

(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
CO7K 16/32 (2006.01)	CO7K 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 W02005/013802
 (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 コーポレーション
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 946
 08-2916, 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、T F F 3 中和剤の使用。

【請求項 2】

前記 T F F 3 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 T F F 3 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。 10

【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 R N A i 分子を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

前記 R N A i 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。 20

【請求項 9】

前記 T F F 3 中和剤が、T F F 3 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 T F F 3 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。 30

【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、T F F 3 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。 40

【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、T F F 3 中和剤の使用。

【請求項 20】

前記腫瘍が、T F F 3 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。 50

【請求項 2 1】

細胞中における T F F 3 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、T F F 3 中和剤の使用。

【請求項 2 2】

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 2 1 に記載の使用。

【請求項 2 3】

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、T F F 3 中和剤の使用。

【請求項 2 4】

癌細胞の浸潤を減少するための医薬の調製における、T F F 3 中和剤の使用。

【請求項 2 5】

細胞における T F F 3 発現を調節するための医薬の調製における T F F 3 中和剤の使用。

【請求項 2 6】

生物学的サンプル中の T F F 3 を検出する方法であって、該方法は、該サンプルを T F F 3 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 T F F 3 との間の結合を検出する工程を包含する、方法。

【請求項 2 7】

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 T F F 3 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 T F F 3 の特異な発現の証拠を検出する工程を包含し、ここで、T F F 3 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 2 8】

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 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

T F F 3 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 T F F 3 の特異な発現の証拠を検出する工程を包含し、ここで、T F F 3 の特異な発現の証拠が、該 T F F 3 中和剤に対する患者の感受性の指標となる、方法。

【請求項 3 0】

前記 T F F 3 の特異な発現の証拠が、前記患者の癌サンプル中の T F F 3 の上方制御である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

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 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 2】

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 T F F 3 発現を第 2 の時点での T F F 3 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 T F F 3 発現の増加が、該癌の進行の指標となる、方法。

【請求項 3 3】

前記 T F F 3 発現の増加が、少なくとも約 2 5 % の発現の増加である、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

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 T F F 3 発現を第 2 の時点での T F F 3 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 T F F 3 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 3 5】

前記 T F F 3 中和剤が検出可能な標識を含む、請求項 1 ~ 請求項 3 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 36】

前記 T F F 3 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 T F F 3 中和剤が、抗体、核酸、アンチセンス分子、または R N A i 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】

T F F 3 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。 10

【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】

T F F 3 発現を調節する、R N A i 分子。

【請求項 42】

前記 R N A i 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 R N A i 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 20

【請求項 44】

請求項 43 に記載の R N A i 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 T F F 3 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 T F F 3 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) フェージ上で抗体のライブラリーを合成する工程、 30

b) 該フェージと配列番号 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 T F F 3 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ェージを単離する工程であって、該抗体が、少なくとも 10^8 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 T F F 3 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 T F F 3 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、単離された該フェージを分析する工程、 40

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。 50

【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 F a b 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。 10

【請求項 55】

前記抗体の結合親和性が、T F F 3 以外のポリペプチドに対して約 1×10^5 K a 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 T F F 3 抗体および薬学的に許容可能なキャリアを含む、組成物。 20

【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 T F F 3 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 T F F 3 中和剤の使用であって、該医薬が、従来 of 癌処置と組み合わせて使用され、ここで、該 T F F 3 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 of 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 of 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。 30

【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 T F F 3 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。 40

【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 T F F 3 中和剤の使用であって、該 T F F 3 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、T F F 3 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 T F F 3 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 T F F 3 中和剤の使用であって、ここで、該 T F F 3 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 6 9 に記載の使用。

【請求項 7 1】

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 T F F 3 中和剤の使用であって、ここで、該 T F F 3 中和剤が請求項 4 5 に記載の抗体である、使用。

【請求項 7 2】

癌の浸潤を減少するための医薬の調製における T F F 3 中和剤の使用であって、該 T F F 3 中和剤が請求項 4 5 に記載の抗体である、使用。

【請求項 7 3】

生物学的サンプル中の T F F 3 の検出方法であって、該方法は、該サンプルを請求項 4 5 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 T F F 3 との間の結合を検出する工程を包含する、方法。

10

【請求項 7 4】

前記 T F F 3 中和剤が検出可能な標識を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

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 4 5 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 T F F 3 の特異な発現の証拠を検出する工程を包含し、ここで、該 T F F 3 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 7 6】

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 7 5 に記載の方法。

20

【請求項 7 7】

前記 T F F 3 中和剤が検出可能な標識を含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、または配列番号 2 8 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 7 9】

前記ポリペプチドが、約 8 アミノ酸長～約 8 0 アミノ酸長である、請求項 7 8 に記載のペプチド。

30

【請求項 8 0】

前記ポリペプチドが抗 T F F 3 抗体に特異的に結合する、請求項 7 8 に記載のペプチド。

【請求項 8 1】

サンプル中の T F F 3 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：T F F 3 複合体を形成可能な条件下で、請求項 4 5 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 T F F 3 の特異な発現を示す、工程を包含する、方法。

40

【請求項 8 2】

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 8 3】

配列番号 1～4 の約 6 個と約 2 0 個との間の連続アミノ酸からなる、請求項 8 2 に記載のエピトープ保有フラグメント。

【請求項 8 4】

配列番号 1～4 の約 1 0 個の連続アミノ酸からなる、請求項 8 3 に記載のエピトープ保有フラグメント。

50

【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。

10

【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。

20

【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巢細胞、骨髓腫細胞、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】

30

【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。

40

【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

50

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)。

10

【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

20

【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

30

【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】

40

【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。

50

【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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

では、T F F 3の特異な発現の証拠は、患者の癌サンプル中のT F F 3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T F F 3発現を第2の時点でのT F F 3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T F F 3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、「T F F 3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T F F 3発現を第2の時点でのT F F 3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T F F 3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、T F F 3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、T F F 3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T F F 3配列の少なくとも1つの領域を認識する、単離抗T F F 3抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、

a) フェージ上で抗体ライブラリーを合成する工程と、

b) 前記フェージと配列番号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T F F 3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ェージを単離する工程と、前記抗体を、少なくとも 10^8 l / 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T F F 3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T F F 3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ェ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、T F F 3以外のポリペプチドに対して約 1×10^5 Ka未満である。

【0027】

10

20

30

40

50

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する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。

10

【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。

20

【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。

30

【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)。

40

【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

50

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。

10

【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、ヒトトレポイル因子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。

20

30

【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。

40

【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

50

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に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、異なる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。

10

【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。

20

【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 Haez erbrouck 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。システイン枯渴ムテインを、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。

30

40

【0043】

50

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。 10

【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、本明細書中に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。 20 30

【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。 40

【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 50

で $0.1 \times SSC$ (90 mM 生理食塩水 / 0.9 M 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つの本明細書中に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 18 nt、25 nt、50 nt、75 nt、または 100 nt の範囲内のサイズのプローブであるが、一般に、約 15 nt 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、対立遺伝子改変体を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 30 nt 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、MPSEARCH プログラム (Oxford Molecular) で実行される Smith-Waterman 相溶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約 85 % の配列同一性を有し、少なくとも

10

20

30

40

50

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。

10

20

【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中に見出される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。

30

【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。

40

【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

50

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 complexity)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)。

10

【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る。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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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発現に關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発現に關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

10

20

30

40

50

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。

10

【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の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。

20

【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(B r a n c h , A . D . , T . I . B . S . 23 : 45 - 50 (1998))

30

【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TF F 3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TF F 3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 : T F F 3 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'

10

20

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。

30

【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。

40

【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

50

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CH₂成分を有する他の骨格を有する骨格が含まれる。

10

【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。

20

30

【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。

40

【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

50

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C₁~C₁₀アルキルまたはC₂~C₁₀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。

10

【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-プロモ）、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。

20

30

40

【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-ジオ-ヘキサデシル-rac-グリセロール-3-H-ホスホネート）、ポリアミンもしくはポ

50

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チ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、RNA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、RNA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、オリゴヌクレオチド、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。

10

【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。

20

30

【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。

40

【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

50

リボヌクレオチドと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0.1 μm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を得られる。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。

10

20

【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。

30

【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)。

40

【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Scarlinge 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

50

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 Cedergren, 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。 10

【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)。 20

【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RNAアーゼプリボザイム、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)。 30

【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. NY Acad. 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。 40

【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標的RNAが切断される8つの塩基対活性部位を有する。

10

【0102】

リボザイムを直接添加するか、リボ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。

20

【0103】

リボザイムを、当業者に公知の種々の方法(リボ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、および生体接着性マイ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。

30

【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(pol I)、RNAポリメラーゼII(pol II)、またはRNAポリメラーゼIII(pol III)のプロモーターから駆動することができる。pol IIまたはpol III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pol II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り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

40

50

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. U.S.A., 90, 6340-4; L'Huillier, P.J., et al., 1992, EMBO J., 11, 4411-8; Lisziewicz, J., et al., 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 et al., 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 coworkers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。RNA_i分子は、dsRNA分子であり得る。

【0108】

使用することができるRNA_i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。

10

【0109】

RNA_i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。

20

【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0.5 μg / 10⁶細胞から3 μg / 10⁶細胞まで変化し得る。

30

【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。

40

【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、当該分野で周知のように、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

50

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 (pH 6.4)、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。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。

10

【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る。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。

20

30

【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。

40

【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

50

(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に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ずに阻害する)。

【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。

10

20

30

40

50

【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、その後多数の定常ドメインを有する。

10

【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、およびと呼ばれる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. 3082:4592(1985); Chothia et al., Nature 342:877-883(1989))。

20

【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。

30

【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. N.Y. 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10³倍、より好ましくは少なくとも10⁴倍、より好ましくは少なくとも10⁵倍、さらにより好ましくは少なくとも10⁶倍でTFF3に結合する。

40

【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

50

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させる。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, Coligan 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)、ドットプロットまたはウェスタンプロットアッセイ、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、SOCl₂、またはR¹N=C=NR(式中、RおよびR¹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、ウシサイロプロブリン、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))。

10

【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。

20

【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 and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

30

【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。

40

【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

50

フィ、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティー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. Opin. Immunol., 5: 256-262 (1993)およびPhickthun, Immunol. Revs., 130: 151-188 (1992)が含まれる。

10

【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., Biotechnol., 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。

20

【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 al., Proc. Natl. Acad. Sci. 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。

30

【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TF3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

40

50

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); Reichmann 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)」法にしたがって、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 et al., 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. Nat. 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

10

20

30

40

50

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); Bruggemann et al., Year in Immunol., 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(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ができ、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 et al., 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み合わせのために、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Trauneker et al., EMBO J, 10:3655-3659 (1991) に開示されている。

10

【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 - 抗原組み合わせ部位) 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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

口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WO92/200373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戦略も報告した。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

10

20

30

40

50

、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(Chariet 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。

10

【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、-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)、ニガウリンヒビター、クルシン(curcumin)、クロシン、サパロナリア・オフィシナリス(sapaonarria 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、W093/21232号を参照のこと。

20

【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(aldehydes)(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(tolylene)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

30

40

50

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 (Charl et al. 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、W088/07378号および米国特許第4,975,278号を参照のこと。

10

【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アルスルファターゼ; 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、スプチリシン、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 -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。

20

30

【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TTF3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。

40

【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り

50

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。

10

【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ッ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)。

20

【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。

30

【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。

40

【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；

50

中性で親水性：c y s、s e r、t h r；
 酸性：a s p、g l u；
 塩基性：a s n、g l n、h i s、l y s、a r g；
 鎖の配向に影響を与える残基：g l y、p r o；および
 芳香族：t r p、t y r、p h e。

【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）。

10

【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。

20

30

【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）。

40

【0177】

50

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。Wolf 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。

10

20

【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、IgG1、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。

30

【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WO94/26764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。

40

【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

50

」は、本発明の化合物の生理学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RNA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、およびポリガラクトン酸などなど）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が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 et al., 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 et al., 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 et al., 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); Gailardin 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。

10

【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); Lebacqz-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。多数のパキウ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., *Biol Technology* (1988) 6:47-55, Miller et al., 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。

20

30

【0187】

哺乳動物発現を、Dijkema et al., *EMBO J.* 4:761 (1985); Gorman et al., *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。

40

【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)

50

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 T F F 3 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's 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。

10

20

【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、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル)、またはマクロエマルジ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。

30

【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 DEPOSIT (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。

40

【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

50

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 T F F 3 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。

10

【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。

20

【0197】

T F F 3 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、T F F 3 中和剤は、T F F 3 の活性を阻害するヒト抗体、キメラ抗体、または抗 T F F 3 抗体の s c F v、抗体フラグメント、ペプチド、または低分子;または T F F 3 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。

30

【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。

40

【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 ~ 30 mg / 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 ~ 10 mg / 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】

50

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 vivo* 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、リボソーム、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。リボ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

10

20

30

40

50

エン、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)、コロンニ刺激因子(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、組み合わせで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、伝統的な癌処置は、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。

10

【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。

20

【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、「ポイデンチャンバー」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。

30

【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ラダーバンド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。

40

【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/投与方法または、例えば、TFF3中和剤を含む培地への細胞の曝露によ

50

て接触させることができる。例えば、細胞を、T F F 3 中和剤が少なくとも部分的に細胞膜に浸透し、細胞中でT F F 3 ポリペプチドまたはT F F 3 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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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、マイクロエマルジョン、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。

50

【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られた場合に、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賦形剤を使用して、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、ダウノルピシン、ダクチノマイシン、ドキシソルピシン、プレオマイシン、マイトマイシン、ナイトロジェンマスタード、クロラム

10

20

30

40

50

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)、ピダラビン、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。

10

【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ト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。

20

30

【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療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) アッシュケナー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)

40

50

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TF F 3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、Hanaahan 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、TF F 3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TF F 3発現を示す。さらなる実施形態では、TF F 3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。

10

【0235】

本発明は、TF F 3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、TF F 3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)TF F 3に対応するポリヌクレオチドの発現、または(2)TF F 3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TF F 3発現の減少またはTF F 3レベルの減少および/またはTF F 3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。

20

【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([³H]-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LISA)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。

30

【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TF F 3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。

40

【0238】

(TF F 3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TF F 3中和剤、TF F 3ポリペプチド、およびTF F 3ポリヌクレオチドの使用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、TF F 3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

50

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TF F 3レベルの検出および/または癌細胞中のTF F 3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TF F 3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TF F 3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TF F 3中和剤とTF F 3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、TF F 3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TF F 3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TF F 3発現の証拠の検出による、TF F 3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、TF F 3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、TF F 3中和剤への治療に正にตอบสนอง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TF F 3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TF F 3(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TF F 3ポリペプチドの検出)

いくつかの実施形態では、TF F 3細胞の過剰発現の検出によるTF F 3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な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―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. Biophys. 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。

10

【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、 ^{152}Eu 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。

20

30

40

【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。

50

【0248】

(癌細胞中のTF F 3ポリペプチドの検出)

癌細胞中のTF F 3転写物の細胞中の発現の検出によるTF F 3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、TF F 3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TF F 3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TF F 3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。

10

【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、TF F 3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。

20

【0250】

一般に、少なくとも12個の連続したTF F 3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TF F 3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。

30

【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。

40

【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

50

、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)に記載の伝統的なプロッティング技術(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。

10

【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 、 ^3H 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、増幅で使用するヌクレオチドのプールを標識する。

20

30

【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ト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

40

50

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799897号; WO97/29212号; WO97/27317号; EP785280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728520号; 米国特許第5,599,695号; 欧州特許第721016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。

10

【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。

20

【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、ガ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（BWF I）、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。

30

【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。

40

【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

50

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 et 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。

10

【0261】

【表 2】

表 2. 前立腺患者のデータ

患者 I D	組織型	グリーソングレード	患者 I D	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。

【 0 2 6 2 】

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

10

20

30

40

50

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発露物質から蛍光標識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。

10

【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トティングを行い、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トティングした。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。

20

30

【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/1mMEDTA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。

40

【0267】

次いで、アレイを、Molecular Dynamics Generation IIIデュアルカラーレーザーキャナ/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。

50

【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TF F3の発現)

(癌におけるTF F3 mRNA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 ($> 2x$)、5倍超 ($> 5x$)、または半分未満 ($< 0.5x$)、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TF F3 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TF F3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TF F3 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-アクトリ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)、NIH3T3(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、0.45μm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/

10

20

30

40

50

BRL)で2 μ M(すなわち、約20 μ g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/ μ g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、 α -アクチン)に対して正規化する。各20 μ lの反応のために、抽出RNA(一般に、全部で0.2~1 μ g)を、滅菌0.5または1.5ml微量遠心管に入れ、水を総体積12.5 μ lまで添加する。各チューブに、2.5 μ l H₂O、2.0 μ l 10 \times 反応緩衝液、10 μ l オリゴdT(20pmol)、1.0 μ l dNTPミックス(各10mM)、0.5 μ l RNAsin(登録商標)(20u)(Ambion, Inc., Hialeah, FL)、および0.5 μ l 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7.5 μ l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 $^{\circ}$ C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。

10

20

【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 \times PCR緩衝液II、3mM MgCl₂、140 μ M 各dNTP、0.175pmol 各オリゴ、1:50, 000倍希釈のSYBR Green、0.25mg/ml BSA、1単位のTaqポリメラーゼ、および20 μ l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50mM KCl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20 μ lアリコート

30

【0281】

(実施例5：TF F3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TF F3を発現する結腸癌細胞株)でのTF F3 mRNA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。

40

【0282】

(ASを使用したTF F3 mRNAのノックダウン)

TF F3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TF F3 mRNAレベルの測定によって試験した。

50

【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、TFF3 mRNA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。

10

【0285】

図6は、TFF3 mRNA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。

20

【0287】

細胞を、96ウェルプレート中で約60～80%コンフルエンスにプレートする。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。

30

【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。

40

【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に対する培地中に放出されたLDHの比

50

(r L D H / t L D H)としてデータを提供する。B C L 2 (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 ; B C L 2 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。

【 0 2 9 1 】

(実施例 8 : T F F 3 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)

S W 6 2 0 細胞における T F F 3 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、A S および R C 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 L D H に対する培養培地に放出された L D H (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 L D H レベルによって示した。ポジティブコントロールとして、B c l - 2 特異的アンチセンスもトランスフェクトした。B c l - 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增加する。結果を図 7 に示す。

10

【 0 2 9 2 】

異なる培養条件で、前立腺癌細胞 (P c a 2 B) 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 C U 1 4 5 および 2 2 R v 1 で類似の結果を得た。P C 3 細胞および L N C a P 細胞でより低い効果が認められた。T F F 3 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。

20

【 0 2 9 3 】

(正常細胞)

T F F 3 を発現しない正常線維芽細胞 (M R C 9) および正常乳房上皮細胞 (1 8 4 B 5) を、A S 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、T F F 3 A S の効果が T F F 3 を発現する細胞に特異的であり、A S オリゴヌクレオチドの一般毒性に起因しない。

【 0 2 9 4 】

(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 (s t a t i c) 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 (t r a n s m i g r a t i o n) アッセイを使用して、L N C a P、P C 3、2 2 R v 1、M D A - P C A - 2 b、または D U 1 4 5 前立腺癌細胞で評価することができる。

30

【 0 2 9 5 】

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 (C a P) 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、2 μ M C e l l T r a c k e r g r e e n C M F D A (M o l e c u l a r P r o b e s , I n c .) を含む新鮮な培地に置換し、細胞を 3 0 分間インキュベートする。インキュベーション後、C a P 培地を新鮮な培地 (C M F D A なし) に置換し、細胞をさらに 3 0 ~ 6 0 分間インキュベートする。C M F P B S / 2 . 5 m M E D T A またはトリプシンを使用して C a P 細胞を剥離し、遠心分離し、D M E M / 1 % B S A / 1 0 m M H E P E S (p H 7 . 0) に懸濁する。最後に、C a P 細胞を計数し、 1×10^6 細胞 / m l の濃度に再懸濁する。

40

【 0 2 9 6 】

内皮細胞 (E C) を、使用 3 日前に 9 6 ウェルプレート上で 4 0 ~ 5 0 % コンフルエンスにプレートする。使用当日に、E C を P B S で 1 回洗浄し、5 0 D M D M / 1 % B S A / 1 0 m M H E P E S (p H 7) を各ウェルに添加する。次いで、各ウェルに 5 0 K

50

(50) 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。

10

【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 Cell Tracker 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、1×10⁶細胞/mlの濃度に再懸濁する。

20

【0299】

ECを、使用5~7日前にFluorBlock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(10K MW)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。

30

【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、22Rv1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、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10⁶/mlに再懸濁する。10μlアリコート、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

40

50

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。

10

【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、TFE3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TFE3 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。

20

【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(TFE3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。

30

【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。

40

【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、TFE3)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

50

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。

10

【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Sequencer(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、Sequencer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 Double Twist Gene Index(Double Twist, Inc., Oakland, CA)のTerabLASTN検索でのクエリー配列として使用する。

20

【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。

30

【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。

40

【0313】

50

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

10

【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	KPLQEAEK
TFF3#3	63-71	63-71	9-マー	28	FKPLQEAEK

20

(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。

30

【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

40

50

11 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の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TF F 3 mRNA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TF F 3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TF F 3 mRNA発現レベルのノックダウンにおける異なるTF F 3 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、TF F 3 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TF F 3 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TF F 3 mRNA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8 A および 8 B 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8 A および 8 B 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TF F 3 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TF F 3 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TF F 3抗体を使用した細胞増殖の阻害を示す。抗TF F 3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50 μg / 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。

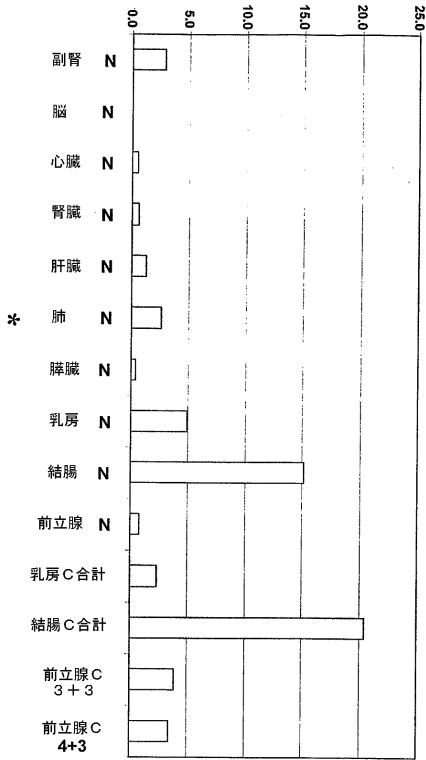
10

20

30

40

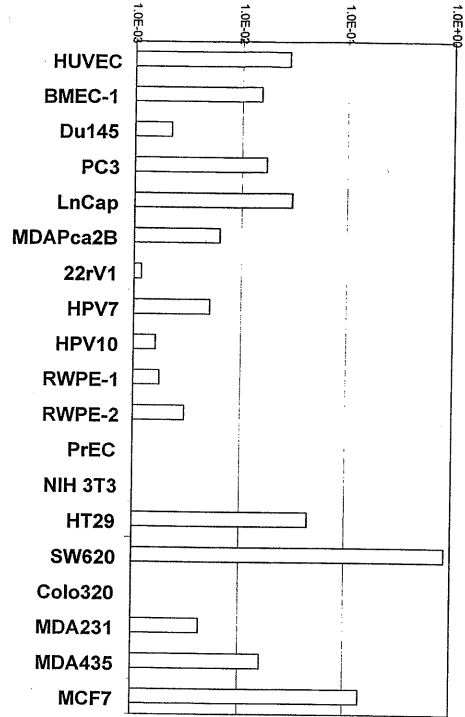
【 図 1 】



TFF3の正常な組織発現 (総組織中にHPRTに対して正規化)

FIGURE 1

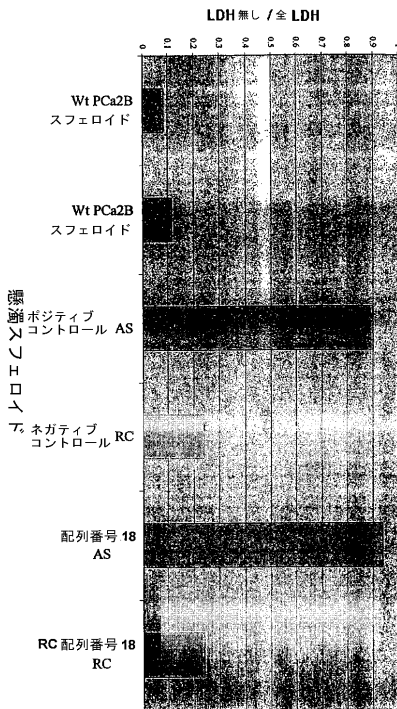
【 図 2 】



細胞株中のTFF3発現 (総組織中のβ-アクトチンに対して正規化)

FIGURE 2

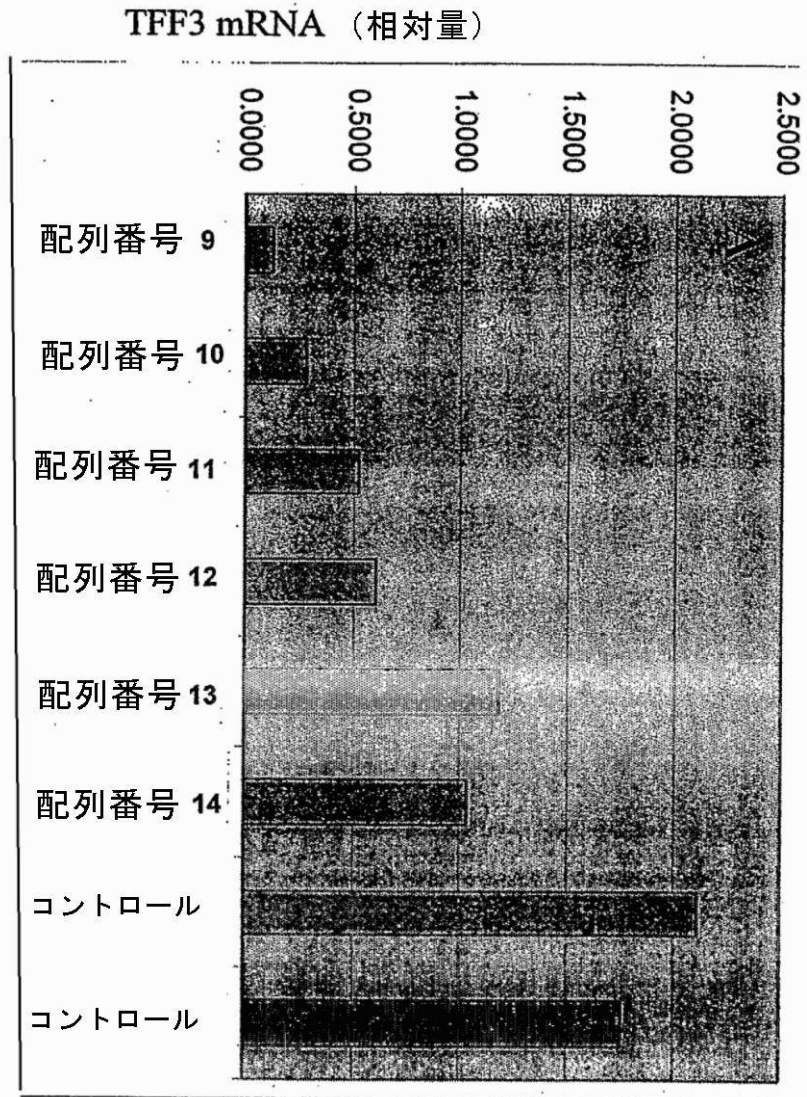
【 図 8 - 2 】



TFF3 ASで処理したPca2Bスフェロイド

FIGURE 8B

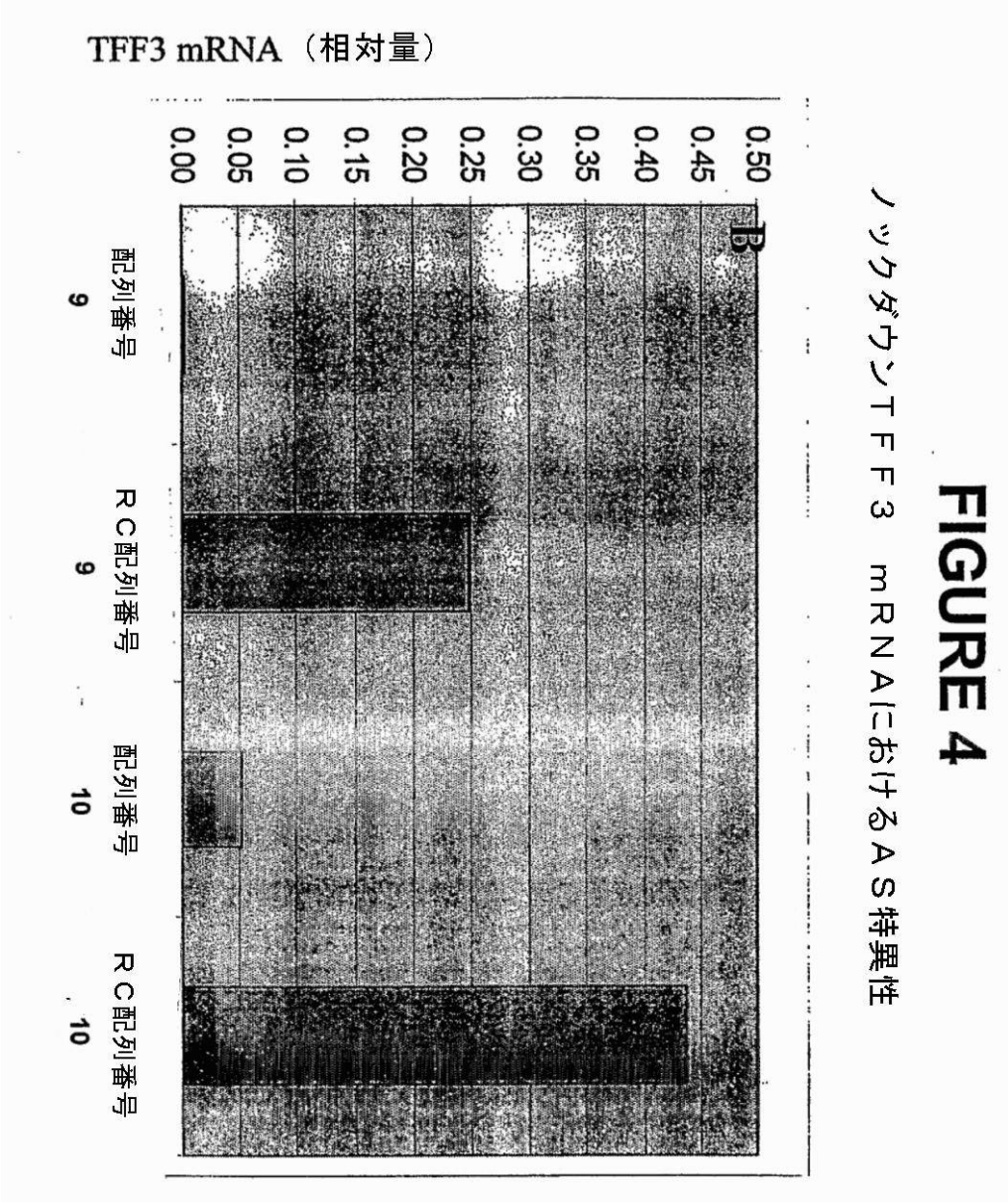
【 図 3 】



ノックダウンTFF3 mRNAにおけるAS有効性試験

FIGURE 3

【 図 4 】



【図 5】

TFF3 mRNA (相対量)

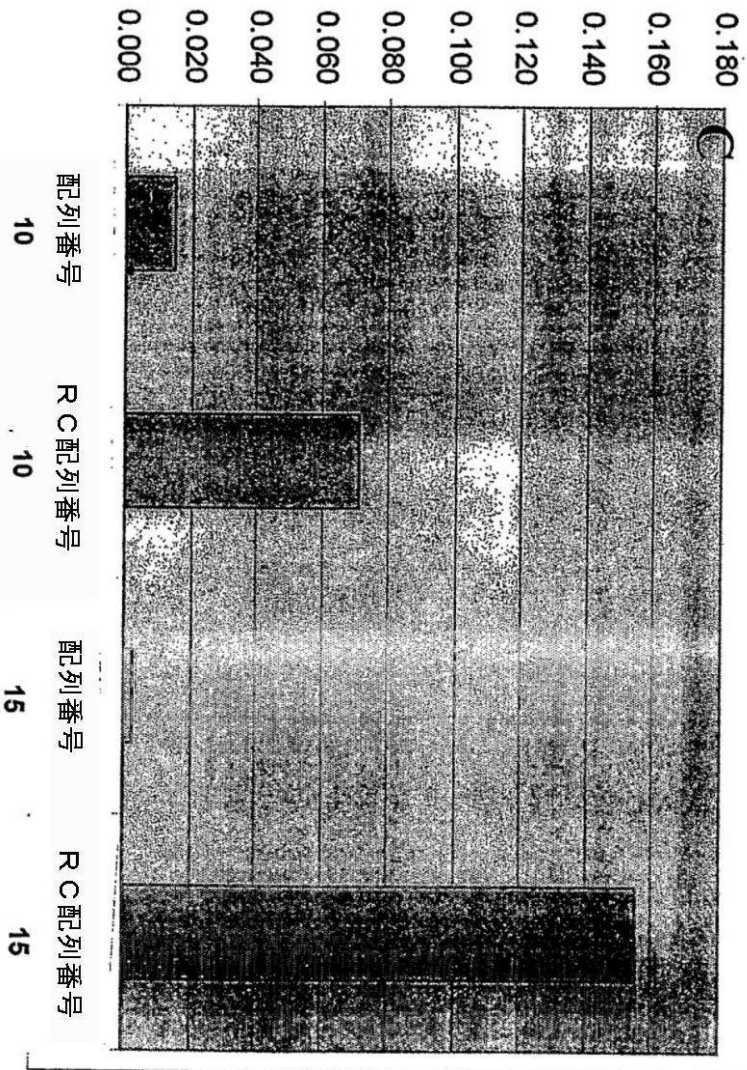


FIGURE 5

ノックダウン TFF3 mRNA における AS 特異性

【図6】

TFF3 mRNA (相対量)

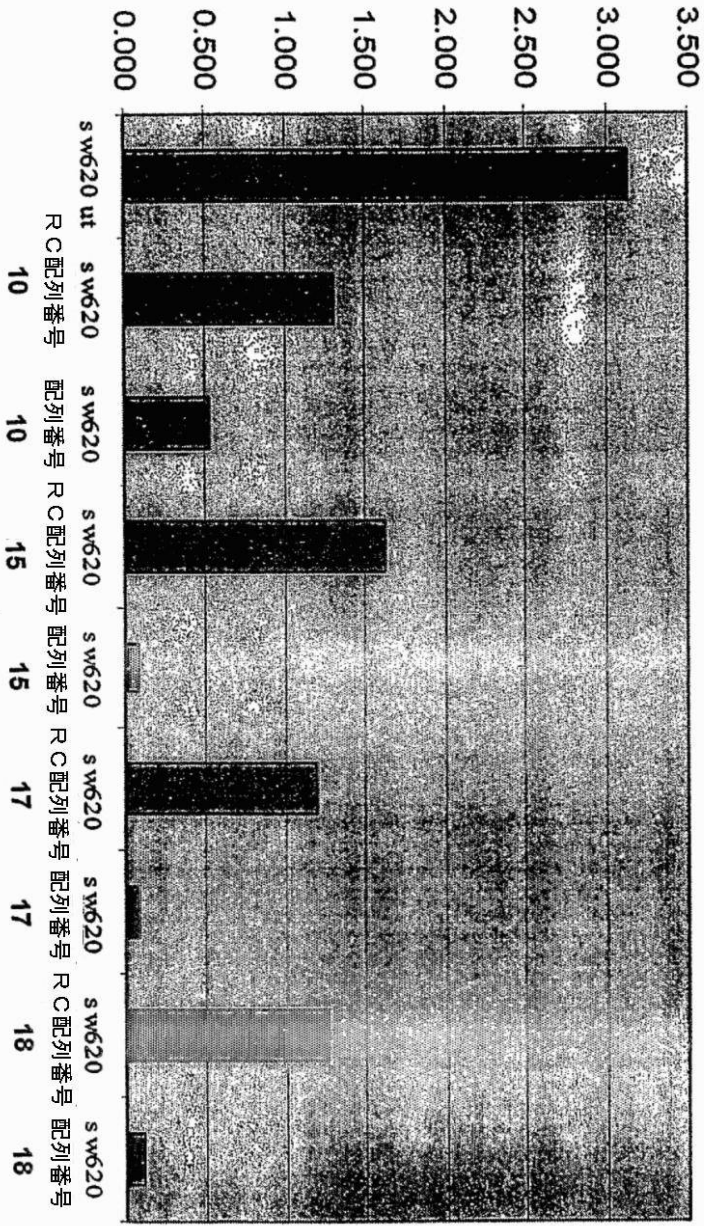
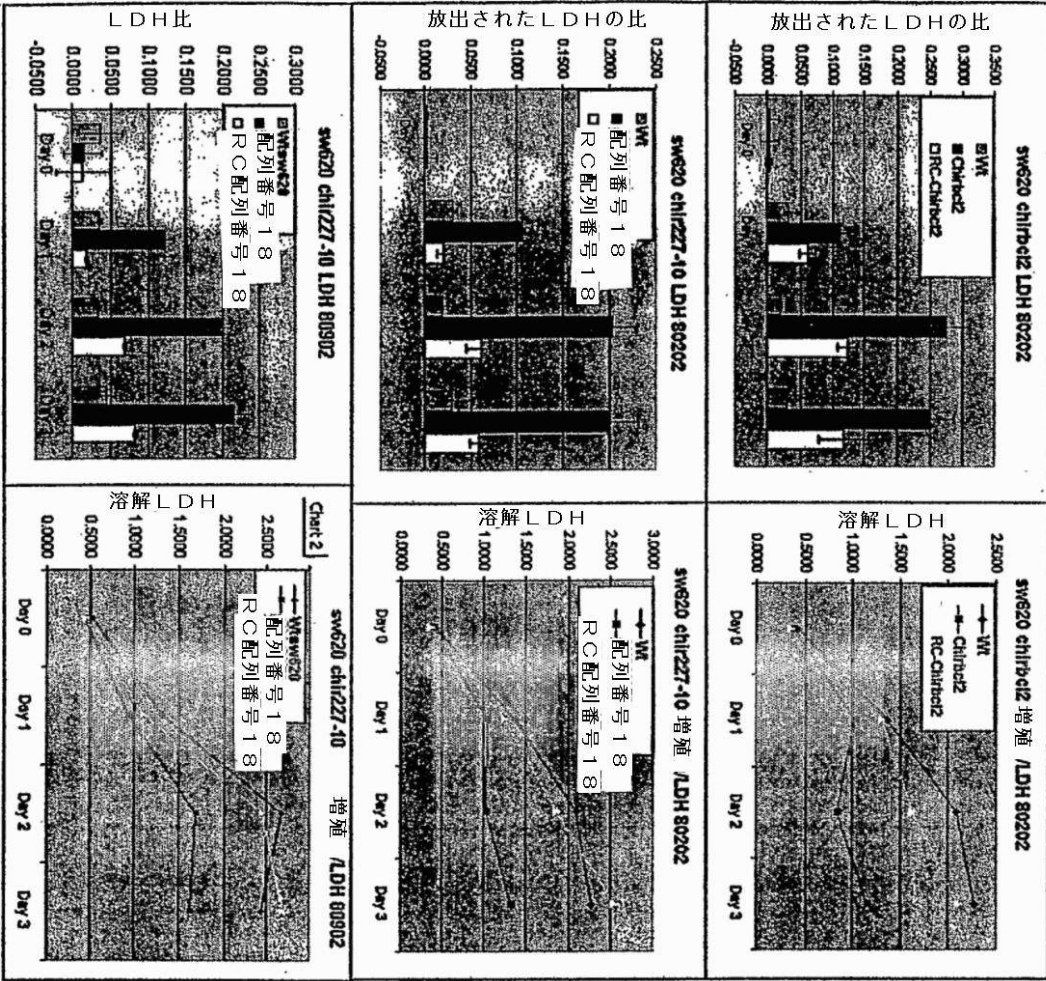


FIGURE 6

ノックダウン TFF3 mRNA における AS 有効性試験

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

【 図 8 - 1 】

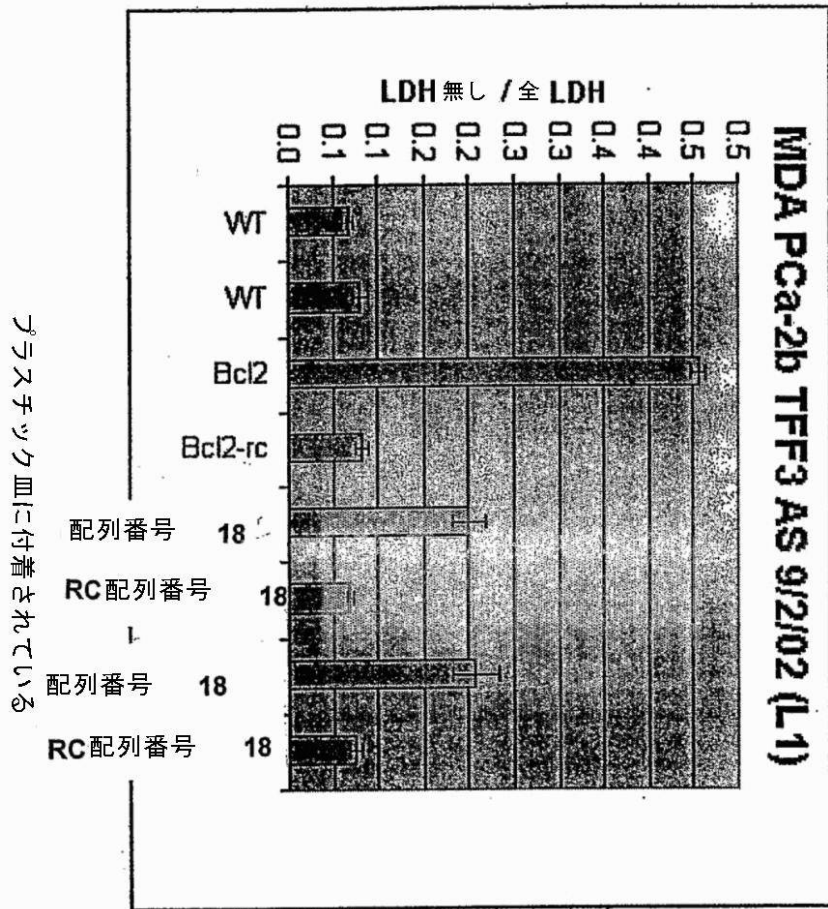
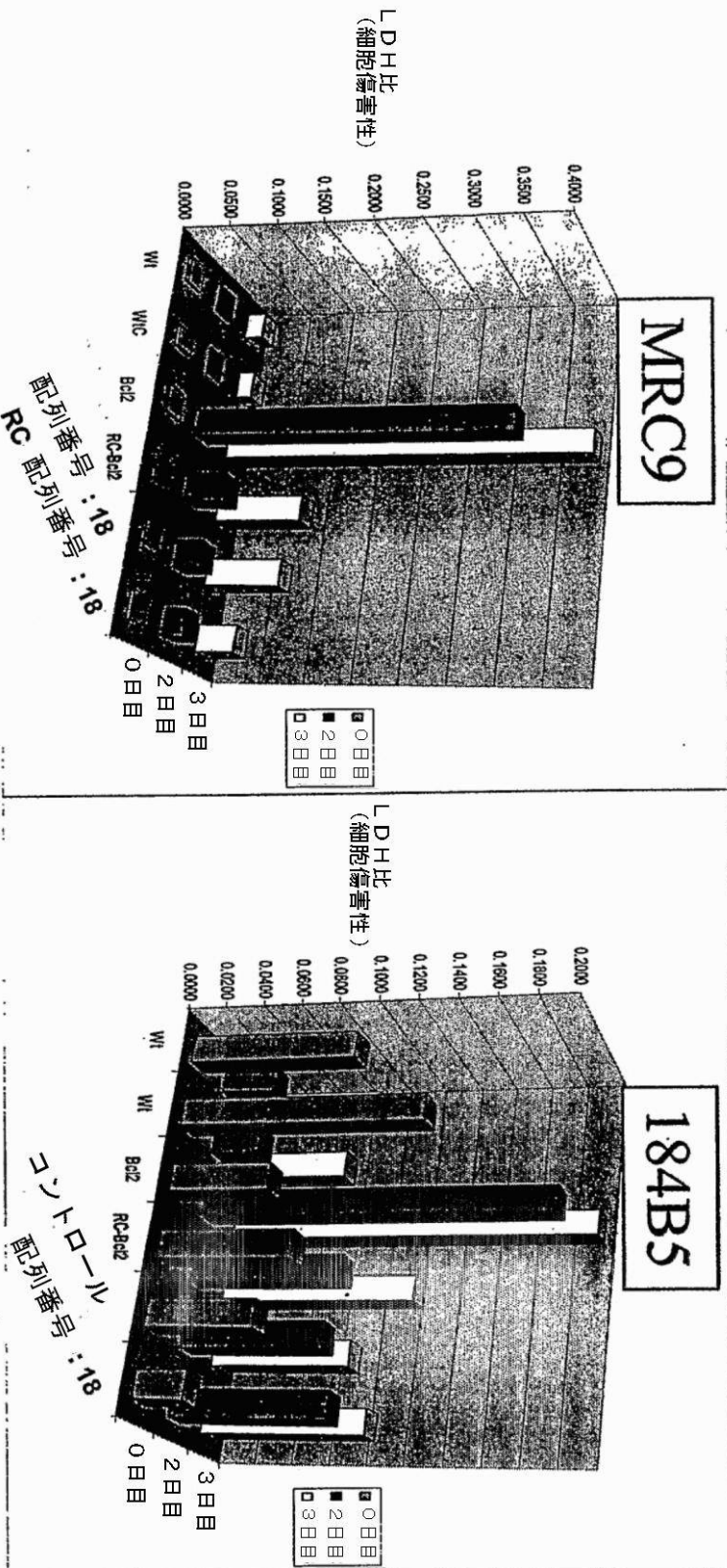


FIGURE 8A

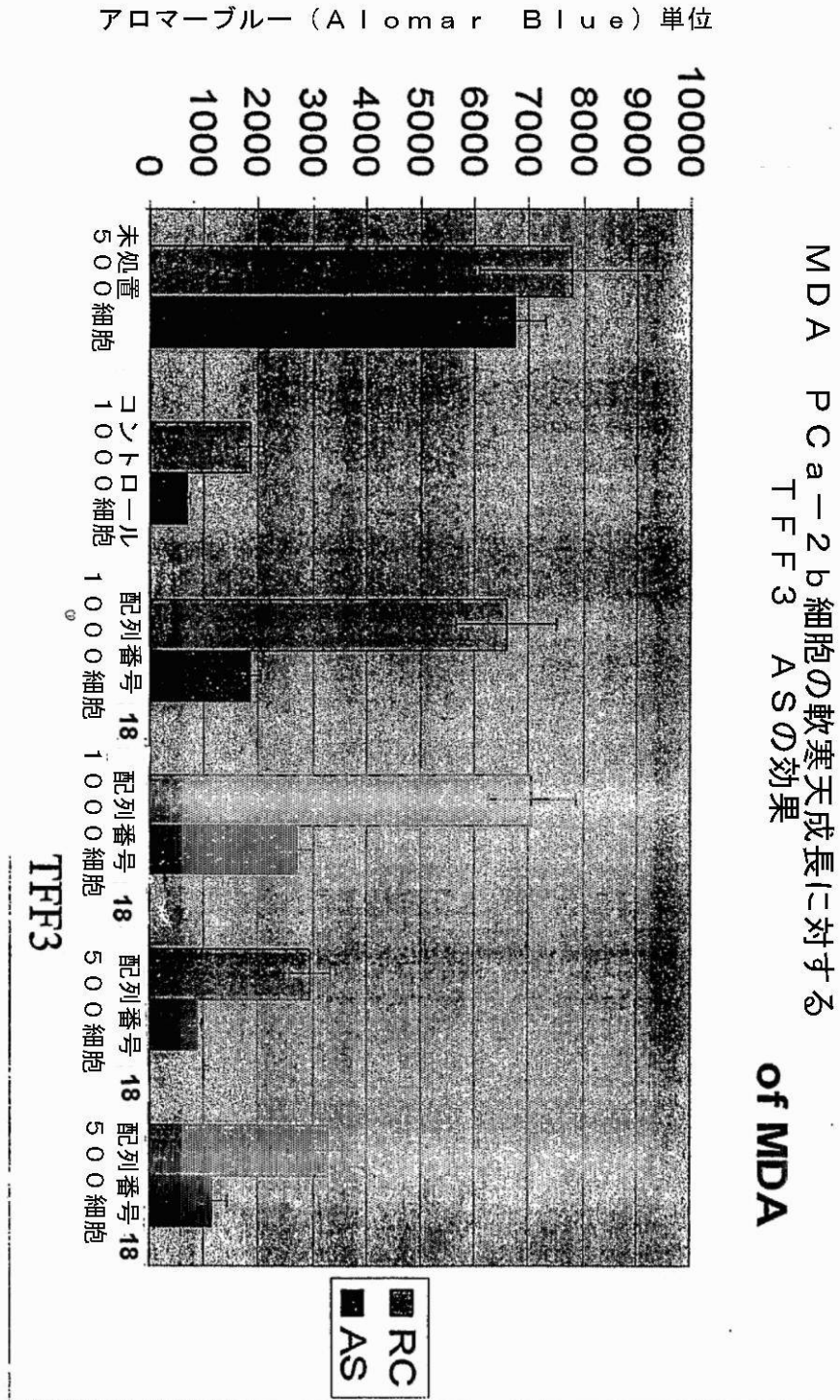
FIGURE 9

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。



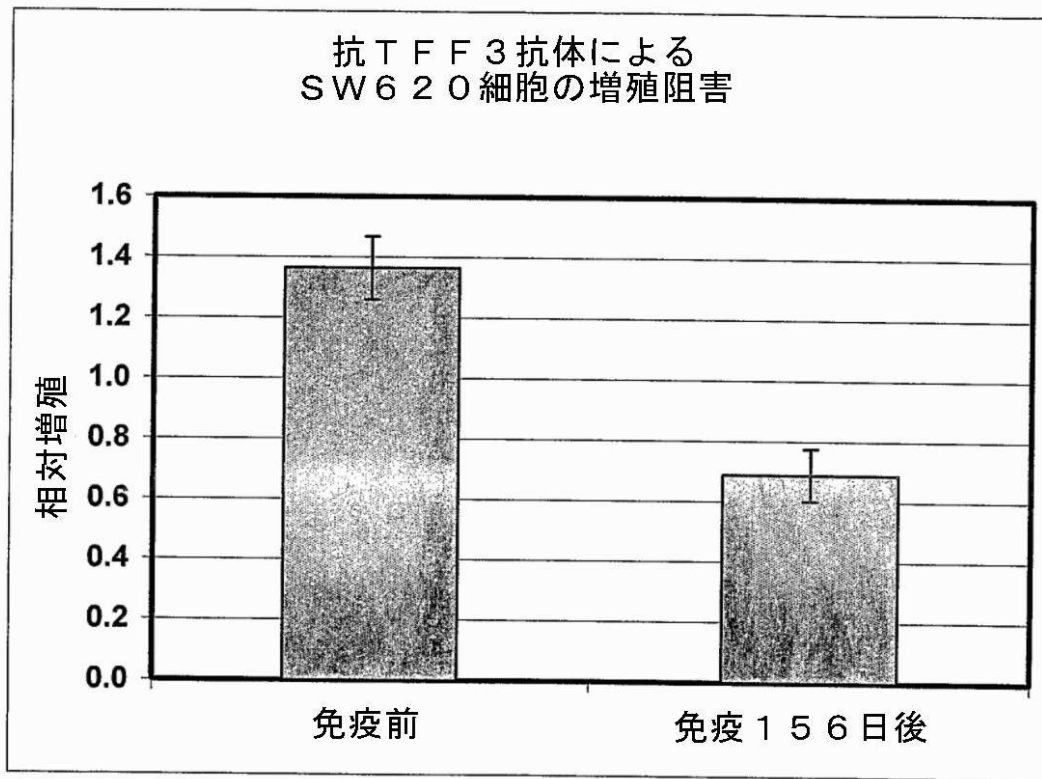
【図 9】

【図 10】



【 図 1 1 】

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
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
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

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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

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 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 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, cmbase, biosis, caplus)
trefoil factor, TFF3, antisense, antibody (SEQ ID NO: 5)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K 14/47	4 C 0 8 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	
A 6 1 K 31/568 (2006.01)	A 6 1 K 31/568	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
	G 0 1 N 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. M a c i n t o s h

- (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 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6, エメリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0, エム/エス アール3 3 8
- (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 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6, エメリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0, エム/エス アール3 3 8
- (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 9 4 6 0 8 - 2 9 1 6, エメリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0, エム/エス アール3 3 8

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)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2007501616A5	公开(公告)日	2007-07-26
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		
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	JP2007501616A		

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。

