

(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2004-505018

(P2004-505018A)

(43) 公表日 平成16年2月19日(2004.2.19)

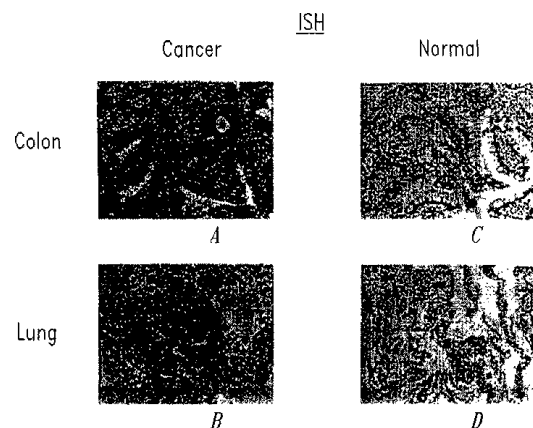
(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 37/02	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	E 4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	T 4 C O 8 5
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 K 48/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 96 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-504305 (P2002-504305)	(71) 出願人	591076811
(86) (22) 出願日	平成13年6月5日 (2001.6.5)		カイロン コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月6日 (2002.12.6)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 6
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/018415		0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0
(87) 国際公開番号	W02001/098350	(74) 代理人	100107489
(87) 国際公開日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		弁理士 大塩 竹志
(31) 優先権主張番号	60/209, 865	(72) 発明者	レインハート, クリストフ
(32) 優先日	平成12年6月7日 (2000.6.7)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6
(33) 優先権主張国	米国 (US)		0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0
		(72) 発明者	ジェファークソン, アン ビー,
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6
			0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 NET-4 モジュレーターを用いて新生物疾患を処置するための組成物および方法

(57) 【要約】

哺乳動物細胞における NET-4 の発現または生物学的活性、もしくは NET-4 mRNA の発現を減少させる NET-4 のモジュレーターを提供する。NET-4 モジュレーターとしては、アンチセンス分子、リボザイム、抗体および抗体フラグメント、タンパク質およびポリペプチド、ならびに小分子が挙げられる。NET-4 モジュレーターは、NET-4 遺伝子発現を減少させるための組成物および方法、ならびに哺乳動物細胞（腫瘍細胞を含む）の増殖を阻害するための方法、および新生物疾患を処置するための方法における用途を見出す。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、タンパク質、ポリペプチド、および小分子からなる群より選択される、単離された N E T-4 モジュレーター。

【請求項 2】

前記 N E T-4 モジュレーターが、アンチセンス分子である、請求項 1 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

【請求項 3】

前記アンチセンス分子またはその相補体が、配列番号 1 の配列の少なくとも 15 の連続する核酸を含む、請求項 2 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

10

【請求項 4】

前記アンチセンス分子またはその相補体が、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 1 の配列にハイブリダイズする、請求項 3 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

【請求項 5】

前記アンチセンス分子が、配列番号 2～6 からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項 2 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

【請求項 6】

前記 N E T-4 モジュレーターが、抗体および抗体フラグメントからなる群より選択される、請求項 1 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

【請求項 7】

前記抗体または抗体フラグメントが、モノクローナルである、請求項 6 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

20

【請求項 8】

前記抗体または抗体フラグメントが、ヒト化されている、請求項 7 に記載の単離された N E T-4 モジュレーター。

【請求項 9】

薬学的に受容可能なキャリア中に治療有効量の N E T-4 モジュレーターを含む、組成物。

【請求項 10】

2 つ以上の N E T-4 モジュレーターを含む、請求項 9 に記載の組成物。

30

【請求項 11】

前記 N E T-4 モジュレーターが、アンチセンス分子である、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 12】

哺乳動物細胞における N E T-4 の発現を減少させるための薬学的組成物の調製のための、請求項 1 に記載の N E T-4 モジュレーターの使用。

【請求項 13】

前記 N E T-4 モジュレーターがアンチセンス分子である、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】

前記アンチセンス分子またはその相補体が、配列番号 1 の配列の少なくとも 15 の連続する核酸を含む、請求項 13 に記載の使用。

40

【請求項 15】

前記アンチセンス分子またはその相補体が、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 1 の配列にハイブリダイズする、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 16】

前記アンチセンス分子が、配列番号 2～6 からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項 13 に記載の使用。

【請求項 17】

前記 N E T-4 モジュレーターが、タンパク質およびポリペプチドからなる群より選択される、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 18】

50

前記 N E T - 4 モジュレーターが、小分子である、請求項 1 2 に記載の使用。

【請求項 1 9】

哺乳動物細胞において N E T - 4 の発現を減少させる方法であって、請求項 1 に記載の N E T - 4 モジュレーターを該細胞に投与する工程を包含し、ここで該 N E T - 4 モジュレーターは、該哺乳動物細胞にエキソビボで投与される、方法。

【請求項 2 0】

前記 N E T - 4 モジュレーターが、アンチセンス分子である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記アンチセンス分子またはその相補体が、配列番号 1 の配列の少なくとも 2 0 の連続する核酸を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

10

【請求項 2 2】

前記アンチセンス分子またはその相補体が、高ストリンジェンシー条件下で配列番号 1 の配列にハイブリダイズする、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記アンチセンス分子が、配列番号 2 6 からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記 N E T - 4 モジュレーターが、タンパク質およびポリペプチドからなる群より選択される、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

20

前記 N E T - 4 モジュレーターが、小分子である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 6】

新生物疾患を処置するための薬学的組成物の調製のための、請求項 1 に記載の N E T - 4 モジュレーターの使用であって、該新生物疾患が重篤度において低減されるように、該 N E T - 4 モジュレーターを哺乳動物細胞に投与する工程を包含する、使用。

【請求項 2 7】

生物学的サンプル中の結腸腫瘍細胞の存在を検出するための診断キットであって、該キットは、配列番号 1 8、1 9、2 0、2 1、および 2 2 からなる群より選択される少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチド、ならびにストリンジェントな条件下で配列番号 1 のポリヌクレオチドとハイブリダイズしない少なくとも 1 つのコントロールオリゴヌクレオチドを

30

【請求項 2 8】

少なくとも 3 つの前記オリゴヌクレオチドを備える、請求項 2 7 に記載のキット。

【請求項 2 9】

5 つの前記オリゴヌクレオチドを備える、請求項 2 7 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

(技術分野)

本発明は、N E T - 4 遺伝子の発現および／または生物学的活性を阻害するための組成物ならびに方法を提供する。このような組成物および方法は、新生物疾患の処置における有用性を見出される。

40

【0 0 0 2】

(発明の背景)

N E T - 4 は、4 回膜貫通レセプター (t e t r a s p a n t r a n s m e m b r a n e r e c e p t o r) ファミリーのメンバーである。この分子の機能を開示する報告は、発表されていない。4 回貫通 (t e t r a s p a n) ファミリーは、M a e c k e r , H . T . ら、F A S E B J . 1 1 : 4 2 8 ~ 4 4 2、1 9 9 7 に議論されている。リンパ腫細胞株における 4 回貫通遺伝子の発現は、F e r r e r , M . ら、C l i n . E x p . I m m u n o l . 1 1 3 : 3 4 6 ~ 3 5 2、1 9 9 8 に議論されている。

【0 0 0 3】

50

従って、当該分野には、このタンパク質ファミリーと必須のプロセスまたは病理学的プロセスとの間の相関関係についての必要性がある。本発明は、腫瘍細胞の増殖を阻害するためのNET-4 アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を開示することによって、この必要性を充足するために役立つ。

【0004】

(発明の要旨)

1つの実施形態において、本発明は、NET-4のインヒビターを提供する。本発明のインヒビターとして、アンチセンス分子、リボザイム、抗体または抗体フラグメント、タンパク質またはポリペプチド、および小分子が挙げられるが、これらに限定されない。例示的なアンチセンス分子は、配列番号1の少なくとも10、15、もしくは20の連続するヌクレオチドを含むか、またはストリンジェントな条件下で配列番号1の核酸にハイブリダイズする。配列番号1の少なくとも15、20もしくは25の連続するヌクレオチドを含むか、またはストリンジェントな条件下で配列番号1の配列にハイブリダイズするアンチセンス分子が、より好ましい。代表的なアンチセンス分子は、本明細書中で配列番号2～6として提供される。

10

【0005】

さらなる実施形態において、1以上のNET-4インヒビターを薬学的に受容可能なキャリア中に含む組成物が提供される。

【0006】

さらなる実施形態は、NET-4遺伝子の発現または生物学的活性を減少させる方法を提供する。

20

【0007】

本発明の各方法は、共通して本発明の1以上の本発明のNET-4インヒビターの哺乳動物細胞への投与を含む。

【0008】

本発明は、さらに結腸腫瘍細胞を検出するためのキットを提供し、このキットは、配列番号18、19、20、21、および22からなる群より選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む。

【0009】

(発明の詳細な説明)

30

NET-4は、タンパク質の4回貫通スーパーファミリーのメンバーである。このタンパク質は、4つの膜貫通ドメインおよび2つの細胞外領域によって特徴付けられる。「新しいEST4回貫通」について、NETタンパク質と呼ばれる特定のファミリーは、このスーパーファミリー内である(Serru, V. ら、Biochem. Biophys. Acta 1478:159~163、2000)。Serruらは、7つのNETタンパク質(NET-1~NET-7と命名される)の存在を報告し、そして細胞株パネルにおける発現を研究した。NET-4は、Tリンパ球細胞株において発現されたが、研究されたほとんどのBリンパ球細胞株によっては発現されなかった。

【0010】

NETタンパク質のいずれかに関して、推定される機能の情報は、現在まで発表されていない。スーパーファミリーそれ自体は、1990年に発見され、そして1997年現在、20のメンバーが同定された。この分子の機能の1つは、特定の細胞表面タンパク質をグループ分けすることであり、この機能によって、機能的なシグナル伝達複合体の形成および安定性が増加することが示唆されている。Maecker, H. T. ら、FASEB J. 11:428~442、1997。図1は、4回貫通タンパク質の図式的な構造を示す。現在利用可能な情報は、いくつかの4回貫通タンパク質が、癌の発症または増殖において阻害的な役割を果たし得、一方、他のタンパク質は癌細胞においてより高いレベルで発現されることを示す。例えば、CD9の発現は、癌腫細胞の機動および転移を抑制し(Ikeyama, S ら、J. Exp. Med. 177:1231~1237、1993)、そしてCD9の発現は、黒色腫細胞の転移に反比例する(Si, Z. ら、Int. J. 50

Cancer 54:37~43、1993)。CD9の発現の減少は、胸部癌腫の芳しくない予後と相関する(Miyake, M. ら、Cancer Res. 56:1244~1249、1996)。CD82の発現は、前立腺癌細胞株の転移を抑制し得る(Dong, J. ら、Science 268:884~886、1995)。

【0011】

本発明は、癌における4回貫通タンパク質の役割についての情報を実質的に追加し、そしてまたNET-4の発現を阻害することによって癌細胞の増殖を調節するための方法および組成物を提供する。本発明によると、NET-4は、DNAマイクロアレイスクリーニングを使用して試験された結腸癌患者サンプルの83%において過剰発現される。腫瘍細胞増殖におけるNET-4発現の役割をさらに調査するために、結腸癌細胞株SW620の細胞を、NET-4の配列に基づく種々のアンチセンス分子に曝露した。表2~5および7に示されるように、SW620細胞の、配列番号2~6それぞれのアンチセンス分子でのトランスフェクションは、SW620細胞の増殖を1日目で始まり、そして4日目まで連続して有意に減少させた。同様に、MRC9細胞のアンチセンス分子(配列番号5)でのトランスフェクションはまた、MRC9細胞の増殖を有意に減少させた(表6)。

10

【0012】

増殖への効果が、NET-4の発現への特異的な効果に起因したか否かを決定するために、NET-4メッセージレベルを、5つの異なるアンチセンス分子に曝露したSW620細胞株において測定した。表1に示されるように、アンチセンスオリゴヌクレオチドに曝露された細胞は、対応する逆のコントロールオリゴヌクレオチドで処理した細胞と比較した場合、有意に低いレベルのNET-4 mRNAを有した。

20

【0013】

従って、NET-4のポリヌクレオチド配列に基づくアンチセンスオリゴヌクレオチドは、NET-4発現の特異的なインヒビターであり、そしてこれは、結腸癌細胞の減少した増殖と相関する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、結腸癌および他の癌(ここで、増加したNET-4の発現が、癌細胞の増殖、遊走、転移、および生存における役割を果たす)のインビボでの処置に適切である。しかし、本発明は、アンチセンスインヒビターの使用に限定されない。本明細書の結果に基づいて、NET-4の発現を阻害するため、またはNET-4の機能を調節もしくは阻害するための他の組成物および方法もまた、細胞増殖を調節するために適切である。なぜなら、NET-4は、膜貫通タンパク質であり、抗体は、その効果を阻害するために特に適切だからである。

30

【0014】

本発明は、一般的に、NET-4の発現および機能を、特に癌細胞において(より詳細には結腸癌細胞において)調節することに関連する。より詳細には、本発明は、NET-4のアゴニストおよびアンタゴニスト(アンチセンスポリヌクレオチドおよびリボザイム、タンパク質またはポリペプチド、抗体またはそのフラグメントならびに小分子を含む)；NET-4モジュレーターを含む組成物；哺乳動物細胞の化学療法および/または放射線治療を補充するための方法、ならびに新生物疾患を処置するための方法を提供する。これら各々の方法は、共通して、哺乳動物細胞への1以上のNET-4モジュレーターの投与を有する。

40

【0015】

(NET-4のインヒビターは、NET-4遺伝子の発現の減少に効果的である)
本発明のNET-4インヒビターとして、アンチセンス分子およびリボザイム、タンパク質またはポリペプチド、抗体またはそのフラグメントならびに小分子が挙げられる。これらのNET-4インヒビターは、これらがNET-4の発現および/または生物学的活性を減少し、結果として癌細胞の増殖を調節、阻害、または予防するという共通の特徴を共有する。本明細書中で開示された例示的なNET-4インヒビターに加えて、代替的なインヒビターは、本明細書中で詳細に開示されるか、またはそうでない場合には容易に利用可能でありかつ当業者の専門技術内であるかのいずれかの方法論を使用する、慣用的な実験によって獲得され得る。

50

【0016】

(アンチセンス分子およびリボザイム)

本発明のNET-4インヒビターとして、哺乳動物細胞に投与された場合に、例えば、NET-4 mRNAの細胞内レベルを減少することに有効なアンチセンス分子が挙げられる。アンチセンス分子は、配列特異的な様式で核酸（例えば、mRNAまたはDNA）に結合する。相補的な配列を有するmRNAに結合される場合、アンチセンス分子は、mRNAの翻訳を阻害する（Altmanらに対する米国特許第5,168,053号；Inouyeに対する米国特許第5,190,931号、Burchに対する米国特許第5,135,917号；Smithに対する米国特許第5,087,617号、およびClusellら、Nucleic Acids Res. 21:3405~3411 (1993)、これはダンベル（dumbbell）アンチセンスオリゴヌクレオチドを記載する）。 10

【0017】

アンチセンス技術は、ポリメラーゼ、転写因子または調節分子の結合のために十分なように二重らせんが開く能力を促進する、三重らせん形成によって遺伝子の発現を制御するために使用され得る。Geeら、Huber and Carr、「Molecular and Immunologic Approaches」、Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY; 1994)。あるいは、アンチセンス分子は、NET-4遺伝子の制御領域（例えば、プロモーター、エンハンサーまたは転写開始部位）とハイブリダイズするように設計され得、そして遺伝子の転写をブロックするか；または転写物のリボソームへの結合を阻害することによって翻訳をブロックする。Hirashimaら、Molecular Biology of RNA: New Perspectives (M. Inouye and B. S. Dudoock編、1987 Academic Press, San Diego, 401頁)；Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression (J. S. Cohen編、1989, MacMillan Press, London)；SteinおよびCheng、Science 261:1004~1012 (1993)；WO95/10607；米国特許第5,359,051号；WO92/06693；ならびにEP-A2-612844、これらのそれぞれが本明細書中で参考として援用される。 20

【0018】

簡単には、このような分子は、転写されたNET-4 mRNA配列の領域に相補的であり、そしてこれらとワトソン-クリックの塩基対を形成し得るように構築される。生じたこの二本鎖核酸は、mRNAの次のプロセッシングを妨害し、それによってタンパク質合成を阻害する。 30

【0019】

一般的に、NET-4コード領域に相補的な配列の一部を使用して、遺伝子発現を調節し得る。NET-4 cDNAの配列は、本明細書中で配列番号1として示される。あるいは、アンチセンスRNAに転写され得るcDNA構築物は、アンチセンスRNAの産生を容易にするために細胞または組織へ導入され得る。従って、本明細書中で使用される場合、語句「アンチセンス分子」は、アンチセンスオリゴヌクレオチド（DNA分子として合成されているか、RNA分子として合成されているかに関わらず）、および哺乳動物細胞に導入された場合に、アンチセンスRNA分子の産生を促進する、全てのプラスミド構築物を、広範に包含する。本明細書中で記載される場合、アンチセンス分子を使用して、mRNAまたはタンパク質の発現、およびその発現のためにNET-4を必要とする任意の他の遺伝子を阻害し得る。 40

【0020】

本発明は、NET-4ポリヌクレオチドの正常な機能を妨害するように設計されたアンチセンスオリゴヌクレオチドに関連する。アンチセンス技術に幅広く適用可能な当該分野で公知のアンチセンス分子の任意の改変またはバリエーションが、本発明の範囲内に含まれる。このような改変としては、米国特許第5,536,821号；同第5,541,30 50

6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号に開示されるようなリン含有結合の調製が挙げられる。

【0021】

本発明のアンチセンス化合物として、米国特許第5，958，773号に開示されたような改変された塩基およびそこに開示された特許物が挙げられ得る。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、この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以上の部分または結合体にこのオリゴヌクレオチドを化学的に結合することによって、改変され得る。このような部分または結合体として、脂質（例えば、コレステロール）、コール酸、チオエーテル、脂肪鎖、リン脂質、ポリアミン、ポリエチレングリコール（PEG）、パルミトイル部分、ならびに例えば、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号に開示されるその他が挙げられる。

10

【0022】

キメラアンチセンスオリゴヌクレオチドもまた、本発明の範囲内であり、例えば、米国特許第5，013，830号、同第5，149，797号、同第5，403，711号、同第5，491，133号、同第5，565，350号、同第5，652，355号、同第5，700，922号および同第5，958，773号に記載される方法を使用して本発明のオリゴヌクレオチドから調製され得る。

20

【0023】

アンチセンス技術において、特定の標的に最適なアンチセンス分子を選択するために、ある程度の慣用的な実験が必要とされ得る。効率的であるために、アンチセンス分子は好ましくは、接近可能であるか、または曝露される標的RNA分子の部分に標的化される。いくつかの場合において、標的mRNA分子の構造についての情報が利用可能であるが、アンチセンスを使用する阻害への現在のアプローチは、実験によるものである。本発明によると、この実験は、実施例1に記載の方法を使用して、細胞を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ことによって、慣用的に実施され得る。細胞中のmRNAレベルは、mRNAの逆転写およびcDNAレベルのアッセイによって、処理された細胞およびコントロール細胞において、慣用的に測定され得る。生物学的効果は、当該分野で公知であるような、細胞増殖または細胞の生存度を測定する方法によって、慣用的に決定され得る。

30

【0024】

cDNAレベルをアッセイおよび分析することによって、アンチセンス活性の特異性を測定することは、アンチセンスの結果を確認する当該分野で認識された方法である。処理された細胞およびコントロール細胞由来のRNAが逆転写され、そして生じたcDNAの集団が分析されるべきことが、示唆されている（Branch, A. D., T. I. B. S., 23: 45~50, 1998）。本発明に従って、SW620細胞の培養物が、NET-4を標的化するように設計された5つの異なるアンチセンスオリゴヌクレオチドでトランスフェクトされた。これらのオリゴヌクレオチドは、配列番号2~6に示されている。NET-4に対応するmRNAのレベルは、処理された細胞およびコントロール細胞で測定された。配列番号2~6は、アクチンmRNAレベルへ標準化されたときのNET-4 mRNAの劇的な減少を引き起こした。

40

【0025】

本明細書中に記載のように使用するためのアンチセンス分子は、当業者に公知の任意の方法（例えば、固相ホスホラミダイトの化学的合成による化学合成を含む）によって合成され得る。WO93/01286；米国特許第6，043，090号；米国特許第5，218，088号；米国特許第5，175，269号；および米国特許第5，109，124号（これらの各々は、本明細書中で参考として援用される）。あるいは、RNA分子は、

50

NET-4 cDNAまたはその部分をコードするDNA配列のインビトロまたはインビボでの転写によって作製され得、ただしこのDNAは、適切なRNAポリメラーゼプロモーター（例えば、T3、T7またはSP6など）の下流でベクターに組込まれる。標識されたヌクレオチドとこのようなプロモーターの下流である直線化されたNET-4 cDNAフラグメントとを、適切なRNAポリメラーゼの存在下でインキュベートすることによって、大量のアンチセンスRNAが、生成され得る。このようなアンチセンス分子は、好ましくは少なくとも10、15、または20のヌクレオチド長である。より好ましくは、アンチセンス分子は、少なくとも25のヌクレオチド長である。特定の実施形態において、本明細書中のアンチセンス分子は、配列番号1のNET-4 cDNA配列に独特な配列、または高いストリンジェンシーの条件下で、配列番号1のcDNAにハイブリダイズし得る配列を含む。本発明の状況において、高いストリンジェンシーは、例えば、5×SSPE、0.5% SDS、65℃のような標準的なハイブリダイゼーション条件、またはそれと等価な条件を意味する。Sambrookら（前出）およびMolecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA（前出）（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

【0026】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、代表的には、以下のような結合を使用することによって、内因性のヌクレオチド分解性酵素による分解に耐えるように設計される：ホスホロチオエート、メチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、ホスホラミダイト、リン酸エステル、および他のこのような結合（Agrawalら、Tetrahedron Lett. 28:3539~3542（1987）；Millerら、J. Am. Chem. Soc. 93:6657~6665（1971）；Stecら、Tetrahedron Lett. 26:2191~2194（1985）；Moodyら、Nucl. Acids Res. 12:4769~4782（1989）；Uznanskiら、Nucl. Acids Res. 17（12）:4863~4871（1989）；Letsingerら、Tetrahedron 40:137~143（1984）；Eckstein、Annu. Rev. Biochem. 54:367~402（1985）；Eckstein、Trends Biol. Sci. 14:97~100（1989）；Stein、Oligodeoxynucleotides Antisense Inhibitors of Gene Expression、Cohen編、Macmillan Press、London、97~117頁（1989）；Jagerら、Biochemistry 27:7273~7246（1988））。可能性のあるさらなる改変または代替的な改変として、隣接配列の5'末端および／もしくは3'末端での付加、ならびに／またはイノシン、キューオシンおよびワイブトシン、ならびにアセチル、メチル、チオ、および他の改変された形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンのような非伝統的塩基の封入が挙げられるが、これらに限定されない。

【0027】

本発明の代替的な実施形態において、NET-4インヒビターはリボザイムであり得る。リボザイムは、RNA基質（例えば、mRNA）を特異的に切断するRNA分子であり、細胞の遺伝子発現の特異的な阻害または妨害を生じる。本明細書中で使用される場合、用語「リボザイム」は、特異的な認識、およびRNA切断酵素活性のためのアンチセンス配列を含むRNA分子を含む。触媒鎖は、標的RNAの特定の部位を、化学量論を超える濃度で切断する。

【0028】

本発明の状況において使用され得る広範な種々のリボザイムとして、例えば、ハンマーヘッドリボザイム（例えば、ForsterおよびSymons、Cell 48:211~220（1987）；HaseloffおよびGerlach、Nature 328:596~600（1988）；WalbotおよびBruening、Nature

334:196 (1988); Haseloff および Gerlach、Nature 334:585 (1988) に記載されるような); ヘアピンリボザイム (例えば、1993年10月19日に発行された Haseloff らの米国特許第5,254,678号、および1990年3月26日に公開された Hempel らの欧州特許公開番号0360257によって記載されるような); ならびにテトラヒメナリボソームRNAに基づくリボザイム (Cech ら、米国特許第4,987,071号を参照のこと) が挙げられる。本発明のリボザイムは、代表的にはRNAからなるが、DNA、核酸アナログ (例えば、ホスホロチオエート)、またはこれらのキメラ (例えば、DNA/RNA/RNA) から構成されてもよい。

【0029】

10

リボザイムは、任意のRNA転写物に標的化され得、そしてこのような転写物を触媒的に切断し得る (米国特許第5,272,262号; 米国特許第5,144,019号; ならびにCech らに対する米国特許第5,168,053号、同第5,180,818号、同第5,116,742号および同第5,093,246号)。本発明の特定の実施形態に従って、任意のこのようなNET-4 mRNA特異的リボザイム、またはこのようなリボザイムをコードする核酸が、宿主細胞に送達され、NET-4 遺伝子発現の阻害をもたらし得る。従って、リボザイムなどは、真核生物プロモーター (例えば、真核生物ウイルスプロモーター) に連結されたリボザイムをコードするDNAによって、宿主細胞へ送達され得、その結果、核への導入の際に、このリボザイムは直接転写される。

【0030】

20

(タンパク質およびポリペプチド)

本明細書中に開示されるアンチセンス分子およびリボザイムに加えて、本発明のNET-4 モジュレーターはまた、NET-4 遺伝子の発現を減少するかまたはNET-4 の生物学的活性の1つ以上を減少するかのいずれかにおいて有効なタンパク質またはポリペプチドを含む。当業者が、慣用的実験を介してこのようなNET-4 インヒビターを迅速に同定し得る種々の方法が、当該分野において容易に利用可能である。本発明は、以下の例示的方法論によって限定されない。

【0031】

NET-4 の生物学的活性のインヒビターは、細胞増殖 (特に、腫瘍細胞の増殖、特に、結腸細胞の増殖) と干渉するタンパク質および/またはポリペプチドを含む。このような干渉は、非競合的または未競合的阻害を介して (例えば、アロステリック部位への結合を介して)、あるいは別のタンパク質に通常結合する領域への結合によって、間接的に生じ得る。従って、NET-4 に結合するタンパク質および/またはポリペプチドを同定するために利用可能な方法は、本明細書中に開示される方法論を介してそのNET-4 阻害活性について特徴付けられ得るリード化合物を同定するために使用され得る。

30

【0032】

タンパク質間相互作用を検出および分析するための方法を記載する多数の文献が、当業者に入手可能である。Phizicky, E. M. ら、Microbiological Reviews 59:94-123 (1995) は、本明細書中に参考として援用される。このような方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 物理的方法 (例えば、タンパク質親和性クロマトグラフィー、親和性ブロッティング、免疫沈降、および架橋)、ならびにライブラリーベースの方法 (例えば、タンパク質プロービング、フェージディスプレイおよびツーハイブリッドスクリーニング)。タンパク質間相互作用を同定するために利用され得る他の方法としては、遺伝的方法 (例えば、遺伝子外 (extragenic) サプレッサー、合成的致死効果、および未結合非相補性の使用) が挙げられる。例示的な方法は、以下により詳細に記載される。

40

【0033】

本発明のNET-4 インヒビターは、NET-4 タンパク質と潜在的なインヒビタータンパク質のパネルまたはライブラリーとの間の直接的相互作用に依存する生物学的スクリーニングアッセイを介して同定され得る。生物学的スクリーニング方法論 (種々の「n-ハ

50

イブリッド技術」を含む)は、例えば、Vidal, M. ら, Nucl. Acids Res. 27 (4) : 919-929 (1999) ; Frederickson, R. M. , Curr. Opin. Biotechnol. 9 (1) : 90-6 (1998) ; Brachmann, R. K. ら, Curr. Opin. Biotechnol. 8 (5) : 561-568 (1997) ; および White, M. A. , Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 : 10001-10003 (1996) に記載され、これらの各々は、本明細書中に参考として援用される。

【0034】

ツーハイブリッドスクリーニング方法論は、阻害特性を有するNET-4結合タンパク質について新しいかまたは既存の標的cDNAライブラリーを検索するために利用され得る。このツーハイブリッド系は、レポーター遺伝子の転写の増加によってタンパク質間相互作用を検出する遺伝子的方法である。この系は、部位特異的転写アクチベーターが、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインを有するという事実依存する。このDNA結合ドメインは、発現される特定の遺伝子に対して活性化ドメインを標的化する。転写アクチベーターの組立て式の性質のために、このDNA結合ドメインは、いずれのドメインの活性も損失することなく、転写活性化ドメインからの共有結合的に切断され得る。さらに、これらの2つのドメインは、転写機構に関連しない2つのタンパク質間のタンパク質-タンパク質接触によって近位にされ得る。従って、ツーハイブリッドは、機能的な系を作製するために構築される。第1のハイブリッド(すなわち、ベイト(bait))は、目的のタンパク質に融合した転写アクチベーターDNA結合ドメインからなる。第2のハイブリッド(標的)は、転写活性化ドメインとタンパク質またはポリペプチドのライブラリーとの融合によって作製される。ベイトタンパク質と標的ライブラリーのメンバーとの間の相互作用は、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの近接を生じ、結果としてレポーター遺伝子の発現の上方制御を生じる。

【0035】

酵母Gal4またはE. coli LexA DNA結合ドメイン(BD)および酵母Gal4または単純疱疹ウイルスVP16転写活性化ドメインのいずれかを最も通常利用する種々のツーハイブリッドベースの系が、当業者に利用可能である。Chien, C.-T. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 : 9578-9582 (1991) ; Dalton, S. ら, Cell 68 : 597-612 (1992) ; Durfee, T. K. ら, Genes Dev. 7 : 555-569 (1993) ; Vojteck, A. B. ら, Cell 74 : 205-214 (1993) ; および Zervos, A. S. ら, Cell 72 : 223-232 (1993)。通常使用されるレポーター遺伝子としては、E. coli lacZ遺伝子ならびに選択可能酵母遺伝子(例えば、HIS3およびLEU2)が挙げられる。Fields, S. ら, Nature (London) 340 : 245-246 (1989) ; Durfee, T. K. , 前出 ; および Zervos, A. S. , 前出。相互作用するタンパク質についてのスクリーニングが、慣用的な実験を介して実施され得るような広範な種々の活性化ドメインライブラリーが、容易に入手可能である。

【0036】

NET-4相互作用タンパク質の同定のための適切なベイトタンパク質は、本明細書中で配列番号1として表されるNET-4 cDNA配列に基づいて設計され得る。このようなベイトタンパク質は、全長NET-4タンパク質またはそのフラグメントのいずれかを含む。

【0037】

NET-4ベイト構築物および標的ライブラリーを調製するためのプラスミドベクター(例えば、pBTM116およびpAS2-1)は、当業者に容易に入手可能であり、そして、例えば、Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen (Carlsbad, CA) および Stratagene (La Jolla, CA) のような販売元から入手され得る。これらのプラスミドベクターは、cDNAと、それぞれL

10

20

30

40

50

e x AまたはG a l 4 B DとしてのD N A結合ドメインとのインフレーションでの融合を可能にする。

【0038】

本発明のN E T-4モジュレーターは、代替的に、タンパク質間相互作用を検出するための当該分野で利用可能な物理的または生化学的方法の1つを介して同定され得る。

【0039】

N E T-4は、他の細胞表面タンパク質と相互作用すると考えられる。タンパク質親和性クロマトグラフィー方法論を介して、潜在的N E T-4インヒビターとして試験されるリード化合物は、固体マトリックス（例えば、セファロースビーズ）に共有結合的または非共有結合的のいずれかで結合される場合、N E T-4に対するその特定の保持によって同定され得る。タンパク質親和性カラムの調製は、例えば、B e e c k m a n s, S. ら, Eur. J. Biochem. 117: 527-535 (1981) および F o r m o s a, T. ら, Methods Enzymol. 208: 24-45 (1991) に記載される。細胞タンパク質の全成分を含む細胞溶解物は、N E T-4親和性カラムを通過し得る。N E T-4についての高い親和性を有するタンパク質は、低塩条件下で特異的に保持されるが、一方、細胞タンパク質の大部分は、このカラムを通過する。このような高親和性タンパク質は、高塩条件下で、カオトロピック溶媒またはドデシル硫酸ナトリウム (S D S) を用いて、固定されたN E T-4から溶出され得る。いくつかの実施形態において、N E T-4特異的結合タンパク質の同定における補助として、この溶解物の調製の前に、この細胞を放射性標識することが好ましくあり得る。哺乳動物細胞を放射性標識するための方法は、当該分野で周知であり、そして例えば S o p t a, M. ら, J. Biol. Chem. 260: 10353-10360 (1985) において提供される。

【0040】

親和性カラムクロマトグラフィーに適切なN E T-4タンパク質は、適切な親和性樹脂上での迅速な精製を可能にするためのタンパク質またはポリペプチドに融合され得る。例えば、N E T-4 c D N Aは、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (G S T) のコード領域に融合され得る。S m i t h ら, Gene 67: 31-40 (1988)。あるいは、融合タンパク質は、プロテインA（これは、免疫グロブリンGを保有するカラム上で精製され得る）；オリゴヒスチジン含有ペプチド（これは、N i ²⁺ を保有するカラム上で精製され得る）；マルトース保有タンパク質（これは、アミロースを含む樹脂上で精製され得る）；およびジヒドロ葉酸レダクターゼ（これは、メトトレキセートカラム上で精製され得る）を含み得る。本明細書中に示されるN E T-4融合タンパク質の調製のために適切な1つの例示的なタグは、インフルエンザウイルスヘマグルチニン (H A) についてのエピトープであり、これに対するモノクローナル抗体が容易に入手可能であり、そしてこのエピトープから、抗体および親和性カラムが調製され得る。

【0041】

N E T-4親和性カラムで特異的に保持されるタンパク質は、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S-P A G E) に供された後に同定され得る。従って、細胞が、細胞溶解物の精製の前に放射性標識され、そしてN E T-4親和性カラムを通過する場合、N E T-4についての高い親和性を有するタンパク質は、オートラジオグラフィーによって検出され得る。N E T-4特異的結合タンパク質の同定は、当業者に容易に利用可能なタンパク質配列決定技術（例えば、M a t h e w s, C. K. ら, Biochemisty, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp. 166-170 (1990)）によって決定され得る。

【0042】

（抗体または抗体フラグメント）

本発明のN E T-4モジュレーター（アンタゴニストおよびアゴニスト）は、N E T-4の遺伝子発現および／または生物学的活性の調節において有効な抗体および／または抗体フラグメントを含む。適切な抗体は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体またはヒ

ト化モノクローナル抗体であり得る。抗体は、従来のハイブリドーマベースの方法論によって、NET-4接種動物から単離された抗血清から、または組換えDNA技術を介して誘導され得る。あるいは、本発明の抗体または抗体フラグメントは、容易に利用可能なファージディスプレイライブラリーの1つ以上の使用によって、インビトロで同定され得る。例示的な方法は、本明細書中に開示される。

【0043】

本発明の1つの実施形態において、NET-4モジュレーターは、以下のようにして産生され得るモノクローナル抗体である。例えば、バキュロウイルスベースの系におけるNET-4 cDNAの発現によって、NET-4タンパク質が産生され得る。この方法によって、NET-4 cDNAまたはそのフラグメントは、適切なプラスミドベクターに連結され、引き続いてタンパク質産生を促進するためにSf9細胞をトランスフェクトするために使用される。さらに、NET-4タンパク質の親和性精製を促進するために、エピトプタグまたは他の部分を組み込むことが有利であり得る。NET-4を発現するSf9細胞のクローンは、例えば、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)によって同定される。溶解物が調製され、そしてNET-4タンパク質が、親和性クロマトグラフィーによって精製され、そして精製されたタンパク質が、BALB/cマウスに腹腔内注射されて、抗体産生を誘導する。生じる免疫応答を増加するために、アジュバント(例えば、フロイントアジュバント)を添加することが有利であり得る。

【0044】

血清は、特異的抗体の産生について試験され、そして陽性の特異的抗体力価を有する動物由来の脾臓細胞は、ハイブリドーマクローンを作製するために、骨髓腫細胞と細胞融合するために使用される。ハイブリドーマクローン由来の上清は、NET-4に対する特異性を有するモノクローナル抗体の存在について試験される。モノクローナル抗体方法論の一般的な記載については、例えば、HarlowおよびLane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)を参照のこと。

【0045】

バキュロウイルス発現系に加えて、他の適切な細菌発現系または酵母発現系は、NET-4タンパク質またはそのポリペプチドの発現のために利用され得る。バキュロウイルス系を用いる場合、動物の接種の前に精製を容易にするための、市販の親和性タグのうちの1つを利用することが有利であり得る。したがって、NET-4 cDNAまたはそのフラグメントは、例えば、アガロースゲル精製および適切なタグタンパク質(例えば、6-His、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)または他のこのような容易に入手可能な親和性タグ)とインフレイムで連結されることによって、単離され得る。例えば、Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press pp. 160-161 (Glick, B. R. および Pasternak, J. J. 編、1998)を参照のこと。

【0046】

本発明の他の実施形態において、NET-4モジュレーターは、ヒト化抗NET-4モノクローナル抗体である。句「ヒト化抗体」とは、非ヒト抗体(代表的には、マウスモノクローナル抗体)由来の抗体をいう。あるいは、ヒト化抗体は、親の非ヒト抗体の抗原結合特性を保持するかまたは実質的に保持するが、ヒトに投与する場合に、親抗体と比較して減少した免疫原性を示すキメラ抗体由来であり得る。句「キメラ抗体」とは、本明細書中で使用される場合、代表的には異なる種起源の2つの異なる抗体由来の配列を含む抗体をいう(米国特許第4,816,567号)。最も代表的には、キメラ抗体は、ヒトおよびマウスの抗体フラグメント、一般的にはヒト定常領域およびマウス可変領域を含む。

【0047】

ヒト化抗体は、ヒトにおいて親マウスモノクローナル抗体よりもはるかに低免疫原性であるため、これらは、アナフィラシーの危険性がはるかに少ないヒトの処置のために使用

され得る。従って、これらの抗体は、ヒトへのインビボ投与を含む治療用途（例えば、新生物疾患の処置のための放射線増感剤としての使用、または、例えば、癌治療の副作用を低減するための方法における使用）において好ましくあり得る。

【0048】

ヒト化抗体は、種々の方法によって達成され得、これらの方法としては、例えば、以下が挙げられる：（１）ヒトフレームワークおよび定常領域への非ヒト相補性決定領域（CDR）の移植（当該分野で「ヒト化」と呼ばれるプロセス）、あるいは（２）全非ヒト可変ドメインの移植であるが、これらを表面残基の置換によってヒト様表面で「覆う（cloaking）」こと（当該分野で「ベニアリング（veneering）」と呼ばれるプロセス）。本発明において、ヒト化抗体は、「ヒト化」抗体および「ベニアされた（veneered）」抗体の両方を含む。これらの方法は、以下に記載される：例えば、Jonesら、Nature 321:522-525（1986）；Morrisonら、Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81:6851-6855（1984）；MorrisonおよびOi, Adv. Immunol., 44:65-92（1988）；Verhoeyerら、Science 239:1534-1536（1988）；Padlan, Molec. Immun. 28:489-498（1991）；Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217（1994）；ならびにKettleborough, C. A. ら、Protein Eng. 4(7):773-83（1991）（これらの各々は、本明細書中に参考として援用される）。

10

20

【0049】

句「相補性決定領域」とは、ネイティブの免疫グロブリン結合部位の天然のFv領域の結合親和性および特異性を一緒に規定するアミノ酸配列をいう。例えば、Chothiaら、J. Mol. Biol. 196:901-917（1987）；Kabataら、U. S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242（1991）を参照のこと。句「定常領域」とは、エフェクター機能を与える抗体分子の部分の部分をいう。本発明において、マウス定常領域は、ヒト定常領域によって置き換えられる。本発明のヒト化抗体の定常領域は、ヒト免疫グロブリン由来である。重鎖定常領域は、5つのアイソタイプ： α 、 δ 、 ϵ 、 γ または μ のいずれかから選択され得る。

30

【0050】

抗体をヒト化する1つの方法は、非ヒト重鎖配列および軽鎖配列を、ヒト重鎖配列および軽鎖配列と整列する工程、非ヒトフレームワークを選択し、そしてこのような整列に基づいてヒトフレームワークと置換する工程、ヒト化配列のコンホメーションを予測するために分子モデリングする工程、および親抗体のコンホメーションと比較する工程を包含する。このプロセスに続いて、ヒト化配列モデルの予測されるコンホメーションが、親の非ヒト抗体の非ヒトCDRのコンホメーションに密接に近づくまで、CDR領域中の残基の復帰変異（これは、CDRの構造をかき乱す）を繰り返す。このようなヒト化抗体は、例えば、Ashwellレセプターを介して、取り込みおよびクリアランスを促進するためにさらに誘導され得る。例えば、米国特許第5,530,101号および同第5,585,089号（これらの特許は、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

40

【0051】

代替的なNET-4インヒビター抗体は、当該分野で一般に公知の他の方法によって容易に入手され得ることが理解される。NET-4に対する高い特異性を有する抗体を同定するための1つの例示的な方法は、ファージディスプレイ技術である。

【0052】

高親和性抗体を産生するためのファージディスプレイライブラリーは、以下において記載されている：例えば、Hoogenboom, H. R. ら、Immunotechnology 4(1):1-20（1998）；Hoogenboom, H. R., Trends Biotechnol. 15:62-70（1997）およびMcGuinness

50

s, B. ら, *Nature Bio. Technol.* 14:1149-1154 (1996) (これらの各々は、本明細書中に参考として援用される)。ファージディスプレイ技術の利点の1つは、従来のハイブリドーマ技術によっては容易に単離できないヒト起源の抗体を単離する能力である。さらに、ファージディスプレイ抗体は、動物の免疫系に依存せずにインビトロで単離され得る。

【0053】

抗体ファージディスプレイライブラリーは、例えば、McCaffertyら, *Nature* 348:552-554 (1990) の方法によって達成され得、これは本明細書中に参考として援用される。手短に言うと、抗体の可変領域のコード配列は、ファージマインナーコートタンパク質 (pIII) のアミノ末端に融合される。抗体可変領域-pIII融合構築物の発現は、ファージ表面上での抗体の「提示」を生じ、対応する遺伝物質はファージ粒子内に含まれる。

10

【0054】

ファージライブラリーをスクリーニングするために適切なNET-4タンパク質は、例えば、記載される (前出) ようなバキュロウイルスSf9細胞中での発現によって、入手され得る。あるいは、NET-4コード領域は、NET-4タンパク質の所望の領域に特異的なプライマーを使用して、PCR増幅され得る。所望の領域は、図1に示される構造に基づいて選択され得る。上記で議論されるように、NET-4タンパク質は、E. coli または酵母中で、市販の1つの親和性タグとの融合物として発現され得る。

【0055】

次いで、得られる融合タンパク質は、固体マトリックス (例えば、組織培養プレートまたはビーズ) に吸着され得る。所望の抗NET-4結合特性を有するファージ発現抗体は、連続的パニング (固体マトリックスの場合) またはNET-4抗原カラムへの親和性吸着によって、引き続いて単離され得る。所望のNET-4阻害活性を有するファージは、感染によって細菌へと再導入され得、そして当業者に公知の標準的な方法によって増殖され得る。陽性の抗体-pIIIファージについてのスクリーニングのための方法の総説については、Hoogenboom, H. R., *Trends Biotechnol.*, 前出を参照のこと。

20

【0056】

(小分子)

本発明はまた、高スループットスクリーニング (HTS) 方法論の慣用的な適用を介して容易に同定され得る小分子のNET-4モジュレーター (アンタゴニストおよびアゴニスト) を提供する。Persidis, A., *Nature Biotechnology* 16:488-489 (1998)。HTS方法は、一般に、治療可能性についてのリード化合物 (例えば、小分子) の迅速なアッセイを可能にする技術をいう。HTS方法論は、試験材料のロボットでの取り扱い、陽性シグナルの検出、およびデータの判読を利用する。このような方法論としては、例えば、可溶性分子を使用するロボットスクリーニング技術、ならびに細胞ベースの系 (例えば、上で詳細に記載されるツーハイブリッド系) が挙げられる。

30

【0057】

操作の容易さおよび溶液中とは対照的な、細胞の状況内で生じる相互作用の臨床的関連性の利点を有する、種々の細胞株ベースのHTS方法が利用可能である。リード化合物は、放射能の組み込みを介して、または読出しとしての吸光度、蛍光または発光に依存する光学的アッセイを介して、同定され得る。Gonzalez, J. E. ら, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(6):624-631 (1998)、これは、本明細書中に参考として援用される。

40

【0058】

HTS方法論は、例えば、NET-4の生物学的活性の1つ (特に、他の細胞表面タンパク質と相互作用するその能力) をブロックするリード化合物についてスクリーニングするために、利用され得る。この方法によって、NET-4タンパク質は、このタンパク質を

50

発現する細胞から免疫沈降され得、そしてロボットスクリーニングに適切なアッセイプレート上のウェルに適用される。次いで、個々の試験化合物は、免疫沈降されたタンパク質と接触され得、そしてNET-4活性に対する各試験化合物の影響が評価される。

【0059】

(NET-4モジュレーターの有効性を評価するための方法)

本明細書中に記載される方法の1つ、またはさもなくば当該分野で利用可能な技術のいずれかによって同定されるリード分子またはリード化合物（アンチセンス分子またはリボザイム、タンパク質および／またはペプチド、抗体および／または抗体フラグメント、あるいは小分子であろうと）は、NET-4遺伝子発現または生物学的活性を阻害するその能力について、種々のインビトロ、エキソビボおよびインビボの動物モデルアッセイ系においてさらに特徴付けられ得る。実施例においてさらに詳細に議論されるように、本発明のNET-4インヒビターは、NET-4の発現レベルの低減において、および癌細胞増殖の阻害において有効である。従って、本発明は、当業者が、これらのパラメーターの各々についての候補インヒビターの影響を評価することを可能にする方法をさらに開示する。

10

【0060】

上記のように、そして実施例に示されるように、候補NET-4インヒビターは、内因性NET-4を発現するか、または組換えNET-4プラスミド構築物を用いる哺乳動物細胞（例えば、SW620）のトランスフェクションによってNET-4を発現するようにされる細胞への投与によって試験され得る。

【0061】

効果的なNET-4阻害分子は、例えば、ノーザンブロットまたはRT-PCR分析によって決定されるようなNET-4 mRNAのレベルを減少する。実施例1；Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press (1989) およびMolecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press (編、Glick, B. R. およびPasternak, J. J. 1998) (本明細書中に参考として援用される)。あるいは、効果的なNET-4阻害分子は、細胞におけるNET-4タンパク質のレベルを減少し得る。所定の候補アンチセンス分子の有効性は、哺乳動物細胞へ投与される場合、NET-4発現に実質的な効果を有さないとして公知のコントロール「アンチセンス」分子との比較によって評価され得る。例示的なコントロール分子としては、実施例2に開示されるRCオリゴヌクレオチドが挙げられる。

20

30

【0062】

本明細書中で考察される1つ以上の方法によってNET-4遺伝子発現および／または細胞増殖を減少するのに有効なNET-4インヒビターは、容易に入手可能な動物モデル系の1つにおける効力についてインビボでさらに特徴付けられ得る。癌および遺伝子に関連する遺伝的な不安定性の研究のための種々の動物モデル系は、例えば、本明細書中に参考として援用されるDonehower, L. A. Cancer Surveys 29: 329-352 (1997) において考察される。

【0063】

(NET-4インヒビターおよびその組成物の投与)

本発明は、NET-4インヒビターおよび1つ以上のNET-4インヒビターを含有する組成物ならびにこれらの本発明のインヒビターをインビボ、エキソビボ、およびインビトロ用途（NET-4または機能的に下流分子の発現および活性を減少または除去するのに有利な）で使用する方法を提供する。NET-4インヒビターは、癌治療剤および他の薬剤を補う薬物としての用途を見出し得る。NET-4インヒビターはまた、過剰増殖の他の疾患における用途を見出し得る。

40

【0064】

組成物は、治療的な処置のために非経口的に、局所的に (topically)、経口的にまたは局部的に (locally) 投与され得る。好ましくは、この組成物は、経口的

50

にまたは非経口的に（すなわち、静脈内に、腹腔内に、皮内にもしくは筋肉内に）投与される。

【0065】

本発明の組成物は、1つ以上のNET-4インヒビターを含み、そして薬学的に受容可能なキャリアまたは賦形剤をさらに含み得る。種々の水性キャリア（例えば、水、緩衝水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなど）が、使用され得、そして安定性を高めるために他のタンパク質（例えば、アルブミン、リポタンパク質、グロブリンなど、中程度の化学的改変などに供されたもの）を含み得る。

【0066】

哺乳動物における疾患の処置に有用なNET-4インヒビターは、他の天然に存在する免疫グロブリンまたは他の生物学的分子を実質的に用いずにしばしば調製される。好ましいNET-4インヒビターはまた、哺乳動物に投与される場合に、最小の毒性を示す。

【0067】

本発明の組成物は、従来の、周知の滅菌技術によって滅菌され得る。得られた溶液は、使用のためにパッケージングされるか、または無菌条件下で濾過され、そして凍結乾燥され得、この凍結乾燥調製物は、投与前に滅菌溶液と組み合わせられ得る。この組成物は、およそその生理的条件に必要とされる薬学的に受容可能な補助物質（例えば、pH調整剤および緩衝剤、張度調整剤など（例えば、酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム）および安定剤（例えば、1~20%マルトースなど））を含み得る。

【0068】

本発明のNET-4インヒビターを投与するための適切な方法の選択は、想定された適用の性質およびNET-4インヒビターの性質に依存する。従って、例えば、NET-4インヒビターの投与のための正確な方法論は、このインヒビターがアンチセンス分子、タンパク質および／またはペプチド、抗体または抗体フラグメントあるいは小分子であるか否かに依存する。他の考察は、例えば、このNET-4インヒビターが腫瘍細胞増殖、浸潤、または転移を阻害するために、あるいは他の癌治療剤に対する添加剤として使用されるか否かを含む。

【0069】

アンチセンス分子の投与のための種々の方法は、当該分野において入手可能である。例示的な方法としては、遺伝子送達技術（ウイルスベースの方法および非ウイルスベースの方法の両方ならびにリポソーム媒介送達方法を含む）が挙げられる。

【0070】

遺伝子送達方法論は、例えば、腫瘍細胞増殖を減少するか、または腫瘍の放射線処置および／もしくは化学療法処置を補うのに効果的である。Wheldon、T. E. ら、Radiother Oncol 48(1):5-13(1998)（分割照射法（fractionated radiotherapy）の増強のための遺伝子送達方法論）。これらの方法論によって、実質的な治療利益は、有意に100%未満のトランスフェクション効率、トランスフェクトされたインヒビターの過渡的な保持および／または治療に対して無反応の標的細胞の亜集団の存在にもかかわらず達成され得る。

【0071】

あるいは、遺伝子送達方法論は、腫瘍細胞中の内因性NET-4を直接ノックアウトするために使用され得る。例えば、NET-4遺伝子は、NET-4インヒビターを保有する遺伝子送達ベクターのトランスフェクションによって標的化され得る。腫瘍細胞への好ましいトランスフェクションまたは腫瘍細胞内の発現は、腫瘍特異的なプロモーターまたは細胞周期特異的なプロモーター（例えば、前立腺特異的抗原に対するプロモーターまたは免疫グロブリン遺伝子に対するプロモーター（Vile、R. G. ら、Cancer Res. 53:962-967(1993)およびVile、R. G.、Semin. Cancer Biol. 5:437-443(1994)）の使用を介して、あるいは特定の器官または構造に限局される栄養ウイルス（例えば、中枢神経系における増殖中の細

胞のみを感染し得る複製選択的および神経栄養ウイルス)の使用を介して達成され得る。

【0072】

従って、治療利益を達成するために、腫瘍細胞中のNET-4は、優先的に阻害されるべきである。これは、NET-4インヒビター、NET-4アンチセンス分子、NET-4遺伝子特異的リプレッサー、またはNET-4遺伝子のタンパク質産物のインヒビターを発現する遺伝子をトランスフェクトすることによって達成され得る。

【0073】

本明細書中で使用される場合、句「遺伝子送達ベクター」とは、一般的に目的のアンチセンス分子を保有し、そして特定の実施形態において、目的のアンチセンス分子の発現を指向し得る核酸構築物をいう(例えば、Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA、第21章、pp. 555-590(編、B. P. GlickおよびJ. J. Pasternak、第2版、1998); Jolly、Cancer Gene Ther. 1: 51-64(1994); Kimura、Human Gene Ther. 5: 845-852(1994); Connolly、Human Gene Ther. 6: 185-193(1995); ならびにKaplit、Nat. Gen. 6: 148-153(1994)に記載されるような)。

【0074】

NET-4インヒビターの投与に適切な多くのウイルスベースの遺伝子送達ベクター系および非ウイルスベースの遺伝子送達ベクター系は、記載されている。ウイルスベースの遺伝子送達系としては、レトロウイルス(例えば、モロニー Maus 白血病ウイルス、スプマウイルスおよびレンチウイルス)ベクター系; アデノウイルスベクター系; アデノ随伴ウイルスベクター系; ならびに単純疱疹ウイルスベクター系が挙げられるが、これらに限定されない。各型のウイルスは、寄託所または収集所(例えば、アメリカン タイプ カルチャー コレクション(ATCC; 10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110-2209)から容易に入手可能であるか、または一般的に入手可能な材料および技術を使用して既知の供給源から単離され得る。

【0075】

本発明の遺伝子送達ベクター系は、インビトロ治療レジメンおよびエキソビボ治療レジメンの両方における適用を見出す。これらの適用の各々は、以下にさらに詳細に記載される。

【0076】

(1. レトロウイルス遺伝子送達ベクター系)

本発明の1つの局面において、NET-4阻害アンチセンス分子を保有または発現するように構築されたレトロウイルス遺伝子送達ベクターが、提供される。本明細書中で使用される場合、用語「NET-4阻害アンチセンス分子」とは、一般的にNET-4阻害活性を有する核酸配列をいう。より詳細には、このようなアンチセンス分子は、NET-4遺伝子発現を減少する。本発明のレトロウイルス遺伝子送達ベクターは、幅広い種々のレトロウイルス(例えば、B型レトロウイルス、C型レトロウイルス、およびD型レトロウイルスならびにスプマウイルスおよびレンチウイルスを含む)から容易に構築され得る。RNA Tumor Viruses、Cold Spring Harbor Laboratory(第2版、1985)を参照のこと。

【0077】

任意の上のレトロウイルスは、本明細書中に提供される開示、および標準的な組換えDNA技術を受け、レトロウイルス遺伝子送達ベクターを組み立てるかまたは構築するために容易に利用され得る。例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press(第2版、1989)およびKunkle、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82: 488(1985)を参照のこと

。さらに、本発明の特定の実施形態において、レトロウイルス遺伝子送達ベクターの一部は、異なるレトロウイルス由来であり得る。

【0078】

レトロウイルスベクター（NE T-4阻害アンチセンス分子の発現に適切な）は、少なくとも1つの転写プロモーター／エンハンサーまたはエレメントを定義する遺伝子座、あるいは他の手段（例えば、選択的スプライシング、核RNA搬出、メッセンジャーの翻訳後修飾、またはタンパク質の転写後修飾）によって遺伝子発現を制御する他のエレメントを含むべきである。このようなベクター構築物はまた、パッケージングシグナル、長い末端反復（LTR）またはそれらの部分、ならびに使用されるレトロウイルスに適切な+鎖および-鎖プライマー結合部位（レトロウイルスベクター中にすでに存在していない場合）を含まなければならない。必要に応じて、レトロウイルスベクターはまた、ポリアデニル化を指向するシグナル、選択可能マーカー（例えば、ネオマイシン耐性、TK、ハイグロマイシン耐性、フレオマイシン耐性、ヒスチジオール耐性、またはDHFR）、ならびに1つ以上の制限部位および翻訳終止配列を含み得る。本発明の1つの局面において、5' LTR、tRNA結合部位、パッケージングシグナル、1つ以上の異種配列、第2鎖DNA合成の起点および3' LTRを含むレトロウイルス遺伝子送達ベクター構築物（ここで、このベクター構築物は、gag/polまたはenvコード配列を欠く）が、提供される。

10

【0079】

他のレトロウイルス遺伝子送達ベクターは、本発明の文脈（例えば以下に開示されるもの（各々が参考として本明細書中に援用される）を含む）において同様に利用され得る：EP0, 415, 731；WO90/07936；WO94/03622；WO93/25698；WO93/25234；米国特許第5, 219, 740号；WO93/11230；WO93/10218；Vileら、Cancer Res. 53:3860-3864（1993）；Vileら、Cancer Res. 53:962-967（1993）；Ramら、Cancer Res. 53:83-88（1993）；Takamiyaら、J. Neurosci. Res. 33:493-503（1992）；Babaraら、J. Neurosurg. 79:729-735（1993）；米国特許第4, 777, 127号、GB2, 200, 651、EP0, 345, 242およびWO91/02805。

20

30

【0080】

上記のレトロウイルス遺伝子送達ベクター構築物との使用に適切なパッケージング細胞株は、用意に調製され得る。例えば、米国特許第5, 716, 832号および同第5, 591, 624号を参照のこと。これらのパッケージング細胞株は、組換えベクター粒子の産生のためのプロデューサー細胞株（ベクター細胞株または「VCL」とも呼ばれる）を作製するために利用され得る。ヒトから作製されたパッケージング細胞株（例えば、HT1080細胞）またはミンク親細胞株を使用することが好ましくあり得、それにより、ヒト血清における不活化を防ぐ組換えレトロウイルスの産生を可能にし得る。

【0081】

（2. アデノ随伴ウイルス遺伝子送達ベクター系）

40

アデノ随伴ウイルス（AAV）は、一般的に遺伝子送達ベクターの開発について、そして特にNE T-4阻害アンチセンス分子をコードするポリヌクレオチドの送達について特に適切にする多くの特性を有する。AAV発現系の一般的な総説については、Rabinowitzら、Current Opin. Biotech. 9（5）：470-475（1998）を参照のこと。AAVは、アデノヘルパーウイルスまたはヘルペスヘルパーウイルスなしでは非感染性である非病原性の欠損ヒトパルボウイルスである。従って、ヘルパーウイルスの非存在下で、AAVは、宿主ゲノムへ潜在的に組み込まれるようになる。さらに、AAVは、幅広い範囲の分裂中の細胞型および休止細胞型の両方を形質導入し得る点において上で考察したレトロウイルスよりも優れた利点を有する。

【0082】

50

種々の AAV 遺伝子送達ベクターは、1 つ以上の NET-4 阻害アンチセンス分子の発現を指向するために利用され得る。このようなベクターの代表的な例としては、Srivastava、WO 93/09239；Samulski ら、J. Virol. 63:3822-3828 (1989)；Mendelson ら、Virol. 166:154-165 (1988)；および Flontte ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90(22):10613-10627 (1993) (本明細書中に参考として援用される) によって開示される AAV ベクターが挙げられる。

【0083】

簡単には、本発明の AAV 遺伝子送達ベクターは、5' アデノ随伴ウイルス逆方向末端反復；NET-4 阻害アンチセンス分子をコードするポリヌクレオチド：標的組織、器官または細胞においてその発現を調節する NET-4 阻害アンチセンス分子に作動可能に連結された配列：および 3' アデノ随伴ウイルス逆方向末端反復を順序正しく含み得る。NET-4 阻害アンチセンス分子の発現に適切な調節配列は、例えば、サイトメガロウイルス (CMV) のエンハンサー／プロモーター配列である。さらに、AAV ベクターは、好ましくは、ウシ成長ホルモン (BGH) ポリアデニル化配列のようなポリアデニル化配列を有し得る。

【0084】

一般的に、AAV ベクターは、複製、パッケージング、宿主細胞ゲノムへの効率的な組み込みおよび染色体からの救出を可能にするように NET-4 阻害アンチセンス分子の各末端で AAV ITR の 1 つのコピーを有するべきである。5' ITR 配列は、AAV DNA ゲノムの 5' 末端でヌクレオチド 1~145 からなり、そして 3' ITR は、AAV ゲノムのヌクレオチド 4681~4536 を含む。好ましくは、AAV ベクターはまた、ITR の末端に続いて少なくとも 10 ヌクレオチド (すなわち、「D 領域」と総称される部分) を含む。

【0085】

アデノ随伴ウイルス遺伝子送達ベクターの最適なパッケージングは、5' および 3' ITR が約 2~5 bp だけ分離されることを必要とする。しかし、ITR 配列間の理想の間隔は、利用される特定のパッケージング系に依存して変わり得ることが明らかである。この間隔は、2 つの ITR の間の核酸配列の全体のサイズを、2 kb および 5 kb との間に持ってくるように「詰め込み (stuffer)」または「充填 (filler)」ポリヌクレオチドフラグメントを組み込むことによって達成され得る。従って、NET-4 阻害アンチセンス分子が 2~5 kb よりも小さい場合、非コード詰め込みポリヌクレオチドは、例えば、3' ITR 配列~5' ITR 配列、および NET-4 阻害アンチセンス分子の 5' へ組み込まれ得る。この詰め込みフラグメントの正確なヌクレオチド配列は、最終構築物の必須エレメントではない。

【0086】

詰め込みフラグメントを取り込むことよりむしろ、意図される正確な適用に依存して、NET-4 阻害アンチセンス分子の複数コピーは、特に最適な ITR 配列間隔を達成するように挿入され得る。独自のプロモーターおよびポリアデニル化シグナルのそれぞれと共に 2 つ以上の別個の転写ユニットとしてポリヌクレオチドを組織化することが好ましくあり得る。

【0087】

本発明の組換え AAV ベクターは、種々のアデノ随伴ウイルス (例えば、血清型 1~6 を含む) から作成され得る。例えば、任意の AAV 血清型由来の ITR は、複製、組み込み、除去および転写機構に関して類似の構造および機能を有することが予測される。

【0088】

本発明の特定の実施形態において、NET-4 阻害アンチセンス分子の発現は、別個のプロモーター (例えば、ウイルスプロモーター) によって達成され得る。この点において適切なプロモーターの代表的な例としては、CMV プロモーター、RSV プロモーター、SV40 プロモーター、または MoMLV プロモーターが挙げられる。本発明の文脈におい

10

20

30

40

50

て同様に利用され得る他のプロモーターとしては、細胞または組織特異的プロモーターあるいは誘導プロモーターが挙げられる。代表的な誘導プロモーターとしては、テトラサイクリン応答プロモーター（例えば、「Tet」プロモーター）（Gossenら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89:5547-5551（1992）；Gossenら、Science 268:1766-1769（1995）；Baronら、Nucl. Acids Res. 25:2723-2729（1997）；Blauら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:797-799（1999）；Bohlら、Blood 92:1512-1517（1998）；およびHabermanら、Gene Therapy 5:1604-1611（1998）に記載されるような）；エクジソンプロモーター（Noら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93:3346-3351（1996）に記載されるような）；ならびに他の調節プロモーターまたはプロモーター系（Riveraら、Nat. Med. 2:1028-1032（1996）に記載されるような）が挙げられる。

【0089】

AAV遺伝子送達ベクターはまた、このベクターに対して所望の機能をもたらすのを援助するさらなる配列（例えば、アデノウイルス由来）を含み得る。このような配列は、例えば、アデノウイルス粒子においてAAV遺伝子送達ベクターをパッケージングするのを援助する配列を含む。

【0090】

アデノ随伴ウイルスベクターを産生するのに適したパッケージング細胞株は、所定の容易に利用可能な技術によって慣用的に調製され得る。例えば、米国特許第5,872,005号（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。最低限、本発明のAAV遺伝子送達系に適切なパッケージング系は、AAV複製およびカプシド遺伝子を含む。

【0091】

好ましいパッケージング細胞株は、AAVヘルパーウイルスおよびNET-4阻害アンチセンス分子を含むAAV遺伝子送達ベクターの両方を含み得る。代表的なパッケージング細胞株系の詳細な記載については、例えば、Holscher, C. ら、J. Virol. 68:7169-7177（1994）；Clark, K. R. ら、Hum. Gene Ther. 6:1329-1341（1995）；およびTamayosa, K. ら、Hum. Gen. Ther. 7:507-513（1996）（本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

【0092】

あるいは、AAVのパッケージングは、無細胞系においてインビトロで達成されて、トランスフェクションプロトコルまたはパッケージング細胞株を不必要にし得る。このようなインビトロ系は、NET-4阻害アンチセンス分子およびヘルパーウイルス機能を供給するレポータータンパク質、カプシドタンパク質およびアデノウイルスタンパク質の供給源を保有するAAV遺伝子送達ベクターを組み込む。後者のタンパク質は、典型的に細胞抽出物の形態で供給される。代表的なインビトロ系は、さらにDing, L. ら、Gen. Ther. 4:1167-1172（1997）およびZhou, Z. ら、J. Virol. 72:3241-3247（1998）（本明細書中に参考として援用される）に記載される。

【0093】

（3. 他のウイルス遺伝子送達ベクター系）

レトロウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベースのベクターに加えて、多数の他のウイルス遺伝子送達ベクター系はまた、NET-4阻害アンチセンス分子の発現のために利用され得る。例えば、本発明の1つの実施形態において、アデノウイルスベクターが、使用され得る。このようなベクターの代表的な例としては、例えば、Berkner, Biotechniques 6:616-627（1988）；Rosenfeldら、Science 252:431-434（1991）；WO93/9191；Kollisら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91(1):215-2

19 (1994); Kass-Eislerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (24): 11498-502 (1993); Guzmanら、Circulation 88 (6): 2838-48 (1993); Guzmanら、Circ. Res. 73 (6): 1202-1207 (1993); Zabnerら、Cell 75 (2): 207-216 (1993); Liら、Hum. Gene Ther. 4 (4): 403-409 (1993); Cailaudら、Eur. J. Neurosci. 5 (10): 1287-1291 (1993); Vincentら、Nat. Genet. 5 (2): 130-134 (1993); Jaffeら、Nat. Genet. 1 (5): 372-378 (1992); および Levreroら、Gene 101 (2): 195-202 (1991); および WO93/07283; WO93/06223 10
; および WO93/07282 によって記載されるものが挙げられる。

【0094】

本発明の遺伝子送達ベクターはまた、ヘルペスウイルスを含む。このようなベクターの代表的な例としては、Kit、Adv. Exp. Med. Biol. 215: 219-236 (1989) によって開示されるもの; ならびに米国特許第5, 288, 641号およびEP0176170 (Roizman) によって開示されるものが挙げられる。さらなる例示的な単純疱疹ウイルスベクターとしては、WO95/04139に開示されるHFEM/ICP6-LacZ (Wistar Institute)、Geller、Science 241: 1667-1669 (1988) ならびにWO90/09441 およびWO92/07945に記載されるpHSVlac; Fink、Human Gene Therapy 3: 11-19 (1992)に記載されるHSV Us3::pgC-lacZ; ならびにEP0453242 (Breakfield)に記載されるHSV7134、2RH105 およびGAL4、ならびに登録番号ATCC VR-977 およびATCC VR-260としてATCCで寄託されたものが挙げられる。 20

【0095】

遺伝子送達ベクターはまた、例えば、ポリオウイルス (Evansら、Nature 339: 385-388 (1989); および Sabin, J. Biol. Standardization 1: 115-118 (1973)); ライノウイルス; ポックスウイルス (例えば、カナリアポックスウイルスまたはワクシニアウイルス) (Fisher-Hochら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 317-321 (1989); Flexnerら、Ann. N.Y. Acad. Sci. 569: 86-103 (1989); Flexnerら、Vaccine 8: 17-21 (1990)); 米国特許第4, 603, 112号、同第4, 769, 330号および同第5, 017, 487号; WO 89/01973); SV40 (Mulliganら、Nature 277: 108-114 (1979)); インフルエンザウイルス (Luytjesら、Cell 59: 1107-1113 (1989); McMichaelら、N. Eng. J. Med. 309: 13-17 (1983); および Yapら、Nature 273: 238-239 (1978)); HIV (Poznansky, J. Virol. 65: 532-536 (1991)); はしか (EP 0 440, 219); アストロウイルス (Munroeら、J. Vir. 67: 3611-3614 (1993)); およびコロナウイルス、ならびに他のウイルス系 (例えば、EP0, 440, 219; WO 92/06693; 米国特許第5, 166, 057号)を含む、広範な種々の他のウイルスから作製され得る。 30 40

【0096】

(4. 非ウイルス遺伝子送達ベクター)

例えば、核酸発現ベクター; 殺傷されたアデノウイルス単独に連結されたかまたは連結されていないポリカチオン凝縮DNA (例えば、Curriel, Hum Gene Ther 3: 147-154 (1992)を参照のこと); リガンド連結DNA (例えば、Wu, J Biol Chem 264: 16985-16987 (1989)を参照のこと); 真核生物細胞送達ベクター; 光重合したヒドロゲル物質の沈着; 携帯型遺伝子送達 50

粒子銃（米国特許第5, 149, 655号において記載されるような）；米国特許第5, 206, 152号およびWO 92/11033において記載されるような電離放射線；核電荷の中和または細胞膜との融合のような、NET-4阻害アンチセンス分子の発現のための他の遺伝子送達ベクターおよび方法が使用され得る。さらなるアプローチは、Phillip, Mol Cell Biol 14:2411-2418 (1994) および Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. 91:1581-1585 (1994) において記載されている。

【0097】

粒子媒介性送達が、使用され得る。手短にいうと、目的のNET-4阻害アンチセンス分子は、高レベルの発現のための従来の制御配列を含む従来のベクターに挿入され得、次いで、アシアロオロソムコイド（Wuら、J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987) において記載されるような）、インスリン（Hucked, Biochem Pharmacol 40:253-263 (1990) において記載されるような）、ガラクトース（Plank, Bioconjugate Chem 3:533-539 (1992) において記載されるような）、ラクトースまたはトランスフェリンのような細胞標的化リガンドに連結された、ポリリジン、プロタミンおよびアルブミンのようなポリマーDNA結合陽イオンのような合成遺伝子送達分子と共にインキュベートされ得る。

【0098】

裸のDNAもまた、使用され得る。例示的な裸のDNA導入方法は、WO90/11092および米国特許第5, 580, 859号において記載されている。取り込み効率は、生分解性ラテックスビーズを使用して改善され得る。DNAコートラテックスビーズは、ビーズによるエンドサイトーシス開始後、細胞に効率的に輸送される。この方法は、疎水性を増加するためにビーズの処理によってさらに改善され得、それにより、エンドソームの破壊およびDNAの細胞質への放出を促進する。

【0099】

遺伝子送達ビヒクルとして作用し得るリポソームは、米国特許5, 422, 120号、PCT特許公開番号WO95/13796、WO94/23697、およびWO91/144445、ならびに欧州特許公開番号524, 968において記載されている。核酸配列は、高レベル発現のための従来の制御配列を含む従来のベクターに挿入され得、次いで、アシアロオロソムコイド、インスリン、ガラクトース、ラクトース、またはトランスフェリンのような細胞標的化リガンドに連結された、ポリリジン、プロタミン、およびアルブミンのようなポリマーDNA結合陽イオンのような合成遺伝子送達分子と共にインキュベートされ得る。他の送達系は、種々の組織特異的または遍在性の活性プロモーターの制御下で、遺伝子を含むDNAをカプセル化するためのリポソームの使用を含む。使用に適切なさらなる非ウイルス送達は、Woffendinら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91(24):11581-11585 (1994) において記載されるアプローチのような機械的送達系を含む。さらに、このようなベクター送達系のコード配列および発現産物は、光重合化ヒドロゲル物質の沈着を介して送達され得る。

【0100】

例示的なリポソーム遺伝子送達ビヒクルおよびポリカチオン性遺伝子送達ビヒクルは、米国特許第5, 422, 120号および同第4, 762, 915号、PCT特許公開番号WO95/13796、WO94/23697、およびWO91/14445、欧州特許公開番号524, 968、およびStarriner, Biochemistry, 236~240頁(1975) W. H. Freeman, San Francisco; Shokai, Biochem. Biophys. Acta. 600:1 (1980); Bayer, Biochem. Biophys. Acta. 550:464 (1979); Rivet, Methods Enzymol. 149:119 (1987); Wang, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84:7851 (1987); Plant, Anal. Biochem. 176:420 (1989) において記載されるよう

10

20

30

40

50

な遺伝子送達ビヒクルである。

【0101】

本発明のポリヌクレオチドは、例えば、腫瘍細胞におけるNET-4メッセンジャーRNAの発現を検出するための診断キットとして処方され得る。診断キットは、ストリンジェントな条件下で配列番号1にハイブリダイズし得る少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含み得る。好ましくは、このポリヌクレオチドは、少なくとも10塩基対長である。好ましい実施形態において、このキットは、配列番号18、19、20、21および22からなる群より選択される少なくとも1つのオリゴヌクレオチド、ならびにストリンジェントな条件下で配列番号1のポリヌクレオチドとハイブリダイズしない少なくとも1つのコントロールオリゴヌクレオチドを含む。このキットはまた、これらのオリゴヌクレオチドの少なくとも3つ（例えば、5つ全てのオリゴヌクレオチド）を含み得る。 10

【0102】

（実施例）

以下の実験的な例は、限定ではなく、例示のために提供される。

【0103】

（実施例1）

（NET-4 mRNAのアンチセンス阻害）

（A. トランスフェクション混合物の調製）

各トランスフェクション混合物について、キャリア分子（好ましくは、リピトイド（lipitoid）またはコレステロイド（cholesteroid））を、水中0.5mMの作業濃度に調製し、そして超音波処理して均一な溶液を生じ、そして0.45μm PVDF膜を通してろ過した。アンチセンスオリゴヌクレオチド（配列番号2～6）を、滅菌Millipore水中で100μMの作業濃度に調製した。 20

【0104】

オリゴヌクレオチドを、マイクロチューブ中で、OptiMEMTM（Gibco/BRL）中に2μMまでか、または約20μgオリゴ/mlのOptiMEMTMまで希釈した。別々のマイクロチューブ中で、リピトイドまたはコレステロイド（代表的に、約1.5～2nmolリピトイド/μg アンチセンスオリゴヌクレオチドの量で）を、オリゴヌクレオチドを希釈するために使用されたのと同じ容量のOptiMEMTM中に希釈した。希釈されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを、希釈したリピトイドに直ぐに添加し、そして上下にピペッティングすることによって混合した。 30

【0105】

（B. トランスフェクション）

SW620またはMRC9細胞を、トランスフェクションの1日前に、血清を含む増殖培地中で、組織培養皿にプレートし、60～90%のトランスフェクションの密度を得た。オリゴヌクレオチド/リピトイド混合物を、混合の直後に、100～300nMアンチセンスオリゴヌクレオチドの最終濃度まで、細胞に添加した。細胞を、トランスフェクション混合物と共に、37℃、5%CO₂で、4～24時間インキュベートした。インキュベーション後、トランスフェクション混合物を取り出し、そして血清を含む通常の増殖培地と交換した。 40

【0106】

総RNAを、製造業者のプロトコルに従って、RNEASYTMキット（Qiagen Corporation, Chatsworth, CA）を使用して抽出した。

【0107】

（C. 逆転写）

標的mRNAのレベルを、Roche LightCyclerTMリアルタイムPCR機械を使用して定量した。標的mRNAについての値を、内部コントロール（例えば、β-アクチン）に対して正規化した。

【0108】

各20μlの反応について、抽出されたRNA（一般に、全部で0.2～1μg）を、滅 50

菌した0.5または1.5 mlの微小遠心管に配置し、そして水を、総量12.5 μ lまで添加した。2.5 μ l H_2O 、2.0 μ l 10 $\times$ 反応緩衝液、10 μ l オリゴdT (20 pmol)、1.0 μ l dNTPミックス (各10 mM)、0.5 μ l RNAsin (登録商標) (20 u) (Ambion, Inc., Hialeah, FL)、および0.5 μ l MMLV逆転写酵素 (50 u) (Ambion, Inc.)を (列挙された順序で) 混合することによって調製した、7.5 μ lの緩衝液/酵素混合物を、各管に添加した。内容物を、上下にピペティングすることによって混合し、そして反応混合物を、42 $^{\circ}C$ で1時間、インキュベートした。各管の内容物を、増幅の前に遠心した。

【0109】

(D. RT反応物のLightCyclerTM増幅)

10

以下の順で混合することによって、増幅混合物を調製した：1 $\times$ PCR緩衝液II、3 mM $MgCl_2$ 、140 μ M 各dNTP、0.175 pmol 各オリゴ、1:50、000希釈のSYBR (登録商標) Green、0.25 mg/ml BSA、1ユニット Taqポリメラーゼ、および20 μ lまでの H_2O (PCR緩衝液IIは、Perkin-Elmer, Norwalk, CTより10 $\times$ 濃度で入手可能である)。1 $\times$ 濃度で、PCR緩衝液IIは、10 mM Tris pH 8.3および50 mM KClを含む。SYBR (登録商標) Green (Molecular Probes, Eugene, OR)は、二本鎖DNAに結合される場合、蛍光を発する色素である。二本鎖PCR産物が増幅の間に生成される場合、SYBR (登録商標) Green由来の蛍光が増加する。

20

【0110】

増幅産物の各20 μ lのアリコートに、2 μ lのテンプレートRTを添加し、そして標準的なプロトコルに従って増幅を行なった。

【0111】

以下の表1において示されるように、NET-4メッセージレベルは、SW620細胞におけるアクチンメッセージと比較して減少した。ASは、アンチセンスオリゴヌクレオチドを示し、そしてRCは、対応するコントロールオリゴヌクレオチドを示す。

【0112】

【表1】

表1

30

SW620細胞におけるNET-4 mRNAレベルに対するNET-4
オリゴヌクレオチドの効果

アンチセンス オリゴヌクレオチド	アクチンに対して正規 化されたNET-4メッセージ レベル
配列番号2 AS	0.04
配列番号3 AS	0.06
配列番号4 AS	0.07
配列番号5 AS	0.03
配列番号6 AS	0.02
配列番号7 RC	0.27
配列番号8 RC	0.32
配列番号9 RC	0.35
配列番号10 RC	0.54
配列番号11 RC	0.26

40

50

(実施例2)

(細胞増殖アッセイ)

細胞を、1ウェル当たり5000細胞の密度で、96ウェルプレートに播種した。4日間の増殖アッセイについて、各日に1つ、5つの独立した96ウェルプレートを調製した。一晚のインキュベーション後、細胞を、上記の手順を使用してトランスフェクトした。増殖アッセイの各日に、全ての培地を、1つのプレートから取り出し、そして -70°C で凍結した。4日目に、全てのプレートを、各ウェルにおいて、DNAの量、従って細胞の数を決定するQuantosTMアッセイキット(Stratagene, La Jolla, CA)中で発育させた。結果を、以下の表2～6に示す。各表において、結果は、蛍光の単位で表される。

10

【0113】

【表2】

表2

SW620細胞の増殖に対するNET-4オリゴヌクレオチド509の効果

オリゴヌクレオチド	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
野生型 (オリゴなし)	1100	2300	2600	3800	4400
509AS (配列番号2)	1100	1500	1300	1600	2500
509RC (配列番号7)	1300	1300	1700	2500	2900

20

表3

SW620細胞の増殖に対するNET-4オリゴヌクレオチド353の効果

オリゴヌクレオチド	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
野生型 (オリゴなし)	1100	2300	2700	3800	4300
353AS (配列番号3)	1000	1500	1000	1400	2500
353RC (配列番号8)	1300	1700	1900	2300	2300

30

表4

SW620細胞の増殖に対するNET-4オリゴヌクレオチド446の効果

オリゴヌクレオチド	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
野生型 (オリゴなし)	1100	2400	2700	3800	4400
446AS (配列番号4)	1000	1700	1300	1800	2800
446RC (配列番号9)	1300	2400	2600	3500	4000

40

表5

SW620細胞の増殖に対するNET-4オリゴヌクレオチド960の効果

オリゴヌクレオチド	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
野生型 (オリゴなし)	1000	2300	2700	3800	4400
960AS (配列番号5)	1000	1100	1000	1100	1700
960RC (配列番号11)	1200	1700	2000	2600	3400

50

表 6

MRC 9細胞の増殖に対するNET-4オリゴヌクレオチド960の効果

オリゴヌクレオチド	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
野生型 (オリゴなし)	400	1000	1200	1700	2100
960AS (配列番号5)	450	800	800	1100	1090
960RC (配列番号11)	400	600	800	1250	1300

表 7

SW620細胞の増殖に対するNET-4オリゴヌクレオチド999の効果

オリゴヌクレオチド	0日目	1日目	2日目	3日目	4日目
野生型 (オリゴなし)	1100	2400	2700	3800	4400
999AS (配列番号6)	1100	1700	1300	1700	2600
999RC (配列番号11)	1300	2000	2000	2900	3100

オリゴヌクレオチドは以下の通りである：

【0114】

【表3】

hNET-4: 509AS	CTGGGTCAAAGCCGCCGAGATCG (配列番号2)
hNET-4: 509RC	GCTAGAGCCGCCGAAACTGGGTC (配列番号7)
hNET-4: 353AS	TTCAGGACCCTTGTAAGTGCTTCCCG (配列番号3)
hNET-4: 353RC	GCCCTTCGTGATGTTCCCAGGACTT (配列番号8)
hNET-4: 446AS	CCATGCCCACAGTCCAATTCCAAGA (配列番号4)
hNET-4: 446RC	AGAACCTTAACCTGACACCCGTACC (配列番号9)
hNET-4: 960AS	GCTGGTCAACTTCTGGTTTTTGCTT (配列番号5)
hNET-4: 960RC	TCCGTTTTTGGTCTTCAACTGGTCG (配列番号10)
hNET-4: 999AS	AAACTGGGGCACACAGCCTTTTCGT (配列番号6)
hNET-4: 999RC	TGCTTTCCGACACACGGGGTCAAA (配列番号11)

(実施例3)

(Net-4 mRNA発現)

多くの正常組織および腫瘍細胞株の定量的PCRを使用して、Net-4の発現を分析した。定量的リアルタイムPCRを、製造業者の指示に従って、Roche RNA単離キットを使用して、細胞からRNAをまず単離することによって行なった。1マイクログラムのRNAを使用して、製造業者の緩衝液および推奨された濃度のオリゴdT、ヌクレオチド、およびRnasinを使用して、MLV逆転写酵素(Ambion)を使用して、第1鎖cDNAを合成する。この第1鎖cDNAは、機械のマニュアルにおいて推奨されるように、Roche light-cyclerを使用する定量的リアルタイムPCRについてのテンプレートとして機能した。Net-4を、正方向プライマーGATCC CGCAGAAGATGTCAACAACA (配列番号12) および逆方向プライマーT

10

20

30

40

50

CTGCAGCAATGCAATGCCCTATGA（配列番号13）を用いて増幅した。PCR産物を、内部標準と比較して増幅が増幅の直線的段階に入るサイクルに基づいて、そして製造業者によって提供されるソフトウェアを使用して定量した。第1鎖cDNA反応における量または全テンプレートにおける小さな差異を、正方向プライマー5'-CGGGAATTCGTGCGTGACATTAAAG-3'（配列番号14）および逆方向プライマー：5'-TGATCTCCTTCTGCAATCCTGTCGG-3'（配列番号15）を使用する別々の定量的PCR反応中の増幅されたアクチンの量に対して正規化することによって、減少させた。正常組織におけるNet-4 mRNAレベルについての結果を、表8に示す；腫瘍細胞株におけるNet-4 mRNAレベルについての結果を、表9に示す。

10

【0115】

【表4】

表8
正常組織におけるNet-4 mRNAレベル

組織型	グルクロニダーゼB mRNAレベルに対して正規化されたNet-4 mRNAレベル
脳(全体)	9
心臓	1.3
腎臓	3.3
肝臓	0.2
肺	0.6
結腸	0.4
骨髄	4.2
小腸	0.6
脾臓	0.2
胃	0.3
胸腺	1
前立腺	0.8
骨格筋	1.6
精巣	1.6
子宮	4.6
胎児脳	14.1
胎児肝臓	8.2
脊髄	6.8
胎盤	0.4
副腎	0.5
脾臓	0.4
唾液腺	2.5
気管	1.4
乳腺	1.5

20

30

【0116】

【表5】

表9
腫瘍細胞株におけるNet-4 mRNAレベル

細胞株	細胞株の詳細	アクチンmRNAレベル に対して正規化され たNet-4 mRNAレベル
MDA-MB-231	ヒト乳癌(骨および/または肺 に対して転移性)	0.80
MDA-MB-435	ヒト乳癌(肺に対して転移性)	0.07
Alab	ヒト乳癌(高転移性)	0.02
MCF-7	ヒト乳癌(骨および/または肺 に対して転移性)	0.34
MDA-MB-468	ヒト乳癌(転移性)	1.16
184B5	化学的に形質転換された正常 乳房上皮細胞	0.18
HMVEC	ヒト微小血管内皮細胞	1.64
DU 145	ヒト前立腺癌(脳に対して転移)	1.32
HT1080	ヒト線維肉腫	1.55
SKOV3	ヒト卵巣癌	0.79
OVCAR3	ヒト卵巣癌	0.07
Km12C	ヒト結腸癌(低転移性)	0.21
Km12L4	ヒト結腸癌(高転移性)	0.43
293	アデノウイルス5 DNAで形質転 換されたヒト腎臓	0.86
Caco.2	ヒト腸上皮細胞	0.36
SW620	ヒト結腸腺癌	1.18
LS174T	ヒト結腸癌	2.00
LOVO	ヒト結腸腺癌(左鎖骨上領域に 対して転移性)	0.61
HT29	ヒト結腸腺癌	1.09
SW480	ヒト結腸腺癌(リンパ節に対して 転移性)	1.29
HCT116	ヒト結腸癌	7.11
Colo 320 DN	ヒト結腸癌	4.30
T84	ヒト結腸癌(肺に対して転移性)	0.57
HCT15	ヒト結腸直腸癌	0.93
DLD-1	ヒト結腸腺癌	0.75
LNCAP	ヒト前立腺癌(左鎖骨上リンパ 節に対して転移性)	0.64
WOCA	原発性前立腺上皮	1.21
PC3	ヒト前立腺癌	2.46
GRDP2	原発性前立腺上皮	2.79
U373MG	ヒトグリア芽腫	0.46
IMR90	ヒト肺線維芽細胞	1.75

10

20

30

40

50

(実施例4)

(細胞増殖のアンチセンス阻害)

コロニー形成に対するNet-4発現の効果を、軟質寒天アッセイにおいて試験した。軟質寒天アッセイを、最初に、細胞上での層形成の数時間以内に新たにプレーティングした、2 mlの0.6%寒天含有培地の下層を構築することにより実施した。細胞層を、0.05%トリプシンを用いてプレートから上述のようにトランスフェクトされた細胞を除去し、そして培地中で二度洗浄することにより、下層上に形成した。この細胞をCoulterカウンターで計数し、そして培地中に1 ml当たり 10^6 個になるまで再懸濁した。10 μ lのアリコートをし、96ウェルプレート中に培地と共にプレーティングするか(WST1での計数をチェックするために)、または軟質寒天アッセイのためにさらに希釈した。2000の細胞を、0.6%寒天下層上の800 μ lの0.4%寒天にプレーティングした(二連ウェル)。細胞層の寒天が固まった後、2 mlの培地を上面に滴下し、そしてアンチセンスまたは逆コントロールオリゴを、送達ビヒクルなしで添加した。新鮮な培地およびオリゴを3~4日毎に添加した。10日~3週間でコロニーが形成した。コロニーの領域を目視で計数した。WST-1代謝値を用いて、出発細胞数における小さな差に

ついて補正した。

【0117】

表10に示すように、Net-4に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド(960AS; 配列番号5)は、逆コントロールオリゴヌクレオチド(960RC; 配列番号10)と比較してコロニー数の減少を導いた。アンチセンスオリゴヌクレオチド960AS(配列番号5)によるコロニー数の減少は、kRAS mRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドkRAS 2576AS(GCATGTGGAAAGGTAGGGAGGCAAGGA)(配列番号16)による減少(逆コントロールオリゴヌクレオチドkRAS 2576RC(AGAACGGAGGGATGGAAAGGTGTACG)(配列番号17)と比較した場合)と同様である。

10

【0118】

【表6】

表10
SW620細胞の増殖に対するNet-4オリゴヌクレオチドの効果

オリゴヌクレオチド	SW620細胞の増殖 (WTS1代謝により測定される、 出発細胞数に対して正規化され たコロニー数)
960AS(配列番号5)	245
960RC(配列番号10)	470
kRAS 2576AS(配列番号16)	270
kRAS 2576RC(配列番号17)	400

20

(実施例5)

(結腸マイクロアレイ分析)

正常および癌性組織を、当該分野で周知のレーザー捕捉顕微解剖(LCM)技術を用いて患者から収集した(例えば、Ohyamaら(2000)Biotechniques 29:530-6; Curranら(2000)Mol. Pathol. 53:64-8; Suarez-Quianら(1999)Biotechniques 26:328-35; Simoneら(1998)Trends Genet 14:272-6; Coniaら(1997)J. Clin. Lab. Anal. 11:28-38; Emmert-Buckら(1996)Science 274:998-1001を参照のこと)。

30

【0119】

cDNAプローブを、患者細胞から単離した総RNAから調製した。LCMは特定の細胞型の単離を提供し、実質的に同質の細胞サンプルを提供するので、これは、類似の純粋なRNAサンプルを提供した。

【0120】

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用いて逆転写してcDNAにし、次に第2鎖のDNA合成を行った。次いで、cDNAを、T7プロモーター媒介発現(例えば、Luoら(1999)Nature Med 5:117-122を参照のこと)を用いてインビトロで転写して、アンチセンスRNAを生成し、次いでこのアンチセンスRNAをcDNAに変換した。第2セットのcDNAを、T7プロモーターを用いてインビトロで再度転写し、アンチセンスRNAを提供した。必要に応じて、このRNAを再度cDNAに変換し、第3ラウンドまでのT7媒介増幅が、より多くのアンチセンスRNAを生成することを可能にした。従って、この手順は、蛍光標識に用いられる最終的なRNAを生成するために2回または3回のラウンドのインビトロ転写を提供した。蛍光プローブを、最初に、アンチセンスRNA混合物にコントロールRNAを加え、そしてこのRNA出発物質から蛍光標識したcDNAを生成することにより作製した。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

40

50

Cy 3 蛍光色素（緑色）を用いて標識し、そして腫瘍細胞から調製した cDNA プローブを Cy 5 蛍光色素（赤色）を用いて標識した。

【0121】

用いた各アレイは、同一の空間的配置およびコントロールスポットセットを有した。各マイクロアレイを2つの領域に分割した。各領域は、各アレイにおける合計約9216スポットに対して各々半分、12群の32×12スポットを有するアレイを有した。単位アレイ当たり少なくとも2つの各クローンの複製物を提供するこの2つの領域は、同一にスポットされる。スポットを0.5 kb~2.0 kbのPCR増幅産物を用いて達成し、そしてMolecular Dynamics Gen III スポッターを用い、製造元の推奨に従ってスポットした。このアレイにおける24の領域の各々の第1列は、約32のコントロールスポット（4つのネガティブコントロールおよび8つの試験ポリヌクレオチド）を有した。試験ポリヌクレオチドを、2~600 pg/スライドの濃度範囲および1:1の比で、標識反応の前に各サンプルにスパイク（spike）した。各アレイの設計のために、2つのスライドを、標識反応において逆標識（reverse-labeled）した試験サンプルとハイブリダイズさせた。これは、各クローンについて4連の測定（各サンプルについて、1つの色が2つ、そしてもう一方の色が2つ）を提供した。

10

【0122】

示差的発現アッセイを、等量の腫瘍細胞由来のプローブと同一患者の正常細胞由来のプローブとを混合することにより実施した。このアレイを、5×SSC/0.2% SDS/1 mM EDTA 中で60℃にて約2時間インキュベーションすることによりプレハイブリダイズさせ、次いで水中で3回、イソプロパノール中で2回洗浄した。アレイのプレハイブリダイゼーション後、次いでプローブ混合物を、高ストリンジェンシーの条件下（50%ホルムアミド、5×SSC、および0.2% SDS 中で42℃にて一晚）でこのアレイとハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、アレイを以下のようにして55℃にて3回洗浄した：1) 1×SSC/0.2% SDS 中での第1の洗浄；2) 0.1×SSC/0.2% SDS 中での第2の洗浄；および3) 0.1×SSC 中での第3の洗浄。

20

【0123】

次いで、このアレイを、Molecular Dynamics Generation III 二色レーザースキャナー/ディテクターを用いて、緑色および赤色についてスキャンした。この画像をBioDiscovery Autogeneを用いて処理し、各スキャンセット由来のデータを正規化して、正常に対する発現比を提供した。マイクロアレイ実験からのデータを、E. J. Moler、M. A. Boyle、およびF. M. Randazzoらにより2000年11月20日に出願された米国特許出願番号60/252,358（表題「Precision and accuracy in cDNA microarray data」）（この出願は本明細書中で参考として詳細に援用される）に記載されるアルゴリズムに従って分析した。

30

【0124】

この実験を繰り返した（両方の「色の方向（color direction）」においてアッセイを実施するために、今回は、反対の色を用いて2つのプローブを標識した）。各実験を、時々、さらに2つのスライド（各色の方向において1つ）を用いて繰り返した。アレイにおける各配列の蛍光レベルを4つのアレイ由来の8つの複製スポット/遺伝子または2つのアレイ由来の4つの複製スポット/遺伝子もしくはいくつかの他の順列の幾何学的平均の比として表した。このデータを各複製領域に存在するスパイクしたポジティブコントロールを用いて正規化し、そしてこの正規化の正確性を、各差異の有意性の最終的な決定に含めた。また、各スポットの蛍光強度を各複製領域におけるネガティブコントロールと比較して、各サンプルにおいてどのスポットが有意な発現レベルを検出したかを決定した。

40

【0125】

蛍光強度の統計的分析を各セットの複製スポットに適用して、各示差的測定の正確性およ

50

び有意性を評価し、これにより各患者の腫瘍サンプルと正常サンプルとの間に発現における差がないという帰無仮説を試験する p 値を得た。マイクロアレイの最初の分析の間、 $p > 10^{-3}$ の場合にこの仮説を受け入れ、そして示差的な比率を、これらのスポットについて 1.000 に設定した。全ての他のスポットは、腫瘍サンプルと正常サンプルとの間の発現における有意な差を有する。腫瘍サンプルが検出可能な発現を有し、正常サンプルがそうでない場合、この比率を 1000 で切り捨てる。なぜなら正常サンプルにおける発現についての値はゼロであり、そしてこの比率は数学的に有用な値ではない（例えば、無限大）からである。正常サンプルが検出可能な発現を有し、そして腫瘍サンプルがそうでない場合、この比率を 0.001 までで切り捨てる。なぜなら、腫瘍サンプルにおける発現の値はゼロであり、この比率は数学的に有用な値ではないからである。これらの後者の 2 つの状態を、本明細書中で「オン／オフ」として参照する。データベースのテーブルを、95% 信頼水準 ($p > 0.05$) を用いて構成させた。

【0126】

結腸腫瘍細胞における Net-4 の発現レベルにおける（一致する正常な結腸細胞と比較しての）差は、91.67% の患者において 2 倍以上（「 $\geq 2 \times$ 」）であり、66.67% の患者において 2.5 倍以上であり、そして 33.33% の試験した患者において 5 倍以上であった。

【0127】

（実施例 6）

（インサイチュハイブリダイゼーション分析）

インサイチュハイブリダイゼーション分析を実施し、正常結腸組織および腫瘍肺組織、ならびに腫瘍結腸組織および腫瘍肺組織における Net-4 の発現を、以下のオリゴヌクレオチドの混合物を用いて特徴付けた：

Net-4 オリゴ 864

CCCTTG TAGTG C（配列番号 18）

Net-4 オリゴ 865

TGAAGTATTTGATGC（配列番号 19）

Net-4 オリゴ 866

CCGATATGCTCTG（配列番号 20）

Net-4 オリゴ 867

TTAGGTTCCAAATCA（配列番号 21）

Net-4 オリゴ 868

CGACTTTCTACTG（配列番号 22）

この結果を図 2 に示す（図 2A－腫瘍結腸組織、図 2B－腫瘍肺組織、図 2C－正常結腸組織、および図 2D－正常肺組織）。

【0128】

前述から、本発明の特定の実施形態が、説明の目的で本明細書中に記載されているが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく種々の改変がなされ得ることが理解される。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外は限定されない。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

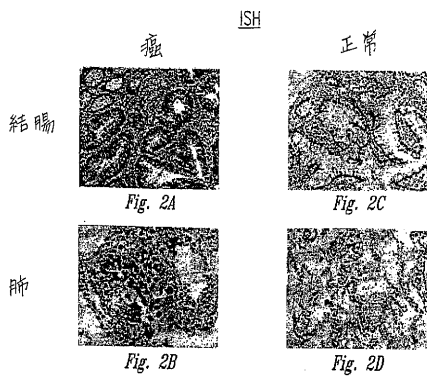
図 1 は、4 回貫通タンパク質の図式的な構造を示す。アミノ末端（N）およびカルボキシル末端（C）ならびに細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインが、ボールドフェースで示されている。18 個の 4 回貫通遺伝子のうち 12 個で見出された高度に保存されたアミノ酸は、丸の中に示されている。14 個以上の 4 回貫通で見出された高度に保存されたアミノ酸は、ボールドフェースの丸の中に示されている。保存された PXS C モチーフは、種々の 4 回貫通の EC2 内の異なる位置に配置され、従って浮いている矢印で示されている。アスタリスクは、膜貫通ドメイン内の保存された荷電アミノ酸を示す。

【図 2】

図 2 は、Net-4 864 : CCCTTG TAGTG C（配列番号 18）；Net-4 50

865 : T G A A G T A T T T G A T G C (配列番号19) ; N e t - 4 866 : C
 C G A T A T G C T C T G (配列番号20) ; N e t - 4 867 : T T A G G T T C C
 A A T C A (配列番号21) ; および N e t - 4 868 : C G A C T T T C A T A C T
 G (配列番号22) からなるオリゴヌクレオチドの混合物を使用する、腫瘍結腸組織 (図
 2 A)、腫瘍肺組織 (図 2 B)、正常結腸組織 (図 2 C)、および正常肺組織 (図 2 D)
 のインサイチュハイブリダイゼーション分析を示す。

【図 2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/98350 A2(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
C12N 15/11, A61K 48/00, A61P 35/00, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/18415

(22) International Filing Date: 5 June 2001 (05.06.2001)

(25) Filing Language: English

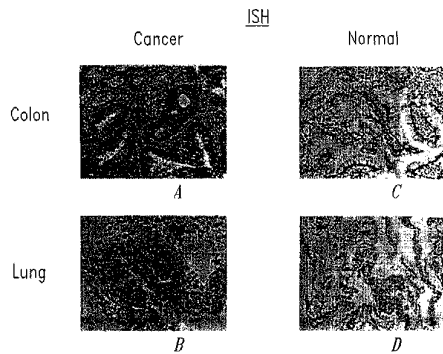
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/209,865 7 June 2000 (07.06.2000) US

(71) Applicant: CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560
Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).(72) Inventors: REINHARD, Christoph; 4560 Horton
Street, Emeryville, CA 94608 (US). JEFFERSON, Anne,
B.; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).
WINTER, Jill, A.; 4560 Horton Street, Emeryville, CA
94608 (US). RANDAZZO, Filippo; 4560 Horton Street,
Emeryville, CA 94608 (US).(74) Agents: BLACKBURN, Robert, P. et al.; Chiron Cor-
poration, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916
(US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING NEOPLASTIC DISEASE USING NET-4 MODULATORS



(57) Abstract: Modulators of NET-4 are provided that reduce the expression or biological activities of NET-4 or the expression of NET-4 mRNA in a mammalian cell. NET-4 modulators include antisense molecules, ribozymes, antibodies and antibody fragments, proteins and polypeptides as well as small molecules. NET-4 modulators find use in compositions and methods for decreasing NET-4 gene expression as well as methods for inhibiting the proliferation of mammalian cells, including tumor cells, and methods for treating neoplastic diseases.

WO 01/98350 A2

WO 01/98350 A2



— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
NEOPLASTIC DISEASE USING NET-4 MODULATORS

TECHNICAL FIELD

5 The invention provides compositions and methods for inhibiting NET-4 gene expression and/or biological activity. Such compositions and methods find utility in the treatment of neoplastic disease.

BACKGROUND OF THE INVENTION

NET-4 is a member of the tetraspan transmembrane receptor family.
10 There have been no published reports disclosing the function of the molecule. The tetraspan family is discussed in Maecker, H.T. et al., *FASEB J.* 11:428-442, 1997. Expression of tetraspan genes in lymphoma cell lines is discussed in Ferrer, M. et al., *Clin. Exp. Immunol.* 113:346-352, 1998.

Thus, there is a need in the art for correlation between this protein family
15 and essential or pathological processes. The present invention helps to fulfill this need by disclosing the use of NET-4 antisense oligonucleotides to inhibit proliferation of tumor cells.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides, in one embodiment, inhibitors of NET-4.
20 Inventive inhibitors include, but are not limited to, antisense molecules, ribozymes, antibodies or antibody fragments, proteins or polypeptides as well as small molecules. Exemplary antisense molecules comprise at least 10, 15 or 20 consecutive nucleotides of or hybridize under stringent conditions to the nucleic acid of SEQ ID NO:1. More preferred are antisense molecules that comprise at least 15, 20 or 25 consecutive
25 nucleotides of or hybridize under stringent conditions to the sequence of SEQ ID NO:1. Representative antisense molecules are provided herein as SEQ ID NO:2-6.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

In further embodiments, compositions are provided that comprise one or more NET-4 inhibitor in a pharmaceutically acceptable carrier.

Additional embodiments provide methods of decreasing NET-4 gene expression or biological activity.

5 Each of the methods of the present invention has in common the administration of one or more inventive NET-4 inhibitor to a mammalian cell.

The invention further provides a kit for detecting a colon tumor cell, comprising at least one oligonucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NO:18, 19, 20, 21 and 22.

10 BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 illustrates the schematic structure of tetraspan proteins. Amino (N) and carboxyl (C) termini and extracellular and transmembrane domains are indicated in boldface. Highly conserved amino acids found in 12 of 18 tetraspan genes, are shown in circles. Highly conserved amino acids found in 14 or more tetraspans are shown in boldface circles. The conserved PXSC motif is located at different positions within EC2 in the various tetraspans, and is therefore indicated with floating arrows. Asterisks indicate conserved charged amino acids within the transmembrane domains.

Figure 2 shows *in situ* hybridization analyses of tumor colon tissue (Fig. 2A), tumor lung tissue (Fig. 2B), normal colon tissue (Fig. 2C), and normal lung tissues (Fig. 2D) using a mixture of oligonucleotides consisting of Net-4 864: CCCTTG TAGTGC (SEQ ID NO:18); Net-4 865: TGAAGTATTTGATGC (SEQ ID NO:19); Net-4 866: CCGATATGCTCTG (SEQ ID NO:20); Net-4 867: TTAGGTTCCAATCA (SEQ ID NO:21); and Net-4 868: CGACTTTCATACTG (SEQ ID NO:22).

25 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

NET-4 is a member of the tetraspan superfamily of proteins. The proteins are characterized by four transmembrane domains and two extracellular regions. Within the superfamily is a specific family referred to as NET proteins, for

WO 01/98350

PCT/US01/18415

"new EST tetraspan" (Serru, V. et al., *Biochem. Biophys. Acta* 1478:159-163, 2000). Serru et al. reported the existence of seven NET proteins (designated NET-1 through NET-7), and studied expression in a panel of cell lines. NET-4 was expressed in T lymphoid cell lines, but not by most B lymphoid cell lines studied.

5 To date there is no published information on a putative function for any of the NET proteins. The superfamily itself was discovered in 1990, and as of 1997, twenty members had been identified. It has been suggested that one of the molecule's functions is to group specific cell-surface proteins, thereby increasing the formation and stability of functional signaling complexes. Maecker, H.T. et al., *FASEB J.* 11:428-442, 10 1997. Figure 1 illustrates the schematic structure of tetraspan proteins. The information available to date indicates that some tetraspan proteins may play an inhibitory role in cancer development or growth, while other proteins are expressed at a higher level in cancer cells. For example, expression of CD9 suppresses motility and metastasis in carcinoma cells (Ikeyama, S. et al., *J. Exp. Med.* 177:1231-1237, 1993), 15 and CD9 expression is inversely correlated with metastasis in melanoma cells (Si, Z. et al., *Int. J. Cancer* 54:37-43, 1993). Reduction of CD9 expression correlates with poor prognosis in breast carcinoma (Miyake, M. et al., *Cancer Res.* 56:1244-1249, 1996). Expression of CD82 may suppress metastasis in prostate cancer cell lines (Dong, J. et al., *Science* 268:884-886, 1995).

20 The present invention substantially adds to the information about the role of tetraspan proteins in cancer and also provides methods and compositions for modulating cancer cell growth by inhibiting NET-4 expression. According to the invention, NET-4 is overexpressed in 83% of colon cancer patient samples tested using DNA microarray screening. To further investigate the role of NET-4 expression in 25 tumor cell growth, cells of colon cancer cell line SW620 were exposed to a variety of antisense molecules based on the sequence of NET-4. As shown in Tables 2-5 and 7, transfection of SW620 cells with antisense molecules of SEQ ID NO:2-6, respectively, significantly decreased the proliferation of SW620 cells beginning at day 1 and continuing through day 4. Likewise, transfection of MRC9 cells with antisense

WO 01/98350

PCT/US01/18415

molecules of SEQ ID NO:5 also significantly decreased the proliferation of MRC9 cells (Table 6).

To determine whether the effect on proliferation was due to a specific effect on NET-4 expression, NET-4 message levels were measured in SW620 cells lines exposed to five different antisense molecules. As shown in Table 1, cells exposed to the antisense oligonucleotides had significantly lower levels of NET-4 mRNA when compared to cells treated with the corresponding reverse control oligonucleotides.

Antisense oligonucleotides based on the polynucleotide sequence of NET-4 therefore are specific inhibitors of NET-4 expression, and this correlates with decreased proliferation of colon cancer cells. Antisense oligonucleotides are suitable for *in vivo* treatment of colon cancer and other cancers in which increased NET-4 expression plays a role in cancer cell growth, migration, metastasis, and survival. However, the invention is not limited to use of antisense inhibitors. Based on the results herein, other compositions and methods for inhibiting NET-4 expression or for modulating or inhibiting NET-4 function are also suitable for regulating cell proliferation. Because NET-4 is a transmembrane protein, antibodies are particularly suitable for inhibiting its effect.

The present invention is directed generally to modulating NET-4 expression and function, particularly in cancer cells, more particularly in colon cancer cells. More specifically, the invention provides agonists and antagonists of NET-4, including antisense polynucleotides and ribozymes, proteins or polypeptides, antibodies or fragments thereof and small molecules; compositions comprising NET-4 modulators; methods of supplementing chemotherapeutic and/or radiation treatment of a mammalian cell, as well as methods of treating neoplastic disease. Each of these methods has in common the administration to a mammalian cell of one or more NET-4 modulator.

Inhibitors of NET-4 are Effective in Reducing NET-4 Gene Expression

Inventive NET-4 inhibitors include antisense molecules and ribozymes, proteins or polypeptides, antibodies or fragments thereof as well as small molecules.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

These NET-4 inhibitors share the common feature that they reduce the expression and/or biological activity of NET-4 and, as a consequence, modulate, inhibit, or prevent the growth of cancer cells. In addition to the exemplary NET-4 inhibitors disclosed herein, alternative inhibitors may be obtained through routine experimentation utilizing methodology either specifically disclosed herein or as otherwise readily available to and within the expertise of the skilled artisan.

Antisense Molecules and Ribozymes

NET-4 inhibitors of the present invention include antisense molecules that, when administered to mammalian cells, are effective in reducing, for example, intracellular levels of NET-4 mRNA. Antisense molecules bind in a sequence-specific manner to nucleic acids, such as mRNA or DNA. When bound to mRNA that has complementary sequences, antisense molecules prevent translation of the mRNA (U.S. Patent No. 5,168,053 to Altman et al.; U.S. Patent No. 5,190,931 to Inouye, U.S. Patent No. 5,135,917 to Burch; U.S. Patent No. 5,087,617 to Smith and Clusel et al. *Nucl. Acids Res.* 21:3405-3411 (1993), which describes dumbbell antisense oligonucleotides).

Antisense technology can be used to control gene expression through triple-helix formation, which promotes the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors or regulatory molecules. Gee et al., In Huber and Carr, "Molecular and Immunologic Approaches," Futura Publishing Co. (Mt. Kisco, NY; 1994). Alternatively, an antisense molecule may be designed to hybridize with a control region of the NET-4 gene, e.g., promoter, enhancer or transcription initiation site, and block transcription of the gene; or block translation by inhibiting binding of a transcript to ribosomes. Hirashima et al. in *Molecular Biology of RNA: New Perspectives* (M. Inouye and B. S. Dudoek, eds., 1987 Academic Press, San Diego, p. 401); *Oligonucleotides: Antisense Inhibitors of Gene Expression* (J.S. Cohen, ed., 1989 MacMillan Press, London); Stein and Cheng, *Science* 261:1004-1012 (1993); WO 95/10607; U.S. Patent No. 5,359,051; WO 92/06693; and EP-A2-612844, each of which is incorporated herein by reference.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Briefly, such molecules are constructed such that they are complementary to, and able to form Watson-Crick base pairs with, a region of transcribed NET-4 mRNA sequence. The resultant double-stranded nucleic acid interferes with subsequent processing of the mRNA, thereby preventing protein synthesis.

5 In general, a portion of a sequence complementary to the NET-4 coding region may be used to modulate gene expression. The sequence of NET-4 cDNA is presented herein as SEQ ID NO:1. Alternatively, cDNA constructs that can be transcribed into antisense RNA may be introduced into cells or tissues to facilitate the production of antisense RNA. Thus, as used herein, the phrase "antisense molecules" broadly encompasses antisense oligonucleotides whether synthesized as DNA or RNA molecules as well as all plasmid constructs that, when introduced into a mammalian cell, promote the production of antisense RNA molecules. An antisense molecule may be used, as described herein, to inhibit expression of mRNA or protein, as well as any

10 other gene that requires NET-4 for its expression.

The present invention relates to antisense oligonucleotides designed to interfere with the normal function of NET-4 polynucleotides. Any modifications or variations of the antisense molecule which are known in the art to be broadly applicable to antisense technology are included within the scope of the invention. Such

20 modifications include preparation of phosphorus-containing linkages as disclosed in U.S. Patents 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361, 5,625,050 and 5,958,773.

The antisense compounds of the invention can include modified bases as disclosed in 5,958,773 and patents disclosed therein. The antisense oligonucleotides of

25 the invention can also be modified by chemically linking the oligonucleotide to one or more moieties or conjugates to enhance the activity, cellular distribution, or cellular uptake of the antisense oligonucleotide. Such moieties or conjugates include lipids such as cholesterol, cholic acid, thioether, aliphatic chains, phospholipids, polyamines, polyethylene glycol (PEG), palmityl moieties, and others as disclosed in, for example,

WO 01/98350

PCT/US01/18415

U.S. Patents 5,514,758, 5,565,552, 5,567,810, 5,574,142, 5,585,481, 5,587,371, 5,597,696 and 5,958,773.

Chimeric antisense oligonucleotides are also within the scope of the invention, and can be prepared from the present inventive oligonucleotides using the methods described in, for example, U.S. Patents 5,013,830, 5,149,797, 5,403,711, 5,491,133, 5,565,350, 5,652,355, 5,700,922 and 5,958,773.

In the antisense art a certain degree of routine experimentation may be required to select optimal antisense molecules for particular targets. To be effective, the antisense molecule preferably is targeted to an accessible, or exposed, portion of the target RNA molecule. Although in some cases information is available about the structure of target mRNA molecules, the current approach to inhibition using antisense is via experimentation. According to the invention, this experimentation can be performed routinely by transfecting cells with an antisense oligonucleotide using methods described in Example 1. mRNA levels in the cell can be measured routinely in treated and control cells by reverse transcription of the mRNA and assaying the cDNA levels. The biological effect can be determined routinely by measuring cell growth or viability as is known in the art.

Measuring the specificity of antisense activity by assaying and analyzing cDNA levels is an art-recognized method of validating antisense results. It has been suggested that RNA from treated and control cells should be reverse-transcribed and the resulting cDNA populations analyzed. (Branch, A. D., *T.I.B.S.* 23:45-50, 1998.) According to the present invention, cultures of SW620 cells were transfected with five different antisense oligonucleotides designed to target NET-4. These oligonucleotides are shown in SEQ ID NO:2-6. The levels of mRNA corresponding to NET-4 were measured in treated and control cells. SEQ ID NO:2-6 caused dramatic decreases in NET-4 mRNA when normalized to actin mRNA levels.

Antisense molecules for use as described herein can be synthesized by any method known to those of skill in this art including chemical synthesis by, for example, solid phase phosphoramidite chemical synthesis. WO 93/01286; U.S. Patent No. 6,043,090; U.S. Patent No. 5,218,088; U.S. Patent No. 5,175,269; and U.S. Patent

WO 01/98350

PCT/US01/18415

No. 5,109,124, each of which is incorporated herein by reference. Alternatively, RNA molecules may be generated by *in vitro* or *in vivo* transcription of DNA sequences encoding the NET-4 cDNA, or a portion thereof, provided that the DNA is incorporated into a vector downstream of a suitable RNA polymerase promoter (such as, *e.g.*, T3, T7 or SP6). Large amounts of antisense RNA may be produced by incubating labeled nucleotides with a linearized NET-4 cDNA fragment downstream of such a promoter in the presence of the appropriate RNA polymerase. Such antisense molecules are preferably at least 10, 15 or 20 nucleotides in length. More preferably, antisense molecules are at least 25 nucleotides in length. Within certain embodiments, an antisense molecule of the present invention will comprise a sequence that is unique to the NET-4 cDNA sequence of SEQ ID NO:1 or that can hybridize to the cDNA of SEQ ID NO:1 under conditions of high stringency. Within the context of the present invention, high stringency means standard hybridization conditions such as, *e.g.*, 5XSSPE, 0.5% SDS at 65°C or the equivalent thereof. See Sambrook et al., *supra* and

15 *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, *supra* incorporated herein by reference.

Antisense oligonucleotides are typically designed to resist degradation by endogenous nucleolytic enzymes by using such linkages as: phosphorothioate, methylphosphonate, sulfone, sulfate, ketyl, phosphorodithioate, phosphoramidate, phosphate esters, and other such linkages (Agrwal et al., *Tetrahedron Lett.* 28:3539-3542 (1987); Miller et al., *J. Am. Chem. Soc.* 93:6657-6665 (1971); Stec et al., *Tetrahedron Lett.* 26:2191-2194 (1985); Moody et al., *Nucl. Acids Res.* 12:4769-4782 (1989); Uznanski et al., *Nucl. Acids Res.* 17(12):4863-4871 (1989); Letsinger et al., *Tetrahedron* 40:137-143 (1984); Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.* 54:367-402 (1985);

25 Eckstein, *Trends Biol. Sci.* 14:97-100 (1989); Stein, in: *Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression*, Cohen, Ed, Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989); Jager et al., *Biochemistry* 27:7237-7246 (1988)). Possible additional or alternative modifications include, but are not limited to, the addition of flanking sequences at the 5' and/or 3' ends and/or the inclusion of nontraditional bases such as

WO 01/98350

PCT/US01/18415

inosine, queosine and wybutosine, as well as acetyl- methyl-, thio- and other modified forms of adenine, cytidine, guanine, thymine and uridine.

Within alternate embodiments of the present invention, NET-4 inhibitors may be ribozymes. A ribozyme is an RNA molecule that specifically cleaves RNA substrates, such as mRNA, resulting in specific inhibition or interference with cellular gene expression. As used herein, the term "ribozymes" includes RNA molecules that contain antisense sequences for specific recognition, and an RNA-cleaving enzymatic activity. The catalytic strand cleaves a specific site in a target RNA at greater than stoichiometric concentration.

A wide variety of ribozymes may be utilized within the context of the present invention, including for example, the hammerhead ribozyme (for example, as described by Forster and Symons, *Cell* 48:211-220 (1987); Haseloff and Gerlach, *Nature* 328:596-600 (1988); Walbot and Bruening, *Nature* 334:196 (1988); Haseloff and Gerlach, *Nature* 334:585 (1988)); the hairpin ribozyme (for example, as described by Haseloff et al., U.S. Patent No. 5,254,678, issued October 19, 1993 and Hempel et al., European Patent Publication No. 0 360 257, published March 26, 1990); and *Tetrahymena* ribosomal RNA-based ribozymes (see Cech et al., U.S. Patent No. 4,987,071). Ribozymes of the present invention typically consist of RNA, but may also be composed of DNA, nucleic acid analogs (e.g., phosphorothioates), or chimerics thereof (e.g., DNA/RNA/RNA).

Ribozymes can be targeted to any RNA transcript and can catalytically cleave such transcripts (U.S. Patent No. 5,272,262; U.S. Patent No. 5,144,019; and U.S. Patent Nos. 5,168,053, 5,180,818, 5,116,742 and 5,093,246 to Cech et al.). According to certain embodiments of the invention, any such NET-4 mRNA-specific ribozyme, or a nucleic acid encoding such a ribozyme, may be delivered to a host cell to effect inhibition of NET-4 gene expression. Ribozymes and the like may therefore be delivered to the host cells by DNA encoding the ribozyme linked to a eukaryotic promoter, such as a eukaryotic viral promoter, such that upon introduction into the nucleus, the ribozyme will be directly transcribed.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Proteins and Polypeptides

In addition to the antisense molecules and ribozymes disclosed herein, NET-4 modulators of the present invention also include proteins or polypeptides that are effective in either reducing NET-4 gene expression or in decreasing one or more of
5 NET-4's biological activities. A variety of methods are readily available in the art by which the skilled artisan may, through routine experimentation, rapidly identify such NET-4 inhibitors. The present invention is not limited by the following exemplary methodologies.

Inhibitors of NET-4's biological activities encompass those proteins
10 and/or polypeptides that interfere with cell proliferation, particularly tumor cell proliferation, especially colon cell proliferation. Such interference may occur indirectly through non- or un-competitive inhibition such as via binding to an allosteric site, or by binding to a region that normally binds to another protein. Accordingly, available methods for identifying proteins and/or polypeptides that bind to NET-4 may be
15 employed to identify lead compounds that may, through the methodology disclosed herein, be characterized for their NET-4 inhibitory activity.

A vast body of literature is available to the skilled artisan that describes methods for detecting and analyzing protein-protein interactions. Phizicky, E.M. et al., *Microbiological Reviews* 59:94-123 (1995) incorporated herein by reference. Such
20 methods include, but are not limited to physical methods such as, *e.g.*, protein affinity chromatography, affinity blotting, immunoprecipitation and cross-linking as well as library-based methods such as, *e.g.*, protein probing, phage display and two-hybrid screening. Other methods that may be employed to identify protein-protein interactions include genetic methods such as use of extragenic suppressors, synthetic lethal effects
25 and unlinked noncomplementation. Exemplary methods are described in further detail below.

Inventive NET-4 inhibitors may be identified through biological screening assays that rely on the direct interaction between the NET-4 protein and a panel or library of potential inhibitor proteins. Biological screening methodologies,
30 including the various "n-hybrid technologies," are described in, for example, Vidal, M.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

et al., *Nucl. Acids Res.* 27(4):919-929 (1999); Frederickson, R.M., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(1):90-6 (1998); Brachmann, R.K. et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(5):561-568 (1997); and White, M.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:10001-10003 (1996) each of which is incorporated herein by reference.

5 The two-hybrid screening methodology may be employed to search new or existing target cDNA libraries for NET-4 binding proteins that have inhibitory properties. The two-hybrid system is a genetic method that detects protein-protein interactions by virtue of increases in transcription of reporter genes. The system relies on the fact that site-specific transcriptional activators have a DNA-binding domain and
10 a transcriptional activation domain. The DNA-binding domain targets the activation domain to the specific genes to be expressed. Because of the modular nature of transcriptional activators, the DNA-binding domain may be severed covalently from the transcriptional activation domain without loss of activity of either domain. Furthermore, these two domains may be brought into juxtaposition by protein-protein
15 contacts between two proteins unrelated to the transcriptional machinery. Thus, two hybrids are constructed to create a functional system. The first hybrid, i.e., the bait, consists of a transcriptional activator DNA-binding domain fused to a protein of interest. The second hybrid, the target, is created by the fusion of a transcriptional activation domain with a library of proteins or polypeptides. Interaction between the
20 bait protein and a member of the target library results in the juxtaposition of the DNA-binding domain and the transcriptional activation domain and the consequent up-regulation of reporter gene expression.

 A variety of two-hybrid based systems are available to the skilled artisan that most commonly employ either the yeast Gal4 or *E. coli* LexA DNA-binding
25 domain (BD) and the yeast Gal4 or herpes simplex virus VP16 transcriptional activation domain. Chien, C.-T. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:9578-9582 (1991); Dalton, S. et al., *Cell* 68:597-612 (1992); Durfee, T.K. et al., *Genes Dev.* 7:555-569 (1993); Vojtek, A.B. et al., *Cell* 74:205-214 (1993); and Zervos, A.S. et al., *Cell* 72:223-232 (1993). Commonly used reporter genes include the *E. coli lacZ* gene as well as
30 selectable yeast genes such as *HIS3* and *LEU2*. Fields, S. et al., *Nature (London)*

WO 01/98350

PCT/US01/18415

340:245-246 (1989); Durfee, T.K., *supra*; and Zervos, A.S., *supra*. A wide variety of activation domain libraries are readily available in the art such that the screening for interacting proteins may be performed through routine experimentation.

Suitable bait proteins for the identification of NET-4 interacting proteins may be designed based on the NET-4 cDNA sequence presented herein as SEQ ID NO:1. Such bait proteins include either the full-length NET-4 protein or fragments thereof.

Plasmid vectors, such as, e.g., pBTM116 and pAS2-1, for preparing NET-4 bait constructs and target libraries are readily available to the artisan and may be obtained from such commercial sources as, e.g., Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen (Carlsbad, CA) and Stratagene (La Jolla, CA). These plasmid vectors permit the in-frame fusion of cDNAs with the DNA-binding domains as LexA or Gal4BD, respectively.

NET-4 modulators of the present invention may alternatively be identified through one of the physical or biochemical methods available in the art for detecting protein-protein interactions.

NET-4 is believed to interact with the other cell surface proteins. Through the protein affinity chromatography methodology, lead compounds to be tested as potential NET-4 inhibitors may be identified by virtue of their specific retention to NET-4 when either covalently or non-covalently coupled to a solid matrix such as, e.g., Sepharose beads. The preparation of protein affinity columns is described in, for example, Beeckmans, S. et al., *Eur. J. Biochem.* 117:527-535 (1981) and Formosa, T. et al., *Methods Enzymol.* 208:24-45 (1991). Cell lysates containing the full complement of cellular proteins may be passed through the NET-4 affinity column. Proteins having a high affinity for NET-4 will be specifically retained under low-salt conditions while the majority of cellular proteins will pass through the column. Such high affinity proteins may be eluted from the immobilized NET-4 under conditions of high-salt, with chaotropic solvents or with sodium dodecyl sulfate (SDS). In some embodiments, it may be preferred to radiolabel the cells prior to preparing the lysate as an aid in identifying the NET-4 specific binding proteins. Methods for radiolabeling

WO 01/98350

PCT/US01/18415

mammalian cells are well known in the art and are provided, *e.g.*, in Sopta, M. et al., *J. Biol. Chem.* 260:10353-10360 (1985).

Suitable NET-4 proteins for affinity chromatography may be fused to a protein or polypeptide to permit rapid purification on an appropriate affinity resin. For example, the NET-4 cDNA may be fused to the coding region for glutathione S-transferase (GST) which facilitates the adsorption of fusion proteins to glutathione-agarose columns. Smith et al., *Gene* 67:31-40 (1988). Alternatively, fusion proteins may include protein A, which can be purified on columns bearing immunoglobulin G; oligohistidine-containing peptides, which can be purified on columns bearing Ni^{2+} ; the maltose-binding protein, which can be purified on resins containing amylose; and dihydrofolate reductase, which can be purified on methotrexate columns. One exemplary tag suitable for the preparation of NET-4 fusion proteins that is presented herein is the epitope for the influenza virus hemagglutinin (HA) against which monoclonal antibodies are readily available and from which antibodies an affinity column may be prepared.

Proteins that are specifically retained on a NET-4 affinity column may be identified after subjecting to SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Thus, where cells are radiolabeled prior to the preparation of cell lysates and passage through the NET-4 affinity column, proteins having high affinity for NET-4 may be detected by autoradiography. The identity of NET-4 specific binding proteins may be determined by protein sequencing techniques that are readily available to the skilled artisan, such as Mathews, C.K. et al., *Biochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp.166-170 (1990).

Antibodies or Antibody Fragments

NET-4 modulators (antagonists and agonists) of the present invention include antibodies and/or antibody fragments that are effective in modulating NET-4 gene expression and/or biological activity. Suitable antibodies may be monoclonal, polyclonal or humanized monoclonal antibodies. Antibodies may be derived by conventional hybridoma based methodology, from antisera isolated from NET-4

WO 01/98350

PCT/US01/18415

inoculated animals or through recombinant DNA technology. Alternatively, inventive antibodies or antibody fragments may be identified *in vitro* by use of one or more of the readily available phage display libraries. Exemplary methods are disclosed herein.

In one embodiment of the present invention, NET-4 modulators are
5 monoclonal antibodies that may be produced as follows. NET-4 protein may be produced, for example, by expression of NET-4 cDNA in a baculovirus based system. By this method, NET-4 cDNA or a fragment thereof is ligated into a suitable plasmid vector that is subsequently used to transfect Sf9 cells to facilitate protein production. In addition, it may be advantageous to incorporate an epitope tag or other moiety to
10 facilitate affinity purification of the NET-4 protein. Clones of Sf9 cells expressing NET-4 are identified, *e.g.*, by enzyme linked immunosorbant assay (ELISA), lysates are prepared and the NET-4 protein purified by affinity chromatography and the purified protein is injected, intraperitoneally, into BALB/c mice to induce antibody production. It may be advantageous to add an adjuvant, such as Freund's adjuvant, to increase the
15 resulting immune response.

Serum is tested for the production of specific antibodies and spleen cells from animals having a positive specific antibody titer are used for cell fusions with myeloma cells to generate hybridoma clones. Supernatants derived from hybridoma clones are tested for the presence of monoclonal antibodies having specificity against
20 NET-4. For a general description of monoclonal antibody methodology, *see, e.g.*, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

In addition to the baculovirus expression system, other suitable bacterial or yeast expression systems may be employed for the expression of NET-4 protein or
25 polypeptides thereof. As with the baculovirus system, it may be advantageous to utilize one of the commercially available affinity tags to facilitate purification prior to inoculation of the animals. Thus, the NET-4 cDNA or fragment thereof may be isolated by, *e.g.*, agarose gel purification and ligated in frame with a suitable tag protein such as 6-His, glutathione-S-transferase (GST) or other such readily available affinity tag. *See,*

WO 01/98350

PCT/US01/18415

e.g., Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press pp. 160-161 (*ed.* Glick, B.R. and Pasternak, J.J. 1998).

In other embodiments of the present invention, NET-4 modulators are humanized anti-NET-4 monoclonal antibodies. The phrase "humanized antibody" refers to an antibody derived from a non-human antibody - typically a mouse monoclonal antibody. Alternatively, a humanized antibody may be derived from a chimeric antibody that retains or substantially retains the antigen-binding properties of the parental, non-human, antibody but which exhibits diminished immunogenicity as compared to the parental antibody when administered to humans. The phrase "chimeric antibody," as used herein, refers to an antibody containing sequence derived from two different antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) which typically originate from different species. Most typically, chimeric antibodies comprise human and murine antibody fragments, generally human constant and mouse variable regions.

Because humanized antibodies are far less immunogenic in humans than the parental mouse monoclonal antibodies, they can be used for the treatment of humans with far less risk of anaphylaxis. Thus, these antibodies may be preferred in therapeutic applications that involve *in vivo* administration to a human such as, *e.g.*, use as radiation sensitizers for the treatment of neoplastic disease or use in methods to reduce the side effects of, *e.g.*, cancer therapy.

Humanized antibodies may be achieved by a variety of methods including, for example: (1) grafting the non-human complementarity determining regions (CDRs) onto a human framework and constant region (a process referred to in the art as "humanizing"), or, alternatively, (2) transplanting the entire non-human variable domains, but "cloaking" them with a human-like surface by replacement of surface residues (a process referred to in the art as "veneering"). In the present invention, humanized antibodies will include both "humanized" and "veneered" antibodies. These methods are disclosed in, *e.g.*, Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoever et al., *Science* 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immunol.* 31(3):169-

WO 01/98350

PCT/US01/18415

217 (1994); and Kettleborough, C.A. et al., *Protein Eng.* 4(7):773-83 (1991) each of which is incorporated herein by reference.

The phrase "complementarity determining region" refers to amino acid sequences which together define the binding affinity and specificity of the natural Fv region of a native immunoglobulin binding site. See, e.g., Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242 (1991). The phrase "constant region" refers to the portion of the antibody molecule that confers effector functions. In the present invention, mouse constant regions are substituted by human constant regions. The constant regions of the subject humanized antibodies are derived from human immunoglobulins. The heavy chain constant region can be selected from any of the five isotypes: alpha, delta, epsilon, gamma or mu.

One method of humanizing antibodies comprises aligning the non-human heavy and light chain sequences to human heavy and light chain sequences, selecting and replacing the non-human framework with a human framework based on such alignment, molecular modeling to predict the conformation of the humanized sequence and comparing to the conformation of the parent antibody. This process is followed by repeated back mutation of residues in the CDR region which disturb the structure of the CDRs until the predicted conformation of the humanized sequence model closely approximates the conformation of the non-human CDRs of the parent non-human antibody. Such humanized antibodies may be further derivatized to facilitate uptake and clearance, e.g., via Ashwell receptors. See, e.g., U.S. Patent Nos. 5,530,101 and 5,585,089 which patents are incorporated herein by reference.

It will be appreciated that alternative NET-4 inhibitor antibodies may be readily obtained by other methods commonly known in the art. One exemplary methodology for identifying antibodies having a high specificity for NET-4 is the phage display technology.

Phage display libraries for the production of high-affinity antibodies are described in, for example, Hoogenboom, H.R. et al., *Immunotechnology* 4(1):1-20 (1998); Hoogenboom, H.R., *Trends Biotechnol.* 15:62-70 (1997) and McGuinness, B. et

WO 01/98350

PCT/US01/18415

al., *Nature Bio. Technol.* 14:1149-1154 (1996) each of which is incorporated herein by reference. Among the advantages of the phage display technology is the ability to isolate antibodies of human origin that cannot otherwise be easily isolated by conventional hybridoma technology. Furthermore, phage display antibodies may be isolated *in vitro* without relying on an animal's immune system.

Antibody phage display libraries may be accomplished, for example, by the method of McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990) which is incorporated herein by reference. In short, the coding sequence of the antibody variable region is fused to the amino terminus of a phage minor coat protein (pIII). Expression of the antibody variable region-pIII fusion construct results in the antibody's "display" on the phage surface with the corresponding genetic material encompassed within the phage particle.

NET-4 protein suitable for screening a phage library may be obtained by, for example, expression in baculovirus Sf9 cells as described, *supra*. Alternatively, the NET-4 coding region may be PCR amplified using primers specific to the desired region of the NET-4 protein. A desired region can be selected based on the structure shown in Figure 1. As discussed above, the NET-4 protein may be expressed in *E. coli* or yeast as a fusion with one of the commercially available affinity tags.

The resulting fusion protein may then be adsorbed to a solid matrix, *e.g.*, a tissue culture plate or bead. Phage expressing antibodies having the desired anti-NET-4 binding properties may subsequently be isolated by successive panning, in the case of a solid matrix, or by affinity adsorption to a NET-4 antigen column. Phage having the desired NET-4 inhibitory activities may be reintroduced into bacteria by infection and propagated by standard methods known to those skilled in the art. See Hoogenboom, H.R., *Trends Biotechnol.*, *supra* for a review of methods for screening for positive antibody-pIII phage.

Small Molecules

The present invention also provides small molecule NET-4 modulators (antagonists and agonists) that may be readily identified through routine application of

WO 01/98350

PCT/US01/18415

high-throughput screening (HTS) methodologies. Persidis, A., *Nature Biotechnology* 16:488-489 (1998). HTS methods generally refer to those technologies that permit the rapid assaying of lead compounds, such as small molecules, for therapeutic potential. HTS methodology employs robotic handling of test materials, detection of positive
5 signals and interpretation of data. Such methodologies include, *e.g.*, robotic screening technology using soluble molecules as well as cell-based systems such as the two-hybrid system described in detail above.

A variety of cell line-based HTS methods are available that benefit from their ease of manipulation and clinical relevance of interactions that occur within a
10 cellular context as opposed to in solution. Lead compounds may be identified via incorporation of radioactivity or through optical assays that rely on absorbance, fluorescence or luminescence as read-outs. Gonzalez, J.E. et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(6):624-631 (1998) incorporated herein by reference.

HTS methodology may be employed, *e.g.*, to screen for lead compounds
15 that block one of NET-4's biological activities, particularly its ability to interact with other cell-surface proteins. By this method, NET-4 protein may be immunoprecipitated from cells expressing the protein and applied to wells on an assay plate suitable for robotic screening. Individual test compounds may then be contacted with the immunoprecipitated protein and the effect of each test compound on NET-4 activity
20 assessed.

Methods for Assessing the Efficacy of NET-4 Modulators

Lead molecules or compounds, whether antisense molecules or ribozymes, proteins and/or peptides, antibodies and/or antibody fragments or small molecules, that are identified either by one of the methods described herein or via
25 techniques that are otherwise available in the art, may be further characterized in a variety of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* animal model assay systems for their ability to inhibit NET-4 gene expression or biological activity. As discussed in further detail in the Examples, NET-4 inhibitors of the present invention are effective in reducing NET-4 expression levels and inhibiting cancer cell proliferation. Thus, the present invention

WO 01/98350

PCT/US01/18415

further discloses methods that permit the skilled artisan to assess the effect of candidate inhibitors on each of these parameters.

As noted above and as presented in the Examples, candidate NET-4 inhibitors may be tested by administration to cells that either express endogenous NET-4 or that are made to express NET-4 by transfection of a mammalian cell, such as SW620, with a recombinant NET-4 plasmid construct.

Effective NET-4 inhibitory molecules will reduce the levels of NET-4 mRNA as determined, *e.g.*, by Northern blot or RT-PCR analysis. Example 1; Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press (1989) and *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press (ed. Glick, B.R. and Pasternak, J.J. 1998) incorporated herein by reference, or may reduce the levels of NET-4 protein in the cell. The effectiveness of a given candidate antisense molecule may be assessed by comparison with a control "antisense" molecule known to have no substantial effect on NET-4 expression when administered to a mammalian cell. Exemplary control molecules include the RC oligonucleotides disclosed in Example 2.

NET-4 inhibitors effective in reducing NET-4 gene expression and/or cell proliferation by one or more of the methods discussed herein may be further characterized *in vivo* for efficacy in one of the readily available animal model systems. The various animal model systems for study of cancer and genetic instability associated genes are discussed in, for example, Donehower, L.A. *Cancer Surveys* 29:329-352 (1997) incorporated herein by reference.

Administration of NET-4 Inhibitors and Compositions Thereof

The present invention provides NET-4 inhibitors and compositions comprising one or more NET-4 inhibitor as well as methods that employ these inventive inhibitors in *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* applications where it is advantageous to reduce or eliminate the expression or activity of NET-4 or a functionally downstream molecule. NET-4 inhibitors may find use as drugs for

WO 01/98350

PCT/US01/18415

supplementing cancer therapeutics and other agents. NET-4 inhibitors may also find use in other diseases of hyperproliferation.

Compositions may be administered parenterally, topically, orally or locally for therapeutic treatment. Preferably, the compositions are administered orally or parenterally, *i.e.*, intravenously, intraperitoneally, intradermally or intramuscularly.

5 Inventive compositions will include one or more NET-4 inhibitor and may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. A variety of aqueous carriers may be used, *e.g.*, water, buffered water, 0.4% saline, 0.3% glycine and the like, and may include other proteins for enhanced stability, such as albumin, lipoprotein, globulin, etc., subjected to mild chemical modifications or the like.

NET-4 inhibitors useful in the treatment of disease in mammals will often be prepared substantially free of other naturally occurring immunoglobulins or other biological molecules. Preferred NET-4 inhibitors will also exhibit minimal toxicity when administered to a mammal.

15 The compositions of the invention may be sterilized by conventional, well known sterilization techniques. The resulting solutions may be packaged for use or filtered under aseptic conditions and lyophilized, the lyophilized preparation being combined with a sterile solution prior to administration. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions, such as pH adjusting and buffering agents, tonicity adjusting agents and the like, for example, sodium acetate, sodium lactate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride and stabilizers (*e.g.*, 1-20% maltose, etc.).

25 The selection of the appropriate method for administering NET-4 inhibitors of the present invention will depend on the nature of the application envisioned as well as the nature of the NET-4 inhibitor. Thus, for example, the precise methodology for administering a NET-4 inhibitor will depend upon whether it is an antisense molecule, a protein and/or peptide, an antibody or antibody fragment or a small molecule. Other considerations include, for example, whether the NET-4

WO 01/98350

PCT/US01/18415

inhibitor will be used to inhibit tumor cell growth, invasion, or metastasis, or as an adjunct to other cancer therapeutics.

A variety of methods are available in the art for the administration of antisense molecules. Exemplary methods include gene delivery techniques, including
5 both viral and non-viral based methods as well as liposome mediated delivery methods.

Gene delivery methodologies will be effective to, for example, reduce tumor cell proliferation, or supplement radiation and/or chemotherapeutic treatment of tumors. Wheldon, T.E. et al., *Radiother Oncol* 48(1):5-13 (1998) (gene delivery methodologies for enhancement of fractionated radiotherapy). By these methodologies,
10 substantial therapeutic benefit may be achieved despite transfection efficiencies significantly less than 100%, transient retention of the transfected inhibitor and/or existence of a subpopulation of target cells refractory to therapy.

Alternatively, gene delivery methodology may be used to directly knock out endogenous NET-4 within tumor cells. For example, the NET-4 gene may be
15 targeted by transfection of a gene delivery vector carrying a NET-4 inhibitor. Preferential transfection into or expression within tumor cells may be achieved through use of a tissue-specific or cell cycle-specific promoter, such as, e.g., promoters for prostate-specific antigen or for immunoglobulin genes (Vile, R.G. et al., *Cancer Res.* 53:962-967 (1993) and Vile, R.G., *Semin. Cancer Biol.* 5:437-443 (1994)) or through
20 the use of trophic viruses that are confined to particular organs or structures, such as, e.g., a replication selective and neurotrophic virus that can only infect proliferating cells in the central nervous system.

Thus, to achieve therapeutic benefit, NET-4 within the tumor cells should be preferentially inhibited. This can be accomplished by transfecting a gene
25 expressing a NET-4 inhibitor, a NET-4 antisense molecule, a NET-4 gene specific repressor, or an inhibitor of the protein product of the NET-4 gene.

As used herein, the phrase "gene delivery vector" refers generally to a nucleic acid construct that carries and, within certain embodiments, is capable of directing the expression of an antisense molecule of interest, as described in, for
30 example, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*,

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Ch. 21, pp. 555-590 (ed. B.P. Glick and J.J. Pasternak, 2nd ed. 1998); Jolly, *Cancer Gene Ther.* 1:51-64 (1994); Kimura, *Human Gene Ther.* 5:845-852 (1994); Connelly, *Human Gene Ther.* 6:185-193 (1995); and Kaplitt, *Nat. Gen.* 6:148-153 (1994).

A number of virus and non-virus based gene delivery vector systems have been described that are suitable for the administration of NET-4 inhibitors. Virus based gene delivery systems include, but are not limited to retrovirus, such as Moloney murine leukemia virus, spumaviruses and lentiviruses; adenovirus; adeno-associated virus; and herpes-simplex virus vector systems. Viruses of each type are readily available from depositories or collections such as the American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209) or may be isolated from known sources using commonly available materials and techniques.

The gene delivery vector systems of the present invention will find applications both in *in vivo* as well as *ex vivo* therapeutic regimens. Each of these applications is described in further detail below.

1. Retroviral Gene Delivery Vector Systems

Within one aspect of the present invention, retroviral gene delivery vectors are provided that are constructed to carry or express a NET-4 inhibitory antisense molecule. As used herein, the term "NET-4 inhibitory antisense molecule" refers generally to a nucleic acid sequence having NET-4 inhibitory activity. More specifically, such antisense molecules will reduce NET-4 gene expression. Retroviral gene delivery vectors of the present invention may be readily constructed from a wide variety of retroviruses, including for example, B, C, and D type retroviruses as well as spumaviruses and lentiviruses. See *RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory (2nd ed.1985).

Any of the above retroviruses may be readily utilized in order to assemble or construct retroviral gene delivery vectors given the disclosure provided herein, and standard recombinant DNA techniques. See, e.g., Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2d

WO 01/98350

PCT/US01/18415

ed. 1989) and Kunkle, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:488 (1985). In addition, within certain embodiments of the invention, portions of the retroviral gene delivery vectors may be derived from different retroviruses.

5 A retroviral vector, suitable for the expression of a NET-4 inhibitory antisense molecule, must include at least one transcriptional promoter/enhancer or locus defining element(s), or other elements that control gene expression by other means such as alternate splicing, nuclear RNA export, post-translational modification of messenger, or post-transcriptional modification of protein. Such vector constructs must also include a packaging signal, long terminal repeats (LTRs) or portion thereof, and
10 positive and negative strand primer binding sites appropriate to the retrovirus used (if these are not already present in the retroviral vector). Optionally, the retroviral vector may also include a signal that directs polyadenylation, selectable markers such as Neomycin resistance, TK, hygromycin resistance, phleomycin resistance histidinol resistance, or *DHFR*, as well as one or more restriction sites and a translation
15 termination sequence. Within one aspect of the present invention, retroviral gene delivery vector constructs are provided comprising a 5' LTR, a tRNA binding site, a packaging signal, one or more heterologous sequences, an origin of second strand DNA synthesis and a 3' LTR, wherein the vector construct lacks *gag/pol* or *env* coding sequences.

20 Other retroviral gene delivery vectors may likewise be utilized within the context of the present invention, including, for example, those disclosed in the following each of which is incorporated herein by reference: EP 0,415,731; WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; U.S. Patent No. 5,219,740; WO 93/11230; WO 93/10218; Vile et al., *Cancer Res.* 53:3860-3864 (1993); Vile et al.,
25 *Cancer Res.* 53:962-967 (1993); Ram et al., *Cancer Res.* 53:83-88 (1993); Takamiya et al., *J. Neurosci. Res.* 33:493-503 (1992); Baba et al., *J. Neurosurg.* 79:729-735 (1993); U.S. Patent No. 4,777,127, GB 2,200,651, EP 0,345,242 and WO 91/02805.

Packaging cell lines suitable for use with the above-described retroviral gene delivery vector constructs may be readily prepared. See, e.g., U.S. Patent Nos.
30 5,716,832 and 5,591,624. These packaging cell lines may be utilized to create producer

WO 01/98350

PCT/US01/18415

cell lines (also termed vector cell lines or "VCLs") for the production of recombinant vector particles. It may be preferred to use packaging cell lines made from human (e.g., HT1080 cells) or mink parent cell lines, thereby allowing production of recombinant retroviruses that avoid inactivation in human serum.

5 2. Adeno-Associated Viral Gene Delivery Vector Systems

Adeno-associated viruses (AAV) possess a number of qualities that make them particularly suitable for the development of gene delivery vectors generally and for the delivery of polynucleotides encoding NET-4 inhibitory antisense molecules in particular. For a general review of AAV expression systems, see Rabinowitz et al.,
10 *Current Opin. Biotech.* 9(5):470-475 (1998). AAV is a non-pathogenic, defective human parvovirus that is non-infective without an adeno or herpes helper virus. Thus, in the absence of a helper virus, AAV becomes integrated latently into the host genome. In addition, AAV has the advantage over the retroviruses, discussed above, in being able to transduce a wide range of both dividing and quiescent
15 cell types.

A variety of AAV gene delivery vectors may be utilized to direct the expression of one or more NET-4 inhibitor antisense molecule. Representative examples of such vectors include the AAV vectors disclosed by Srivastava in WO 93/09239; Samulski, et al. *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); Mendelson, et al. *Virol.*
20 166:154-165 (1988); and Flotte, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(22):10613-10617 (1993) incorporated herein by reference.

Briefly, an AAV gene delivery vector of the present invention may include, in order, a 5' adeno-associated virus inverted terminal repeat; a polynucleotide encoding the NET-4 inhibitory antisense molecule; a sequence operably linked to the
25 NET-4 inhibitory antisense molecule that regulates its expression in a target tissue, organ or cell; and a 3' adeno-associated virus inverted terminal repeat. A suitable regulatory sequence for the expression of NET-4 inhibitory antisense molecule is, e.g., the enhancer/promoter sequence of cytomegalovirus (CMV). In addition, the AAV

WO 01/98350

PCT/US01/18415

vector may preferably have a polyadenylation sequence such as the bovine growth hormone (BGH) polyadenylation sequence.

Generally, AAV vectors should have one copy of the AAV ITR at each end of the NET-4 inhibitory antisense molecule, to allow replication, packaging, efficient integration into the host cell genome and rescue from the chromosome. The 5' ITR sequence consists of nucleotides 1 to 145 at the 5' end of the AAV DNA genome, and the 3' ITR includes nucleotides 4681 to 4536 of the AAV genome. Preferably, the AAV vector may also include at least 10 nucleotides following the end of the ITR (*i.e.*, a portion of the so-called "D region").

Optimal packaging of an adeno-associated virus gene delivery vector requires that the 5' and 3' ITRs be separated by approximately 2-5 kb. It will be apparent, however, that the ideal spacing between ITR sequences may vary depending on the particular packaging system utilized. This spacing may be achieved by incorporating a "stuffer" or "filler" polynucleotide fragment to bring the total size of the nucleic acid sequence between the two ITRs to between 2 and 5 kb. Thus, where the NET-4 inhibitory antisense molecule is smaller than 2-5 kb, a non-coding stuffer polynucleotide may be incorporated, for example, 3' to the 5' ITR sequence and 5' of the NET-4 inhibitory antisense molecule. The precise nucleotide sequence of the stuffer fragment is not an essential element of the final construct.

Depending upon the precise application contemplated, rather than incorporating a stuffer fragment, multiple copies of the NET-4 inhibitory antisense molecule may be inserted, *inter alia*, to achieve the optimal ITR sequence spacing. It may be preferred to organize the polynucleotides as two or more separate transcription units each with its own promoter and polyadenylation signal.

Recombinant AAV vectors of the present invention may be generated from a variety of adeno-associated viruses, including for example, serotypes 1 through 6. For example, ITRs from any AAV serotype are expected to have similar structures and functions with regard to replication, integration, excision and transcriptional mechanisms.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Within certain embodiments of the invention, expression of the NET-4 inhibitory antisense molecule may be accomplished by a separate promoter (e.g., a viral promoter). Representative examples of suitable promoters in this regard include a CMV promoter, an RSV promoter, an SV40 promoter, or a MoMLV promoter. Other promoters that may similarly be utilized within the context of the present invention include cell or tissue specific promoters or inducible promoters. Representative inducible promoters include tetracycline-response promoters (e.g., the "Tet" promoter) as described in Gossen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:5547-5551 (1992); Gossen et al., *Science* 268:1766-1769 (1995); Baron et al., *Nucl. Acids Res.* 25:2723-2729 (1997); Blau et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:797-799 (1999); Bohl et al., *Blood* 92:1512-1517 (1998); and Haberman et al., *Gene Therapy* 5:1604-1611 (1998); the ecdysone promoter system as described in No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:3346-3351 (1996); and other regulated promoters or promoter systems as described in Rivera et al., *Nat. Med.* 2:1028-1032 (1996).

The AAV gene delivery vector may also contain additional sequences, for example from an adenovirus, which assist in effecting a desired function for the vector. Such sequences include, for example, those which assist in packaging the AAV gene delivery vector in adenovirus particles.

Packaging cell lines suitable for producing adeno-associated viral vectors may be routinely prepared given readily available techniques. See, e.g., U.S. Patent No. 5,872,005, incorporated herein by reference. At a minimum, suitable packaging systems for AAV gene delivery systems of the present invention will include the AAV replication and capsid genes.

Preferred packaging cell lines may contain both an AAV helper virus as well as an AAV gene delivery vector containing the NET-4 inhibitory antisense molecule. For detailed descriptions of representative packaging cell line systems, see, e.g. Holscher, C. et al., *J. Virol.* 68:7169-7177 (1994); Clark, K.R. et al., *Hum. Gene Ther.* 6:1329-1341 (1995); and Tamayosa, K. et al., *Hum. Gen. Ther.* 7:507-513 (1996) which are incorporated herein by reference.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Alternatively, packaging of AAV may be achieved *in vitro* in a cell free system to obviate transfection protocols or packaging cell lines. Such *in vitro* systems incorporate an AAV gene delivery vector bearing the NET-4 inhibitory antisense molecule and a source of Rep-protein, capsid-protein and Adenovirus proteins that supply helper-viral functions. The latter proteins are typically supplied in the form of a cell extract. Representative *in vitro* systems are further described in Ding, L. et al., *Gen. Ther.* 4:1167-1172 (1997) and Zhou, Z. et al., *J. Virol.* 72:3241-3247 (1998) which are incorporated herein by reference.

3. Other Viral Gene Delivery Vector Systems

In addition to retroviral vectors and adeno-associated virus-based vectors, numerous other viral gene delivery vector systems may also be utilized for the expression of NET-4 inhibitory antisense molecules. For example, within one embodiment of the invention adenoviral vectors may be employed. Representative examples of such vectors include those described by, for example, Berkner, *Biotechniques* 6:616-627 (1988); Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); WO 93/9191; Kolls et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(1):215-219 (1994); Kass-Eisler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(24):11498-502 (1993); Guzman et al., *Circulation* 88(6):2838-48 (1993); Guzman et al., *Cir. Res.* 73(6):1202-1207 (1993); Zabner et al., *Cell* 75(2):207-216 (1993); Li et al., *Hum. Gene Ther.* 4(4):403-409 (1993); Caillaud et al., *Eur. J. Neurosci.* 5(10):1287-1291 (1993); Vincent et al., *Nat. Genet.* 5(2):130-134 (1993); Jaffe et al., *Nat. Genet.* 1(5):372-378 (1992); and Levrero et al., *Gene* 101(2):195-202 (1991); and WO 93/07283; WO 93/06223; and WO 93/07282.

Gene delivery vectors of the present invention also include herpes vectors. Representative examples of such vectors include those disclosed by Kit in *Adv. Exp. Med. Biol.* 215:219-236 (1989); and those disclosed in U.S. Patent No. 5,288,641 and EP 0176170 (Roizman). Additional exemplary herpes simplex virus vectors include HFEM/ICP6-LacZ disclosed in WO 95/04139 (Wistar Institute), pHSVlac described in Geller, *Science* 241:1667-1669 (1988), and in WO 90/09441 and WO 92/07945; HSV Us3::pgC-lacZ described in Fink, *Human Gene Therapy* 3:11-19

WO 01/98350

PCT/US01/18415

(1992); and HSV 7134, 2 RH 105 and GAL4 described in EP 0453242 (Breakefield), and those deposited with the ATCC as accession numbers ATCC VR-977 and ATCC VR-260.

Gene delivery vectors may also be generated from a wide variety of other viruses including, for example, poliovirus (Evans et al., *Nature* 339:385-388 (1989); and Sabin, *J. Biol. Standardization* 1:115-118 (1973)); rhinovirus; pox viruses, such as canary pox virus or vaccinia virus (Fisher-Hoch et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:317-321 (1989); Flexner et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86-103 (1989); Flexner et al., *Vaccine* 8:17-21 (1990); U.S. Patent Nos. 4,603,112, 4,769,330 and 5,017,487; WO 89/01973); SV40 (Mulligan et al., *Nature* 277:108-114 (1979); influenza virus (Luytjes et al., *Cell* 59:1107-1113 (1989); McMichael et al., *N. Eng. J. Med.* 309:13-17 (1983); and Yap et al., *Nature* 273:238-239 (1978)); HIV (Poznansky, *J. Virol.* 65:532-536 (1991)); measles (EP 0 440,219); astrovirus (Munroe et al., *J. Vir.* 67:3611-3614 (1993)); and coronavirus, as well as other viral systems (e.g., EP 0,440,219; WO 92/06693; U.S. Patent No. 5,166,057).

4. Non-viral Gene Delivery Vectors

Other gene delivery vectors and methods that may be employed for the expression of NET-4 inhibitory antisense molecules such as, for example, nucleic acid expression vectors; polycationic condensed DNA linked or unlinked to killed adenovirus alone, for example, see Curiel, *Hum Gene Ther* 3:147-154 (1992); ligand linked DNA, for example, see Wu, *J Biol Chem* 264:16985-16987 (1989); eucaryotic cell delivery vectors; deposition of photopolymerized hydrogel materials; hand-held gene delivery particle gun, as described in US Patent No. 5,149,655; ionizing radiation as described in U.S. 5,206,152 and in WO 92/11033; nucleic charge neutralization or fusion with cell membranes. Additional approaches are described in Philip, *Mol Cell Biol* 14:2411-2418 (1994), and in Woffendin, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:1581-1585 (1994).

Particle mediated gene delivery may be employed. Briefly, the NET-4 inhibitory antisense molecule of interest can be inserted into conventional vectors that

WO 01/98350

PCT/US01/18415

contain conventional control sequences for high level expression, and then be incubated with synthetic gene delivery molecules such as polymeric DNA-binding cations like polylysine, protamine, and albumin, linked to cell targeting ligands such as asialoorosomucoid, as described in Wu, et al., *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987),
5 insulin as described in Hucked, *Biochem Pharmacol* 40:253-263 (1990), galactose as described in Plank, *Bioconjugate Chem* 3:533-539 (1992), lactose or transferrin.

Naked DNA may also be employed. Exemplary naked DNA introduction methods are described in WO 90/11092 and U.S. Patent No. 5,580,859. Uptake efficiency may be improved using biodegradable latex beads. DNA coated
10 latex beads are efficiently transported into cells after endocytosis initiation by the beads. The method may be improved further by treatment of the beads to increase hydrophobicity and thereby facilitate disruption of the endosome and release of the DNA into the cytoplasm.

Liposomes that can act as gene delivery vehicles are described in U.S.
15 Patent No. 5,422,120, PCT Patent Publication Nos. WO 95/13796, WO 94/23697, and WO 91/14445, and European Patent Publication No. 524,968. Nucleic acid sequences can be inserted into conventional vectors that contain conventional control sequences for high level expression, and then be incubated with synthetic gene delivery molecules such as polymeric DNA-binding cations like polylysine, protamine, and albumin, linked
20 to cell targeting ligands such as asialoorosomucoid, insulin, galactose, lactose, or transferrin. Other delivery systems include the use of liposomes to encapsulate DNA comprising the gene under the control of a variety of tissue-specific or ubiquitously-active promoters. Further non-viral delivery suitable for use includes mechanical delivery systems such as the approach described in Woffendin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(24):11581-11585 (1994). Moreover, the coding sequence and the
25 product of expression of such can be delivered through deposition of photopolymerized hydrogel materials.

Exemplary liposome and polycationic gene delivery vehicles are those described in U.S. Patent Nos. 5,422,120 and 4,762,915, in PCT Patent Publication Nos.
30 WO 95/13796, WO 94/23697, and WO 91/14445, in European Patent Publication No.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

524,968 and in Startier, *Biochemistry*, pp. 236-240 (1975) W.H. Freeman, San Francisco; Shokai, *Biochem. Biophys. Acta.* 600:1 (1980); Bayer, *Biochem. Biophys. Acta.* 550:464 (1979); Rivet, *Methods Enzymol.* 149:119 (1987); Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7851 (1987); Plant, *Anal. Biochem.* 176:420 (1989).

5 The polynucleotides of the invention can be formulated as a diagnostic kit for detecting, for example, the expression of NET-4 messenger RNA in a tumor cell. A diagnostic kit may contain at least one oligonucleotide capable of hybridizing to SEQ ID NO:1 under stringent conditions. Preferably the polynucleotide will be at least 10 base pairs in length. In a preferred embodiment, the kit will comprise at least one
10 oligonucleotide selected from the group consisting of SEQ ID Nos: 18, 19, 20, 21 and 22, and at least one control oligonucleotide that does not hybridize with a polynucleotide of SEQ ID NO:1 under stringent conditions. The kit may also comprise at least 3 of these oligonucleotides, such as all five oligonucleotides.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

EXAMPLES

The following experimental examples are offered by way of illustration, not limitation.

5

EXAMPLE 1

ANTISENSE INHIBITION OF NET-4 mRNA

A. Preparation of Transfection Mixture

For each transfection mixture, a carrier molecule, preferably a lipidoid or cholesterolid, was prepared to a working concentration of 0.5 mM in water, sonicated to yield a uniform solution, and filtered through a 0.45 μ m PVDF membrane. The antisense oligonucleotide (SEQ ID NO:2-6) was prepared to a working concentration of 100 μ M in sterile Millipore water.

The oligonucleotide was diluted in OptiMEM™ (Gibco/BRL), in a microfuge tube, to 2 μ M, or approximately 20 μ g oligo/ml of OptiMEM™. In a separate microfuge tube, lipidoid or cholesterolid, typically in the amount of about 1.5-2 nmol lipidoid/ μ g antisense oligonucleotide, was diluted into the same volume of OptiMEM™ used to dilute the oligonucleotide. The diluted antisense oligonucleotide was immediately added to the diluted lipidoid and mixed by pipetting up and down.

B. Transfection

SW620 or MRC9 cells were plated on tissue culture dishes one day in advance of transfection, in growth media with serum, to yield a density at transfection of 60-90%. The oligonucleotide/lipidoid mixture was added to the cells, immediately after mixing, to a final concentration of 100-300 nM antisense oligonucleotide. Cells were incubated with the transfection mixture at 37°C, 5% CO₂ for 4-24 hours. After incubation, the transfection mixture was removed and replaced with normal growth media with serum.

Total RNA was extracted using the RNEASY™ kit (Qiagen Corporation, Chatsworth, CA), according to manufacturer's protocols.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

C. Reverse Transcription

The level of target mRNA was quantitated using the Roche LightCycler™ real-time PCR machine. Values for the target mRNA were normalized versus an internal control (*e.g.*, beta-actin).

5 For each 20 µl reaction, extracted RNA (generally 0.2-1 µg total) was placed into a sterile 0.5 or 1.5 ml microcentrifuge tube, and water was added to a total volume of 12.5 µl. To each tube was added 7.5 µl of a buffer/enzyme mixture, prepared by mixing (in the order listed) 2.5 µl H₂O, 2.0 µl 10X reaction buffer, 10 µl oligo dT (20 pmol), 1.0 µl dNTP mix (10 mM each), 0.5 µl RNAsin® (20u) (Ambion, Inc., Hialeah, FL), and 0.5 µl MMLV reverse transcriptase (50u) (Ambion, Inc.). The contents were mixed by pipetting up and down, and the reaction mixture was incubated at 42°C for 1 hour. The contents of each tube were centrifuged prior to amplification.

D. LightCycler™ Amplification of RT Reactions

An amplification mixture was prepared by mixing in the following order:
15 1X PCR buffer II, 3 mM MgCl₂, 140 µM each dNTP, 0.175 pmol each oligo, 1:50,000 dil of SYBR® Green, 0.25 mg/ml BSA, 1 unit *Taq* polymerase, and H₂O to 20 µl. (PCR buffer II is available in 10X concentration from Perkin-Elmer, Norwalk, CT). In 1X concentration it contains 10 mM Tris pH 8.3 and 50 mM KCl. SYBR® Green (Molecular Probes, Eugene, OR) is a dye which fluoresces when bound to double
20 stranded DNA. As double stranded PCR product is produced during amplification, the fluorescence from SYBR® Green increases.

To each 20 µl aliquot of amplification mixture, 2 µl of template RT was added, and amplification was carried out according to standard protocols.

As shown in Table 1 below, NET-4 message levels were decreased
25 relative to actin message in SW620 cells. AS represents the antisense oligonucleotides and RC represents the corresponding control oligonucleotides.

Table 1

Effect of NET-4 Oligonucleotides on NET-4 mRNA Levels in SW620 Cells

Antisense oligonucleotide	NET-4 message levels normalized to actin
SEQ ID NO:2 AS	0.04
SEQ ID NO:3 AS	0.06
SEQ ID NO:4 AS	0.07
SEQ ID NO:5 AS	0.03
SEQ ID NO:6 AS	0.02
SEQ ID NO:7 RC	0.27
SEQ ID NO:8 RC	0.32
SEQ ID NO:9 RC	0.35
SEQ ID NO:10 RC	0.54
SEQ ID NO: 11 RC	0.26

WO 01/98350

PCT/US01/18415

EXAMPLE 2

CELL PROLIFERATION ASSAY

Cells were seeded into 96 well plates at a density of 5000 cells per well. For a 4 day proliferation assay, 5 independent 96 well plates were prepared, one for each day. After overnight incubation, cells were transfected using the procedure described above. On each day of the proliferation assay, all medium was removed from one plate and frozen at -70°C. On day four, all plates were developed with the Quantos™ assay kit (Stratagene, La Jolla, CA) which determines the amount of DNA, and thus the number of cells, in each well. The results are shown in Tables 2-6 below.

In each table, the results are expressed in units of fluorescence.

Table 2

Effect of NET-4 Oligonucleotide 509 on Growth of SW620 Cells

Oligonucleotide	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Wild type (no oligo)	1100	2300	2600	3800	4400
509AS (SEQ ID NO:2)	1100	1500	1300	1600	2500
509RC (SEQ ID NO:7)	1300	1300	1700	2500	2900

Table 3

Effect of NET-4 Oligonucleotide 353 on Growth of SW620 Cells

Oligonucleotide	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Wild type (no oligo)	1100	2300	2700	3800	4300
353AS (SEQ ID NO:3)	1000	1500	1000	1400	2500
353RC (SEQ ID NO:8)	1300	1700	1900	2300	2300

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Table 4

Effect of NET-4 Oligonucleotide 446 on Growth of SW620 Cells

Oligonucleotide	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Wild type (no oligo)	1100	2400	2700	3800	4400
446AS (SEQ ID NO:4)	1000	1700	1300	1800	2800
446RC (SEQ ID NO:9)	1300	2400	2600	3500	4000

Table 5

Effect of NET-4 Oligonucleotide 960 on Growth of SW620 Cells

Oligonucleotide	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Wild type (no oligo)	1000	2300	2700	3800	4400
960AS (SEQ ID NO:5)	1000	1100	1000	1100	1700
960RC (SEQ ID NO:11)	1200	1700	2000	2600	3400

5

Table 6

Effect of NET-4 Oligonucleotide 960 on Growth of MRC9 Cells

Oligonucleotide	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Wild type (no oligo)	400	1000	1200	1700	2100
960AS (SEQ ID NO:5)	450	800	800	1100	1090
960RC (SEQ ID NO:11)	400	600	800	1250	1300

Table 7

Effect of NET-4 Oligonucleotide 999 on Growth of SW620 Cells

Oligonucleotide	Day 0	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4
Wild type (no oligo)	1100	2400	2700	3800	4400
999AS (SEQ ID NO:6)	1100	1700	1300	1700	2600
999RC (SEQ ID NO:11)	1300	2000	2000	2900	3100

10

The oligonucleotides are:

35.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

	hNET-4: 509AS	CTGGGTCAAAGCCGCCGAGATCG (SEQ ID NO:2)	
	hNET-4: 509RC	GCTAGAGCCGCCGAAACTGGGTC (SEQ ID NO:7)	
5	hNET-4: 353AS	TTCAGGACCCTTGTAAGTGCTTCCCG (SEQ ID NO:3)	
	hNET-4: 353RC	GCCCTTCGTGATGTTCCCAGGACTT (SEQ ID NO:8)	
10	hNET-4: 446AS	CCATGCCCACAGTCCAATTCCAAGA (SEQ ID NO:4)	
	hNET-4: 446RC	AGAACCTTAACCTGACACCCGTACC (SEQ ID NO:9)	
15	hNET-4: 960AS	GCTGGTCAACTTCTGGTTTTTGCCT (SEQ ID NO:5)	
	hNET-4: 960RC	TCCGTTTTGGTCTTCAACTGGTCG (SEQ ID NO:10)	
20	hNET-4: 999AS	AAACTGGGGCACACAGCCTTTCGT (SEQ ID NO:6)	
	hNET-4: 999RC	TGCTTCCGACACACGGGGTCAAA (SEQ ID NO:11)	

EXAMPLE 3

NET-4 MRNA EXPRESSION

25 Quantitative PCR of a number of normal tissues and tumor cell lines was used to analyze expression of Net-4. Quantitative real-time PCR was performed by first isolating RNA from cells using a Roche RNA Isolation kit according to manufacturer's directions. One microgram of RNA was used to synthesize a first-strand cDNA using MMLV reverse transcriptase (Ambion) using the manufacturer's buffer and
30 recommended concentrations of oligo dT, nucleotides, and Rnasin. This first-strand cDNA served as a template for quantitative real-time PCR using the Roche light-cycler as recommended in the machine manual. Net-4 was amplified with the forward primer GATCCCGCAGAAGATGTCATCAACA (SEQ ID NO:12) and the reverse primer TCTGCAGCAATGCAATGCCTATGA (SEQ ID NO:13). PCR product was
35 quantified based on the cycle at which the amplification entered the linear phase of amplification in comparison to an internal standard and using the software supplied by the manufacturer. Small differences in amounts or total template in the first-strand cDNA reaction were eliminated by normalizing to amount of actin amplified in a

WO 01/98350

PCT/US01/18415

separate quantitative PCR reaction using the forward primer 5'-CGGGAAATCGTGC GTGACATTAAG-3' (SEQ ID NO:14) and the reverse primer: 5'-TGATCTCCTTCTGCATCCTGTCGG-3' (SEQ ID NO:15). The results for Net-4 mRNA levels in normal tissues are shown in Table 8; the results for Net-4 mRNA levels in tumor cell lines are shown in Table 9.

Table 8

Net-4 mRNA Levels in Normal Tissues

Tissue type	Net-4 mRNA levels normalized to glucuronidase B mRNA levels
Brain(whole)	9.0
Heart	1.3
Kidney	3.3
Liver	0.2
Lung	0.6
Colon	0.4
Bone marrow	4.2
Small intestine	0.6
Spleen	0.2
Stomach	0.3
Thymus	1
Prostate	0.8
Skeletal muscle	1.6
Testis	1.6
Uterus	4.6
Fetal brain	14.1
Fetal liver	8.2
Spinal cord	6.8
Placenta	0.4
Adrenal gland	0.5
Pancreas	0.4
Salivary gland	2.5
Trachea	1.4
Mammary gland	1.5

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Table 9
Net-4 mRNA Levels in Tumor Cell Lines

Cell line	Description of cell line	Net-4 mRNA levels normalized to actin mRNA levels
MDA-MB-231	Human breast cancer (metastatic to bone and/or lung)	0.80
MDA-MB-435	Human breast cancer (metastatic to lung)	0.07
Alab	Human breast cancer (highly metastatic)	0.02
MCF-7	Human breast cancer (metastatic to bone and/or lung)	0.34
MDA-MB-468	Human breast adenocarcinoma (metastatic)	1.16
184B5	Normal breast epithelial cells, chemically transformed	0.18
HMVEC	Human microvascular endothelial cells	1.64
DU 145	Human prostate cancer (metastatic to brain)	1.32
HT1080	Human fibrosarcoma	1.55
SKOV3	Human ovarian cancer	0.79
OVCAR3	Human ovarian cancer	0.07
Km12C	Human colon cancer (lowly metastatic)	0.21
Km12L4	Human colon cancer (highly metastatic)	0.43
293	Human kidney transformed with adenovirus 5 DNA	0.86
Caco.2	Human intestinal epithelial cell	0.36
SW620	Human colon adenocarcinoma (metastatic to lymph node)	1.18
LS174T	Human colon cancer	2.00
LOVO	Human colon adenocarcinoma (metastatic to left supraclavicular region)	0.61
HT29	Human colon adenocarcinoma	1.09

WO 01/98350

PCT/US01/18415

SW480	Human colon adenocarcinoma (metastatic to lymph node)	1.29
HCT116	Human colon cancer	7.11
Colo 320 DN	Human colon cancer	4.30
T84	Human colon cancer (metastatic to lung)	0.57
HCT15	Human colorectal cancer	0.93
DLD-1	Human colon adenocarcinoma	0.75
LNCAP	Human prostatic cancer (metastatic to left supraclavicular lymph node)	0.64
WOCA	Primary prostate epithelium	1.21
PC3	Human prostate cancer	2.46
GRDP2	Primary prostate epithelium	2.79
U373MG	Human glioblastoma	0.46
IMR90	Human lung fibroblasts	1.75

EXAMPLE 4

ANTISENSE INHIBITION OF CELL GROWTH

5 The effect of Net-4 expression upon colony formation was tested in a soft agar assay. Soft agar assays were conducted by first establishing a bottom layer of 2 ml of 0.6% agar in media plated fresh within a few hours of layering on the cells. The cell layer was formed on the bottom layer by removing cells transfected as described above from plates using 0.05% trypsin and washing twice in media. The cells were counted in a Coulter counter, and resuspended to 10^5 per ml in media. 10 μ l aliquots

10 were placed with media in 96-well plates (to check counting with WST1), or diluted further for soft agar assay. 2000 cells were plated in 800 μ l 0.4% agar in duplicate wells above 0.6% agar bottom layer. After the cell layer agar solidified, 2 ml of media was dribbled on top and antisense or reverse control oligo was added without delivery vehicles. Fresh media and oligos were added every 3-4 days. Colonies formed in 10

15 days to 3 weeks. Fields of colonies were counted by eye. Wst-1 metabolism values were used to compensate for small differences in starting cell number.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

As shown in Table 10, antisense oligonucleotides to Net-4 (960AS; SEQ ID NO:5) led to decreased colony number compared to reverse control oligonucleotides (960RC; SEQ ID NO:10). The decrease in colony number by antisense oligonucleotide 960AS (SEQ ID NO:5) is similar to that by antisense oligonucleotide kRAS 2576AS (GCATGTGGAAGGTAGGGAGGCAAGA (SEQ ID NO:16), which is directed to the kRAS mRNA, when compared to control reverse oligonucleotides kRAS 2576RC (AGAACGGAGGGATGGAAGGTGTACG (SEQ ID NO:17).

Table 10

Effect of Net-4 Oligonucleotides on the Growth of SW620 cells

Oligonucleotide	Growth of SW 620 Cells (number of colonies normalized to starting cell numbers as measured by WTS1 metabolism)
960AS (SEQ ID NO:5)	245
960RC (SEQ NO:10)	470
kRAS 2576AS (SEQ ID NO:16)	270
kRAS 2576RC (SEQ ID NO:17)	400

10

EXAMPLE 5

COLON MICROARRAY ANALYSIS

Normal and cancerous tissues were collected from patients using laser capture microdissection (LCM) techniques, which are well known in the art (see, e.g., Ohyama *et al.* (2000) *Biotechniques* 29:530-6; Curran *et al.* (2000) *Mol. Pathol.* 53:64-8; Suarez-Quian *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).

cDNA probes were prepared from total RNA isolated from the patient cells. Since LCM provides for the isolation of specific cell types to provide a substantially homogenous cell sample, this provided for a similarly pure RNA sample.

20

WO 01/98350

PCT/US01/18415

Total RNA was first reverse transcribed into cDNA using a primer containing a T7 RNA polymerase promoter, followed by second strand DNA synthesis. cDNA was then transcribed *in vitro* to produce antisense RNA using the T7 promoter-mediated expression (see, *e.g.*, Luo *et al.* (1999) *Nature Med* 5:117-122), and the antisense RNA was then converted into cDNA. The second set of cDNAs were again transcribed *in vitro*, using the T7 promoter, to provide antisense RNA. Optionally, the RNA was again converted into cDNA, allowing for up to a third round of T7-mediated amplification to produce more antisense RNA. Thus the procedure provided for two or three rounds of *in vitro* transcription to produce the final RNA used for fluorescent labeling. Fluorescent probes were generated by first adding control RNA to the antisense RNA mix, and producing fluorescently labeled cDNA from the RNA starting material. Fluorescently labeled cDNAs prepared from the tumor RNA sample were compared to fluorescently labeled cDNAs prepared from normal cell RNA sample. For example, the cDNA probes from the normal cells were labeled with Cy3 fluorescent dye (green) and the cDNA probes prepared from the tumor cells were labeled with Cy5 fluorescent dye (red).

Each array used had an identical spatial layout and control spot set. Each microarray was divided into two areas, each area having an array with, on each half, twelve groupings of 32 x 12 spots for a total of about 9,216 spots on each array. The two areas are spotted identically which provide for at least two duplicates of each clone per array. Spotting was accomplished using PCR amplified products from 0.5kb to 2.0 kb and spotted using a Molecular Dynamics Gen III spotter according to the manufacturer's recommendations. The first row of each of the 24 regions on the array had about 32 control spots, including 4 negative control spots and 8 test polynucleotides. The test polynucleotides were spiked into each sample before the labeling reaction with a range of concentrations from 2-600 pg/slide and ratios of 1:1. For each array design, two slides were hybridized with the test samples reverse-labeled in the labeling reaction. This provided for about 4 duplicate measurements for each clone, two of one color and two of the other, for each sample.

The differential expression assay was performed by mixing equal amounts of probes from tumor cells and normal cells of the same patient. The arrays were prehybridized by incubation for about 2 hrs at 60°C in 5X SSC/0.2% SDS/1 mM

WO 01/98350

PCT/US01/18415

EDTA, and then washed three times in water and twice in isopropanol. Following prehybridization of the array, the probe mixture was then hybridized to the array under conditions of high stringency (overnight at 42°C in 50% formamide, 5X SSC, and 0.2% SDS. After hybridization, the array was washed at 55°C three times as follows: 1) first wash in 1X SSC/0.2% SDS; 2) second wash in 0.1X SSC/0.2% SDS; and 3) third wash in 0.1X SSC.

The arrays were then scanned for green and red fluorescence using a Molecular Dynamics Generation III dual color laser-scanner/detector. The images were processed using BioDiscovery Autogene software, and the data from each scan set normalized to provide for a ratio of expression relative to normal. Data from the microarray experiments was analyzed according to the algorithms described in U.S. application serial no. 60/252,358, filed November 20, 2000, by E.J. Moler, M.A. Boyle, and F.M. Randazzo, and entitled "Precision and accuracy in cDNA microarray data," which application is specifically incorporated herein by reference.

The experiment was repeated, this time labeling the two probes with the opposite color in order to perform the assay in both "color directions." Each experiment was sometimes repeated with two more slides (one in each color direction). The level of fluorescence for each sequence on the array was expressed as a ratio of the geometric mean of 8 replicate spots/genes from the four arrays or 4 replicate spots/gene from 2 arrays or some other permutation. The data were normalized using the spiked positive controls present in each duplicated area, and the precision of this normalization was included in the final determination of the significance of each differential. The fluorescent intensity of each spot was also compared to the negative controls in each duplicated area to determine which spots have detected significant expression levels in each sample.

A statistical analysis of the fluorescent intensities was applied to each set of duplicate spots to assess the precision and significance of each differential measurement, resulting in a p-value testing the null hypothesis that there is no differential in the expression level between the tumor and normal samples of each patient. During initial analysis of the microarrays, the hypothesis was accepted if $p > 10^{-3}$, and the differential ratio was set to 1.000 for those spots. All other spots have a significant difference in expression between the tumor and normal sample. If the tumor

WO 01/98350

PCT/US01/18415

sample has detectable expression and the normal does not, the ratio is truncated at 1000 since the value for expression in the normal sample would be zero, and the ratio would not be a mathematically useful value (e.g., infinity). If the normal sample has detectable expression and the tumor does not, the ratio is truncated to 0.001, since the value for expression in the tumor sample would be zero and the ratio would not be a mathematically useful value. These latter two situations are referred to herein as "on/off." Database tables were populated using a 95% confidence level ($p > 0.05$).

The difference in the expression level of Net-4 in the colon tumor cells relative to the matched normal colon cells was greater than or equal to 2 fold (" $\geq 2x$ ") in 91.67% of the patients, greater than or equal to 2.5 fold in 66.67% of the patients, and greater than or equal to 5 fold in 33.33% of the patients examined.

EXAMPLE 6

In Situ Hybridization Analysis

In situ hybridization analysis was conducted to characterize the expression of Net-4 in normal colon and lung tissues, as well as tumor colon and lung tissues using a mixture of the following oligonucleotides:

NET-4 oligo 864	CCCTTG TAGTGC (SEQ ID NO:18)
NET-4 oligo 865	TGAAGTATTGATGC (SEQ ID NO:19)
NET-4 oligo 866	CCGATATGCTCTG (SEQ ID NO:20)
NET-4 oligo 867	TTAGGTTCCAATCA (SEQ ID NO:21)
NET-4 oligo 868	CGACTTTCATACTG (SEQ ID NO:22)

The results are shown in Figure 2 (Fig. 2A—tumor colon tissue, Fig. 2B—tumor lung tissue, Fig. 2C—normal colon tissue, and Fig. 2D—normal lung tissue).

From the foregoing it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, various modifications may be made without departing from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated NET-4 modulator selected from the group consisting of an antisense oligonucleotide, a ribozyme, a protein, a polypeptide, and a small molecule.
5
2. The isolated NET-4 modulator of claim 1 wherein said NET-4 modulator is an antisense molecule.
3. The isolated NET-4 modulator of claim 2 wherein said antisense molecule or the complement thereof comprises at least 15 consecutive nucleic acids of the sequence of SEQ ID NO:1.
10
4. The isolated NET-4 modulator of claim 3 wherein said antisense molecule or the complement thereof hybridizes under high stringency conditions to the sequence of SEQ ID NO:1.
5. The isolated NET-4 modulator of claim 2 wherein said antisense molecule comprises a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2-6.
15
6. The isolated NET-4 modulator of claim 1 wherein said NET-4 modulator is selected from the group consisting of an antibody and an antibody fragment.
- 20 7. The isolated NET-4 modulator of claim 6 wherein said antibody or antibody fragment is monoclonal.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

8. The isolated NET-4 modulator of claim 7 wherein said antibody or antibody fragment is humanized.
9. A composition, comprising a therapeutically effective amount of a NET-4 modulator in a pharmaceutically acceptable carrier.
- 5 10. The composition of claim 9, comprising two or more NET-4 modulators.
11. The composition of claim 9 wherein said NET-4 modulator is an antisense molecule.
12. A method of decreasing the expression of NET-4 in a
10 mammalian cell, comprising administering to said cell a NET-4 inhibitor of claim 1.
13. The method of claim 12 wherein said NET-4 modulator is an antisense molecule.
14. The method of claim 13 wherein said antisense molecule or the complement thereof comprises at least 15 consecutive nucleic acids of the sequence of
15 SEQ ID NO:1.
15. The method of claim 13 wherein said antisense molecule or the complement thereof hybridizes under high stringency conditions to the sequence of SEQ ID NO:1.
16. The method of claim 13 wherein said antisense molecule
20 comprises a nucleic acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2-6.

WO 01/98350

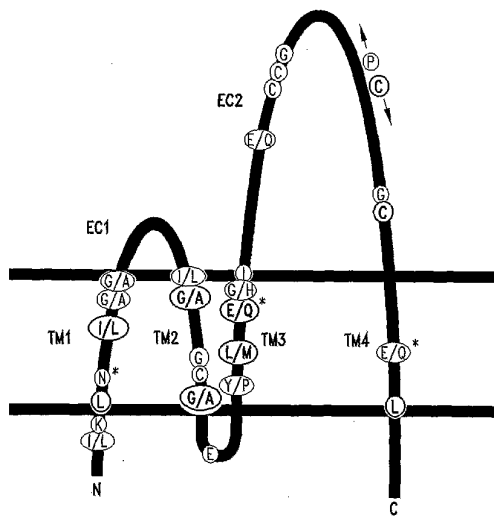
PCT/US01/18415

17. The method of claim 12 wherein said NET-4 modulator is selected from the group consisting of a protein and a polypeptide.
18. The method of claim 12 wherein said NET-4 modulator is a small molecule.
- 5 19. The method of claim 12 wherein said NET-4 modulator is administered *ex vivo* to said mammalian cell.
20. A method of treating neoplastic disease, comprising administering to a mammalian cell a NET-4 modulator of claim 1 such that said neoplastic disease is reduced in severity.
- 10 21. A diagnostic kit for detecting the presence of a colon tumor cell in a biological sample, said kit comprising at least one oligonucleotide selected from the group consisting of SEQ ID NOs:18, 19, 20, 21 and 22, and at least one control oligonucleotide that does not hybridize with a polynucleotide of SEQ ID NO:1 under stringent conditions.
- 15 22. The kit of claim 21 comprising at least 3 of said oligonucleotides.
23. The kit of claim 21 comprising said five oligonucleotides.

WO 01/98350

PCT/US01/18415

1/2

*Fig. 1*

WO 01/98350

PCT/US01/18415

2/2

ISH

Cancer

Normal

Colon

Lung



Fig. 2A



Fig. 2C

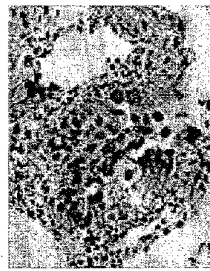


Fig. 2B

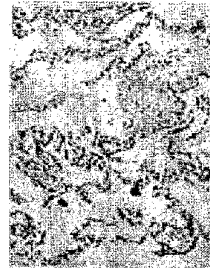


Fig. 2D

WO 01/98350

PCT/US01/18415

1

SEQUENCE LISTING

<110> Chiron Corporation
Reinhard, Christoph
Jefferson, Anne B.
Winter, Jill A.
Randazzo, Filippo

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATING
NEOPLASTIC DISEASE USING NET-4 MODULATORS

<130> PP-01701.003/200130.522PC

<140> PCT

<141> 2001-06-05

<160> 22

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 864

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
assay on SW620 cells

<400> 1
ctttgcocga agcccgggga cgaacgcgac gaccgaccgc ctggcgcaag gacgcgggag 60
ctcgctttgt gttcgggggt agcgtcgccg agccttgagc ttgcagcgcg cggcttccct 120
gctttctcgc ggccaccccg gctccggcgg cctcgccgcg cgaggggctg gaggtgcggg 180
agccgctctc cgcggtcgcg tcccgcgcg gctgagccca ggccgcacg gccgcggccc 240
cgtgcggtgt cctgagctc ctgctcccg ccgggctgct ccgagcaacg gtgcttcgga 300
gctccaaact cgggctgcgc gggcaagtgt ctccatgaac ccagagggatg tccggggaagc 360
actacaaggg tccgaagtc agttgttgc tcaaatctt catatttggc ttcaatgta 420
tattttggt ttgggaata acatttctt gaattgact gtgggcatg aatgaaaag 480
gagttctgct caacatctct tccatcaocg atctcgccg ctttgaacca gtttgctct 540
tccttgggt gggaggagtg atgttcttt tgggatttc aggtgtcatt ggagcgctac 600
gggaaaacac ttctctctc aagtttttt ctgtgtctt gggaattatt ttcttcttg 660
agctcaatgc cggagttct gcatattgtt tcaagactg gatcaagac cagctgtatt 720
tccttataaa caacaacatc agagcatatc gggatgacat tgatttgcaa aacctcatg 780
acttcaccca ggsatattg cagtgtgtg gggcttttg agctgatgat tggaacctaa 840
atattactt caattgcaca gatt 864

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
assay on SW620 cells

WO 01/98350

PCT/US01/18415

2

<400> 2
ctgggtcaaa gccgcogaga tcg 23
<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
assay on SW620 cells

<400> 3
ttcaggaccc ttgtagtgtc tcccg 25
<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
assay on SW620 cells

<400> 4
ccatgcccac agtccaattc caaga 25
<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
assay on SW620 cells

<400> 5
gctggtaaac ttctggtttt tgctt 25
<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
assay on SW620 cells

<400> 6
aaactggggc acacagcctt tcgt 24
<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation

WO 01/98350

PCT/US01/18415

3

assay on SW620 cells

<400> 7
 gctagagccg ccgaaactgg gtc 23

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
 assay on SW620 cells

<400> 8
 gcccttctgt atgttcccag gactt 25

<210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
 assay on SW620 cells

<400> 9
 agaactctaa cctgaccccc gtacc 25

<210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
 assay on SW620 cells

<400> 10
 tccgtttttg gtcttcaact ggctg 25

<210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> NET-4 oligonucleotide used in cell proliferation
 assay on SW620 cells

<400> 11
 tgctttccga cacacggggt caaa 24

<210> 12
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 01/98350

PCT/US01/18415

4

<220>
<223> PCR primer

<400> 12
gatccgcgag aagatgtcat caaca 25

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 13
tctgcagcaa tgcaatgcct atga 24

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 14
cgggaaatcg tgcgtgcat taag 24

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer

<400> 15
tgatctcctt ctgcattctg tcgg 24

<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense oligonucleotide kRAS 2576AS

<400> 16
gcatgtggaa ggtaggagag caaga 25

<210> 17
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Antisense oligonucleotide kRAS 2576RS

WO 01/98350

PCT/US01/18415

5

<400> 17 agaacggagg gatggaaggt gtacg	25
<210> 18 <211> 12 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleotide NET-4 oligo 864 used for in-situ hybridization	
<400> 18 acottgtagt gc	12
<210> 19 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleotide NET-4 oligo 865 used for in-situ hybridization	
<400> 19 tgaagtattt gatgc	15
<210> 20 <211> 13 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleotide NET-4 oligo 866 used for in-situ hybridization	
<400> 20 ccgatatgct ctg	13
<210> 21 <211> 14 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleotide NET-4 oligo 867 used for in-situ hybridization	
<400> 21 ttaggttcca atca	14
<210> 22 <211> 14 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
<220> <223> Oligonucleotide NET-4 oligo 868 used for in-situ	

WO 01/98350

PCT/US01/18415

6

hybridization

<400> 22
cgactttcat actg

14

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 December 2001 (27.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/98350 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
C12N 15/11, A61K 48/00, A61P 35/00, C12Q 1/68

(21) International Application Number: PCT/US01/18415

(22) International Filing Date: 5 June 2001 (05.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/209,865 7 June 2000 (07.06.2000) US

(71) Applicant: CHIRON CORPORATION [US/US]; 4560
Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).(72) Inventors: REINHARD, Christoph; 4560 Horton
Street, Emeryville, CA 94608 (US). JEFFERSON, Anne,
B.; 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608 (US).
WINTER, Jill, A.; 4560 Horton Street, Emeryville, CA
94608 (US). RANDAZZO, Filippo; 4560 Horton Street,
Emeryville, CA 94608 (US).(74) Agents: BLACKBURN, Robert, P. et al.; Chiron Cor-
poration, 4560 Horton Street, Emeryville, CA 94608-2916
(US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
13 June 2002For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/98350 A3

(54) Title: COMPOSITIONS COMPRISING NET-4 MODULATIONS AND THEIR USE FOR TREATING NEOPLASTIC DIS-
EASE(57) Abstract: Modulators of NET-4 are provided that reduce the expression or biological activities of NET-4 or the expression of
NET-4 mRNA in a mammalian cell. NET-4 modulators include antisense molecules, NET-4 modulators find use in compositions
and methods for decreasing NET-4 gene expression as well as methods for inhibiting the proliferation of mammalian cells, including
tumor cells, and methods for treating neoplastic diseases.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/US 01/18415
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 C12N15/11 A61K48/00 A61P35/00 C12Q1/68 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 C07K C12N 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) SEQUENCE SEARCH, WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SERRU VALERIE ET AL: "Sequence and expression of seven new tetraspans." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1478, no. 1, 16 March 2000 (2000-03-16), pages 159-163, XP002194214 ISSN: 0006-3002 cited in the application page 162, left-hand column; figure 1; tables 1,2	1-4,9,11
Y	same citations	21-23
Y	same citations	1-20
☒ 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 claims 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 26 March 2002		Date of making of the international search report 12/04/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Steffen, P

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.
PCT/US 01/18415

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TODD SCOTT C ET AL: "Sequences and expression of six new members of the tetraspanin/TM4SF family." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1399, no. 1, 30 July 1998 (1998-07-30), pages 101-104, XP002194215 ISSN: 0006-3002 figure 1; table 1	21-23
Y	AZORSA DAVID O ET AL: "A general approach to the generation of monoclonal antibodies against members of the tetraspanin superfamily using recombinant GST fusion proteins." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, vol. 229, no. 1-2, 29 October 1999 (1999-10-29), pages 35-48, XP002194216 ISSN: 0022-1759 page 36, right-hand column, paragraph 1; table 2 page 46, right-hand column, paragraph 2	6-8
Y	HALLDEN GUNNEL ET AL: "Y receptor-mediated induction of CD63 transcripts, a tetraspanin determined to be necessary for differentiation of the intestinal epithelial cell line, hBRIE 3801 cells." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 274, no. 39, pages 27914-27924, XP002194217 ISSN: 0021-9258 page 27915, right-hand column, last paragraph -page 27916, left-hand column, paragraph 2 page 27919, right-hand column, paragraph 2 -page 27920, left-hand column, paragraph 1	1-20
Y	CHEONG KWANG HO ET AL: "VIP17/MAL, a lipid raft-associated protein, is involved in apical transport in MDCK cells." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 11, 25 May 1999 (1999-05-25), pages 6241-6248, XP002194218 May 25, 1999 ISSN: 0027-8424 page 6242, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1 page 6244, right-hand column, last paragraph -page 6243, right-hand column, paragraph 2	1-20

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/18415

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO 00 70076 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; NI JIAN (US); ROSEN CRAIG A (US); FAN P) 23 November 2000 (2000-11-23) SEQ ID NO: 5 page 23, line 25 -page 26, line 12 page 77, line 26 -page 103, line 6 page 197, line 1 -page 203, line 6	1, 2, 4, 8, 9, 12, 13, 15

International Application No. PCT/US 01 /8415

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1, 9, 10, 12, 17, 19, 20 (partly); 18 (completely)

Present claims 1, 9, 10, 12, 17, 18, 19, 20 relate to a product which is either an antisense oligonucleotide, ribozyme, an unspecified protein, polypeptide or small molecule defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that, said antisense oligonucleotide, ribozyme, unspecified protein, polypeptide or small molecule modulates NET-4 and/or decreases NET-4 expression.

The claims cover all products 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 products. 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 product 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, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the antisense oligonucleotide, ribozyme, and protein when the latter is limited to an antibody. In other words no search for the above mentioned claims 1, 9, 10, 12, 17, 19, 20 could be carried out in respect to generally an unspecified protein or polypeptide as well as an unspecified small molecule. No search at all could be carried out for claim 18.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No.
PCT/US 01/18415

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0070076	A	23-11-2000	AU 5022200 A
		EP 1183386 A1	05-12-2000
		WO 0070076 A1	06-03-2002
		AU 5174600 A	23-11-2000
		EP 1187908 A1	02-01-2001
		WO 0077173 A1	20-03-2002
			21-12-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 35/00	
C 0 7 K 16/30	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 15/09	C 0 7 K 16/30	
	C 1 2 N 15/00	Z N A A

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

(72)発明者 ウィンター, ジル エイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

(72)発明者 ランダッツ, フィリポ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 0 8, エミリービル, ホートン ストリート 4 5 6 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA05 DA03 HA17
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 DA40 DC50 NA14
ZB212 ZB261 ZC412
4C085 AA13 AA14 BA34 BB01 CC03 CC21 DD62 EE01
4H045 AA11 AA30 DA76 EA28 FA74