

(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2008-502584

(P2008-502584A)

(43) 公表日 平成20年1月31日(2008.1.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-534360 (P2006-534360)	(71) 出願人	505002185
(86) (22) 出願日	平成16年10月8日 (2004.10.8)		ユニヴァーシティー オヴ ルイスヴィル
(85) 翻訳文提出日	平成18年6月7日 (2006.6.7)		リサーチ ファウンデーション インコ
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/033174		ーポレイテッド
(87) 国際公開番号	W02005/035579		アメリカ合衆国 ケンタッキー州 4 0 2
(87) 国際公開日	平成17年4月21日 (2005.4.21)		0 2 ルイスヴィル イースト ジェファ
(31) 優先権主張番号	10/683,480		ーソン ストリート 2 0 1 スウィート
(32) 優先日	平成15年10月9日 (2003.10.9)		2 1 5 メッド センター 3
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】ヌクレオリンを抑制することによる悪性疾患の治療方法

(57) 【要約】

癌治療における抗体、アンチセンス分子および干渉性RNA分子のような抗-ヌクレオリン薬の使用。該治療は、好ましくは、化学毒性薬または化学療法薬の投与または放射線療法と併用する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象者に、治療上有効量の抗-ヌクレオリン薬および製薬上許容し得る担体を投与することを特徴とする対象者の癌の治療方法。

【請求項 2】

前記対象者に、化学毒性薬または化学治療薬を投与することをさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記対象者を放射線療法によりさらに治療する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記化学毒性薬または化学療法薬を、シクロホスファミド、エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンからなる群から選択する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

対象者に、治療上有効量の抗-ヌクレオリン抗体および製薬上許容し得る担体を投与することを含み、該ヌクレオリン抗体がヒトに対して実質的に非免疫原性であることを特徴とする対象者の癌の治療方法。

【請求項 6】

前記対象者に、化学毒性薬または化学治療薬を投与することをさらに含む、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

前記対象者を放射線療法によりさらに治療する、請求項 5 記載の方法。

【請求項 8】

前記化学毒性薬または化学療法薬を、シクロホスファミド、エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンからなる群から選択する、請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

対象者に、治療上有効量の抗-ヌクレオリン抗体、化学毒性薬または化学療法薬、および製薬上許容し得る担体を投与することを特徴とする対象者の癌の治療方法。

【請求項 10】

前記化学毒性薬または化学療法薬を、シクロホスファミド、エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンからなる群から選択する、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

対象者に治療上有効量の抗-ヌクレオリン抗体および製薬上許容し得る担体を投与し、該対象者を放射線療法でさらに治療することを特徴とする対象者の癌の治療方法。

【請求項 12】

治療上有効量のヌクレオリンに対する二重干渉性のRNAおよび製薬上許容し得る担体を投与することを特徴とする癌の治療方法。

【請求項 13】

癌患者に、ヌクレオリンポリペプチドの産生を抑制するヌクレオリンアンチセンス分子を投与することを特徴とする癌患者の治療方法。

【請求項 14】

癌患者に、ヌクレオリン遺伝子の産生を発現するヌクレオリン干渉性RNA分子を投与する

10

20

30

40

50

ことを特徴とする癌患者の治療方法。

【請求項 15】

製薬上許容し得る担体およびヌクレオリンに対して特異性のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む製薬組成物。

【請求項 16】

製薬上許容し得る担体およびヌクレオリンに対する抑制性RNAを含む製薬組成物。

【請求項 17】

製薬上許容し得る担体およびヌクレオリン抗体を含む製薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

10

【0001】

(関連出願)

本出願は、2002年4月8日に出願された米国特許出願第10/118,854号の一部継続出願であり、該出願は、その全体を参考として本明細書に合体させる。

【0002】

(背景技術)

癌

戦に対して用意周到であることは成功を産み出す；障害が癌である場合、早期検出は、医療介入が功を奏するより大きな可能性をもたらす。早期段階においては、治療は、多くの場合、患部組織のみに的を絞り、副作用を軽減している。早期に見出せなかった場合、癌細胞は、全身に亘って転移し拡散し得る。この場合の予後はより悲惨であり、薬物治療は、多くの場合全身に亘って施され、癌細胞のみならず大多数の健常細胞も死滅させる。

20

米国国立がん研究所は、2002年において、1.285百万人のアメリカ人が癌を有すると新たに診断され、560,000人以上のアメリカ人が癌関連疾病により死亡するであろうと推定している。

癌細胞の特性は、制御されていない増殖である。これらの細胞の制御されていない増殖は、正常臓器機能を干渉する細胞塊(腫瘍)として現れる。増殖が制御または抑制されない場合、腫瘍からの細胞は、身体の他の組織に移行して移植し、事実上死をもたらす。

タバコの煙、放射線およびウィルスのような外部因子は、調節されない細胞増殖を生じる特定遺伝子の変質をもたらし得る。遺伝子性突然変異、ホルモンレベルおよび代謝のような固有因子は、癌を患うリスクに寄与する。

30

また、癌細胞は、形態および機能異常を示す。細胞形態はあまり組織化されてなく、例えば、細胞は、適切な細胞機能を可能にする非対称オルガネラおよび構造的組織化(細胞極性)を喪失する。細胞-細胞および細胞-基質接触は、これらの特異性が正常機能においても必要であるが、多くの場合、調節されるかまたは喪失する。機能的には、細胞は、有るにしても僅かしか野生タイプ機能を持続しないか、或いは悪化した、調節されていない正常機能(ホルモン分泌のような)を有し得る。そのような細胞は、早期発生段階に退行し、野生タイプ(即ち、正常な)親細胞よりも少なく分化するようである。

また、癌細胞は、多くの場合、誤発現視或いはタンパク質を不適切な細胞コンパートメントに誤ターゲティングさせる。タンパク質はアップ-またはダウン-調節され、特定の細胞タイプによっては通常発現されないタンパク質さえも形質転換された相応細胞によって発現し得る。タンパク質誤発現は、膜組成、オルガネラ形成または生理学特性における強烈な変化のような、下流細胞作用過多を有し得る。タンパク質(および脂質のような他の分子等)の誤ターゲティングも細胞極性の喪失に寄与する。

40

【0003】

癌の治療

癌の治療法としては、手術(癌組織の物理的除去)、放射線療法(細胞致死線量の放射能への暴露によって細胞を死滅させる)、化学療法(化学毒素を細胞に投与する)、免疫療法(癌細胞をターゲットし且つ癌細胞を本来の免疫系により破壊するようマークする抗体類を使用する)および核酸系治療(例えば、癌増殖を抑制する遺伝子物質の発現)がある。しか

50

しながら、各々の方法は、それぞれの限界を有する。

手術、化学療法および放射線療法は、癌細胞の不完全除去または健常細胞の不用意な死滅のような、同様な有意の限界を有する。手術戦略は、癌が早期段階で体内の限られた局在領域にある場合には、最も有効である。早期に診断される僅かな症例においてさえも、癌細胞の手術除去は多くの場合不完全であり、しばしば転移性病変の再出現へと続く。化学療法薬は、正確な投与量で投与した場合、急増殖中の癌細胞に対し選択的に毒性であり、大多数の健常細胞を損傷しない。局所伝達線量の外部ビーム放射線は、急増殖中の細胞に対して最も有効であり、非特異性のDNA損傷を取込ませることによって細胞を死滅させる。放射線療法は、手術と同様に、ターゲット癌塊を良好に範囲定めした場合最良に働く；健常細胞と癌細胞を死滅させるバランスを注意深く評価しなければならない。化学療法および放射線療法は、双方とも、癌細胞に対して全く選択性ではない；必然的に、幾分かの健常細胞が毒性作用の犠牲になり、既に被っている癌犠牲の上に深刻な副作用を負わせる。

他の一般的な方法の免疫療法および遺伝子療法は、全く強力であり得、手術、化学療法および放射線療法を凌ぐ。これらの方法は、腫瘍生存、細胞増殖または転移に関連する特異的な因子をターゲットする。例えば、B細胞に対する特異性表面タンパク質に結合するモノクローナル抗体、即ち、B細胞悪性腫瘍を治療するのに使用するCD20 (RITUXAN[®] ; Genentech社およびIDEC社)のような抗体類は、特異性腫瘍関連タンパク質をターゲットし得る。有効な遺伝子療法の例は、bcl-2発現のアンチセンス抑制である(GENASENSE[®] ; Genta社)。有効ではあるが、課題は、臨床的に適切な遺伝子およびタンパク質を同定することおよびこれら遺伝子およびタンパク質をターゲットして癌細胞の破壊をもたらす適切な療法を開発することである。さらにまた、上記方法はこれらの分子を同定するのが面倒であるのみならず、多くの場合、同定した分子は、1つのタイプの癌または腫瘍細胞にしか特異性でない。

【0004】

(発明の開示)

本発明は、下記による対象者の腫瘍または癌の治療方法を提供する：

(1) 治療上有効な量の抗-ヌクレオリン剤および製薬上許容し得る担体を投与する。この製薬組成物は、シクロホスファミド、エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシン(mytomycin)のような他の化学療法薬または化学毒性薬をさらに含み得る。同時に、放射線療法も併用し得る。

(2) 治療上有効な量の抗-ヌクレオリン抗体および製薬上許容し得る担体を投与する、該抗体はヒトに対して実質的に非免疫原性である。この製薬組成物は、他の化学療法薬または化学毒性薬をさらに含み得る。同時に、放射線療法も併用し得る。

(3) 治療上有効な量の抗-ヌクレオリン抗体、化学毒性薬または化学療法薬、および製薬上許容し得る担体を投与する。

(4) 治療上有効な量のヌクレオリン抗体および製薬上許容し得る担体を投与し、対象者を放射線療法でさらに治療する。

(5) 治療上有効な量のヌクレオリンに対する二重干渉性RNAおよび製薬上許容し得る担体を投与する。

(6) ヌクレオリンタンパク質の産生を抑制するヌクレオリンアンチセンス分子を投与する。

(7) ヌクレオリン遺伝子の発現を抑制するヌクレオリン干渉性RNA分子を投与する。

これらの局面においては、化学療法薬または化学毒性薬は、シクロホスファミド、エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンであり得る。

さらにもう1つの局面においては、本発明は、製薬上許容し得る担体、および下記を含む製薬組成物を提供する：

(8) ヌクレオリンに対して特異性のアンチセンスオリゴヌクレオチド。

(9) ヌクレオリンに対する抑制性RNA。

(10) ヌクレオリン抗体。

【0005】

(発明を実施するための最良の形態)

本発明は、ヌクレオリン原形質膜発現と新生物細胞の存在および悪性度間の相関の発見に基づく。健常細胞核内部に殆ど限られていたヌクレオリンが、細胞表面上で見出される場合、前悪性または悪性フェノタイプと相関するという予想外の発見。この観察は、癌の診断および予後診断を容易にするのみならず、新規且つ強力な治療方法も提供する。本発明は、ヌクレオリンを特異的にターゲティングする化合物を投与することによる癌の治療方法を提供する。さらにまた、本発明は、ヌクレオリンターゲティング化合物を他の癌療法、例えば、抗癌薬と一緒に投与することによる癌の治療方法を提供する。そのような併用療法は、優れた相乗的治療結果を達成する。

表面局在性ヌクレオリンを使用して腫瘍および癌を治療する利点としては、下記がある：

(1) 特異性。原形質膜ヌクレオリンは、殆どの野生タイプ(健常)細胞の原形質膜においては通常観察されない。即ち、他の非特異性治療方法(例えば、手術、放射線、化学毒素)と異なり、原形質膜ヌクレオリンターゲティングは、癌細胞を特異的に死滅させるのに使用し得る。

(2) 広い応用性。従来の免疫および遺伝子療法と異なり、原形質膜上でのヌクレオリン発現は、多くのタイプの癌細胞上で生じる。従って、多くの種々の癌を、原形質膜ヌクレオリンを活用することによって治療し得る；さらに、他のあまり特異的でない治療(例えば、放射線療法)と異なり、健常細胞を損傷または死滅させることはない。

(3) 治療：早期または後期。原形質膜ヌクレオリンは悪性細胞のみならず前悪性細胞も指標するので、治療は、腫瘍塊が他の手段によって普通に検出される前であっても、表面ヌクレオリンの検出によって開始し得る。

【0006】

癌細胞に対する非アンチセンスグアノシンリッチオリゴヌクレオチド(GRO)類の抗-増殖活性の研究中に、そのような抗-増殖性GRO類がヌクレオリンと結合してその効果を奏することが見出された(Bates等、1999年；Miller等、2000年)。ヌクレオリン(Bandman等、1999年)は、核小体の豊富な非リボソームタンパク質、即ち、リボソーム遺伝子転写および前リボソームRNAのパッケージング部位である。この707個アミノ酸のリントタンパク質は、ヒストン様N-末端、4個のRNA認識モチーフを含有する中央ドメイン、およびグリシン/アルギニンリッチC-末端からなる多ドメイン構造を有し、110 kDの見掛け分子量を有する。その多ドメイン構造は、この多面性タンパク質の著しく多様な機能を反映している(Ginisty等、1999年；SrivastavaおよびPollard、1999年；TutejaおよびTuteja、1998年)。ヌクレオリンは、細胞生存および増殖の多くの基本的局面に関与している。最も理解されているのは、リボソーム生体発生におけるヌクレオリンの役割である。他の機能としては、核-細胞質間輸送、細胞質分裂、元素合成およびアポトーシスがあり得る。ヌクレオリンは核オーガナイザー領域(NOR)タンパク質の1つであり、その銀染色によって測定したときのレベルは、細胞増殖のマーカーおよび悪性物の指標として病理学者によって評価されている(Derenzini、2000年)。

また、リンパ球および内部髄質集合管細胞のような少数の細胞タイプの細胞原形質膜中にも存在して、ヌクレオリンは、レセプターとして機能するものと想定されている(例えば、Callebaut等、1998年；SorokinaおよびKleinman、1999年)。しかしながら、原形質膜ヌクレオリンの役割は、良好には理解されていない。さらに、原形質膜ヌクレオリンが核小体タンパク質と同一であるかどうか或いは原形質膜ヌクレオリンが異なるイソフォームまたはヌクレオリン様タンパク質を示すのかも明らかではない。しかしながら、原

10

20

30

40

50

形質膜ヌクレオリンの発現は、新生物細胞(悪性または前悪性のような)に対して特異性である；即ち、原形質膜ヌクレオリンの機能は、有効な治療的介入においては知る必要のないことである。

【0007】

定義

新生物、悪性腫瘍、腫瘍、癌細胞

新生物は、新生物細胞、即ち、正常細胞よりも急速且つ制御されないで増殖する細胞に由来する異常組織増殖である。通常、部分的にまたは完全に構造的に無秩序の新生物は、相応する正常組織との機能的連携を欠く。新生物は、通常、良性(腫瘍)または悪性(癌)のいずれかであり得る明確な組織塊を形成する。

癌細胞は、周囲組織に浸潤し、離れた部位に転移し得、除去試み後に再生するようであり、適切に治療されない場合、対象者の死を引起す。構造的無秩序に加え、癌細胞は、より原始的または未分化状態(退形成)に退行するが、形態学または生化学的には、相応する野生タイプ細胞の多くの機能を依然として示し得る。癌腫は、上皮に由来する癌であり；肉腫は、結合組織に由来する。ある場合には、癌は、腫瘍を伴わず、患部組織と同様に、鎮性(defuse)、例えば、白血病である。

癌は、侵襲性が高いかまたは侵襲性が低くあり得る。癌細胞の侵襲性フェノタイプとは、ヌードマウスにおける増殖速度および腫瘍を形成し転移する能力を称する。侵襲性癌は、侵襲性が低い腫瘍よりも腫瘍から急速、より容易に増殖し、転移する。

腫瘍および癌には、固形、増殖障害性組織変化および広範性腫瘍がある。癌および腫瘍が正常な生理学的機能を奏さない細胞の制御されていない増殖を有する異常な増殖物であるという意味において、用語“腫瘍”および“癌”は、互換的に使用する。腫瘍および癌の例としては、黒色腫、リンパ腫、形質細胞腫、肉腫、神経膠腫、胸腺腫、白血病、乳癌、前立腺癌、結腸癌、肝癌、食道癌、脳腫瘍、肺癌、卵巣癌、子宮頸癌、ヘパトーマおよび他の新生物がある。腫瘍および癌のさらなる例については、例えば、(Stedman、2000年)を参照されたい。

“間質細胞”は、腫瘍内で見出されるアクセサリー細胞である。そのような細胞は、例えば、線維芽細胞、細網細胞および内皮細胞であり得、腫瘍増殖において支援的役割を果たすが健常細胞である。従って、間質細胞および線維芽細胞は、腫瘍細胞が転移中に侵襲する微環境の構成成分である。

【0008】

新生物状態

用語“新生物状態”とは、3つの状態、即ち、正常、前悪性および悪性を称する。“正常”とは、臨床的に正常(健常)である増殖または細胞を称する。“前悪性”とは、悪性腫瘍への途中にあるが、検査時点では、通常の方法によっては悪性と分類されないであろう増殖または細胞を称する。“悪性”とは、以下の特性の少なくとも1つを有する細胞または増殖を称する：局所侵襲性、破壊的増殖および転移。

GRO類および他のポリペプチド結合性オリゴヌクレオチド類

ヌクレオリンのような、ポリペプチド類に特異的に結合するオリゴヌクレオチド類は、入手可能である。そのような例は、グアノシンリッチオリゴヌクレオチド類であるGRO類である。GRO類の特徴としては、下記がある：

(1) 少なくとも1個のGGTモチーフを有する

(2) 好ましくは4~100個のヌクレオチドを有するが、それよりも多いヌクレオチドを有するGRO類も可能である

(3) 安定性を改善するための化学修飾を有する。

とりわけ有用なGRO類は、295 nmでの可逆的熱変性/再生プロフィールによって示されるようなG-カルテット構造を形成する(Bates等、1999年)。また、好ましいGRO類は、電気泳動移動性シフトアッセイにおいて、ターゲット細胞タンパク質に結合するためにテロメアオリゴヌクレオチドと拮抗する(Bates等、1999年)。

他のオリゴヌクレオチド類は、ヌクレオリンに対する高結合特異性を有し得る。

抗-ヌクレオリン薬

“抗-ヌクレオリン薬”は、ヌクレオリンに結合する。例としては、抗-ヌクレオリン抗体およびある種のオリゴヌクレオチド類がある。

【0009】

核酸系の定義

“構造遺伝子”または“遺伝子”とは、ポリペプチド(ポリペプチドは少なくとも2個のアミノ酸残基からなる)に翻訳し得るメッセンジャーRNA(mRNA)に転写するDNA配列を称する。

プロモーターは、RNA転写の開始部位、転写の方向、および転写速度を特定するDNA配列である。このため、プロモーターは、得られるRNA転写体をコード化するDNA配列における開始部位の5' (+1として表示)に通常位置する。プロモーターは、調節されないかまたは調節し得る。プロモーターを調節しない場合、プロモーターは、特定の基本活性レベルにおいて構造的に作動する。プロモーターを調製する場合、プロモーターの効率は、1つの因子に応答して調節され得る。RNA転写は、因子がプロモーター活性を正に調節する環境において、基本転写レベルに対比して増大する；逆に、RNA転写は、因子がプロモーター活性を負に調節する環境において、基本転写レベルに対比して減少する。プロモーター活性を正に調節する因子は、いわゆるアクチベーターであり；プロモーター活性を負に調節する因子は、いわゆるリプレッサーである。

エンハンサーは、プロモーター活性効率を増大させ得るDNA転写要素である。プロモーター同様、エンハンサーは、疾患遺伝子に物理的に結合している。エンハンサーも調節されないかまたは調節し得る。しかしながら、プロモーターと異なり、エンハンサーは、RNA転写の開始部位または転写方向を特定し得ない。エンハンサーは、RNA転写の開始部位に対するエンハンサーの配向または位置とは無関係に遺伝子発現を刺激し得る。エンハンサーはRNA転写の開始部位を特定しないので、エンハンサーは、特定の遺伝子に対して大きな距離(数千ベース)に亘ってその作用を奏し得る。

【0010】

調節配列は、典型的に、因子の活性に正または負に応答する短鎖DNAモチーフである。調節配列は、双方向性または一方向性であり得る。調節配列は、プロモーターまたはエンハンサーのいずれかのモジュール構成比の1部であり得る。プロモーターとの関連においては、調節配列は、プロモーター効率を調節するおよび/またはRNA転写の開始部位の選択に影響を与えるかのいずれかであり得る。エンハンサーとの関連においては、調節配列は、エンハンサーの効率を調節する。

“クローニングベクター”は、細胞内で複製し得る能力を有する、プラスミド、コスミドまたはバクテリオファージのようなDNA分子である。クローニングベクターは、DNAフラグメントの変更および付加の導入を可能にする制限エンドヌクレアーゼ認識部位を典型的に含有する。また、クローニングベクターは、効率的な発現を可能にするプロモーターおよびアンピシリンまたはテトラサイクリンのような化合物に抵抗性を与える選択性マーカーも典型的に含む。

“発現ベクター”は、宿主細胞によって発現されるようにしたコード配列(遺伝子のような)を含むポリヌクレオチドである。発現ベクターは、プロモーター、エンハンサー、および発現遺伝子またはDNAフラグメントに操作的に結合させている組織特異性調節要素を典型的に含有する。

用語“イソフォーム”とは、アミノ酸配列または転写後修飾(グリコシル化またはタンパク質分解処理事象)において異なるポリペプチドを称する。また、イソフォームは、選択的スプライシングに由来する一般的遺伝子から産生するポリペプチドを称するのにも使用する。

【0011】

治療関連の定義

“細胞毒性薬”とは、細胞の少なくとも1つの機能を抑制または阻止する、或いは細胞の破壊を起させる物質を称する。放射性同位元素(例えば、 ^{211}At 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{192}Ir 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Rn 、 ^{223}Fr 、 ^{225}Ac 、 ^{225}Bi 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、 ^{227}Po 、 ^{227}At 、 ^{227}Rn 、 ^{227}Fr 、 ^{227}Ra 、 ^{227}Ac 、 ^{227}Th 、 ^{227}Pa 、 ^{227}U 、 ^{227}Np 、 ^{227}Pu 、 ^{227}Am 、 ^{227}Cm 、 ^{227}Bk 、 ^{227}Cf 、 ^{227}Es 、 ^{227}Fm 、 ^{227}Md 、 ^{227}No 、 ^{227}Lr 、 ^{227}Hf 、 ^{227}Ta 、 ^{227}W 、 ^{227}Re 、 ^{227}Os 、 ^{227}Ir 、 ^{227}Pt 、 ^{227}Au 、 ^{227}Hg 、 ^{227}Tl 、 ^{227}Pb 、 ^{227}Bi 、

^{53}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P およびLuの放射性同位元素)、並びに化学療法薬および小分子毒素または細菌、真菌、植物もしくは動物由来の毒素のような毒素類は、そのような薬剤の例である。

“放射線療法”または“放射線治療”とは、局所伝達線量の外部ビーム放射線を使用して腫瘍または癌細胞の死滅をもたらすことを称する。

“化学療法薬”は、癌細胞を処置するのに有効に使用し得る化学化合物である。一般的に使用する腫瘍薬および剤の例としては、ビノレルビン(Navelbine[®])、マイトマイシン、カンプトセシン、シクロホスファミド(Cytoxin[®])、メトトレキサート、クエン酸タモキシフェン、5-フルオロウラシル、イリノテカン、ドキシソルビシン、フルタミド、パクリタキセル(Taxol[®])、ドセタキセル、ビンブラスチン、メシル酸イマチニブ(Gleevec[®])、アントラサイクリン、レトロゾール、三酸化ヒ素(Trisenox[®])、アナストロゾール、トリオブレリンパモエート、オゾガマイシン、塩酸イリノテカン(Camptosar[®])、BCG生(Pacis[®])、酢酸ロイプロリドインプラント(Viadur)、ベキサロテン(Targretin[®])、エキセメスタン(Aromasin[®])、塩酸トポテカン(Hycamtin[®])、ゲムシタピンHCL (Gemzar[®])、塩酸ダウノルビシン(Daunorubicin HCL[®])、ゲムシタピンHCL (Gemzar[®])、クエン酸トレミフェン(Faresto[®]n)、カルボプラチン(Paraplatin[®])、シスプラチン(Platinol[®]およびPlatinol-AQ[®])、オキサリプラチンおよび任意の他の白金含有腫瘍薬がある。

“医薬品”、“治療組成物”および“製薬組成物”は、対象者において治療効果を奏する化合物、物質、混合物または製剤を示すために互換的に使用する。

【0012】

“承認された治療用抗体”としては、リツキシマブ(Rituxan[®])、ゲムツズマブ(Mylotarg[®])、アレムツズマブ(Campath[®])およびトランスツズマブ(Herceptin[®])がある。

“抗体”とは、最も広い意味において使用し、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異性抗体、抗体フラグメントおよび誘導体を称する。

“人工抗体”は、ポリペプチド骨格に結合したポリペプチド結合性ドメインを有する結合剤である(Irving等、2001年; Koide、2002年)。

“抱合抗体薬”とは、細胞毒性薬である成分に抱合させた抗体または抗体フラグメントを含む治療薬を称する。

“抗体融合タンパク質”とは、1種以上の抗体成分とサイトカイン、酵素または細胞毒性薬のような治療薬とを含む組換え分子を称する。

用語“裸抗体”とは、酵素、細胞毒性薬または化学療法薬に融合も抱合もさせていない、モノクローナル、組換えモノクローナルまたはポリクローナル抗体のような全体的なインタクト抗体を称する。

“ヌクレオリン抗体”または“抗-ヌクレオリン抗体”は、ヌクレオリンポリペプチドに結合する抗体、抱合抗体薬、抗体融合タンパク質、裸抗体または人工抗体である。

“アンチセンスオリゴヌクレオチド”、“オリゴ”、“オリゴ核酸”、“アンチセンス”または“アンチセンスポリヌクレオチド”は、遺伝子発現を選択的に改変または鎮静させて所望の治療効果を生じさせ得る配列特異性薬物である。

用語“干渉性RNA”、“RNAi”、“短鎖干渉性RNA”または“二本鎖干渉性RNA”とは、遊離のリボ核酸分子または遺伝子発現系により生体内で産生させたりリボ核酸分子のいずれかを称する。そのような干渉性RNA分子は、ターゲット遺伝子の発現を改変し得る。

“腫瘍を治療する”または“癌を治療する”とは、腫瘍/癌の増殖および/または転移を有意に抑制することを意味する。増殖抑制は、腫瘍容積の低下または転移発生の低下によって指標し得る。腫瘍増殖は、例えば、一般的手法(ダイアルキリパーにより2次元測定値を得るような)により腫瘍容積を検査することによって判定し得る。転移は、二次部位における腫瘍細胞について検査するか或いは生検腫瘍細胞の転移能を生体外で周知の方法を使用して検査することによって判定し得る。

“抗-ヌクレオリン薬”としては、ヌクレオリンと相互作用する任意の分子、化合物等がある。そのような薬剤としては、抗-ヌクレオリン抗体およびその誘導体、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、RNAi等がある。

【 0 0 1 3 】

実施態様

以下の実施態様は、本発明を実施する種々の方法の例として提示する。また、多くの種々の本発明の実施方法が可能である。

全ての実施態様において、基本的原理は、治療発明において、原形質膜ヌクレオリンと核ヌクレオリンとを特異的に識別させることによって細胞をターゲッティングすることである。原形質膜ヌクレオリンは、本出願人らが発見したように、新生物状態にある細胞と相関している。この特異的原形質膜発現を利用して、腫瘍および癌細胞を治療においてターゲットすることができる。

原形質膜ヌクレオリンの検出

種々の方法により、使用者は、核および原形質膜ヌクレオリンを識別することが可能である。ヌクレオリン検出試薬が細胞の細胞外部分(従って、細胞原形質膜ヌクレオリン)に対する排他的な受入れを有する検出方法、或いは表面原形質膜および/または表面タンパク質のいずれかを他の細胞成分およびコンパートメントから分離する生化学的方法も、有用である。本発明を実施する1つの実施態様は、ヌクレオリンをターゲッティングする治療の潜在的有効性を、先ず細胞をヌクレオリン原形質膜発現について検査することによって判定すること望む。

1つの実施態様においては、ヌクレオリンを細胞表面上で直接検出する。細胞を対象者から分離し、原形質膜ヌクレオリンを、ヌクレオリンと結合する薬剤を使用して検出する。細胞は、任意の公知の方法により分離し得る。分離した細胞は、新生物でない細胞を含む大きな組織サンプルを含み得る。検出手順は、細胞外ヌクレオリンエピトープに結合する抗-ヌクレオリン抗体を使用する；これらの抗体は、直接標識化してもよく、或いは、結合したときに、間接的に検出してもよい。他の有用な原形質膜ヌクレオリン検出剤としては、ヌクレオリンに特異的に結合するGRO類である。蛍光活性化細胞選別法(FACS)または免疫蛍光法のような有用な手法は、蛍光標識を使用し、一方、組織化学法、免疫組織化学法および他の顕微鏡法(電子顕微鏡検査法(EM)、免疫EM)のような他の細胞学的方法は、比色性または放射性いずれかの種々の他の標識を使用する。種々の試薬を、キットとして組合せ得る。

【 0 0 1 4 】

もう1つの実施態様においては、細胞を対象者から分離し、抽出する。次いで、原形質膜および/またはタンパク質を分離し(微分抽出、または特異的な物理的細胞破壊、清浄剤抽出細胞の分画遠心分離等によるようにして)、その後、ヌクレオリンを、ヌクレオリンに結合する薬剤を使用し、分離膜中で検出する。一般に、ヌクレオリンを検出する有用な方法としては、抽出物を基質上に置き、基質をヌクレオリン検出試薬で精査する方法がある。そのような方法の例としては、ポリペプチドドットプロット法およびウェスタンブロット法、バイオチップ法、タンパク質アレー法等がある。他の検出方式としては、多様な具現方式における酵素免疫吸着測定法(ELISA)がある(Ausubel等、1989年)。原形質膜表面分子を多くの他の細胞成分およびコンパートメントから物理的に分離する実施態様においては、ヌクレオリン結合剤は、ヌクレオリンの細胞外部分を何ら特異的に認識する必要はない。種々の試薬を、キットとして組合せ得る。

さらなる実施態様においては、本発明の方法は、肺小細胞癌のような肺癌の検出に関する。原形質膜ヌクレオリン発現は、検出および予後検診において有用である。

1つの実施態様においては、本発明は、ヌクレオリン特異性化学療法のようなある種の治療を細胞表面上の増大した多量のヌクレオリンに関連する症状の治療または改善に適應させる対象者を同定する方法を提供する。そのような症状としては、癌、新生物および前癌病変がある。そのような方法は、ヌクレオリンに特異的に結合する薬剤を対象者のまたは対象者由来の細胞と接触させる工程、および原形質膜ヌクレオリンの結合量を測定する工程を含む。

もう1つの実施態様においては、過去に癌を発症している個々人をヘルスケアプロバイダーに検査のために供する。細胞を有するサンプル、例えば、生検試験標本を個々人の身

10

20

30

40

50

体から採取し、その後直ぐに、このサンプルを抗-ヌクレオリン抗体と接触させ、インキュベートし、その後、結合抗体を検出する。結合抗体の量は、同じ個々人から分離した健常細胞と結合した量と比較し得る。その後、治療計画を、個々人の身体から採取した細胞当りの細胞表面ヌクレオリンの量並びに細胞表面ヌクレオリンとヌクレオリンをターゲットする化学療法のようなある種の治療法に対する癌の感受性との間の既知の相関に基づき立案する。

ヌクレオリンをターゲットとする腫瘍/癌細胞の治療

1つの実施態様においては、癌および腫瘍細胞のような新生物状態にある細胞の治療法を提供する；これらの方法は、治療薬の指針として作用する原形質膜ヌクレオリンを利用する。例えば、毒素または細胞死を刺激しまたは壊死を生じさせる他の手段と結合させる抗-ヌクレオリン抗体の投与は、原形質膜ヌクレオリン発現細胞の除去をもたらす。

10

【0015】

本発明の実施

以下は、本発明を限定するものではなく、本発明の実施に当って実施者を助けるために提示するが、他の方法、技法、細胞、試薬および試みを使用しても本発明を達成し得る。

細胞

細胞または組織サンプルは、対象者から採集する。対象者は、脊椎動物、より好ましくはサル、イヌ、ネコ、ウサギ、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ラット、マウス、モルモット等のような哺乳類、最も好ましくはヒトである。生検、手術、削り取り(頬内部、皮膚等)および血液吸引のような、所望細胞の任意の採集方法を使用し得る。そのような作業は、任意の適切な道具を使用して実施し得る。試験個体群(即ち、新生物状態について試験する細胞)を試験しない細胞および組織(汚染性物質)から分離する必要は、抽出を含む生化学方法を使用する幾つの場合以外はない。この後者の場合、試験個体群は、汚染性物質から完全に分離する必要はないが、優勢であるか或いは容易に区別し得なければならない(例えば、形態学的に(構造的に特異性のマーカー)または生化学的に)。

20

肺癌を分析する方法においては、痰採集は、魅力的で容易に得られるサンプルである。本明細書において使用するときの用語“痰”とは、唾液と呼吸気道からの排出物から構成される吐出物を称する。痰は、明白なゲル様構造を有する高度に複雑な物質である。

痰の採集については、Byrne等(Byrne、1986年)は、患者が数回の深い咳によって生じた物質を蓋付きの容器内に採集することを示唆している。また、痰は、気管支鏡を使用しても採集し得る(Kim等、1982年)。特定の装置または薬剤を使用して痰採集を容易にすることもできる(Babkes等、2001年；KingおよびSpeert、2002年；RubinおよびNewhouse、1999年)。他の痰採集方法も使用し得る。

30

【0016】

細胞培養

ある場合には、採集細胞を培養して、細胞数を増大させて原形質膜ヌクレオリン検出を容易にすることが望ましい。一次培養物を生成させる適切な培地および条件は、周知である。培地および培養条件の選択は、細胞タイプによって変動し、経験的に決定し得る。例えば、骨格筋、骨、ニューロン、皮膚、肝臓および胚幹細胞は、内容物において異なる特定の培地中で増殖させる。さらにまた、1つの細胞タイプ用の培地は、実験室間および施設間で有意に異なり得る。細胞を微細に保つには、培地に、ウシ胎仔血清(FCS)(ウシ胎仔血清(FBS)としても知られている)のような血清を比較的大量に、細胞または組織タイプ次第で5~30容量%添加する。他の血清としては、ウシ新生仔血清(NCS)、仔ウシ血清(BCS)、ウシ成獣血清(ABS)、ウマ血清(HS)；ヒト、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ウサギおよびヒツジの血清がある。制御処理血清代替物タイプ(CPSR；1または3)またはウシ胚液のような血清代替物も使用し得る。特定の精製増殖因子または複数の増殖因子混合物も添加または血清と置換え得る。増殖または細胞生存を促進させる特定の因子またはホルモン類も使用し得る。

40

適切な培養培地の例としては、イスコブ変性ダルベッコ培地(IMDM)、ダルベッコ変性イーグル培地(DMEM)、最少必須培地イーグル(MEM)、基本培地イーグル(BME)、クリック培地

50

、L-15培地リーボピッツ、マッコイ5A培地、グラスゴー最少必須培地(GMEM)、NCTC 109培地、ウィリアムス培地E、RPMI-1640および培地199がある。特定の細胞タイプ/系または細胞機能に対して特異的に発生させた培地、例えば、マジン-ダービー(Madin-Darby)ウシ腎臓増殖培地、マジン-ダービーウシ腎臓維持培地、各種のハイブリドーマ培地、内皮基本培地、線維芽細胞基本培地、ケラチノサイト基本培地およびメラノサイト基本培地も知られている。所望であれば、タンパク質低減または無タンパク質および/または無血清培地および/または化学的に明確にした無動物成分培地、例えば、CHO、遺伝子治療培地またはQBSF無血清培地(Sigma Chemical社；ミズーリ州セントルイス)、DMEM栄養素混合物F-12 Ham、MCDB (105、110、131、151、153、201および302)、NCTC 135、Ultra DOMA PFまたはH L-1 (双方ともBiowhittaker社から；メリーランド州ウォークーズビル)も使用し得る。

10

【0017】

培地には、培養する細胞に応じて、各種の増殖因子、サイトカイン類、血清等を加え得る。適切な増殖因子の例としては、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、血管内皮増殖因子(VEGF)、上皮増殖因子(EGF)、形質転換増殖因子(TGF α およびTGF β)、血小板由来増殖因子(PDGF)類、肝細胞増殖因子(HGF)、インスリン様成長因子(IGF)、インスリン、エリスロポイエチン(EPO)およびコロニー刺激因子(CSF)がある。適切なホルモン添加剤の例は、エストロゲン、プロゲステロン、テストステロン、またはデキサメタゾンのようなグルココルチコイド類である。サイトカイン培地添加剤の例は、インターフェロン類、インターロイキン類または腫瘍壊死因子- α (TNF α)である。アルセベル(Alsever's)溶液、ダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)、イーグル平衡塩類溶液、ガイ(Gey's)平衡塩類溶液(GBSS)、ハンク(Hank's)平衡塩類溶液(HBSS)、バック(Puck's)食塩水Aおよびタイロード(Tyrode's)塩類溶液のような塩類溶液も、培地に添加し得る。必要に応じて、種々の培養条件における添加剤および培養物成分は、これらが細胞応答、活性寿命または生物活性に影響を与える他の特徴を変化させ得るので、最適化し得る。さらに、細胞を増殖させる表面は、細胞の生存、増殖および/または分化に寄与する各種の基質でコーティングし得る。これらの基質としては、限定するものではないが、ラミニン、EHS-マトリックス、コラーゲン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリオルニチンおよびフィブロネクチンがある。三次元培養物を所望する場合、コラーゲン、EHS-マトリックスまたはゼラチン(変性コラーゲン)のような細胞外マトリックスゲルを使用し得る。細胞は、そのようなマトリックス上で増殖し得、或いはゲル自体内に流し込み得る。

20

30

【0018】

所望であれば、培地には、培養物のアシドーシスを抑制する試薬、例えば、培地への緩衝剤添加剤(N,N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(BES)、ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノ-トリス(ヒドロキシメチル)メタン(BIS-Tris)、N-(20-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-3-プロパンスルホン酸(EPPSまたはHEPPS)、グリシクルクリシン(glycylcysteine)、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタン-スルホン酸)(PIPES)、重炭酸ナトリウム、3-(N-トリス(ヒドロキシメチル)-メチル-アミノ)-2-ヒドロキシ-プロパンスルホン酸(TAPSO)、(N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(TES)、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-グリシン(Tricine)、トリス(ヒドロキシメチル)-アミノメタン(Tris)等)を加え得る。頻繁な培地交換および供給CO₂(多くの場合約5%)濃度の変更を使用してもアシドーシスを制御し得る。

40

培養用のガスは、典型的には、約5%の二酸化炭素と残りの窒素であるが、必要に応じて、変動量の酸化窒素(3 ppmほどの低い出発)、一酸化炭素および他のガス(いずれも不活性で生物学的に活性)を含有し得る。二酸化炭素濃度は、典型的には5%辺りの範囲であるが、2~10%で変動し得る。酸化窒素と一酸化炭素の双方は、必要な場合、経験的にまたは文献から決定した極めて少量(即ち、ppm範囲)で典型的に投与する。細胞を最適に増殖させる温度は経験的に決定し得るが、培養温度は、通常、細胞を分離した動物の正常な生理学的範囲内である。

【0019】

50

ヌクレオリンの検出：抗体系方法

抗体

ヌクレオリンは、細胞、組織切片、培養細胞およびこれらの抽出物においてタンパク質レベルで検出し得る。タンパク質発現を検出する免疫化学法は、周知であり、限定するものではないが、ウェスタンブロッティング法、イムノアフィニティー精製法、免疫沈降法、酵素免疫吸着測定法(ELISA)、ドットまたはスロットブロッティング法、ラジオイムノアッセイ法(RIA)、免疫組織化学検出法、免疫細胞化学染色法、およびフローサイトメトリーがある。抗体を使用する一般の手順および使用説明は、良好に対処されている(例えば、HarlowおよびLane、1988年；HarlowおよびLane、1999年)。原形質膜ヌクレオリンを検出するのに有用な選択した抗体類を下記の表1に示す。

10

表1：抗-ヌクレオリン抗体

抗体	供給元	抗原源	注記
p7-1A4マウスモノクローナル抗体(mAb)	Developmental Studies Hybridoma Bank (アイオワ大学；アイオワ州アメス)	アフリカツメガエル卵母細胞	IgG ₁
sc-8031マウスmAb	Santa Cruz Biotech社 (カリフォルニア州サンタクルス)	ヒト	IgG ₁
sc-9893ヤギポリクローナルAb (pAb)	Santa Cruz Biotech社	ヒト	IgG
sc-9892ヤギpAb	Santa Cruz Biotech社	ヒト	IgG
クローン4E2マウスmAb	MBL International社 (マサチューセッツ州ウォータータウン)	ヒト	IgG ₁
クローン3G4B2マウスmAb	Upstate Biotechnology社(ニューヨーク州レークプラシッド)	イヌ(MDCK細胞)	IgG _{1k}

20

30

【0020】

さらなる抗-原形質膜ヌクレオリン抗体を所望する場合、それらの抗体は、周知の方法を使用して産生させ得る(HarlowおよびLane、1988年；HarlowおよびLane、1999年)。例えば、ポリクローナル抗体(pAb)類は、哺乳類宿主中で、表面発現性ヌクレオリンの細胞外ドメインのような免疫原および必要に応じてのアジュバントを1回以上注入することによって産生させ得る。典型的には、免疫原(およびアジュバント)は、皮下または腹腔内注射により、哺乳類中に注入する。免疫原としては、ポリペプチド(分離した、分離していない、または組換え産生させた)、細胞または細胞画分のような成分があり得る。アジュバントの例としては、フロイント完全、モノホスホリルリピッドA合成テレハロースジコリノミコレート、水酸化アルミニウム(アルム)、ヒートショックタンパク質HSP 70またはHS P96 (WO 01/91787A1号)、モノホスホリルリピッドAを含有するスクアレンエマルジョン(LaPostaおよびEldrige、2001年)、 α_2 -マクログロブリンと界面活性物質(オイルエマルジョンのような)、側板(pleuronic)ポリオール類、ポリアニオン類およびジニトロフェノールがある。免疫応答を改善するためには、免疫原を、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、血清アルブミン、ウシチログロブリン、コレラ毒素、不安定エンテロトキシンまたは大豆トリプシンインヒビターのような宿主内で免疫原性であるポリペプチドに抱合させ得る。また、pAb類は、ニワトリ中で調製して、IgY分子を産生させ得る(Schade等、1996年)。

40

【0021】

また、モノクローナル抗体(mAb)類は、宿主または宿主由来のリンパ球を免疫化し、mAb

50

分泌性(または潜在的に分泌性)リンパ球を採集し、これらのリンパ球を不死化細胞(例えば、ミエローマ細胞)に融合させ、所望のmAbを分泌する細胞を選択することによって調製し得る(Goding、1996年; KohlerおよびMilstein、1975年)。EBV-ハイブリドーマ法のような他の方法も使用し得る(Cole等、1985年; Coligan、1996年)。ヒトイムノグロブリンの定常ドメインの遺伝子に対する非ヒト抗体の可変ドメインをコード化する遺伝子をスプライシングすることによるキメラ抗体の産生方法は、アミノ酸レベルにおいて実質的ヒトである“キメラ抗体”をもたらす(Neuberger、Williams等、1984年; Morrison、Johnson等、1984年)。必要に応じて、mAbは、培養培地または腹水液から、通常の方法、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、硫酸アンモニウム沈降またはアフィニティークロマトグラフィーによって精製し得る(HarlowおよびLane、1988年; HarlowおよびLane、1999年)。さらに、ヒトモノクローナル抗体は、第3コピーIgGヒトトランス-遺伝子座およびサイレンス型内生マウスIg遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスの免疫化により(Surani等、1996年)、或いはヒト-トランスジェニックマウスを使用して(Jakobovits等、1998年; LonbergおよびKay、1998年)、産生させ得る。また、ヒト化モノクローナル抗体およびそのフラグメントの産生は、ファージ提示法によっても行い得る(Winter、Griffiths等、1994年)。

10

20

30

40

50

【0022】

開示された方法(KohlerおよびMilstein、1975年)に従うヒトヌクレオリンに対するマウスモノクローナル抗体の産生の例は、以下のとおりである。雌BALB/cマウス(20~25g)に、ヒトヌクレオリンポリペプチドを含有する抗原またはそのタンパク質の100 μ gを腹腔内注入する。別法としては、抗原は、ヒトヌクレオリンを発現するよう形質転換させたマウス細胞を含む。2週間後、50 μ gの抗原を含む2回目の注入液を注入する。抗-ヌクレオリン抗体の産生について試験するために、マウスからの血清を免疫組織学スクリーニングにおいて使用する。高血清レベルの抗-ヌクレオリン抗体を示すマウスは、抗原の3回目の注入(20 μ g)を受ける。4日後、マウスを死亡させ、その脾臓細胞を分離し、ミエローマ系、例えば、P3X63Ag8.653 (American Type Tissue Collection; バージニア州マナッサス)と融合させる。得られたハイブリドーマ細胞を培養し、サブクローニングし、ヌクレオリンに対して高親和性を有する抗体の発現について選択する。

ヌクレオリンに結合する非免疫原性ヒト様またはヒト化ポリクローナル抗体も産生させ得る。これらのポリクローナル抗体は、例えば、ファージ提示法を使用して(Sharon、1995年)、或いはヒトポリクローナル抗体を産生し得るトランスジェニックまたは遺伝子操作動物を免疫化することにより(SinghおよびDias、2002年)、調製し得る。

【0023】

治療に適する抗体

治療薬として使用するのに最も理想的な抗体は、対象者に投与したときに非免疫原性である抗体である。そのような抗体は、最低の副作用を示し、長期の血清および生物学的半減期を有し、広い生体分布を有し、高ターゲット特異性および免疫系のエフェクター段階との関与における高活性を有するという利点を有する。これらの抗体は、ヒト対象者を意図する場合、“ヒト化”、“ヒト”、“キメラ”または“霊長類化”抗体と一般に称される; これらは、ヒトアミノ酸配列から実質的になる(>70%)。

検出

抗体を使用して抗原の存在を検出する方法は、下記の工程の全部ではないにしても1以上を含む:

(1) 原形質膜ヌクレオリンについて試験する存在物を、緩衝液または水で洗浄することによって調製する工程

(2) 非特異抗体結合部位を遮断する工程

(3) 抗体(例えば、ヌクレオリン)を適用する工程

(4) 結合抗体を、一次抗体を認識する検出可能な標識化二次抗体或いは結合(抗-ヌクレオリン)抗体に直接付着または結合している検出可能な標識により検出する工程。

基質は、エピトープ構造を干渉しない任意の溶液で洗浄し得る。一般的な緩衝液として

は、食塩水並びにピシン、トリシンおよびトリスのような生物学的緩衝液がある。

非特異結合部位は、ウシ血清アルブミン(BSA; 変性または未変性)、乳タンパク質、或いは検出試薬が二次抗体である場合は種が検出抗体と同じ起源である免疫化していない宿主動物由来の正常血清またはイムノグロブリンのような、タンパク質溶液を適用して遮断する。例えば、ヤギにおいて調製した二次抗体を使用する手順は、正常ヤギ血清(NGS)を使用する。

その後、基質を興味ある抗体と反応させる。抗体は、F_{ab}フラグメントまたはその誘導体、精製抗体(アフィニティー、沈降による)、ハイブリドーマ培養物からの上清、腹水、血清、または組換え細胞中で発現させた組換え抗体のような任意の形で適用し得る。抗体は、多くの場合非特異結合部位を遮断するのに使用した溶液のようなタンパク質担体を含む緩衝液または培地中で希釈し得る; 有用な抗体濃度は、通常、経験的に決定する。一般に、ポリクローナル血清、精製抗体および腹水は、1:50~1:200,000、より頻繁には1:200~1:500に希釈し得る。ハイブリドーマ上清は、1:0~1:10に希釈し得、或いは透析または硫酸アンモニウム沈降(または、興味ある抗体は保持するが液体成分および好ましくは塩類のような他の小分子は少なくとも部分的に除去する任意の他の手段)により濃縮し、必要に応じて希釈し得る。抗体とのインキュベーションは、37℃においては20分ほどの短時間、室温(約22℃)においては2~6時間、または4℃においては8時間以上で実施し得る。

【0024】

抗体-抗原複合体を検出するには、標識を使用し得る。標識は、結合用抗体または第1抗体を認識する第2抗体に結合させ得、一次抗体インキュベーションおよび完全洗浄後のサンプルと一緒にインキュベートする。適切な標識としては、蛍光成分、例えば、フルオレセインイソチオシアネート; フルオレセインジクロロトリアジンおよびフルオレセインのフッ素化アナログ類; ナフトフルオレセインカルボン酸およびそのスクシンイミジルエステル; カルボキシローダミン6G; ピリジルオキサゾール誘導体; Cy2、3および5; フィコエリスリン; プロピオン酸スクシンイミジルエステルおよびペンタン酸スクシンイミジルエステルのような、スクシンイミジルエステル、カルボン酸、イソチオシアネート、スルホニルクロライドおよびダンシルクロライド類の蛍光種; カルボキシテトラメチルローダミンのスクシンイミジルエステル; ローダミンレッド-Xスクシンイミジルエステル; テキサスレッドスルホニルクロライド; テキサスレッド-Xスクシンイミジルエステル; テキサスレッド-Xナトリウムテトラフルオロフェノールエステル; レッド-X; テキサスレッド染料; テトラメチルローダミン; リスアミン(lissamine)ローダミンB; テトラメチルローダミン; テトラメチルローダミンイソチオシアネート; ナフトフルオレセイン; クマリン誘導体; ピレン類; ピリジルオキサゾール誘導体; ダボキシル染料; カスケードブルーおよびイエロー染料; ベンゾフランイソチオシアネート類; ナトリウムテトラフルオロフェノール類; 4,4'-ジフルオロ-4'-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンがある。適切な標識としては、さらに、アルカリホスファターゼまたはホースラディッシュペルオキシダーゼのような酵素成分; ³⁵Sおよび¹³⁵I-ラベルのような放射性成分; アビジン(またはストレプトアビジン)-ビオチン系検出系(多くの場合、酵素または金シグナル系とカップリングさせた); および金粒子がある。酵素系検出系の場合、酵素は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにおける3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)のような適切な基質と反応させる; 好ましくは、反応生成物は不溶性である。金標識サンプルは、微細構造解析用に調製しない場合、化学的に反応させて金シグナルを増強させ得る; この方法は、光学顕微鏡においてとりわけ好ましい。標識の選択は、用途、所望の解像力および所望の観察方法による。蛍光標識においては、フルオロフォアを適切な波長で励起させ、サンプルを、顕微鏡、共焦点顕微鏡またはFACS装置を使用して観測する。放射性標識化においては、サンプルをオートラジオグラフィフィルムと接触させ、フィルムを現像する; 別法として、オートラジオグラフィは、微細構造法を使用しても達成し得る。また、放射能は、シンチレーションカウンターを使用しても定量し得る。

【0025】

また、本発明は、個々人における腫瘍の生体内検出方法も提供する。個々人に、細胞表面ヌクレオリンと結合する薬剤を含む製薬上許容し得る組成物を投与する。該薬剤は、放射能ラベルのような検出可能な標識も取込み、その後、この標識の対象者体内の分布をマッピングする。該薬剤は、アプタマー、オリゴヌクレオチド、ペプチド、小分子、または抗体のような高分子を含み得る。

上記方法の1つの例においては、腫瘍細胞表面ヌクレオリンに特異的に結合する組成物を放射能標識する。放射能標識本性を、患者身体内の上記薬剤の存在および分布を記録するのに使用する装置により測定する。例えば、ガンマカメラを使用する標準の放射線画像法を使用する場合、数種の放射性同位元素の任意の1つ、例えば、テクネチウム-99またはインジウム-111を使用する。また、陽電子放出断層撮影法(PET)を使用する場合、放射能標識は、フッ素-18のような放射性ハロゲンである。患者に上記放射能標識薬剤を静脈内注射し、薬剤の位置を可視化するための患者スキャンを、その後の12時間に亘って、例えば、注射後の1時間、4時間および12時間で実施する。モニタリング方法は、全身スキャン、SPECT (身体断面を可視化するのを可能にする)、および放出のモニタリングを可能にする任意の方法を含む。

【0026】

細胞学系方法：

免疫蛍光/免疫組織化学法

細胞または組織によるタンパク質発現は、抗原の免疫学的局在決定により確認し得る。一般に、細胞または組織を固定化によって保存し、興味あるエピトープを認識する抗体、例えば、ヌクレオリンに暴露し、結合抗体を可視化する。

細胞、細胞系、組織のいずれも或いは生物体全体でさえも、固定化に適している。細胞は、一次培養物細胞系として生体外培養し得、或いは組織から採集し、機械的にまたは酵素により分離し得る。組織は、任意の臓器、植物または動物に由来し得、固定化の前または後に採集し得る。固定化は、必要に応じて、任意の公知の手段により得る；条件は、検出すべきタンパク質を、結合剤、最も多くは抗体が認識できないようにしないことである。適切な固定剤としては、パラホルムアルデヒド-リシン-ペリオデート、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、メタノール、酢酸-メタノール、グルタルアルデヒド、アセトン、カルノフスキー(Karnovsky's)固定剤等がある。固定剤の選択は、興味あるタンパク質、特定の検出試薬(抗体のような)の特性、検出方法(蛍光、酵素法)および観測方法(落射蛍光顕微鏡、共焦点顕微鏡、光学顕微鏡、電子顕微鏡等)のような変動要因による。サンプルは、通常、固定化前に、最も多くの場合は生物学的緩衝液により先ず洗浄する。固定剤は、溶液中または生物学的緩衝液中で調製する；固定剤の多くは、サンプルへの適用直前に調製する。適切な生物学的緩衝液としては、食塩水(例えば、リン酸緩衝食塩水)、N-(カルバモイルメチル)-2-アミノエタンスルホン酸(ACES)、N-2-アセトアミド-2-イミノジ酢酸(ADA)、ピシン、ビス-トリス、3-シクロヘキシルアミノ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸(CAPS)、エタノールアミン類、グリシン、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸(HEPES)、2-N-モルホリノエタンスルホン酸(MES)、3-N-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)、3-N-モルホリノ-2-ヒドロキシ-プロパンスルホン酸(MOPSO)、ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸)(PIPES)、トリシン、トリエタノールアミン等がある。適切な緩衝液を、分析するサンプル、適切なpH、および検出方法の条件に従って選択する。有用な緩衝液は、リン酸緩衝食塩水(PBS)である。固定化後、サンプルは、好ましくは新鮮な固定剤中に、一時的にまたは無限に、約4 ~ 約22 の温度で保存し得る。

【0027】

サンプルサイズ、サンプル厚および固定剤粘度によって、5分~1週間の固定化後、サンプルを緩衝液中で洗浄する。サンプルが厚くまたは切片を望む場合、サンプルは、適切なマトリックス中に埋込み得る。低温切片化においては、スクロースを流し込み、OCT Tissue Tek (Andwin Scientific社；カリフォルニア州カノガパーク)またはゼラチンのようなマトリックス中に埋込む。また、サンプルは、パラフィンワックス中、またはエポキシ系

(Araldite、Polybed 812、Durcupan ACM、Quetol、Spurr'sまたはこれらの混合物； Polysciences社、ペンシルベニア州ウォリントン)、アクリレート類(London Resins (LR White、LR gold)、Lowicryls、Unicryl； Polysciences社)、メタクリレート類(JB-4、OsteoBed； Polysciences社)、メラミン(Nanoplast； Polysciences社)およびDGD、Immuno-Bed (Polysciences社)のような他の媒質のような電子顕微鏡検査に適する樹脂中にも埋込み、その後重合させ得る。とりわけ適切である樹脂は、親水性のもの(Lowicryls、London Resins、水溶性Durcupan等)である；何故ならば、これらは、重合中に興味あるタンパク質をあまり変性させないようであり、抗体溶液を反発しないからである。ワックスまたは樹脂中に埋込む場合、サンプルは、1連濃度のエタノールまたはメタノールに通して脱水する；ある場合には、ポリプロピレンオキサイドのような他の溶媒も使用し得る。埋込みは、サンプルを検出剤と反応させた後に生じてもよく、或いはサンプルを先ず埋込み、切片化し(ミクロトーム、サイロトーム(cyrotome)、ウルトラミクロトームにより)、その後、切片を検出剤と反応させてもよい。ある場合には、埋込み物質を検出前に部分的にまたは完全に取出して、抗原受入れを容易にすることもできる。

10

【0028】

ある場合には、抗体が結合するヌクレオリンエピトープ(1個以上)は、固定化故に、利用し得ないようにしている可能性がある。抗原修復方法を使用して抗原を抗体結合に利用可能にすることができる。多くの修復法を利用し得る(例えば、McNicolおよびRichmond、1998年；RobinsonおよびVandre、2001年；Shi等、2001年において概説されている)。一般的な方法は、オートクレーブ、マイクロ波、熱水または熱緩衝液、圧力釜または他の熱源から供給された熱を使用することを含む。多くの場合、熱源は、順次使用する；サンプルは、多くの場合、溶液中にあるべきである(例えば、マイクロ波処理)。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS、0.25%~1%)または他の変性用清浄剤のような清浄剤処理も抗原を暴露させ得る。化学方法は、強アルカリ類(NaOHのような)、水中での長時間浸漬、尿素、蟻酸、および硫酸亜鉛-ホルマリン中での再固定化を含む。他の場合には、タンパク質分解酵素処理により、抗原を変性させて、抗原を抗体に対して利用できるようにする。トリプシンのような任意の多くのプロテアーゼ類を使用し得る。これらの方法は、組合せて最適の結果を達成し得る。抗原修復方法の選択は、サンプル、その埋込み法(されている場合)および抗-ヌクレオリン抗体によるであろう。

20

とりわけ免疫蛍光または酵素生成物系検出の場合には、残留固定剤、タンパク質交差結合、タンパク質沈降または内生酵素に基づく背景シグナルは、例えば、塩化アンモニウムもしくは水素化ホウ素ナトリウム、または交絡内生酵素を失活または欠乏させる物質、例えば、ペルオキシダーゼ類上で作用する過酸化水素を使用して、失活させ得る。切片化されていないサンプル中の細胞内タンパク質を検出するには、サンプルを浸透化し得る。浸透化剤としては、t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール類、ポリオキシエチレンソルビタン類のような清浄剤、およびリシン類、プロテアーゼ類等のような他の薬剤がある。

30

非特異結合部位は、ウシ血清アルブミン(BSA；変性または未変性)、乳タンパク質、または好ましくは検出剤が抗体である場合の非免疫化宿主動物(その種は、検出用抗体と同じ起源である)由来の正常血清またはIgGのような、タンパク質溶液を適用させることによって遮断し得る。

40

【0029】

フローサイトメトリー/蛍光活性化細胞選別法(FACS)

フローサイトメトリーの実施方法は、周知である(OrfaoおよびRuiz-Arguelles、1996年)。原形質膜ヌクレオリンを精査するので、細胞質コンパートメントの受入れを可能にする細胞浸透化は、望ましくない。採集後、細胞を単一細胞懸濁液として調製する；その後、細胞を、通常非特異結合部位を遮断した後、抗-ヌクレオリン抗体と一緒にインキュベートする。好ましくは、抗-ヌクレオリン抗体を蛍光マーカーで標識する。上記抗体を蛍光マーカーで標識しない場合は、該第1抗体と免疫反応性で且つ蛍光マーカーを含有する第2抗体を使用する。十分に洗浄して、過剰または未結合抗体の除去を確実にした後、細

50

胞は、フローサイトメトリーをする状態にある。

【0030】

生化学系方法：

これらの方法においては、先ずは、原形質膜タンパク質を他の細胞コンパートメントから分離することが望ましい。この分離は、例えば、単純細胞抽出、微分抽出または機械的破壊、その後の細胞コンパートメントの勾配(スクロースまたはポリデキストランのような)上での分離、その後の遠心分離、抽出、およびその後の原形質膜特異性抗体による適切な細胞コンパートメントの免疫選択等のような、任意の多くの方法で実施し得る。そのような方法の例は、Naito等、1988年；Yao等、1996年bに記載されている。抽出試薬は、周知である。例えば、メタノールのような溶媒は、場合によっては有用であり得る。それよりは、*t*-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール(ポリエチレングリコールtert-オクチルフェニルエーテルとしても知られている)のような清浄剤は、単純抽出においてとりわけ有用である。また、グルコピラノシド類、マルトピラノシド類、マルトシド類、ポリオキシエチレンエステル類、他のポリオキシエチレンエーテル類；アルギン酸、カプリル酸、コール酸、1-デカンスルホン酸、デオキシコール酸、ジオクチルスルホコハク酸、1-ドデカンスルホン酸、グリココール酸、グリコデオキシコール酸、1-ヘプタンスルホン酸、1-ヘキサンスルホン酸、N-ラウロイルサクロシン、ラウリル硫酸塩(例えば、SDS)、1-ノナンスルホン酸、1-オクタンスルホン酸、1-ペンタンスルホン酸、タウロコール酸およびタウロデオキシコール酸の塩類；7-エチル-2-メチル-4-ウンデシル硫酸ナトリウム、および2-エチルヘキシル硫酸ナトリウムも有用である。他の有用な清浄剤としては、(3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート；(3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-2-ヒドロキシ-1-プロパン-スルホネート；N-デシル-、N-ドデシル-、N-ヘキサデシル-、N-オクタデシル-、N-テトラデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネート；およびホスファチジルコリンがある。あまり有用ではないが、ある場合に助けとなり得るのは、アルキルトリメチルアンモニウムブロマイド、ベンズアルコニウムクロライド、ベンズエトニウムクロライド、ベンジルジメチルドデシルアンモニウムブロマイド、ベンジルジメチルヘキサデシルアンモニウムクロライド、セチルジメチルエチルアンモニウムブロマイド、セチルピリジニウム、デカメトニウムブロマイド、ジメチルジオクタデシルアンモニウムブロマイド、メチルベンズエトニウムクロライド、メチルトリオクチルアンモニウムクロライド、およびN,N',N'-ポリオキシエチレン(10)-N-タロウ-1,3-ジアミノプロパンである。種々の抽出剤を単独または組合せて使用し得る；これらの抽出剤は、単純な水溶液または適切な緩衝液中で調製し得る。

ポリエチレングリコールター-オクチルフェニルエーテルは、その低曇り点を利用して膜タンパク質を可溶性タンパク質から2つの異なる相に分離することにより、微分抽出においてとりわけ有用である。

抽出緩衝液は、アプロチニン、ベンズアミジン、アンチパイン、ペプスタチンおよびイオドアセトアミドのようなプロテアーゼインヒビターを含み得る。

その後、抽出物をヌクレオリン発現についてアッセイする。表面原形質膜を他の細胞コンパートメント(とりわけ核心)から分離する方法においては、ヌクレオリン検出剤は、細胞外原形質膜ヌクレオリンエピトープに対して特異性である必要はない。

【0031】

免疫吸着アッセイ(ELISA) (Ausubel等、1987年)

タンパク質発現を検出する種々のタイプの酵素免疫吸着測定法(ELISA)は公知であり、これらはヌクレオリン検出に応用し得る。しかしながら、他のELISA様アッセイ法は、ラジオイムノアッセイおよび他の非酵素結合抗体結合アッセイおよび手法を含む。これらのアッセイにおいては、細胞表面タンパク質は、細胞調製における基本的な成分である。

二重抗体サンドイッチELISA法は、とりわけ有用である。二重抗体サンドイッチELISAの基本的プロトコールは、次のとおりである。プレートを抗-ヌクレオリン抗体(キャプチャー抗体)でコーティングする。その後、プレートをBSAのような遮断剤で洗浄して、試験プレートへのタンパク質(抗体または抗原)の非特異結合を遮断する。次いで、試験サンプル

ルをキャプチャー抗体でコーティングしたプレート上でインキュベートする。プレートを、その後、洗浄し、抗-ヌクレオリン抗体と一緒にインキュベートし、再度洗浄し、特異抗体標識抱合体と一緒にインキュベートし、シグナルを適切に検出する。

他のELISA法においては、タンパク質またはペプチドを選択された表面上に固定し、その表面展示面、例えば、特別処理ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェルは、タンパク質に対して親和性を有し得る。洗浄して不完全吸着物質を除去した後、BSAまたはカゼインのような、抗-ヌクレオリン抗体とは抗原的に中性であることが知られている非特異性タンパク質をウェル底上に結合させるまたはコーティングすることが一般に望ましい。この工程は、固定表面上の非特異吸着部位の遮断を可能にし、表面上への抗体非特異結合によって生じる背景を低下させる。抗体を、動物内で、ポリペプチドをタンパク質 (例えば、BSA) に抱合させることによって産生させた場合、一般に、抗体組成物中で遮断用タンパク質に対する抗体の存在する可能性故に、異なるタンパク質を遮断剤として使用する。

ウェルへのヌクレオリンの結合、背景を低下させるための非反応性物質によるコーティングおよび未結合物質除去のための洗浄後、固定表面を抗-ヌクレオリン抗体組成物と免疫複合体(抗原/抗体)形成を促す方法で接触させる。そのような条件は、抗体組成物をBSA、ウシγグロブリン(BGG)およびPBS/ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートのような希釈剤で希釈することを含む。これらの添加薬剤も、非特異背景シグナルの低減を助長する。その後、層化抗体組成物を、例えば、25 ~ 37 °Cで2~4時間インキュベートせしめる。インキュベーション後、抗体組成物接触表面を洗浄して非免疫複合体化物質を除去する。1つの洗浄手順は、PBS/ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートまたはホウ酸塩緩衝溶液による洗浄を含む。

試験サンプルと抗体間の特異的免疫複合体の形成およびその後の洗浄後、免疫複合体形成を、抗-ヌクレオリン抗体に対する特異性を有する第2抗体を使用して検出する。検出においては、第2抗体を酵素または蛍光分子のような検出可能な標識と結合させる。イムノアッセイ法の多くは、米国特許第5,736,348号、第5,192,660号および第4,474,892号に記載されている。

【0032】

ウェスタンブロッティング (Ausubel等、1987年)

ウェスタンブロッティング法は、周知である。一般的には、タンパク質サンプルを、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)に、サンプル内のタンパク質の適切な分離を得るような条件において供する。その後、タンパク質を、各タンパク質相互の相対的位置を維持するような方法で膜(例えば、ニトロセルロース、ナイロン等)に転移させる。

既知分子量の可視化標識タンパク質を上記ゲルのレーン内に含ませ得る。これらのタンパク質は、膜へのタンパク質の適切な転移を担保するための対照として並びにプロット上の他のタンパク質の相対的分子量を決定する分子量マーカーとして作用する。別法としては、標識していないマーカータンパク質(或いは、ある稀な場合には、マーカータンパク質無し)を、転移後に、Brilliant Blue (GまたはR; Sigma社、ミズーリ州セントルイス)または他のタンパク質染料によって検出する。タンパク質転移後、膜を遮断溶液中に沈めて一次抗体の非特異結合を阻止する。

一次抗体、例えば、抗-ヌクレオリンは標識し得、抗原の存在および分子量は、膜の特異的位置での標識を検出することによって測定し得る。しかしながら、一次抗体は標識しなくてもよく、プロットを標識化第2抗体とさらに反応させる。この二次抗体は、一次抗体と免疫反応性である; 例えば、二次抗体は、ウサギイムノグロブリンに対する抗体であり得、アルカリホスファターゼにより標識し得る。ウェスタンブロットを実施する装置および方法は、米国特許第5,567,595号に記載されている。

【0033】

免疫沈降法 (Ausubel等、1987年; HarlowおよびLane、1999年)

タンパク質発現は、免疫沈降法を使用して抗原を分離することによって測定し定量し得

10

20

30

40

50

る。免疫沈降法は、米国特許第5,629,197号に記載されている。免疫沈降法は、ターゲット抗原成分を複合体混合物から分離することを含み、微量のタンパク質を識別または分離するのに使用する。細胞表面タンパク質の分離においては、ノニオン性塩を多くの場合使用する。

例えば、細胞全体からの免疫沈降は、以下のようにして実施し得る。細胞を、例えば、20 mM Tris緩衝液、pH 8.6中1% t-オクチルフェノキシポリエトキシエタノール/0.1% SDS /150 mM NaClのような1種以上の清浄剤で抽出する。撹拌により助長させ得る抽出後、不溶性破片を、遠心分離機を使用して除去する。抗-ヌクレオリン抗体を抽出物に加え、その後、サンプルを4℃で30分～1夜インキュベートする。その後、セファロースまたはトリリス-アクリルビーズに接合させた黄色ブドウ球菌もしくは組換え産生プロテインAまたはC群ブドウ球菌プロテインGを添加する。抗-ヌクレオリン抗体がプロテインAに良好に結合しない場合、抗-ヌクレオリン抗体を調製した動物の抗体を認識するIgG Abを同時に添加する。その後、サンプルを、緩やかに撹拌しながら、4℃でおよそ2時間インキュベートする。今や抗体-抗原複合体に結合したビーズまたは細菌細胞を、通常は先ず上記抽出溶液または高塩緩衝液のいずれかで、次に低塩緩衝液または水で十分に洗浄して、非特異結合タンパク質および残留清浄剤分子を除去する。残留緩衝液の除去後、ビーズを、電気泳動サンプル緩衝液のような緩衝液と一緒にインキュベートし、次いで、95℃に3～5分間供してビーズから結合タンパク質を溶出させる。その後、サンプルは、分析およびヌクレオリン検出する状態にある。

10

20

30

40

50

【0034】

他の方法：

免疫選択手法(FACS以外の) (Ausubel等、1987年)

原形質膜ヌクレオリンを発現する細胞は、抗-抗体抗体類でコーティングしたプラスチックプレート上での“パニング(panning)”により容易に分離し得る(WysockiおよびSatoh、1978年)。パニングは、他の免疫選択手法を上回る多くの利点を有する：パニングは、迅速で、効率的で(10^7 個の細胞を2枚の60mmプラスチックプレート上で30分内で容易にパニングし得る)、且つ安価である。

一般に、単一細胞懸濁液を抗-ヌクレオリン抗体により標識し、次いで、二次抗体(遮断した非特異結合部位を有する)でコーティングした基体上でインキュベートする。室温での1～3時間のインキュベーション後、付着していない細胞を洗い流す。この実施態様においては、結合細胞は、ヌクレオリンが原形質膜内に発現していることを示し、新生物細胞を示唆している。

【0035】

ヌクレオリンの検出：オリゴヌクレオチド系方法

ヌクレオリンを認識し結合するGRO類および他のオリゴヌクレオチド類(Bates等、1999年；Miller等、2000年；Xu等、2001年)は、抗体類とほぼ同じ方法で使用し得る。適切なアッセイ法の例を下記に示す。ある場合には、GROヌクレオチドを大きめの核酸配列中に取込ませることが有利である；例えば、GRO核酸の基質への結合を、ヌクレオリン結合部位を変性させることなく容易にする。

ヌクレオリンを結合する(さらにまた、癌細胞増殖を抑制する生物学的特性を有する)有用なGRO類は、開示されている(Bates等、1999年；Miller等、2000年；Xu等、2001年)。これらのGRO類は、下記の表2に示すものを含む。対照GRO類は、背景シグナルレベルを検出するのに有用である。

【 0 0 3 6 】

表2：ヌクレオリンに結合する非アンチセンス GRO および非結合性対照^{1,2,3}

GRO	配列	SEQ ID NO:
GRO29A ¹	tttggtggtg gtggttggg tgggtggtg	1
GRO29-2	tttggtggtg gtggtttgg tgggtggtg	2
GRO29-3	tttggtggtg gtggtggtg tgggtggtg	3
GRO29-5	tttggtggtg gtggtttggg tgggtggtg	4
GRO29-13	tgggtggtg ggt	5
GRO14C	gggtggtg gtg	6
GRO15A	gttgtttggg gtggt	7
GRO15B ²	ttggggggg tgggt	8
GRO25A	gggtgggtg ggtgggtg gtgg	9
GRO26B ¹	gggtggtg gttgtggtg tgggtg	10
GRO28A	tttggtggtg gtggttggg tgggtggtg	11
GRO28B	tttggtggtg gtggtggtg ggtggtg	12
GRO29-6	gggtggtg gttgtggtg tgggtgtt	13
GRO32A	gggtggtg gtggttggg tgggtggtg gg	14
GRO32B	tttggtggtg gtggttggg tgggtggtg tt	15
GRO56A	gggtggtg gttgtggtg tgggtgtg ggtggtg gttgtggtg tgggtg	16
CRO	tttctctc ctcctctc tctctctc	18
GRO A	ttagggttag ggttagggtt aggg	19
GRO B	gggtggtg g	20
GRO C	gggtggtg gtg	21
GRO D	gggtggtg gtg	22
GRO E	gggtttggg	23
GRO F	gggtttggtt ttggtttgg	24
GRO G ¹	gggtggtg gtg	25
GRO H ¹	gggtttggg gg	26
GRO I ¹	gggtttggg	27
GRO J ¹	gggtttggg ggtttggg tttggg	28
GRO K ¹	ttgggttgg ggtgggtt ggg	29
GRO L ¹	gggtgggtg gtggt	30
GRO M ¹	gggtttggtt ttggtttgg tttgg	31
GRO N ²	tttctctc ctcctctc tctctctc	32
GRO O ²	cctctctc cttctctc tctctc	33
GRO P ²	tgggt	34
GRO Q ²	gcgtgt	35
GRO R ²	gcgtttgcg g	36
GRO S ²	tagg	37
GRO T ²	gggttggg tgggttgg ggg	38

¹ 良好な原形質膜ヌクレオリン結合性 GRO を示す。²ヌクレオリン対照(非原形質膜ヌクレオリン結合性)を示す。

³ ¹または²表示のない GRO 配列は、若干の抗増殖活性を有する。

【 0 0 3 7 】

細胞学系方法：

細胞位置特定/標識化(免疫系位置特定/標識化アッセイ法の関連)

10

20

30

40

50

免疫系位置特定アッセイ法について前記で概略説明した手法(免疫蛍光またはFACSのような)は、検出試薬がヌクレオリン結合性GROであるアッセイ法においても応用可能である。修正としては、BSAのようなタンパク質の代りにサケ精子由来のような変性DNAを使用して非特異結合を阻止する修正を含む。また、検出においては、前記で概略説明したのと同様な標識が、GROをある形の標識で誘導化し得る限り、有用である。この目的においては、ビオチン-アビジン核酸標識化は、ジゴキシゲニン標識化同様に、とりわけ好都合である(Ausubel等、1987年)。ビオチン化ヌクレオチドの合成は、開示されている(Langer等、1987年)。水溶性ビタミンであるビオチンは、アリアルアミンリンカーアームによりピリミジン環のC5位置に共有結合し得る；ビオチンは、アビジンまたはストレプトアビジンと非共有結合し、容易に標識化し得る。また、ビオチンは、末端ヌクレオチドの5'-ヒドロキシルにカップリングすることにより、合成中のオリゴヌクレオチドに付加する。ジゴキシゲニン-11-dUTPは、ニックトランスレーションまたはランダムオリゴヌクレオチド開始型合成プロトコルのいずれかにより、DNA中に取込ませ得る。ジゴキシゲニンは、標識化抗-ジゴキシゲニン抗体を使用して検出する。好都合なジゴキシゲニン系が商業的に入手可能である(Roche Molecular Biochemicals社；インディアナ州インディアナポリス)。オリゴヌクレオチドを使用してタンパク質を検出し、位置特定する手法の例は、Davis等、1998年によって開示されている。

生化学系方法：

また、GRO類は、前述するような生化学方法におけるヌクレオリンを検出する抗体として、同様な方式で使用し得る。例えば、“サウスウェスタン”タイプのプロットティング試験をGRO類によって実施し得る(Bates等、1999年；Miller等、2000年)。細胞を適切に抽出した(例えば、原形質膜タンパク質を細胞内タンパク質から微分分離した)後、タンパク質をポリアクリルアミドゲル上で電気泳動に供しポリビニリデンジフルオライド膜のような基体に転移させる。タンパク質は、6 M グアニジン-HClによる4 で30分の洗浄、次いで、25 mM HEPES (pH 7.9)/4 mM KCl/3 mM MgCl₂中の3 M、1.5 Mおよび0.75 M グアニジンHCl中での洗浄により、変性および再生し得る。非特異結合部位をHEPES緩衝液中の5%無脂肪乾燥乳により遮断した後、標識GROを、0.25%のNDM、0.05%のNP-40、400 ng/mlのサケ精子DNAおよび100 ng/mlの、tcgagaaaaa ctctcctctc ctctccttctt ctcca；SEQ ID NO:17のような無関連混合配列オリゴヌクレオチドを補充したHEPES結合用緩衝液中で、4 で2時間ハイブリッド化する。HEPES結合用緩衝液で洗浄後、シグナルを適切に検出する。

【0038】

他の方法：

アレー

チップ上の固定化ヌクレオリン結合試薬のアレー

チップは、はるかに低密度の分子または固定化分子を含有しない領域によって隔てられた固定化分子を含有する領域のアレーである。例えば、タンパク質チップは、ヌクレオリン結合性抗体を適用することによって製造し得る；“アブタマー”様チップは、ヌクレオリン結合性GRO類を適用することによって製造し得る。残りの領域は、被覆されないで残るか、或いは不活性分子で被覆する。アレーを洗浄して、全部ではないが特異的に固定化したポリペプチドまたは核酸を除去し得る。さらに、チップは、複数ヌクレオリン結合性抗体(表1)、核酸(GRO類のような；表2)、または両方を含有させても製造し得、さらに、ヌクレオリンと非反応性である対照抗体および/または核酸も含有し得る。そのようなアレーは、同時の試験確認、複製および内部統制を可能にするであろう。

抗-ヌクレオリン抗体のようなタンパク質は、固形支持体上に、アミンとカルボン酸の縮合およびジスルフィド形成のような単純な化学反応により固定し得る。不活性基体上でのタンパク質のこの共有固定化は、非特異吸収に基づく高背景シグナルを阻止し得る。ビオチンのような他の分子により誘導された基体も固定化すべきタンパク質がアビジンまたはストレプトアビジンにより誘導された場合に有用であり、或いはその逆も然りである。ある稀な場合、とりわけ抗-ヌクレオリン抗体コード化核酸配列を利用し得る場合、抗-ヌクレオリン抗体を含む融合ポリペプチドが基体上への固定化において有利であり得る。

【 0 0 3 9 】

表面は、ヌクレオリン結合剤を固定化し得る任意の材料であり得る。例えば、表面は、金属、ガラス、セラミック、ポリマー、木材または生物学的組織であり得る。表面としては、所定材料の基体、および基体の1部または全表面上の他の材料の層(1層以上)があり得る。表面は、GST融合ポリペプチドの精製におけるグルタチオンの固定化において使用する表面のような、アフィニティークロマトグラフィーにおいて使用する任意の一般的表面であり得る。アフィニティークロマトグラフィー用の表面としては、例えば、セファロース、アガロース、ポリアクリルアミド、ポリスチレンおよびデキストランがある。表面は、固形である必要はなく、コロイド、剥脱ミネラルクレー、脂質膜分子層、脂質二分子層、ゲルまたは多孔質材料であり得る。

10

固定化方法は、望ましくは、表面上のヌクレオリン結合剤の位置を調整して、例えば、抗体の抗原結合部分を基体に付着しないようにし得、一方、非抗原結合部分を基体に根付けさせる。個々の反応物リガンドの位置を調整することにより、リガンドのパターンまたはアレーを生成させ得る。ヌクレオリン結合試薬が占有しない表面部分は、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの非特異吸着を許容しない。

この実施態様においては、対象者からのサンプル、例えば、血液を、ヌクレオリン結合性分子を含有するチップ上に通す。その後、表面プラズモン共鳴の変化を検出する装置のようなバイオセンシング装置を使用して、結合ヌクレオリンを検出する。BIAcore (Uppsala社、スウェーデン)チップは、有用なチップおよび検出装置の例として役立っている。

20

予測アッセイ法

さらにまた、ヌクレオリンの表面発現を通常の方法よりも早期に検出し得るので、診断方法を使用して、疾病発症の早期段階の新生物を有するまたは発症するリスクにある対象者を同定することができる。予測アッセイ法は、有害な新生物、とりわけ癌の家族歴を有する対象者のような、新生物を有するまたは発症するリスクにある対象者を同定するのに使用し得る。そのような個々人の同定方法は、対象者から得られた試験サンプルおよびヌクレオリンの細胞表面位置特定について試験することを含む。

もう1つの実施態様においては、原形質膜ヌクレオリンを検出し、次いで、ヌクレオリン量を定性的または定量的に評価することにより(通常、結合ヌクレオリン分子から発生したシグナルによって間接的に)、原形質膜ヌクレオリンレベルは細胞増殖速度に相関するので、細胞増殖速度を指標し得る。

30

【 0 0 4 0 】

キット

ヌクレオリンプローブおよび検出試薬を投与のための使用説明書と一緒に含むキット、容器、パックまたはディスペンサーを組立て得る。キットとして供給する場合、種々の成分は別々の容器内に包装され、使用直前に混合し得る。そのような各成分の別々の包装は、活性成分の機能を喪失することなく長期保存を可能にし得る。

また、キットは、診断試験のような特定の試験の実施を容易にする別々の容器内の試薬を含む。例えば、非ヌクレオリン結合性GRO類を内部陰性対照用に、ヌクレオリンおよびヌクレオリン結合試薬を内部陽性対照用に供給し得る。キットの各成分は、ヌクレオリンについて精査するために使用する抗-ヌクレオリン薬、対照サンプル、および任意成分としてのヌクレオリンを検出する組成物である。抗-ヌクレオリン薬の例としては、抗-ヌクレオリン抗体(表1に示すような)またはそのフラグメントがある；標識されている場合、ヌクレオリン結合検出試薬は不要である。ヌクレオリン結合性オリゴヌクレオチド(例えば、表2に示すような)は、第2標識試薬(ビオチンのような)が結合し得るように誘導し得る。しかしながら、標識GRO核酸を提供する場合、第2標識試薬は不要である。検出試薬の例としては、標識二次抗体、例えば、ロバ内で調製され、その後、ローダミンのようなフルオロフォアでタグ付けした抗-マウスpAb、或いはGRO類のようなオリゴヌクレオチドを検出するための標識試薬、例えば、プローブがビオチン化されている場合のホースラディッシュペルオキシダーゼに結合させたアビジンまたはストレプトアビジンがある。対照成分としては、二次抗体を調製した動物由来の正常血清；ヌクレオリンポリペプチドまた

40

50

はヌクレオリン結合性オリゴヌクレオチドを含有する溶液；ヌクレオリン結合試薬反応性をアッセイするためのヌクレオリントタンパク質のドットプロット；または、原形質膜中にヌクレオリンを発現する固定または保存細胞がある。他の成分としては、緩衝液、固定剤、遮断用溶液、顕微鏡スライドおよび/またはカバースリップ、またはマイクロタイタープレートのような分析用の他の適切な基体；清浄剤もしくは清浄剤溶液、または他の細胞抽出試薬；雑多な試薬類、プロテアーゼインヒビター類、各種容器類、およびアッセイを容易にするための雑多な器具類があり得る。

【0041】

(a) 容器

キットに含ませる試薬類は、種々の成分の寿命が保たれ且つ容器材料によって吸着または変化を受けないような任意の種類の容器内で供給し得る。例えば、密封ガラスアンプルは、凍結乾燥ヌクレオリン結合試薬(抗-ヌクレオリン抗体またはヌクレオリン結合性オリゴヌクレオチドのような)または窒素のような中性の非反応性ガス下に包装した緩衝液を含有し得る。アンプルは、ガラス、有機ポリマー(即ち、ポリカーボネート、ポリスチレン等)、セラミック、金属または試薬類を保持するのに典型的に使用される任意の他の材料のような、任意の適切な材料からなり得る。適切な容器の他の例としては、アンプルと同様な物質から製造し得る単純なボトル類、およびアルミニウムまたは合金のようなホイールライニング内部を有し得る包装材がある。他の容器としては、試験管、バイアル、フラスコ、ボトル、シリンジ等がある。容器は、皮下注射針によって刺し通し得るストッパーを有するボトルのように、滅菌受入れ口を有し得る。他の容器は、取り除き時に各成分の混合を可能にする容易に取り除き得る膜によって隔離されている2つのコンパートメントを有し得る。取り除き得る膜は、ガラス、プラスチック、ゴム等であり得る。

(b) 使用説明資料

また、キットは、使用説明資料と一緒に供給し得る。使用説明は、紙または他の基体に印刷し得、および/または電子読取り媒体、例えば、フロッピーディスク、CD-ROM、DVD-ROM、DVD、ビデオテープ、オーディオテープ等として供給し得る。詳細な使用説明書をキットと一緒に物理的に付けなくてもよく；代りに、使用者をキットの製造業者または販売業者が特定したインターネットウェブサイトに向けさせるか、或いは電子メールとして供給してもよい。

【0042】

治療の方法

治療方法

本発明のもう1つの局面は、治療目的におけるヌクレオリン発現または活性の調節方法に関する。本発明の調節方法は、細胞を、細胞と関連するヌクレオリン活性の1以上の活性を調節する薬剤と接触させることを含む。ヌクレオリン活性を調節する薬剤は、核酸またはタンパク質、ヌクレオリンの自然産生性同系リガンド、ペプチド、ヌクレオリンペプチド擬態物、または他の小分子であり得る。調節方法は、生体内で(例えば、上記薬剤を対象者に投与することにより)、実施し得る。そのようなものとして、本発明は、ヌクレオリンの異常発現または活性に特徴を有する疾患または障害に苦しんでいる個々人の治療方法を提供する。

治療薬としての抗-ヌクレオリン抗体

ヌクレオリンと結合したヌクレオリンを干渉する、前記“ヌクレオリンの検出；抗体系方法：抗体”の項で説明したような抗体は、いずれも腫瘍および癌を治療するのに使用し得る。ある場合には、モノクローナル抗体が、特異性で且つ限定されたエピトープのみに結合するので好ましい。しかしながら、他の場合には、ヌクレオリン上の2以上のエピトープを干渉し得るポリクローナル抗体が好ましい。抗体は、全抗体およびそのフラグメントまたは誘導体であり得る。例えば、生細胞をアッセイする場合、F_{ab}フラグメントの使用は、架橋を排除し、それによって細胞が結合抗体を取込むのを阻止するであろう。

スプライセオソーム介在RNAトランススプライシング (SMaRT) (Mitchell, 1997年)

もう1つの実施態様においては、選択された数のヌクレオリンを発現する細胞小集団を

10

20

30

40

50

、スプライセオソーム介在RNAトランススプライシングによりターゲットする。この方法は、プレカーサー治療用分子(PMT)と特異性ターゲット細胞内で特異的に発現する前mRNA分子との間のトランススプライシング反応をターゲティングすることにより、選択された細胞小集団内に異種遺伝子を発現させる手段である(Puttaraju、DiPasquale等、2001年)。上記異種遺伝子は、細胞に対する治療価値を有するか或いは特異的細胞を死滅させる毒素のいずれかであり得る。

【0043】

アンチセンス化合物

対象者における腫瘍の治療方法は、ヌクレオリン発現を調節する、とりわけ抑制するのに使用し得る、治療上有効量のアンチセンス核酸分子またはリボザイムを投与することを含む。

アンチセンス核酸分子は、遺伝子発現を選択的に改変または鎮静させ得る配列特異性手段である。特異性遺伝子の同系RNAの相補配列をワトソン-クリック(Watson-Crick)塩基対合により結合させてRNA-オリゴハイブリッド分子を形成させることによるアンチセンスオリゴ機能(KnorreおよびVlassov、1990年)。RNA-オリゴハイブリッド形成は、RNA機能、安定性および結果としてのタンパク質発現を干渉する。種々のメカニズムが、物理的立体効果による干渉および二本鎖アンチセンス-オリゴ-プローブ：mRNAハイブリッドのRNA分解酵素H介在分解の開始のような、アンチセンス核酸分子によるタンパク質翻訳の抑制に寄与している(DagleおよびWeeks、2000年)。従って、アンチセンスオリゴヌクレオチド分子は、治療的にまた薬物ターゲットを認証する手段として有用である。

好ましい実施態様のヌクレオリンアンチセンスDNAは、少なくとも10個のヌクレオチド、好ましくは15~25個のヌクレオチド、即ち、ストランドに相補的に結合し、最も容易に調製され、且つターゲット臓器および細胞に伝達される長さを有する。合成アンチセンスヌクレオチドは、好ましくは、全くの天然ホスホジエステル結合よりはむしろホスホロチオエートまたはチオエステルのようなホスホエステルアナログを含有する；何故ならば、これらの自然産生結合は、ヌクレアーゼ類に対して不安定であるからである(Shaw、Kent等、1991年)。上記ホスホロチオエート群のオリゴヌクレオチドは、高溶解性、合成の容易さ、ワトソン-クリックヌクレオチド水素結合パターンの維持、および細胞mRNAのRNA分解酵素H介在分解を活性化させる能力というさらなる利点を有する(Stein、Tonkinson等、1991年；Crooke、1993年；SrinivasanおよびIversen、1995年；Bock、Griffin等、1992年)。

【0044】

リボザイムは、自己開裂性および自己スプライシング性である酵素“触媒”RNA分子である(Cech、1986年；Altman、1990年；Symons、1992年)。自然産生リボザイムの触媒ドメインをターゲットRNA分子に対して特異性のオリゴヌクレオチドと結合させることにより、特異性RNAターゲットを開裂する人工触媒RNA分子を調製し得る。リボザイムは、少なくとも2つの機能性ドメイン、即ち、(1) RNA特異性結合のための特定化された配列；および、(2) RNA開裂に関与する触媒配列を含有する(Cech等、1992年)。

干渉性RNA

また、腫瘍および癌は、干渉性RNA組成物を投与することにより主要調節遺伝子の発現を干渉することによっても治療し得る。合成干渉性RNA二本鎖体、合成短鎖ヘアピンRNA二本鎖体、および干渉性RNA分子の生体内産生および伝達を可能にする遺伝子発現系のような、この技術の幾つかの実施態様は、現在開示されている(SharpおよびZamore、2000年；Bernstein、Caudy等、2001年；Ketting、Fischer等、2001年；Sharp、2001年；McManus、Petersen等、2002年；McManusおよびSharp、2002年；Paddison、Caudy等、2002年；Paddison、Caudy等、2002年)(Beach等、2001年；Fire等、2003年；Tuschl等、2002年；Tuschl等、2001年)。

併用療法

本発明の上述の方法の実施においては、上記特異性インヒビター(例えば、ヌクレオリンに対して特異性の、抗体、アンチセンス、リボザイム、PMTまたは干渉性RNA類)は、単

独で、或いは互いとまたは他の抗-腫瘍薬、例えば、放射線、化学療法薬および細胞毒性薬と併用して使用し得る。そのような併用治療は、優れた相乗的な治療結果を達成する。

【 0 0 4 5 】

投与

製薬組成物

“製薬上許容し得る担体”としては、薬物投与に適合し得る任意および全ての溶媒類、分散媒類、コーティング類、抗菌薬および抗真菌薬、等張剤および吸収遅延剤等がある(Remington、2000年)。そのような担体または希釈剤の好ましい例としては、水、食塩水、リンゲル溶液およびデキストロス溶液がある。補足的活性化合物も上記組成物中に混入し得る。

10

一般的検討事項

製薬組成物は、静脈内、皮内、皮下、経口、吸入、経皮、経粘膜および直腸投与のようなその意図する投与経路に適合し得るように調合する。非経口、皮内または皮下投与において使用する溶液または懸濁液は、注射用水、食塩水、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒のような滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベン類のような抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムのような酸化防止剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩のような緩衝剤；および塩化ナトリウムまたはデキストロスのような等張性を調整するための薬剤を含み得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムのような酸または塩基類によって調整し得る。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多数回投与量バイアル内に封入し得る。

20

注射可能製剤

注射に適する製薬組成物は、滅菌注射可能溶液または分散液の即時調製のための滅菌水溶液または分散液を含む。静脈内投与においては、適切な担体としては、生理食塩水、静菌水、CREMOPHOR EL^R (BASF社；ニュージャージー州パーシッパニー)またはリン酸緩衝食塩水(PBS)がある。全ての場合において、組成物は、滅菌性でなければならず、シリンジを使用して投与するように流体であるべきである。そのような組成物は、製造および保存中に安定でなければならず、細菌および真菌のような微生物による汚染に対して保たなければならない。担体は、例えば、水、ポリオール(グリセリン、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールのような)、および他の適合性のある適切な混合物を含有する分散媒であり得る。各種の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸およびチメロサルは、微生物汚染を抑制し得る。砂糖類；マンニトール、ソルビトールのようなポリアルコール類；および塩化ナトリウムのような等張剤も組成物中に含ませ得る。吸収を遅延させ得る組成物は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような薬剤を含む。

30

滅菌注射可能溶液は、所定量の抗-ヌクレオリン薬および他の治療成分を、必要に応じた成分の1つまたは組合せを含む適切な溶媒中に混入し、その後滅菌することによって調製し得る。滅菌注射可能溶液の調製用の滅菌固形物の製造方法は、真空乾燥および凍結乾燥して固形物を得ることを含む。

40

【 0 0 4 6 】

経口組成物

経口組成物は、一般に、不活性希釈剤と食用担体を含む。経口組成物は、ゼラチンカプセル中に封入するか或いは錠剤として圧縮し得る。経口治療投与目的においては、活性化化合物を賦形剤と一緒に混入して、錠剤、トローチ剤またはカプセル剤の形で使用し得る。また、経口組成物は、うがい薬として使用する液体担体を使用しても調製し得、該液体担体中の化合物を経口投与する。製薬上適合し得る結合剤および/またはアジュバント物質を含ませ得る。錠剤、ピル剤、カプセル剤、トローチ剤等は、以下の成分または同様な性質を有する化合物のいずれかを含有し得る：微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンのようなバインダー；澱粉またはラクトスのような賦形剤；アルギン酸、PRIMOGE^R、またはコーンスターチのような崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはSTERO

50

TES^Rのような潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素のような流動促進剤；スクロースまたはサッカリンのような甘味化剤；またはペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ風味料のような風味剤。

吸入用組成物

吸入による投与においては、化合物は、適切な推進剤、例えば、二酸化炭素のようなガスを含有するネブライザーまたは加圧容器からのエアゾールスプレーとして伝達させる。

担体

1つの実施態様においては、活性化合物は、インプラントおよびマイクロカプセル化伝達系を含む制御放出製剤のように、化合物を身体からの急速排出から保護する担体と一緒に調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリアンヒドライド類、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステル類およびポリ乳酸のような、生分解性または生体適合性ポリマー類を使用し得る。そのような物質は、ALZA Corporation社(カリフォルニア州マウンテンビュー)およびNOVA Pharmaceuticals社(カリフォルニア州レークエルシノア)から商業的に入手し得、或いは当業者であれば製造し得る。

10

【0047】

経粘膜または経皮製剤

投与は、経粘膜または経皮であり得る。経粘膜または経皮投与においては、ターゲットバリアー(1以上)に浸透し得る浸透剤を使用する。経粘膜浸透剤としては、清浄剤、胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体がある。鼻内スプレーまたは坐薬は、経粘膜投与において使用し得る。経皮投与においては、活性化合物は、軟膏、膏薬(salve)、ゲルまたはクリームとして調合する。坐薬(例えば、ココアバターおよび他のグリセリドのような基材を含む)または直腸伝達用の持続浣腸剤も調製し得る。

20

単位投与量

単位投与量剤形の経口製剤または非経口組成物を調製して投与および投与量均一性を容易にし得る。単位投与量剤形とは、治療すべき対象者用の単回投与量として適し、治療上有効量の活性化合物を必要な製薬担体と一緒に含有する物理的に独立した単位を称する。本発明の単位投与量剤形についての明細は、活性化合物の独自の特徴および特定の所望する治療効果、並びに活性化合物配合の固有の制約によって決定され、それらに直接依存する。

投与量

製薬組成物は、癌および腫瘍の治療において通常投与する本明細書において述べるような他の治療上活性な化合物をさらに含み得る。

30

ヌクレオリン調節を必要とする症状の治療または予防においては、当該治療薬の適切な投与量レベルは、一般に、単回または複数回投与量で投与し得る約0.01~500 mg/kg患者体重/日である。好ましくは、投与量レベルは、約0.1~約250 mg/kg/日、より好ましくは約0.5~約100 mg/kg/日である。適切な投与量レベルは、約0.01~250 mg/kg/日、約0.05~100 mg/kg/日、または約0.1~50 mg/kg/日であり得る。この範囲内において、投与量は、0.05~0.5、0.5~5または5~50 mg/kg/日である。経口投与においては、組成物は、好ましくは、1.0~1000ミリグラムの活性成分、とりわけ、治療すべき患者への対症的投与量調整のための1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、50.0、75.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、400.0、500.0、600.0、750.0、800.0、900.0および1000.0ミリグラムの活性成分を含有する錠剤の形で提供する。化合物は、1日当り1~4回、好ましくは1日当り1回または2回の処方投与し得る。

40

しかしながら、いずれの特定の患者における特定の投与量レベルおよび投与頻度も変動し得、使用する特定の化合物の活性、代謝安定性およびその化合物の作用の長さ、年齢、体重、一般的健康性、性別、食餌、投与方式および時間、排出速度、薬物組合せ、特定の症状の重篤度、治療を受けている宿主のような種々の要因に依存するであろう。

【0048】

治療薬の生物学的効果の判定

適切な生体外および生体内アッセイを実施して、特定の治療薬の効果およびその投与が

50

患部組織の治療に適応しているかどうかを判定し得る。

種々の特定の実施態様において、生体外アッセイを患者の障害に關与するタイプ(1種以上)の代表的な細胞により実施して、所定の治療法が上記細胞タイプ(1種以上)に対して所望の効果を奏するかどうかを判定し得る。治療において使用する方式は、ヒト対象者において試験する前に、限定するものではないが、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギ、イヌ等のような適切な動物モデル系において試験し得る、同様に、生体内試験においても、当該技術において既知の任意の動物モデル系を、ヒト対象者に投与する前に使用し得る。

以下の実施例は、限定することなく、本発明を具体的に説明することを意図する。

【0049】

(実施例)

実施例 1

細胞内での原形質膜ヌクレオリンの免疫蛍光標識化

本実施例は、核ヌクレオリン、または原形質膜ヌクレオリンのみを染色する手順を例示する。

細胞系DU145 (ヒト前立腺癌)、MDA-MB-231 (ヒト乳癌)、HeLa (ヒト子宮頸癌)およびHS27 (正常皮膚線維芽細胞) (いずれもATCCから入手可能; バージニア州マナッサス)由来の細胞を培養基質からトリプシンにより放出させ、単一細胞として再懸濁させ、顕微鏡スライド上に置いた。細胞で種付けしたスライドを、顕微鏡を使用して目視検査によりアッセイしたときに、細胞が良好に付着するまで37℃でインキュベートした。付着細胞をPBSで2分間1回洗浄した後、細胞を、4%ホルムアルデヒド/PBS中で、22℃で少なくとも15分間固定した。核ヌクレオリン染色においては、細胞を、抗体との接触前に、1% Triton X-100で浸透化した。PBSで2回洗浄(5分/洗浄)後、非特異結合部位を1%NGS/PBSにより22℃で15~60分間遮断し、その後、1%NGS/PBSまたはPBS/Tween(0.05%~0.1%)中に希釈したマウス抗-ヌクレオリン抗体と一緒に4℃で1時間~1夜インキュベートした。サンプルをPBSで各5分間4回洗浄し、次いで、PBS中に希釈したFITC標識二次抗体により標識したヤギ抗-マウスpAbと一緒に22℃で1時間インキュベートした。再度PBSで各5分間4回洗浄した後、サンプルを、Mowiol標本化培地(次のようにして調製した: 9mlのグリセリンと3.36gのMowiol 40-88を22℃で1時間攪拌した。その後、9mlの水を添加し、攪拌を22℃で2時間続行した。その後、Tris (0.2 M、pH 8.5; 18ml)を添加し、溶液を、固形分がほぼ完全に溶解するまで、50℃で6時間インキュベートした。5,000×gで遠心分離後、液相を標本化に使用した)中で標本化し、顕微鏡で観察し、写真撮影した。

図1および図2は、各細胞系における核(図1)および原形質膜(図2)ヌクレオリン染色を示している。免疫蛍光写真(図1および2; パネルB、D、F、H)および並行位相差顕微鏡写真(図1および2; パネルA、C、E、G)を示しており; DU145細胞は、AおよびBに示し; MDA-MB-231細胞は、CおよびDに示し; HeLa細胞は、EおよびFに示し; HS27細胞は、GおよびHに示している。全ての細胞系が明白な核ヌクレオリン染色を示している(図1A、1C、1Eおよび1G)。細胞を浸透化しないで、即ち、表面原形質膜への抗体受入れを制限した場合、正常皮膚細胞系、HS27は、原形質膜染色において完全に陰性であるのに対し(図2H)、癌細胞は、強い染色を示している(図2B、2D、2Fおよび2H)。そのように、原形質膜ヌクレオリンの染色は、核ヌクレオリンまたは銀染色NOR類と比較して、診断および予後診断の優れた方法である。

【0050】

実施例 2

原形質膜ヌクレオリン発現度と癌悪性度との相関

本試験は、高レベルの原形質膜ヌクレオリンを含む細胞系が最も急速な増殖を示す細胞系に相応することを実証する。

2種の癌細胞系、DU145とHeLa、および1種の正常細胞系、HS27を増殖速度についてアッセイし、比較した。細胞倍增時間は、MTTアッセイ(生存細胞が3-(van de Loosdrecht等、1994年)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド(MTT)をホルマザンに還元する能力

10

20

30

40

50

に基づく；(van de Loosdrecht等、1994年))を使用して、一定間隔で細胞密度を測定することによって算出し、トリパンブルー除外法を使用して細胞を計数することにより確認した。

図3は、MTTアッセイにより測定したときのDU145(■)、HeLa()およびHS27(●)の比較増殖速度を示す。培養3日まで、増殖速度は同様であったが、3日後、HeLaおよびDU145は、正常HS27細胞よりも速い速度で増大している。MDA-MB-231はこの試験には含ませなかったけれども、増殖速度は、DU145 > MDA-MB-231 > HeLa > HS27であることを実証している。高レベルの原形質膜ヌクレオリンを含む細胞系(図2参照)は、最も速い増殖を有する細胞系(DU145およびHeLa)に相応することに注目されたい。

【0051】

実施例3

パラフィン埋込み組織切片中のヌクレオリンの免疫蛍光標識化

本発明実施例は、埋込んでいる固定化サンプル中のヌクレオリンを検出し位置特定する適切な方法を提供する。

固定化しパラフィンワックス中に埋込み、顕微鏡スライド上に固定した細胞切片を3回交換のキシレン(各々2分間)中で洗浄してパラフィンを除去し、勾配アルコール(連続の100%、95%および70%；各々2分間)中で水和し、PBS中に5分間入れた。抗原回収には、低温抗原修復法(LTAR；(Shi等、1997年；Shi等、2001年))を使用した。PBS中に希釈した0.1%トリプシン-EDTA(容量/容量)(Invitrogen社；カリフォルニア州カールスバッド)により、37℃/5%CO₂で15分間消化した後、サンプルを脱イオン水で洗浄し、10 mM クエン酸緩衝液(pH 6)中で80℃にて2時間インキュベートした。冷却後、スライドを、脱イオン水次いでPBSで洗浄した。

非特異結合部位を、PBS中の3%BSA中での22℃、30分間のインキュベーションにより遮断した。その後、サンプルをPBS/1%NGS中に希釈した4 μg/mlのマウス抗-ヌクレオリンmAb (Santa Cruz社)と一緒に4℃で1夜インキュベートした。次いで、サンプルを22℃とし、PBSで5分間4回洗浄し、その後、PBS/1%NGS中に希釈した50 μg/mlのAlexa488接合ヤギ抗-マウスIgG (Molecular Probes社；オレゴン州ユージーン)および2 μg/mlのヨウ化プロピジウムと22℃で1時間反応させた。PBSで5分間4回洗浄した後、サンプルをMowiol標本化培地中で標本化し、蛍光顕微鏡で観察した。

図4は、そのような試験の結果を示す。頭部および頸部の扁平上皮癌の臨床サンプルを調製し、原形質膜ヌクレオリンについて精査した。原形質膜ヌクレオリンシグナルは、悪性新生物細胞に偏っていた。図4Aは、ヌクレオリンについての精査から得られた免疫蛍光シグナルを示し；核をDNA挿入染料で対比染色している。図4Bは、並行位相差顕微鏡写真を示す。図4Cおよび4Dは、染色領域をより良好に示すようにマークを入れた以外は図4Aおよび4Bの複製である。領域1においては、シグナルは、細胞上で強く(図4Aの核染色と対比して淡いシグナル)；これらの細胞は、ゆるく組織化された組織内にあり、低い密度でパックされており、これらの細胞が悪性であることを示唆している。領域2、即ち、正常細胞(良好にパックされた細胞および組織化された組織によって示されているような)においては、細胞は、原形質膜ヌクレオリンシグナルを示していない。

【0052】

実施例4

肺癌細胞内での原形質膜ヌクレオリン発現

本発明実施例は、肺癌細胞を原形質膜ヌクレオリンに対する染色によって容易に同定し得ることを実証する。

NCI-H1299(ヒトリンパ節から分離した非小細胞肺癌；(Giaccone等、1992年；LinおよびChang、1996年))およびNCI-H82(小細胞肺癌細胞、ヒト、(Carney等、1985年；Little等、1983年；Takahashi等、1989年))細胞を、培養基質からトリプシンにより放出させ、単一細胞として再懸濁させ、顕微鏡スライド上に塗抹した。細胞を、顕微鏡を使用して目視検査によりアッセイしたときに、細胞が良好に付着するまで37℃でインキュベートした。細胞をPBSで2分間1回洗浄した後、細胞を、4%ホルムアルデヒド/PBS中で、22℃で少な

10

20

30

40

50

くとも15分間固定した。PBSで2回洗浄した後(5分/洗浄)、非特異結合部位を、1%NGS/PBSにより22℃で15～60分間遮断し、その後、マウス抗-ヌクレオリン抗体と一緒に4℃で1時間～1夜インキュベートした。サンプルをPBSにより各々5分で4回洗浄し、その後、ヨウ化プロピジウム(核染色のための)を含むPBS中に希釈したFITC標識二次抗体で標識したヤギ抗-マウスpAbと一緒に22℃で1時間インキュベートした。PBSで各々5分間4回再度洗浄した後、サンプルをMowiol標本化培地中で標本化し、蛍光顕微鏡で観察し、写真撮影した。

図5は、上記2種の肺癌細胞系、NCI-H82(図5A; 並行位相差像は5Bに示している)およびNCI-H1299(図5C; 並行位相差像は5Dに示している)の原形質膜ヌクレオリンについて精査した細胞全体を示す。両細胞系において、原形質膜ヌクレオリン染色は強く; 良好に染色された細胞の例は、図5Aおよび5Cにおいて星印(*)により示している。

【0053】

実施例5

臨床試験標本の原形質膜ヌクレオリン染色

この新規な原形質膜ヌクレオリンのアッセイ方法を使用して、腫瘍、前悪性および悪性細胞を診断する実効性を試験するために、健常対象者および癌を患っている対象者からの臨床試験標本を収集した。末梢血由来のサンプル、骨髄および腫瘍生検サンプルを取得し、実施例4に記載したようにして原形質膜ヌクレオリンに対して染色した。図6は、末梢血(A、B)または骨髄(C、DおよびE、F)の位相差像(B、D、F)および免疫蛍光像(A、C、E)を示す。原形質膜ヌクレオリンに対する高染色細胞は、星印(*)でマークしている; これらは、癌腫を患っている患者(A、BおよびC、D)においてのみ見られるのに対し、健常患者由来の細胞は、何ら原形質膜染色を示していなかった(E、F)。

【0054】

実施例6

腫瘍増殖の抑制

SCIDマウスコロニーを、Taconic社(ニューヨーク州ジャーマンタウン)から入手した初代SCIDマウス(C.B-17/1crACSCID)を使用して産生させた。マウスをマイクロアイソレーターゲージ(Allentown Caging Equipment Company社、ニュージャージー州アレントウン)内に囲い、特定病原体未感染条件下に維持した。マウスは、NIH31照射ペレット(Tekland Premier社; ウィスコンシン州マジソン)を食し、オートクレーブ処理水を飲んだ。マウスを、ELISA血清検査により、マイコプラズマ、マウス肝炎ウイルス、蟻虫、およびセンダイ(Sendai)ウイルスについて月毎にスクリーニングした。マウスを陰性と試験した。

6～8週齢の雌マウスを眼窩後方(retro-orbital)穿刺により出血させ(200μl)、ELISAを使用してマウスイムノグロブリン(Ig)の存在についてスクリーニングした。IgGレベル<20μg/mlを有するマウスのみを試験に使用した。マウスを毎週1回秤量した。腫瘍細胞注入物を、200μlの総容量で、マウスの下部右脇腹にSC投与した。薬物注入物を、腫瘍を確立させたとき(6日目)、腹腔内(IP)注射(200μl)により投与した。腫瘍が発症したとき、SC腫瘍を、式($a^2 \times b/2$) (式中、aは最小直径であり、bは最大直径である)に従う腫瘍容積評価(mm³)のために測定した。マウスをCO₂により死亡させ、腫瘍を採取した。採取腫瘍を3mm切片にスライスし、10%中性緩衝ホルマリン中で24時間固定し、次いで70%エタノール

【0055】

MDA-MB-231乳癌細胞系を、2.05 mMのL-グルタミンを含み10%ウシ胎仔血清(Sigma社; ミズーリ州セントルイス)を加えたHyQ RPMI-1640 (1X)培地(HyClone社、ユタ州ローガン)中で増殖させ、5%CO₂-95%空気湿潤雰囲気中に37℃で維持した。1フラスコ容量の集簇性(sub-confluent)細胞を、0.25%トリプシン-EDTA (HyClone社、ユタ州ローガン)を使用して採取し、トリパンブルーアッセイ法により計数した。他の各フラスコ容量の集簇性細胞を擦り取った。細胞(95～100%生存率)を、それぞれ、 8×10^6 細胞数/200μl滅菌食塩水濃度で再懸濁させた。

タクソール 10 mg/kgを調製し、調製時から1時間未満以内の合計5回注入において、1日

おきに200 μ lの容量でIP投与した。モノクローナルおよびポリクローナル抗体、マウスIgG、およびポリウサギIgGを調製し、10 mg/kgの初期負荷投与量用の200 μ lの容量で1時間以内でIP注入した。残りの量の各抗体を200 μ l中3 mg/kgの維持投与量で調製し、これを、合計6週間の週毎注入のための抗体毎6本の別々のチューブに小分けし、凍結させた。週毎の維持投与量を解凍し、1時間以内で注入した。PBS 1×対照を、合計で7回の注入で週毎に200 μ lでIP投与した。試験結果は、いずれかの抗体組成物とタクソールの併用により有意に高い腫瘍退縮を実証していた。

【0056】

実施例 7

(予測) 原形質膜ヌクレオリン発現度と癌悪性度との相関

American Type Culture Collection (バージニア州マナッサス)からほぼ入手し得る33種の肺癌細胞系を分析する。細胞増殖時間は、MTTアッセイを使用して一定間隔で細胞密度を測定することによって算出し、トリパンブルー除外法を使用して細胞を計数することによって確認する。各試験において、HeLa細胞(Gey等、1952年)を、内部対照として含ませる。各値は、3個の複製サンプルによる少なくとも2つの個々の試験により測定する。核および原形質膜ヌクレオリンレベルを測定するには、2つの方法を実施する。まず、核および原形質膜抽出物を、各細胞系から、開示されている方法(Ausubel等、1987年; Bates等、1999年; Yao等、1966年a)を使用して調製する。要するに、細胞を採取して、低張緩衝液中に再懸濁させ、次いで、氷上で数分間膨潤せしめる。細胞を、Dounceホモジナイザーを使用して溶解し、核心を遠心分離により集める。核心を高塩緩衝液中に再懸濁させて核タンパク質を抽出する; 塩は、その後、透析により除去する。原形質膜タンパク質は、S-100画分から分離し得、細胞質タンパク質および他のオルガネラ類から、スクロース勾配による遠心分離によって分離する。異なる細胞からの核およびPM抽出物を、抗-ヌクレオリン抗体(Santa Cruz社)を使用するウェスタンブロット分析(Ausubel等、1987年)およびその後の化学発光可視化によって分析する。その後、ヌクレオリンレベルは、X線フィルム上に記録した得られたシグナルのデンシトメトリーにより定量し、HeLa抽出物対照の強度に対して標準化する。ヌクレオリンレベルを測定する第2の方法は、ヌクレオリンについての細胞系の免疫蛍光精査を含む。細胞を、ヌクレオリン表面発現について、陽性対照としてのDU145細胞(Mickey等、1977年; Stone等、1978年)、陰性対照としてのHS27細胞、および参照としてのHeLa細胞と並行して精査する(図2参照)。細胞を写真撮影し、シグナル度の順序でランク付けし、シグナルも定量し得(ピクセルを定量するソフトウェアおよび画像を使用するシステムを使用して、この場合は、ビデオ像を使用する)或いは定性的に評価し得る。その後、データを統計解析に供して、細胞増殖度(細胞増殖速度が高いほど、より侵襲性の癌細胞を示す)とサンプル全体に亘ってのまた小集団内でのヌクレオリンシグナル強度との相関を実証する。

【0057】

実施例 8

(予測) 肺癌検出

この実施例においては、記録保存および日常的臨床試験標本を本試験において使用して、患者生検、痰サンプルおよび切除肺組織を原形質膜ヌクレオリンについて精査し、これらの結果を肺癌の他の診断および予後診断マーカーと比較する。

方法

気管支生検、痰サンプル、および切除肺組織のような試験標本を、健常および肺癌を患っている対象者双方のヒト対象者から入手し、各サンプルを、ヌクレオリン精査および観察時にサンプル起源が知られないようにコード化する。

その後、免疫組織化学法を使用するこれらサンプルの精査を実施する。例えば、原形質膜ヌクレオリンは、表1から選択した1種以上の抗-ヌクレオリンAb類、フルオロフォアタグ付け二次Abから発生したシグナルにより精査し、サンプルを観察し、写真撮影する。適切な対照としては、二次抗体のみによる精査、抗体無しによる精査、免疫前血清のみによる精査、および分析する細胞タイプと反応しないことが分っている抗体による精査があ

る。可視化および位置特定判断を容易にするには、細胞を、Hoechst 33258またはヨウ化プロピジウム(核心を可視化するため)によりおよび/または蛍光タグ付けファロイジンまたはファリシジン(アクチン細胞骨格を可視化するため)で対比染色し得る。サンプルを観察し、点数付けし(原形質膜ヌクレオリン発現を指標する表面シグナル)、記録する。

【 0 0 5 8 】

引用した文献は、全て参考として本明細書に合体させる。本開示において使用してきた用語および表現は、限定のない説明用語として使用しており、そのような用語および表現の使用において、提示し説明した特徴の等価物またはその一部を何ら除外するつもりはない；種々の修正は、可能であり、本発明の範囲内にある。

【 0 0 5 9 】

参考文献

- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1987. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Babkes, M., A. Ranford, and K. Yaeger. 2001. Sputum trap manifold with nested caps/ US Patent 6,325,785.
- Bandman, O., H. Yue, N. Corley, and P. Shah. 1999. Human nucleolin-like protein/ US Patent No. 5,932,475.
- Bates, P.J., J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, and D.M. Miller. 1999. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *J Biol Chem.* 274:26369-77. 10
- Beach, D., E. Bernstein, A. Caudy, S. Hammond, and G. Hannon. 2001. Methods and compositions for RNA interference/ WO 01/68836.
- Byrne, C.J. 1986. Laboratory tests : implications for nursing care. Addison-Wesley Pub. Co. Health Sciences Division, Menlo Park, Calif. xxi, 756 pp.
- Callebaut, C., J. Blanco, N. Benkirane, B. Krust, E. Jacotot, G. Guichard, N. Seddiki, J. Svab, E. Dam, S. Muller, J.P. Briand, and A.G. Hovanessian. 1998. Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4(+) cells. *J Biol Chem.* 273:21988-97. 20
- Carney, D.N., A.F. Gazdar, G. Bepler, J.G. Guccion, P.J. Marangos, T.W. Moody, M.H. Zweig, and J.D. Minna. 1985. Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer Res.* 45:2913-23.
- Cech, T., A. Zaug, and M. Been. 1992. RNA ribozyme polymerases, dephosphorylases, restriction endoribo-nucleases and methods/ US 5,093,246.
- Cole, S.P., E.H. Vreeken, and J.C. Roder. 1985. Antibody production by human X human hybridomas in serum-free medium. *J Immunol Methods.* 78:271-8. 30
- Coligan, J.E. 1996. Current protocols in immunology. Wiley, [New York]. 3 v. (loose leaf) pp.
- Davis, K.A., Y. Lin, B. Abrams, and S.D. Jayasena. 1998. Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res.* 26:3915-24.
- Derenzini, M. 2000. The AgNORs. *Micron.* 31:117-20.
- Fire, A., S. Kostas, M. Montgomery, L. Timmons, S. Xu, H. Tabara, S. Driver, and C. Mello. 2003. Genetic inhibition by double-stranded RNA/ US 6,506,559.
- Gey, G., W. Coffman, and M. Kubicek. 1952. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12:264. 40
- Giaccone, G., J. Battey, A.F. Gazdar, H. Oie, M. Draoui, and T.W. Moody. 1992. Neuromedin B is present in lung cancer cell lines. *Cancer Res.* 52:2732s-2736s.

- Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci.* 112:761-72.
- Goding, J.W. 1996. Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Academic Press, San Diego. 492 pp.
- Harlow, E., and D. Lane. 1988. Antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 726 pp.
- Harlow, E., and D. Lane. 1999. Using antibodies: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 10
- Irving, R.A., G. Coia, A. Roberts, S.D. Nuttall, and P.J. Hudson. 2001. Ribosome display and affinity maturation: from antibodies to single V-domains and steps towards cancer therapeutics. *J Immunol Methods.* 248:31-45.
- Jakobovits, A., R. Kucherlapati, S. Klapholz, M. Mendez, and L. Green. 1998. Transgenic mammals having human Ig loci including plural V/ WO 98/24893.
- Kim, C.S., B.B. Berkley, W.M. Abraham, and A. Wanner. 1982. A micro double capillary method for rheologic measurements of lower airway secretions. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 18:915-27. 20
- King, M., and D. Speert. 2002. Use of dextran and other polysaccharides to improve mucus clearance/ US Patent 6,339,075.
- Kohler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256:495-7.
- Koide, S. 2002. Nucleic acids encoding artificial antibody polypeptides/ US 6,462,189.
- Langer, P.R., A.A. Waldrop, and D.C. Ward. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:6633-7.
- LaPosta, V., and J. Eldrige. 2001. Adjuvant and vaccine compositions containing monophosphoryl lipid A/ US 6,306,404. 30
- Lin, D.L., and C. Chang. 1996. p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily. *J Biol Chem.* 271:14649-52.
- Little, C.D., M.M. Nau, D.N. Carney, A.F. Gazdar, and J.D. Minna. 1983. Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines. *Nature.* 306:194-6.
- Lonberg, N., and R. Kay. 1998. Transgenic non-human animals capable of producing heterologous antibodies/ US 5,770,429. 40
- McNicol, A.M., and J.A. Richmond. 1998. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathology.* 32:97-103.

- Mickey, D.D., K.R. Stone, H. Wunderli, G.H. Mickey, R.T. Vollmer, and D.F. Paulson. 1977. Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res.* 37:4049-58.
- Miller, D., P. Bates, and J. Trent. 2000. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides and method of using same to bind to nucleolin/ WO 00/61597.
- Mitchell, L. 1997. Therapeutic molecules generated by trans-splicing/ WO 09/722250.
- Naito, M., H. Hamada, and T. Tsuruo. 1988. ATP/Mg²⁺-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells. *J Biol Chem.* 263:11887-91. 10
- Orfao, A., and A. Ruiz-Arguelles. 1996. General concepts about cell sorting techniques. *Clin Biochem.* 29:5-9.
- Robinson, J.M., and D.D. Vandre. 2001. Antigen retrieval in cells and tissues: enhancement with sodium dodecyl sulfate. *Histochem Cell Biol.* 116:119-30.
- Rubin, B., and M. Newhouse. 1999. Use of surface active agents to promote mucus clearance/ US Patent 5,925,334.
- Sharon, J. 1995. Polyclonal antibody libraries/ WO 95/20401. 20
- Shi, S.R., R.J. Cote, and C.R. Taylor. 1997. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem.* 45:327-43.
- Shi, S.R., R.J. Cote, and C.R. Taylor. 2001. Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem.* 49:931-7.
- Singh, S., and P. Dias. 2002. Transgenic avian species for making human and chimeric antibodies/ US 2002/0028488.
- Sorokina, E.A., and J.G. Kleinman. 1999. Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem.* 274:27491-6. 30
- Srivastava, M., and H.B. Pollard. 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J.* 13:1911-22.
- Stedman, T.L. 2000. Stedman's medical dictionary. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. xxxvi, [127], 2098 p. pp.
- Stone, K.R., D.D. Mickey, H. Wunderli, G.H. Mickey, and D.F. Paulson. 1978. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer.* 21:274-81.
- Surani, A., M. Neuberger, and M. Bruggemann. 1996. Production of antibodies from transgenic animals/ US 5,545,807. 40

Takahashi, T., M.M. Nau, I. Chiba, M.J. Birrer, R.K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A.F. Gazdar, and J.D. Minna. 1989. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*. 246:491-4.

Tuschl, T., S. Elbashir, and W. Lendeckel. 2002. RNA interference mediating small RNA molecules/ WO 02/44,321.

Tuschl, T., P. Sharp, P. Zamore, and D. Bartel. 2001. RNA sequence-specific mediators of RNA interference/ WO 01/075,164.

Tuteja, R., and N. Tuteja. 1998. Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 33:407-36.

van de Loosdrecht, A.A., R.H. Beelen, G.J. Ossenkoppele, M.G. Broekhoven, and M.M. Langenhuijsen. 1994. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. *J Immunol Methods*. 174:311-20.

Wysocki, L.J., and V.L. Sato. 1978. "Panning" for lymphocytes: a method for cell selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75:2844-8.

Xu, X., F. Hamhouyia, S.D. Thomas, T.J. Burke, A.C. Girvan, W.G. McGregor, J.O. Trent, D.M. Miller, and P.J. Bates. 2001. Inhibition of DNA Replication and Induction of S Phase Cell Cycle Arrest by G-rich Oligonucleotides. *J Biol Chem*. 276:43221-30.

Yao, G.Q., S. Corrias, and Y.C. Cheng. 1996a. Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines. *Biochem Pharmacol*. 51:431-6.

Yao, G.Q., S. Corrias, and Y.C. Cheng. 1996b. Identification of two oligodeoxyribonucleotide binding proteins on plasma membranes of human cell lines. *Biochem Pharmacol*. 51:431-6.

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0060】

【図1】各種細胞系における核ヌクレオリン染色を示す。免疫蛍光写真(B、D、F、H)および並行位相差顕微鏡写真(A、C、E、G)を示している。分析した細胞系は、DU145前立腺癌細胞(A、B)、MDA-MB-231乳癌細胞(C、D)、HeLa子宮頸癌細胞(E、F)およびHS27正常皮膚細胞(G、H)であった。抗-ヌクレオリン抗体を使用した；各細胞は、染色前に浸透化して、細胞質および核コンパートメントへの抗体受入れを可能にした。

【図2】図1に示した細胞系における原形質膜ヌクレオリン染色を示す。免疫蛍光写真(B、D、F、H)および並行位相差顕微鏡写真(A、C、E、G)を示している。分析した細胞系は、DU145前立腺癌細胞(A、B)、MDA-MB-231乳癌細胞(C、D)、HeLa子宮頸癌細胞(E、F)およびHS27正常皮膚細胞(G、H)であった。抗-ヌクレオリン抗体を使用した；各細胞は、染色前に浸透化せずに、原形質膜のみへの抗体受入れを可能にした。

【図3】MTTアッセイにより測定したときの各細胞系の比較増殖速度を示す。■ = DU145、□ = HeLa、● = HS27。MDA-MB-231はこの試験には含まれなかったけれども、これら4種の細胞系における増殖速度は、DU145 > MDA-MB-231 > HeLa > HS27であることを実証している。高レベルの原形質膜ヌクレオリンを含む細胞系は、最も速い増殖を有する細胞系に相応することに注目されたい(DU145およびHeLa、図2参照)。

【図4】頭部および頸部の扁平上皮癌を有する患者から切除したパラフィン埋込み試験標本の位相差像(B、D)および免疫蛍光像(A、C)を示す。試験標本を原形質膜ヌクレオリンに対して染色し、ヨウ化プロビジウムにより対比染色して細胞核を示した。像(C)および(D)

は、ヌクレオリン染色をより良好に示すためにマーキングでオーバーレイした像(A)および(B)を示す。白線で囲まれた領域 1 は強いヌクレオリン染色を示し、一方、1 の外側領域は、殆どシグナル無し 3 またはシグナル無し 2 を示す。

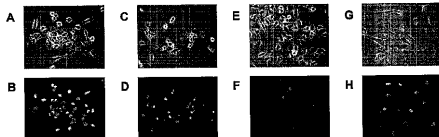
【図 5】サイトスピナーを使用して顕微鏡スライド上に置いた小細胞(NCI-H82)および非小細胞(NCI-H1299)肺癌細胞系の位相差像(B、D)および免疫蛍光像(A、C)を示す。各サンプルを原形質膜ヌクレオリンに対して染色し、ヨウ化プロピジウムにより対比染色して細胞核を示した。ひととき良好に染色された原形質膜を有する細胞は、星印(*)によって示している。

【図 6】ヒト対象者由来の末梢血(A、B)および骨髓(C、DおよびE、F)の位相差像(B、D、F)および免疫蛍光像(A、C、E)を示す。各サンプルを原形質膜ヌクレオリンに対して染色し、ヨウ化プロピジウムにより対比染色して細胞核を示した。ヌクレオリンに対して高染色された細胞は、星印(*)でマークしている；これらは、癌腫を患っている患者においてのみ見られるだけであり(A、BおよびC、D)、一方、健康患者由来の細胞は、何らの原形質膜ヌクレオリン染色を示していなかった(E、F)。

10

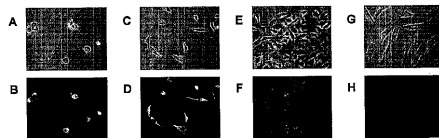
【図 1】

Figure 1



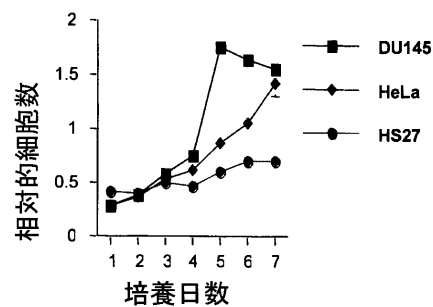
【図 2】

Figure 2



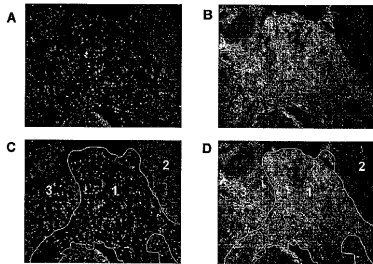
【図 3】

Figure 3



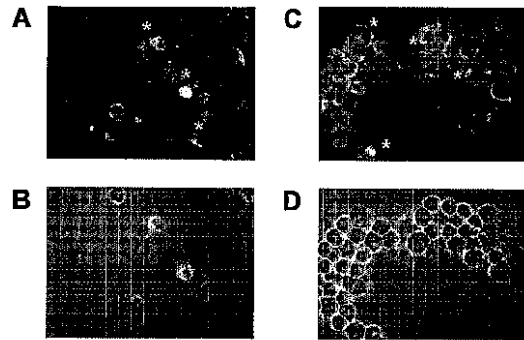
【 図 4 】

Figure 4



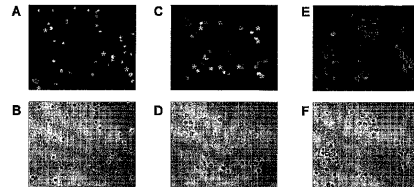
【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

Figure 6



【 配 列 表 】

2008502584000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平成19年10月9日 (2007.10.9)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

治療上有効量の抗-ヌクレオリン薬および製薬上許容し得る担体を含むことを特徴とする対象者の癌の治療用製薬組成物。

【 請 求 項 2 】

化学毒性薬または化学治療薬をさらに含む、請求項1記載の製薬組成物。

【 請 求 項 3 】

前記対象者が、放射線療法によりさらに治療される、請求項1記載の製薬組成物。

【 請 求 項 4 】

前記化学毒性薬または化学療法薬が、シクロホスファミド、エトポシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンからなる群から選択される、請求項2記載の製薬組成物。

【 請 求 項 5 】

治療上有効量の抗-ヌクレオリン抗体および製薬上許容し得る担体を含み、該ヌクレオ

リン抗体がヒトに対して実質的に非免疫原性であることを特徴とする対象者の癌の治療用製薬組成物。

【請求項 6】

化学毒性薬または化学治療薬をさらに含む、請求項 5 記載の製薬組成物。

【請求項 7】

前記対象者が、放射線療法によりさらに治療される、請求項 5 記載の製薬組成物。

【請求項 8】

前記化学毒性薬または化学療法薬が、シクロホスファミド、エトボシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンからなる群から選択される、請求項 6 記載の製薬組成物。

【請求項 9】

治療上有効量の抗-ヌクレオリン抗体、化学毒性薬または化学療法薬、および製薬上許容し得る担体を含むことを特徴とする対象者の癌の治療用製薬組成物。

【請求項 10】

前記化学毒性薬または化学療法薬が、シクロホスファミド、エトボシド、ドキソルビシン、メトトレキサート、ビンクリスチン、プロカバジン、プレドニゾン、デキサメタゾン、クエン酸タモキシフェン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、カンプトセシン、ゾレドロン酸、イバンドロネートおよびマイトマイシンからなる群から選択される、請求項 9 記載の製薬組成物。

【請求項 11】

治療上有効量の抗-ヌクレオリン抗体および製薬上許容し得る担体を含み、対象者が放射線療法でさらに治療されることを特徴とする対象者の癌の治療用製薬組成物。

【請求項 12】

治療上有効量のヌクレオリンに対する二重干渉性のRNAおよび製薬上許容し得る担体を含むことを特徴とする癌の治療用製薬組成物。

【請求項 13】

ヌクレオリンポリペプチドの産生を抑制するヌクレオリンアンチセンス分子を含むことを特徴とする癌患者の治療用製薬組成物。

【請求項 14】

ヌクレオリン遺伝子の発現を抑制するヌクレオリン干渉性RNA分子を含むことを特徴とする癌患者の治療用製薬組成物。

【請求項 15】

製薬上許容し得る担体およびヌクレオリンに対して特異性のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む製薬組成物。

【請求項 16】

製薬上許容し得る担体およびヌクレオリンに対する抑制性RNAを含む製薬組成物。

【請求項 17】

製薬上許容し得る担体およびヌクレオリン抗体を含む製薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/033174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 C07K16/18 C12N15/11 A61K39/395 A61K31/713 A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N A61K C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MI YINGCHANG ET AL: "Validation of nucleolin as a novel target for cancer drug discovery" PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 43, March 2002 (2002-03), pages 959-960, XP001182614 ISSN: 0197-016X	5,13,15,17
Y	abstract & 93RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH; SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, USA; APRIL 06-10, 2002 ----- -/--	5-12,14
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 February 2005		Date of mailing of the international search report 14/03/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2260 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-8016		Authorized officer Andres, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PC1/US2004/033174

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/61597 A (UAB RESEARCH FOUNDATION; MILLER, DONALD, M; BATES, PAULA, J; TRENT, JO) 19 October 2000 (2000-10-19) cited in the application page 8, line 4 - line 11 page 21, line 8 - line 21 page 28, line 23 - page 29	5-11
X	WO 03/029277 A (RIGEL PHARMACEUTICALS, INC; CHU, PETER; LI, CONGFEN; LIAO, X., CHARLEN) 10 April 2003 (2003-04-10) page 3, line 11 - line 21	15-17
Y		12,14
X	WO 01/32832 A (ISIS PHARMACEUTICALS, INC; BENNETT, C., FRANK; COWSERT, LEX, M) 10 May 2001 (2001-05-10) the whole document	13,15
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1996, no. 01, 31 January 1996 (1996-01-31) & JP 07 242566 A (KIRIN BREWERY CO LTD), 19 September 1995 (1995-09-19) abstract	17
X	DE 100 37 861 A1 (MAX-DELBUECK-CENTRUM FUER MOLEKULARE MEDIZIN) 14 February 2002 (2002-02-14) abstract the whole document	13,15
X	GRINSTEIN EDGAR ET AL: "Nucleolin as activator of human papillomavirus type 18 oncogene transcription in cervical cancer" JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 196, no. 8, 21 October 2002 (2002-10-21), pages 1067-1078, XP002318669 ISSN: 0022-1007 the whole document	13,15,17
P,X	WO 03/087124 A (THE BURNHAM INSTITUTE; RUOSLAHTI, ERKKI; PORKKA, KIMMO; CHRISTIAN, SVE) 23 October 2003 (2003-10-23) page 29, last paragraph - page 34, line 10 page 43, line 19 - page 44, line 31 page 47 - page 48	5,6, 8-10,17
P,X	WO 03/086174 A (UNIVERSITY OF LOUISVILLE; BATES, PAULA, J; MILLER, DONALD, M; TRENT, J) 23 October 2003 (2003-10-23) cited in the application the whole document	17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/033174

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0061597	A	19-10-2000	AU 775412 B2	29-07-2004
			AU 4212900 A	14-11-2000
			CA 2370000 A1	19-10-2000
			EP 1181304 A1	27-02-2002
			JP 2002541264 T	03-12-2002
			WO 0061597 A1	19-10-2000
WO 03029277	A	10-04-2003	WO 03029277 A2	10-04-2003
			WO 03029278 A2	10-04-2003
			WO 03029280 A2	10-04-2003
			US 2003109440 A1	12-06-2003
WO 0132832	A	10-05-2001	US 6165786 A	26-12-2000
			AU 1245001 A	14-05-2001
			WO 0132832 A2	10-05-2001
JP 07242566	A	19-09-1995	NONE	
DE 10037861	A1	14-02-2002	NONE	
WO 03087124	A	23-10-2003	US 2004186056 A1	23-09-2004
			AU 2003228431 A1	27-10-2003
			WO 03087124 A2	23-10-2003
WO 03086174	A	23-10-2003	US 2003194754 A1	16-10-2003
			AU 2003234694 A1	27-10-2003
			EP 1492440 A2	05-01-2005
			WO 03086174 A2	23-10-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/033174

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 5-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1-4
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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004 /033174

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-4 (all partially) and claims 5-11,17

Use of anti-nucleolin antibodies in the treatment of cancer.

2. claims: 1-4 (all partially) and claims 12,14 and 16

Use of anti-nucleolin interfering RNA in the treatment of cancer.

3. claims: 1-4 (all partially) and claims 13 and 15

Use of anti-nucleolin antisense molecules in the treatment of cancer.

International Application No. PCT/US2004 /033174

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 5-14 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-4

Present claims 1-4 relate to compounds defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that of being an anti-nucleolin agent. The claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds (namely antibodies (claim 5), antisenses (claim 13) and siRNAs (claim 12)). In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compounds by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, taking into account that the specifically disclosed compounds are claimed further on, NO search has been carried out for claims 1-4.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/395		N
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 K 48/00		
		C 1 2 N 15/00		A

(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. フロッピー

(74) 代理人 100093300
弁理士 浅井 賢治

(74) 代理人 100114007
弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 ベイツ ポーラ ジェイ
アメリカ合衆国 ケンタッキー州 4 0 2 0 7 ルイスヴィル ブラウンズ レーン 4 0 8

(72) 発明者 ミラー ドナルド エム
アメリカ合衆国 ケンタッキー州 4 0 2 0 6 ルイスヴィル バーベリー レーン 5 3 7

(72) 発明者 トレント ジョン オー
アメリカ合衆国 ケンタッキー州 4 0 2 0 7 ルイスヴィル ブラウンズ レーン 4 0 8

(72) 発明者 シュー シャオフア
アメリカ合衆国 ケンタッキー州 4 0 2 0 2 ルイスヴィル サウス プレストン ストリート
6 2 7 アpartment 6 ジー

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA11 GA18 HA17
4C084 AA13 AA17 AA20 NA14 ZB261
4C085 AA13 AA14 DD62 DD88 EE01
4C086 AA01 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26

专利名称(译)	通过抑制核仁素治疗恶性疾病的方法		
公开(公告)号	JP2008502584A	公开(公告)日	2008-01-31
申请号	JP2006534360	申请日	2004-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	路易斯维尔大学研究基金会公司		
申请(专利权)人(译)	盐湖城大学OVU路易斯维尔研究基金会有限公司		
[标]发明人	ベイツポーラジェイ ミラードナルドエム トレントジョンオー シューシアオフア		
发明人	ベイツ ポーラ ジェイ ミラー ドナルド エム トレント ジョン オー シュー シアオフア		
IPC分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K45/06 A61K39/395 A61K31/7088 A61K48/00 C12N15/09 G01N33/53 A61K38/00 C07K14/47 C12N15/113 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P35/00 C07K14/47 C12N15/113 C12Q1/6886 G01N33/5005 G01N33/57492 A61K39 /39558 A61K45/06 A61N5/10 C07K16/18		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61P35/00 A61K45/06 A61K39/395.D A61K31/7088 A61K39/395.N A61K48/00 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA11 4B024/GA18 4B024/HA17 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084 /AA20 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	10/683480 2003-10-09 US		
其他公开文献	JP2008502584A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过利用通常核定位蛋白核仁素的表面表达来治疗肿瘤和癌症的方法。

GRO	配列	SEQ ID NO:
GRO 29A ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	1
GRO 29-2	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	2
GRO 29-3	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	3
GRO 29-5	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	4
GRO 29-13	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	5
GRO 14C	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	6
GRO 16A	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	7
GRO 16B ²	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	8
GRO 25A	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	9
GRO 25B ³	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	10
GRO 28A	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	11
GRO 28B	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	12
GRO 29-6	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	13
GRO 32A	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	14
GRO 32B	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	15
GRO 36A	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	16
GRO	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	17
GRO A	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	18
GRO B	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	19
GRO C	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	20
GRO D	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	21
GRO E	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	22
GRO F	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	23
GRO G ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	24
GRO H ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	25
GRO I ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	26
GRO J ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	27
GRO K ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	28
GRO L ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	29
GRO M ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	30
GRO N ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	31
GRO O ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	32
GRO P ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	33
GRO Q ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	34
GRO R ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	35
GRO S ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	36
GRO T ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	37
GRO U ¹	tttgggtgactg actggttctgag tgcgtgactg	38

¹ 良好な原形質膜スクレオリン結合性 GRO を示す。² スクレオリン対照(非原形質膜スクレオリン結合性)を示す。
³ 1または2表示のない GRO 配列は、若干の抗腫瘍活性を有する。