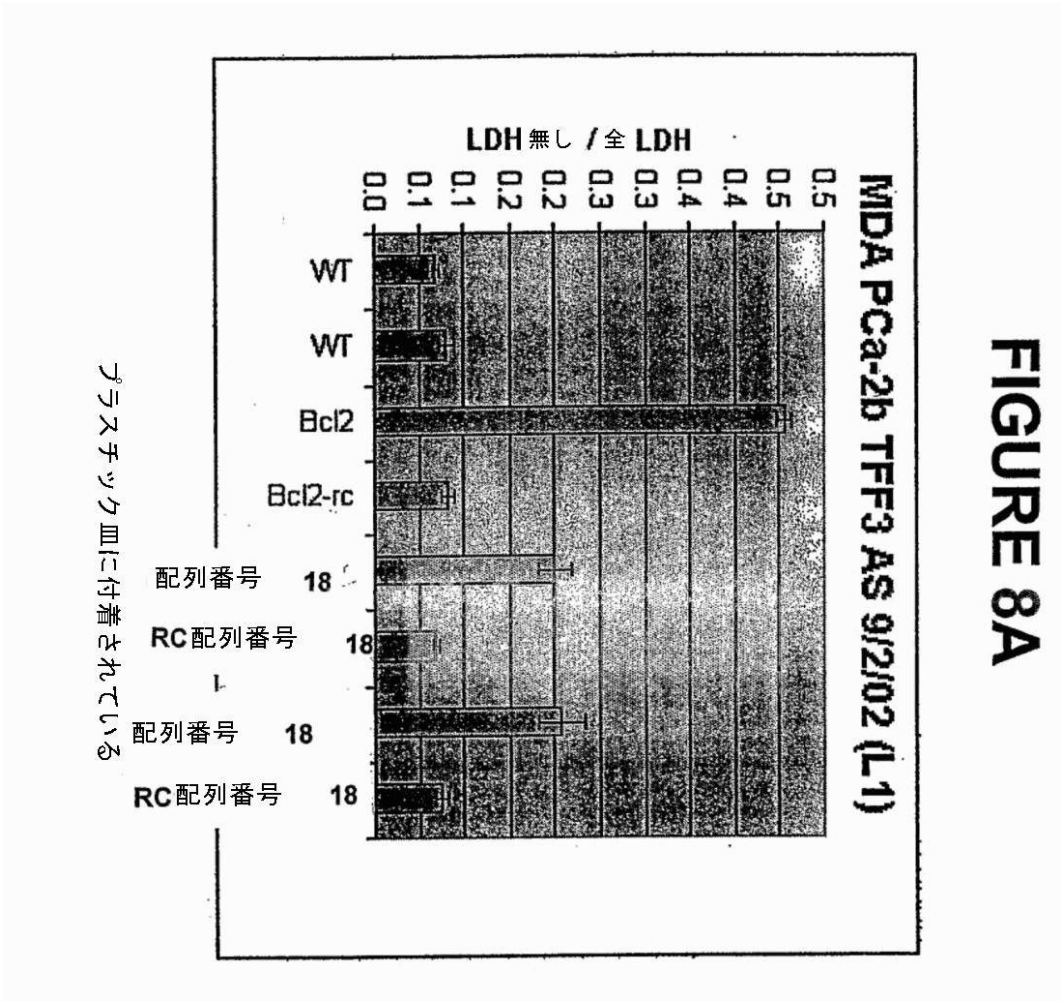


FIGURE 8A

【図９】

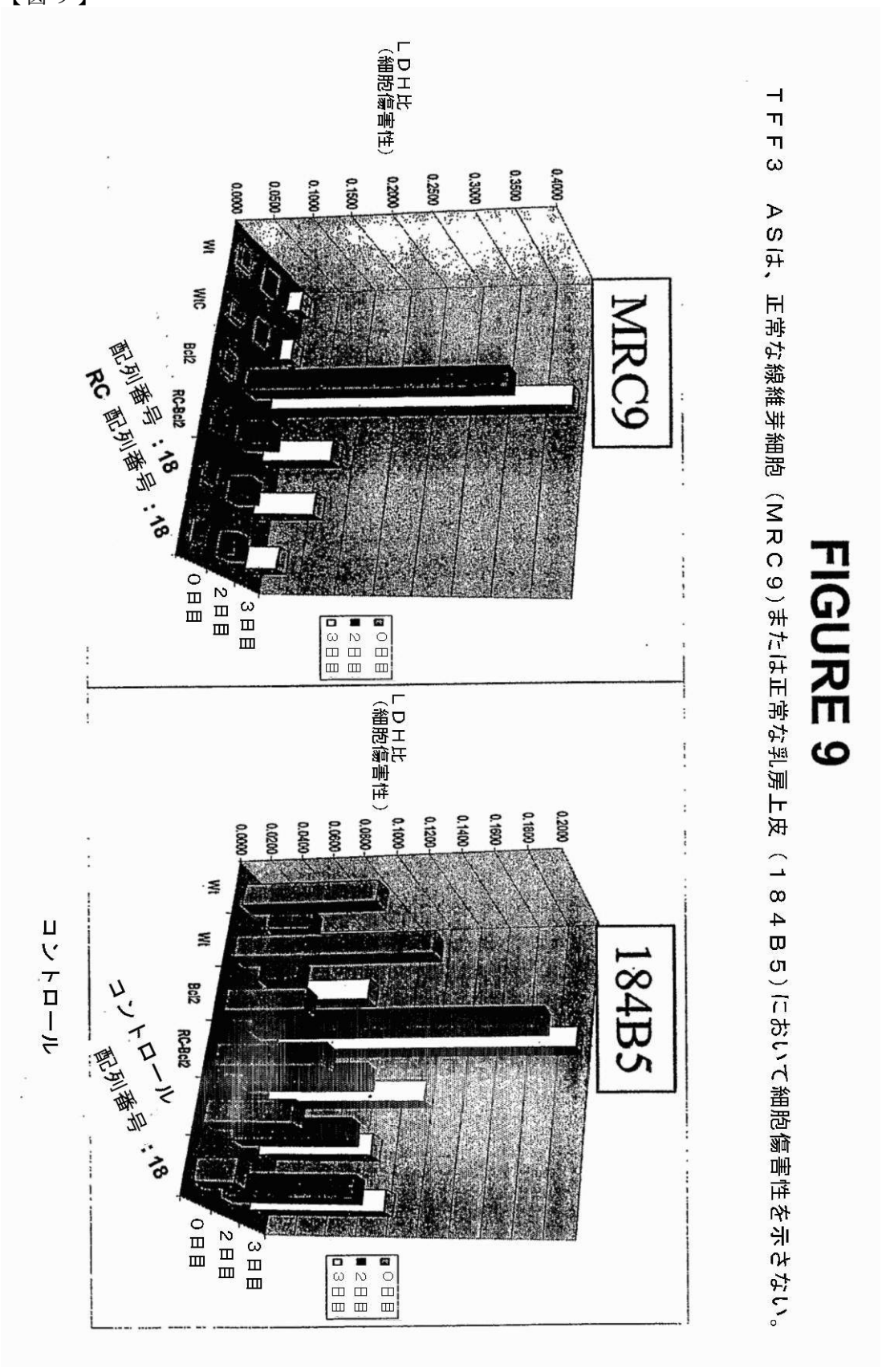


FIGURE 9
ＴＦＦ３　ＡＳは、正常な線維芽細胞（ＭＲＣ９）または正常な乳房上皮（１８４Ｂ５）において細胞傷害性を示さない。
MRC9
184B5
ＬＤＨ比（細胞傷害性）
0.4000
0.3500
0.3000
0.2500
0.2000
0.1500
0.1000
0.0500
0.0000
0.2000
0.1800
0.1600
0.1400
0.1200
0.1000
0.0800
0.0600
0.0400
0.0200
0.0000
Wt
WtC
Bcl2
RC-Bcl2
配列番号：18
RC 配列番号：18
コントロール
配列番号：18
コントロール
０日目
２日目
３日目

【図１０】

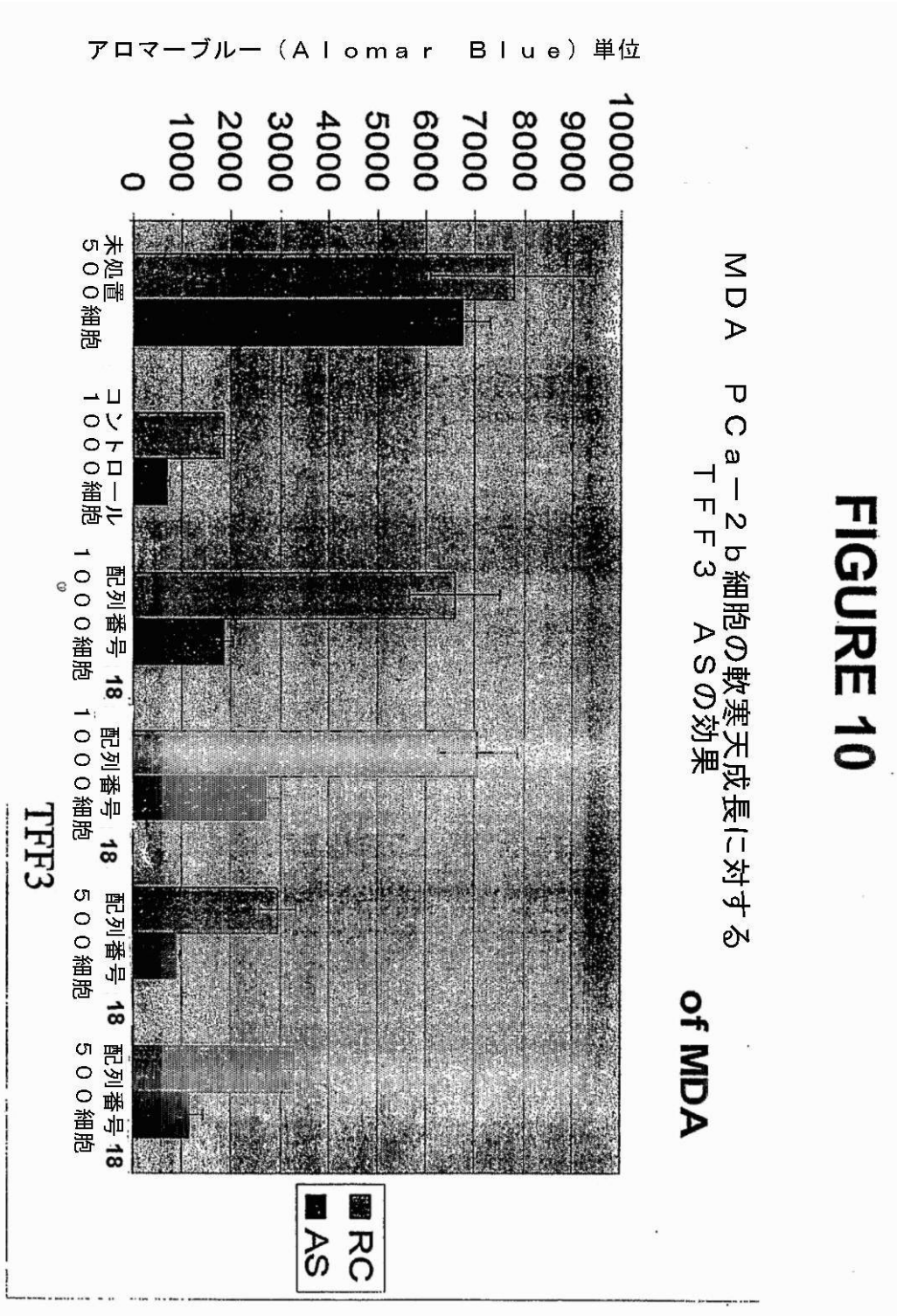
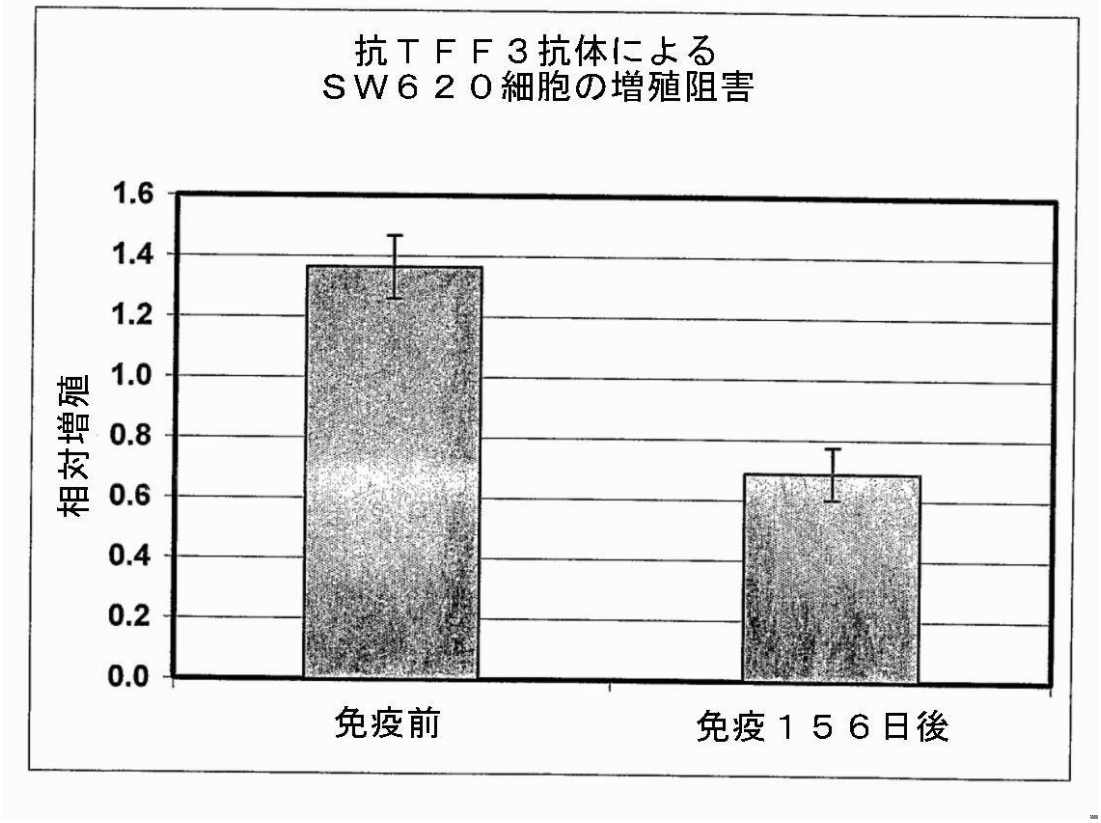


FIGURE 10
ＭＤＡ　ＰＣａ－２ｂ細胞の軟寒天成長に対するＴＦＦ３　ＡＳの効果
of MDA
アロマーブルー（Ａｌｏｍａｒ　Ｂｌｕｅ）単位
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
RC
AS
未処置５００細胞
コントロール１０００細胞
配列番号18　１０００細胞
配列番号18　１０００細胞
配列番号18　５００細胞
配列番号18　５００細胞
TFF3

【図１１】

FIGURE 11



【配列表】
2007501616000001.xml
【手続補正書】
【提出日】平成18年5月10日(2006.5.10)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】
2007501616000001.app

【国際調査報告】

60601030087

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/25508

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(7) : A61K 48/00
US CL : 514/44
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)
U.S. : 514/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/004989 A2 (LILLIE ET AL.) 16 January 2003 (16.01.2003) (see in particular, SEQ ID NO: 465, pg. 2, line 30 - pg. 4, line 8; pg. 8. line 16 - pg. 11, line 6; pg. 26, line 25 - pg. 48, line 30)	1-3, 5-8, 10-25
Y	US 5,733,748 (YU ET AL.) 31 March 1998 (31.03.1998) (see in particular SEQ ID NO: 13, Abstract, col. 3, Fig. 13, col. 4, lines 60-67; col. 16 -col. 22).	1-3, 5-8 and 10-25
Y	US 5,988,148 (BENNETT Et Al.) 7 December 1999 (07.12.1999) (col. 2, line 65- col. 25, line 12)	1-3, 5-6, 10-25
Y	BERTRAND ET AL. comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. Biochem. Biophys. Res. Comm. 2002 Vol., 296: pp. 1000-1004.	7-8

☐ 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
"E" earlier application or patent 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
12 December 2005 (12.12.2005)

Date of mailing of the international search report
05 JAN 2006

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) 273-3201

Authorized officer
Jon B. Ashen
Telephone No. 703-308-1235

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

08. 8. 2006

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/25508

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.: 4
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:
Please See Continuation 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 any 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.: 1-3, 5-8, 10-25 and SEQ ID NO:5

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.

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/25508

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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 examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups 1-15, claim(s) 1-3, 5-8 and 10-25, drawn to a method of making a medicament using a TFF3 neutralizing agent that is an antisense or RNAi molecule that comprises or overlaps any one of SEQ ID NOs: 5-19.

Groups 16-24, claim(s) 1, 9-25 and 59-74, drawn to drawn to a method of making a medicament using a TFF3 neutralizing agent that is an antibody that recognizes at least one region of TFF3 sequence corresponding to one of SEQ ID NOs: 20-28.

Groups 25-33, claim(s) 26-31, 33 and 75-77, drawn to an assay method for detecting TFF3 expression using a TFF3 neutralizing agent that is an antibody that recognizes at least one region of TFF3 sequence corresponding to one of SEQ ID NOs: 20-28.

Group 34, claim(s) 32 and 34, drawn to a method for assessing progression of cancer in a patient comprising comparing TFF3 expression at first and second time points.

Groups 35-49, claim(s) 38-44, drawn to an antisense molecule that modulates the expression of TFF3 that comprises or overlaps any one of SEQ ID NOs: 5-19.

Groups 50-58, claim(s) 45-58, 88-90 and 92-93, drawn to an isolated TFF3 antibody that recognizes at least one region of any one of SEQ ID NOs: 20-28, cell or hybridoma that produces an isolated TFF3 antibody and a composition comprising an isolated TFF3 antibody.

Groups 59-67, claim(s) 79-80 and 87, drawn to an isolated polypeptide comprising amino acid sequences selected from any one of SEQ ID NOs: 20-28.

Groups 68-76, claim(s) 81, drawn to a method of detecting differential expression of TFF3 using an an isolated TFF3 antibody that recognizes at least one region of any one of SEQ ID NOs: 20-28.

Groups 77-80, claim(s) 82-86, drawn to an isolated epitope bearing fragment of SEQ ID NO: 1-4.

Group 81, claim(s) 91, drawn to a method of making an antibody that binds to and neutralizes TFF3.

The inventions listed as Groups 1-81 do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:.

Claim 6 of Group 1, the first claimed invention, specifically claims a method of making a medicament wherein the medicament requires an antisense molecule that comprises or overlaps any one of SEQ ID NOs: 5-19.

This international searching authority considers that the international application does not comply with the requirements of unity of invention (Rules 13.1, 13.2 and 13.3) for the reasons indicated below:

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/25508

According to the guidelines in Section (f)(i)(a) of Annex B of the PCT Administrative Instructions, the special technical feature as defined by PCT Rule 13.2 shall be considered to be met when all the alternatives of a Markush-group are of similar nature. For chemical alternatives, such as the claimed polynucleotide sequences, the Markush group shall be regarded as being of similar nature when:
(A) all alternatives have a common property or activity and
(B)(1) a common structure is present, i.e., a significant structure is shared by all of the alternatives or
(B)(2) in cases where the common structure cannot be the unifying criteria, all alternatives belong to an art recognized class of compounds in the art to which the invention pertains.

The instant antisense oligonucleotide sequences, are considered to be each separate inventions for the following reasons:

The sequences do not meet the criteria of (A), common property or activity or (B)(2), art recognized class of compounds. Although the antisense sequences of the instant application all target a TFF3 gene, each antisense sequence behaves in a different way in the context of the claimed invention. Each sequence targets a different and specific region of a TFF3 gene and each sequence, absent evidence to the contrary, will modulate the expression of a TFF3 gene to varying degrees (as shown in the instant specification, Figure 3, for example). Each member of the class of antisense oligonucleotides cannot be substituted, one for the other, with the expectation that the same intended result would be achieved.

Further, although the instant antisense oligonucleotide sequences target the same "gene" which is "a TFF3 gene", the sequences do not meet the criteria of (B)(1), as they do not share, one with another, a common core structure. Accordingly, unity of invention between the antisense oligonucleotide sequences claimed in the instant application is lacking and each nucleotide sequence claimed is considered to constitute a special technical feature.

For PCT's: If the polynucleotide sequences of the instant invention are recited in the first claimed invention, Applicants will obtain a search of the first sequence listed in the claim. In the instant case, the first sequence listed in claim 6 is SEQ ID NO: 5. For every other sequence applicants wish to have searched, applicants need to elect the sequence and pay an additional fee.

If the sequences are recited in the second or subsequent claimed invention, Applicants will need to elect the group and pay the fee to obtain a search of the first sequence listed in the claims encompassed by the second or subsequent group. For every other sequence in the second/subsequent group that applicants wish to have searched, applicants need to elect the sequence and pay an additional fee.

The special technical feature of Groups 1-15 is a method of making a medicament using a TFF3 neutralizing agent that is an antisense or RNAi molecule that comprises or overlaps any one of SEQ ID NOs: 5-19.

The special technical feature of Groups 16- 24 is a method of making a medicament using a TFF3 neutralizing agent that is an antibody that recognizes at least one region of TFF3 sequence corresponding to any one of SEQ ID NOs: 20-28.

The special technical feature of Groups 25-33 is an assay method for detecting TFF3 expression using a TFF3 neutralizing agent that is an antibody that recognizes at least one region of TFF3 sequence corresponding to any one of SEQ ID NOs: 20-28.

The special technical feature of Group 34 is a method for assessing progression of cancer in a patient comprising comparing TFF3 expression at first and second time points.

The special technical feature of Groups 35-49 is an antisense molecule that modulates the expression of TFF3 that comprises or overlaps any one of SEQ ID NOs: 5-19.

The special technical feature of Groups 50-58 is an isolated TFF3 antibody that recognizes at least one region of any one of SEQ ID NOs: 20-28, cell or hybridoma that produces an isolated TFF3 antibody and a composition comprising an isolated TFF3 antibody.

The special technical feature of Groups 59-67 is an isolated polypeptide comprising amino acid sequences selected from any one of SEQ ID NOs: 20-28.

The special technical feature of Groups 68-76 is a method of detecting differential expression of TFF3 using an isolated TFF3 antibody that recognizes at least one region of any one of SEQ ID NOs: 20-28.

The special technical feature of Groups 77-80 is an isolated epitope bearing fragment of one of SEQ ID NOs: 1-4.

The special technical feature of Group 81 is a method of making an antibody that binds to and neutralizes TFF3.

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US04/25508

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
EAST, STN (medline, embase, biosis, caplus)
trefoil factor, TFF3, antisense, antibody (SEQ ID NO: 5)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C07K 14/47	***(2006.01)***	Ｃ０７Ｋ	14/47		４Ｃ０８５
A61K 48/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８６
A61K 31/7088	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/7088		４Ｈ０４５
A61K 39/395	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
A61K 31/568	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	31/568		
A61P 35/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	35/00		
A61P 43/00	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５	
G01N 33/53	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
		Ｇ０１Ｎ	33/53	Ｄ	

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．Ｍａｃｉｎｔｏｓｈ

(72)発明者 ジャナトポア, マリー ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８－２９１６, エメリービル, ホートン ストリート ４５６０, エム／エス アール３３８
(72)発明者 ガルシア, パブロ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８－２９１６, エメリービル, ホートン ストリート ４５６０, エム／エス アール３３８
(72)発明者 ラインハルト, クリストフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８－２９１６, エメリービル, ホートン ストリート ４５６０, エム／エス アール３３８

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 BA61 CA11 DA02 EA10 GA01 GA11 HA12 HA17
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR36 QR42 QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QS03 QS25 QS34 QS36 QS39 QX01 QX02
4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA14
4B065 AA90X AB02 AC14 BA08 CA25 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB26
4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 CC21 DD88 EE01
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26
4H045 AA11 AA30 BA09 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74

专利名称(译)	三叶因子3（TFF 3）作为抗癌治疗的靶标		
公开(公告)号	JP2007501616A	公开(公告)日	2007-02-01
申请号	JP2006522760	申请日	2004-08-05
[标]申请(专利权)人(译)	希龙公司		
申请(专利权)人(译)	Chiron公司		
[标]发明人	ジャナトポアマリージェイ ガルシアパブロ ラインハルトクリストフ		
发明人	ジャナトポア, マリー ジェイ. ガルシア, パブロ ラインハルト, クリストフ		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C07K16/32 C12P21/08 C12N5/10 C07K14/47 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/395 A61K31/568 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/53 A61B C07K14/575 C07K16/26 C12N15/113		
CPC分类号	C12N15/1136 C07K14/575 C07K16/26 C07K2317/34 C07K2317/73 C12N2310/11		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C07K16/32 C12P21/08 C12N5/00.B C07K14/47 A61K48/00 A61K31/7088 A61K39/395.D A61K31/568 A61P35/00 A61P43/00.105 A61K39/395.N G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA45 4B024/BA61 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/EA10 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS03 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AB02 4B065/AC14 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB31 4C085/CC21 4C085/DD88 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/493173 2003-08-07 US 60/498438 2003-08-28 US		
其他公开文献	JP2007501616A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及治疗和预防癌症的方法，例如以三叶因子3（TFF3）的差异表达为特征的癌症。该方法包括向患者施用调节TFF3活性或表达的试剂。本发明还涉及降低细胞中TFF3表达的生理作用，包括抑制细胞运动和对细胞凋亡的抗性。还提供了可以调节TFF3的表达或活性的寡核苷酸和抗体。

(P2007-501616A)
(43)公表日 平成19年2月1日(2007.2.1)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	***(2006.01)***	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C12Q 1/68	***(2006.01)***	C12Q	1/68	A	4B063
C07K 16/32	***(2006.01)***	C07K	16/32		4B064
C12P 21/08	***(2006.01)***	C12P	21/08		4B065
C12N 5/10	***(2006.01)***	C12N	5/00	B	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 （全 90 頁） 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2006-522760 (P2006-522760)
(86)(22)出願日 平成16年8月5日 (2004.8.5)
(85)翻訳文提出日 平成18年3月28日 (2006.3.28)
(86)国際出願番号 PCT/US2004/025508
(87)国際公開番号 WO2005/013802
(87)国際公開日 平成17年2月17日 (2005.2.17)
(31)優先権主張番号 60/493,173
(32)優先日 平成15年8月7日 (2003.8.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
(31)優先権主張番号 60/498,438
(32)優先日 平成15年8月28日 (2003.8.28)
(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 505418696
カイロン コーポレイション
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４６０８－２９１６， エミリービル， ホートン ストリート ４５６０， エム／エス アール３３８
(74)代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74)代理人 100062409
弁理士 安村 高明
(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く