

(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2016-502536

(P2016-502536A)

(43) 公表日 平成28年1月28日(2016.1.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 31/353 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/353	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 31/7028 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/7028	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-544614 (P2015-544614)	(71) 出願人	502379147
(86) (22) 出願日	平成25年11月28日 (2013.11.28)		イエダ リサーチ アンド デベロップメ ント カンパニー リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月16日 (2015.3.16)		イスラエル国 7 6 1 0 0 レホヴォト
(86) 国際出願番号	PCT/IL2013/050986		ビー. オー. ボックス 9 5 アット ザ
(87) 国際公開番号	W02014/083567		ワインツマン インスティテュート オ ブ サイエンス
(87) 国際公開日	平成26年6月5日 (2014.6.5)	(74) 代理人	100105050
(31) 優先権主張番号	61/731, 003		弁理士 鷲田 公一
(32) 優先日	平成24年11月29日 (2012.11.29)	(72) 発明者	ヤルデン ヨゼフ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォ ト ザ ワインツマン インスティテュ ート オブ サイエンス ネヴェ ウィルナ ー クタラヴ ストリート 4
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 腫瘍転移を防止し、がんを処置および予後診断し、推定転移阻害剤である薬剤を同定する方法

## (57) 【要約】

腫瘍がグリオーマではないという条件で腫瘍転移を防止する方法が提供される。この方法は、腫瘍転移の防止を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン 2 (SYNJ 2) の阻害剤を投与することによって、腫瘍転移を防止することを含む。また、がんを処置する方法も提供される。この方法は、がんの処置を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン 2 (SYNJ 2) の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤を投与することによって、がんを処置することを含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

腫瘍がグリオーマではないという条件で腫瘍転移を防止する方法であって、  
腫瘍転移の防止を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤を投与することによって、腫瘍転移を防止するステップを含む、方法。

## 【請求項 2】

腫瘍がグリオーマではないという条件で腫瘍転移を防止するためのシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤。

## 【請求項 3】

がんを処置する方法であって、がんの処置を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤を投与することによって、がんを処置するステップを含む、方法。

10

## 【請求項 4】

がんを処置するためのシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤。

## 【請求項 5】

がんの前記発症または進行と関連する前記細胞表面受容体が受容体チロシンキナーゼである、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記受容体チロシンキナーゼが ErbB 受容体である、請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記 ErbB 受容体が表皮増殖因子受容体 (EGFR) である、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

腫瘍転移の推定阻害剤を同定する方法であって、試験薬剤の存在下での PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> から PI (3, 4) P<sub>2</sub> への SYNJ2 媒介性プロセッシングを分析するステップを含み、

前記試験薬剤の前記存在下での PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> から PI (3, 4) P<sub>2</sub> へのプロセッシングの、前記試験薬剤の非存在下でのプロセッシングと比較した減少が、腫瘍転移の推定阻害剤を示す、方法。

30

## 【請求項 9】

PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> から PI (3, 4) P<sub>2</sub> への SYNJ2 媒介性プロセッシングの前記分析が、競合アッセイにより実施される、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記競合アッセイが、PI (3, 4) P<sub>2</sub> に結合した PI (3, 4) P<sub>2</sub> 結合ドメインを含む複合体からの前記 PI (3, 4) P<sub>2</sub> 結合ドメインの置換をアッセイする、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記競合アッセイが、蛍光偏光競合アッセイである、請求項 9 または 10 に記載の方法。

40

## 【請求項 12】

がんの予後診断を必要とする対象においてがんを予後診断する方法であって、  
前記対象のがん細胞中の SYNJ2 のレベルまたは活性を決定するステップを含み、前記対象の前記がん細胞中の前記 SYNJ2 の活性の前記レベルの、罹患していない対照試料の細胞中の SYNJ2 の活性のレベルと比較した上方調節が、予後不良を示す、方法。

## 【請求項 13】

至適基準法を用いて前記予後診断を補強するステップをさらに含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記至適基準法が、マーカーの検出を含む、請求項 13 に記載の方法。

50

## 【請求項 15】

前記マーカーが、HER-2 およびエストロゲン受容体 (ER) からなる群から選択される、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

前記転移がEGF 依存的である、請求項 1 または 12 に記載の方法。

## 【請求項 17】

前記がんが乳がんである、請求項 3 または 12 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記SYNJ2の阻害剤が、小分子、抗体、ペプチドおよび核酸サイレンシング剤からなる群から選択される、請求項 1 または 3 に記載の方法。

10

## 【請求項 19】

前記小分子が、表 2 に列挙される分子から選択される、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

SYNJ2の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤を包装する包装材料を含む、がんの処置またはがん転移の防止のための製品。

## 【請求項 21】

前記がんの発症または進行と関連する前記細胞表面受容体の前記阻害剤が、抗体である、請求項 3 に記載の方法または請求項 20 に記載の製品。

## 【請求項 22】

前記がんの発症または進行と関連する前記細胞表面受容体の前記阻害剤が、小分子阻害剤である、請求項 3 に記載の方法または請求項 20 に記載の製品。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、腫瘍転移を防止し、がんを処置および予後診断し、推定転移阻害剤である薬剤を同定する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

細胞運動は、腫瘍転移などの様々な生理学および病理学的プロセスを支援する (Ridley, 2011)。移動の開始は、葉状仮足および糸状仮足の形成を引き起こすアクチン重合およびRhoファミリーのGTPaseにより誘導される。数多くの証拠が、マトリックス分解における、浸潤突起と呼ばれる、別の種類のアクチン誘導性突出を暗示する (Murphy and Courtneidge, 2011)。転移を始めるために、移動性乳がん細胞は浸潤突起を形成し、近隣の血管中に浸潤する。乳がん細胞の肺 (Minn et al., 2005) および脳 (Bos et al., 2009) への転移と関連する遺伝子発現特性を特徴付けるための研究により、部位特異的転移の基礎となる遺伝子セットが同定された。興味深いことに、両セットは、表皮増殖因子 (EGF) ファミリーのメンバーを含み、これは共有された受容体、EGFRによるシグナリングが転移播種を支援することを示唆している。

30

## 【0003】

40

細胞内輸送は、細胞移動および腫瘍進行の重要な特徴として現れる (Mosesson et al., 2008)。例えば、p53変異体は、Rabカップリングタンパク質 (RCP) に依存する、インテグリンおよびEGFR輸送の増強を介して転移を促進することが示された (Muller et al., 2010)。Rabタンパク質と共に、ホスホイノシチドが、小胞の同一性を決定することによって細胞区画化において中枢的な役割を果たしている (Yuan and Cantley, 2008)。例えば、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) によるPI(4,5)P<sub>2</sub> (ホスファチジル-イノシトール4,5-二リン酸) のD3位でのリン酸化は、浸潤突起形成にとって必要であるPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を生成する (Yamaguchi et al., 2011)。同様に、PI(4,5)P<sub>2</sub>は、エンドサイトーシスおよびアクチン動力学を制御する複数のタンパク質を調節する (Saarikangas et al., 2010) が、そのレベ

50

ルは2つのさらなる型の酵素により厳密に制御される：ホスホリパーゼC（PLC）は、コフィリン（アクチン切断タンパク質）を活性化し、乳腺細胞移動を誘導する、PI（4, 5）P<sub>2</sub>の加水分解を促進する（van Rheenen et al., 2007）。同様に、イノシトールポリリン酸5 - ホスファターゼ、例えば、シナプトジャニン2（SYNJ2）は、イノシトール環のD5位を脱リン酸化し、グリオーマ細胞移動を制御する（Chuang et al., 2004; Malecz et al., 2000）。さらに、ホモ接合変異が、ある特定の前立腺がん試料中で同定された（非特許文献1）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許第4, 036, 945号明細書

【特許文献2】米国特許第4, 331, 647号明細書

【特許文献3】米国特許第4, 946, 778号明細書

【特許文献4】米国特許第4, 816, 567号明細書

【特許文献5】米国特許第5, 545, 807号明細書

【特許文献6】米国特許第5, 545, 806号明細書

【特許文献7】米国特許第5, 569, 825号明細書

【特許文献8】米国特許第5, 625, 126号明細書

【特許文献9】米国特許第5, 633, 425号明細書

【特許文献10】米国特許第5, 661, 016号明細書

【特許文献11】米国特許第6, 348, 185号明細書

【特許文献12】米国特許第6, 326, 174号明細書

【特許文献13】米国特許第4, 666, 828号明細書

【特許文献14】米国特許第4, 683, 202号明細書

【特許文献15】米国特許第4, 801, 531号明細書

【特許文献16】米国特許第5, 192, 659号明細書

【特許文献17】米国特許第5, 272, 057号明細書

【特許文献18】米国特許第3, 791, 932号明細書

【特許文献19】米国特許第3, 839, 153号明細書

【特許文献20】米国特許第3, 850, 752号明細書

【特許文献21】米国特許第3, 850, 578号明細書

【特許文献22】米国特許第3, 853, 987号明細書

【特許文献23】米国特許第3, 867, 517号明細書

【特許文献24】米国特許第3, 879, 262号明細書

【特許文献25】米国特許第3, 901, 654号明細書

【特許文献26】米国特許第3, 935, 074号明細書

【特許文献27】米国特許第3, 984, 533号明細書

【特許文献28】米国特許第3, 996, 345号明細書

【特許文献29】米国特許第4, 034, 074号明細書

【特許文献30】米国特許第4, 098, 876号明細書

【特許文献31】米国特許第4, 879, 219号明細書

【特許文献32】米国特許第5, 011, 771号明細書

【特許文献33】米国特許第5, 281, 521号明細書

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Rossi et al. Cancer Genet Cytogenet. 2005 Sep;161(2): 97-103

【非特許文献2】Zhang 2007 J. Clin. Invest. 117 (8): 2051-8

【非特許文献3】Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988

【非特許文献4】Porter, R. R. [Biochem. J. 73: 119-126 (1959)]

10

20

30

40

50

- 【非特許文献 5】Inbar et al. [Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 69:2659-62 (1972)]
- 【非特許文献 6】Whitlow and Filpula, Methods 2: 97-105 (1991)
- 【非特許文献 7】Bird et al., Science 242:423-426 (1988)
- 【非特許文献 8】Pack et al., Bio/Technology 11:1271-77 (1993)
- 【非特許文献 9】Larrick and Fry [Methods, 2: 106-10 (1991)]
- 【非特許文献 10】Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)
- 【非特許文献 11】Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988)
- 【非特許文献 12】Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)
- 【非特許文献 13】Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988)
- 【非特許文献 14】Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536 (1988) 10
- 【非特許文献 15】Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)
- 【非特許文献 16】Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)
- 【非特許文献 17】Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)
- 【非特許文献 18】Boerner et al., J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)
- 【非特許文献 19】Marks et al., Bio/Technology 10,: 779-783 (1992)
- 【非特許文献 20】Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994)
- 【非特許文献 21】Morrison, Nature 368 812-13 (1994)
- 【非特許文献 22】Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-51 (1996)
- 【非特許文献 23】Neuberger, Nature Biotechnology 14: 826 (1996) 20
- 【非特許文献 24】Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995)
- 【非特許文献 25】Strat et al., Nucleic Acids Research, 2006, Vol. 34, No. 13 38  
03-3810
- 【非特許文献 26】Bhargava A et al. Brain Res. Protoc. 2004;13:115-125
- 【非特許文献 27】Diallo M., et al., Oligonucleotides. 2003;13:381-392
- 【非特許文献 28】Paddison P.J., et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002;99:1443-1448
- 【非特許文献 29】Tran N., et al., FEBS Lett. 2004;573:127-134
- 【非特許文献 30】Billy et al., PNAS 2001, Vol 98, pages 14428-14433
- 【非特許文献 31】Diallo et al, Oligonucleotides, October 1, 2003, 13(5): 381-39 30  
2. doi:10.1089/154545703322617069
- 【非特許文献 32】Shinagwa and Ishii [Genes & Dev. 17 (11): 1340-1345, 2003]
- 【非特許文献 33】Rusk et al. Curr Biol. 2003 Apr 15;13(8):659-63
- 【非特許文献 34】Erratum in: Curr Biol. 2003 Sep 30;13(19):1746
- 【非特許文献 35】Brummelkamp, T. R. et al. (2002) Science 296: 550
- 【非特許文献 36】Castanotto, D. et al. (2002) RNA 8:1454
- 【非特許文献 37】Tuschl ChemBiochem. 2:239-245
- 【非特許文献 38】wwwdotambiondotcom/techlib/tn/91/912dothtml
- 【非特許文献 39】wwwdotncbidotnlmdotnihdotgov/BLAST/
- 【非特許文献 40】virusesdotfwdarwdot humans 40
- 【非特許文献 41】Bartel 2004, Cell 116-281
- 【非特許文献 42】Doench & Sharp 2004 GenesDev 2004-504
- 【非特許文献 43】Brennecke et al, 2005 PLoS 3-e85
- 【非特許文献 44】Lewis et al 2005 Cell 120-15
- 【非特許文献 45】Krek et al (2005, Nat Genet 37-495)
- 【非特許文献 46】Breaker, R.R. and Joyce, G. Chemistry and Biology 1995;2:655
- 【非特許文献 47】Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 1997;94  
3:4262
- 【非特許文献 48】Santoro, S.W. & Joyce, G.F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 199
- 【非特許文献 49】Khachigian, LM Curr Opin Mol Ther 4:119-21 (2002) 50

- 【非特許文献 5 0】Itoh et al, 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther  
www.dotasgtdotorg
- 【非特許文献 5 1】Luft J Mol Med 76: 75-6 (1998)
- 【非特許文献 5 2】Kronenwett et al. Blood 91: 852-62 (1998)
- 【非特許文献 5 3】Rajur et al. Bioconjug Chem 8: 935-40 (1997)
- 【非特許文献 5 4】Lavigne et al. Biochem Biophys Res Commun 237: 566-71 (1997)
- 【非特許文献 5 5】Aoki et al. (1997) Biochem Biophys Res Commun 231: 540-5 (1997)
- 【非特許文献 5 6】Walton et al. Biotechnol Bioeng 65: 1-9 (1999)
- 【非特許文献 5 7】Matveeva et al., Nature Biotechnology 16: 1374 - 1375 (1998) 10
- 【非特許文献 5 8】Holmund et al., Curr Opin Mol Ther 1:372-85 (1999)
- 【非特許文献 5 9】Gerwitz Curr Opin Mol Ther 1:297-306 (1999)
- 【非特許文献 6 0】Uno et al., Cancer Res 61:7855-60 (2001)
- 【非特許文献 6 1】Welch et al., Curr Opin Biotechnol. 9:486-96 (1998)
- 【非特許文献 6 2】Welch et al., Clin Diagn Virol. 10:163-71 (1998)
- 【非特許文献 6 3】「Remington's Pharmaceutical Sciences」, Mack Publishing Co., Easton, PA, latest edition
- 【非特許文献 6 4】Fingl, et al., 1975, 「The Pharmacological Basis of Therapeutics」, Ch. 1 p.1
- 【非特許文献 6 5】Nuovo GJ, et al. [Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. Am J Surg Pathol. 1993, 17: 683-90] 20
- 【非特許文献 6 6】Komminoth P, et al. [Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR. Pathol Res Pract. 1994, 190: 1017-25]
- 【非特許文献 6 7】Lodish et al. (eds.). Chapter 7.8: DNA Microarrays: Analyzing Genome-Wide Expression. In: Molecular Cell Biology, 4th ed., W. H. Freeman, New York. (2000)
- 【非特許文献 6 8】「Molecular Cloning: A laboratory Manual」, Sambrook et al., (1989) 30
- 【非特許文献 6 9】「Current Protocols in Molecular Biology」, Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994)
- 【非特許文献 7 0】Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)
- 【非特許文献 7 1】Perbal, 「A Practical Guide to Molecular Cloning」, John Wiley & Sons, New York (1988)
- 【非特許文献 7 2】Watson et al., 「Recombinant DNA」, Scientific American Books, New York
- 【非特許文献 7 3】Birren et al. (eds) 「Genome Analysis: A Laboratory Manual Series」, Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998) 40
- 【非特許文献 7 4】「Cell Biology: A Laboratory Handbook」, Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994)
- 【非特許文献 7 5】「Current Protocols in Immunology」, Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)
- 【非特許文献 7 6】Stites et al. (eds), 「Basic and Clinical Immunology」(8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)
- 【非特許文献 7 7】Mishell and Shiigi (eds), 「Selected Methods in Cellular Immunology」, W. H. Freeman and Co., New York (1980)
- 【非特許文献 7 8】「Oligonucleotide Synthesis」, Gait, M. J., ed. (1984) 50

【非特許文献 7 9】「Nucleic Acid Hybridization」Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985)

【非特許文献 8 0】「Transcription and Translation」Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984)

【非特許文献 8 1】「Animal Cell Culture」Freshney, R. I., ed. (1986)

【非特許文献 8 2】「Immobilized Cells and Enzymes」IRL Press, (1986)

【非特許文献 8 3】「A Practical Guide to Molecular Cloning」Perbal, B., (1984)

【非特許文献 8 4】「Methods in Enzymology」Vol. 1-317, Academic Press

【非特許文献 8 5】「PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications」, Academic Press, San Diego, CA (1990)

【非特許文献 8 6】Marshak et al., 「Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual」, CSHL Press (1996)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、腫瘍がグリオーマではないという条件で腫瘍転移を防止する方法であって、腫瘍転移の防止を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤を投与することによって、腫瘍転移を防止するステップを含む、方法が提供される。

【0007】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、がんを処置する方法であって、がんの処置を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤を投与することによって、がんを処置することを含む、方法が提供される。

【0008】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、前記腫瘍がグリオーマではないという条件で、腫瘍転移を防止するためのシナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤が提供される。

【0009】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、がんを処置するための、シナプトジャニン 2 (SYNJ2) の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤が提供される。

【0010】

本発明のいくつかの実施形態によれば、がんの発症または進行と関連する細胞表面受容体は、受容体チロシンキナーゼである。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態によれば、受容体チロシンキナーゼは、ErbB 受容体である。

【0012】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ErbB 受容体は、表皮増殖因子受容体 (EGFR) である。

【0013】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、腫瘍転移の推定阻害剤を同定する方法であって、試験薬剤の存在下での PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> から PI (3, 4) P<sub>2</sub> への SYNJ2 媒介性プロセッシングを分析するステップを含み、試験薬剤の存在下での PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> から PI (3, 4) P<sub>2</sub> へのプロセッシングの、試験薬剤の非存在下でのプロセッシングと比較した減少が、腫瘍転移の推定阻害剤を示す、方法が提供される。

【0014】

本発明のいくつかの実施形態によれば、PI (3, 4, 5) P<sub>3</sub> から PI (3, 4) P<sub>2</sub> への SYNJ2 媒介性プロセッシングの分析は、競合アッセイにより実施される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 5 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、競合アッセイは、 $PI(3,4)P_2$  に結合した  $PI(3,4)P_2$  結合ドメインを含む複合体からの  $PI(3,4)P_2$  結合ドメインの置換をアッセイする。

## 【 0 0 1 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、競合アッセイは、蛍光偏光競合アッセイである。

## 【 0 0 1 7 】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、がんの予後診断を必要とする対象においてがんを予後診断する方法であって、対象のがん細胞中の  $SYNJ2$  のレベルまたは活性を決定するステップを含み、対象のがん細胞中の  $SYNJ2$  の活性のレベルの、罹患していない対照試料の細胞中の  $SYNJ2$  の活性のレベルと比較した上方調節が、予後不良を示す、方法が提供される。

10

## 【 0 0 1 8 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、前記方法は、至適基準法を用いて予後診断を補強することをさらに含む。

## 【 0 0 1 9 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、至適基準法は、マーカーの検出を含む。

## 【 0 0 2 0 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、マーカーは、 $HER-2$  およびエストロゲン受容体 ( $ER$ ) からなる群から選択される。

20

## 【 0 0 2 1 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、転移は、 $EGF$  依存的である。

## 【 0 0 2 2 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、がんは乳がんである。

## 【 0 0 2 3 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、 $SYNJ2$  の阻害剤は、小分子、抗体、ペプチドおよび核酸サイレンシング剤からなる群から選択される。

## 【 0 0 2 4 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、小分子は、表 2 に列挙される分子から選択される。

30

## 【 0 0 2 5 】

本発明のいくつかの実施形態の態様によれば、 $SYNJ2$  の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤を包装する包装材料を含む、がんの処置またはがん転移の防止のための製品が提供される。

## 【 0 0 2 6 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、がんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤は、抗体である。

## 【 0 0 2 7 】

本発明のいくつかの実施形態によれば、がんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤は、小分子阻害剤である。

40

## 【 0 0 2 8 】

別途定義しない限り、本明細書で用いられる全ての技術および / または科学用語は、本発明が属する当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似するか、または等価である方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験において用いることができるが、例示的方法および / または材料を以下に記載する。矛盾する場合、定義を含む本明細書が優先されるものとする。さらに、材料、方法、および例は例示に過ぎず、必ずしも限定を意図するものではない。

## 【 0 0 2 9 】

本発明のいくつかの実施形態は、添付の図面を参照して、ほんの一例として本明細書に

50



記載される。ここで図面を詳細に特に参照すれば、示される項目は例であり、本発明の実施形態の例示的考察のためのものであることが強調される。これに関して、図面と共に記載される説明により、本発明の実施形態をどのように実施することができるかが当業者には明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】EGFが乳腺細胞の侵襲的増殖を促進し、特定の遺伝子セットを誘導することを示す図である。図1A - MCF10A細胞を増殖因子の非存在下で播種し、クラスターを形成させた。72時間後、細胞を示された増殖因子（それぞれ、 $10\text{ ng/mL}$ ）で処理し、位相差画像を24時間後に撮影した（スケールバーは $50\text{ }\mu\text{m}$ である）。図1B - MCF10A細胞を、示されたりガンド（ $10\text{ ng/mL}$ ）の存在下で、示されたような移動または侵襲チャンバー中に播種し、18時間後、下方の区画に移動した細胞をクリスタルバイオレットで染色した（左パネル）。EGF処理の効果に対して正規化された、移動および侵襲シグナルの定量化が示される。データは、2回繰り返した代表実験からの生物学的トリプリケート（Biological triplicate）の平均 $\pm$ S.D.である（右パネル）。図1C - MCF10A細胞を、EGFを含有する培地中、トランスウェルインサート中に、阻害剤AG-1478（ $1\text{ }\mu\text{M}$ ）、U0126（ $5\text{ }\mu\text{M}$ ）、またはウォルトマンニン（ $200\text{ nM}$ ）を入れずに、またはそれと共に播種し、18時間移動させた。データは、トリプリケートの平均 $\pm$ S.D.である。実験を2回繰り返した。図1D - EGFにより（血清によってではない（Amit et al., 2007））ヒト乳腺MCF10A細胞中で特異的に誘導された425個の遺伝子の一覧を、MDA-MB-231細胞の転移の状況において上方調節された遺伝子（1,597個の遺伝子）と交差させた（Minn et al., 2005）。23個の重複する遺伝子の1個が、5'-ホスファチジルイノシトール脂質ホスファターゼであるシナプトジャニン-2（SYNJ2）をコードする。図1E - MCF10A細胞を、LacZ（Ctrl）またはSYNJ2-GFP（SYNJ2-OX）をコードするレンチウイルス粒子に感染させた。内因性SYNJ2およびSYNJ2-GFP融合タンパク質の発現レベルを免疫プロットングにより決定し、等量のタンパク質をチューブリンの精査により確認した。図1F - MCF10A細胞のCtrlおよびSYNJ2-OXクローンを、EGF（ $10\text{ ng/mL}$ ）の非存在下（NT）または存在下で移動チャンバー中に播種し（ $5 \times 10^4$ 細胞/ウェル）、22時間移動させた。フィルターの他方の側に到達した移動細胞をクリスタルバイオレットで染色し、画像を撮影した。図1G - MCF10A細胞に、siRNA対照（siCtrl）またはSYNJ2に対するsiRNA（siSYNJ2）をトランスフェクトし、SYNJ2のタンパク質レベルを36時間後に免疫プロットングにより決定した。等量のタンパク質を、Ras-GAPに関する免疫プロットングにより確認した。図1H - Gで提示される細胞を、EGF（ $10\text{ ng/mL}$ ）の非存在下（NT）または存在下で移動チャンバー（ $5 \times 10^4$ 細胞/ウェル）中に播種し、22時間移動させた。フィルターの下面に到達した移動細胞をクリスタルバイオレットで染色し、画像を捕捉した。図1I - MCF10A細胞の集密培養物を、示されたsiRNAで処理した。一度、単層が形成されたら、それらを、擦過傷閉鎖の速度をモニタリングする自動擦過システムにかけた。

【図2】EGFによるSYNJ2の転写誘導が侵襲的増殖を促進することを示す図である。図2A - 血清飢餓MCF10A細胞を、EGF（ $20\text{ ng/mL}$ ）または血清（5%）で刺激し、SYNJ2 mRNA発現をマイクロアレイまたはRT-qPCRを用いることによりアッセイした。図2B - MCF10A細胞をEGFで刺激し、抽出し、示されたように免疫プロットした。図2C - GFP-SYNJ2（SYNJ2-OX）または対照としてのLacZ（Ctrl）をコードするウイルスに感染させたMCF10A細胞を、EGFの非存在下または存在下で4日間培養した。ファロイジンおよびDAPIを用いて、位相差画像（上、バー： $100\text{ }\mu\text{m}$ ）および共焦点画像（下、バー： $20\text{ }\mu\text{m}$ ）を取得した。図2D~E - MCF10A細胞を、EGF（ $10\text{ ng/mL}$ ）の非存在下（NT）または存在下で、移動または侵襲チャンバー（ $5 \sim 6 \times 10^4$ 細胞/ウェル）中で22時

10

20

30

40

50

間培養した。フィルターの底に到達した細胞を染色し、フィルターの被覆を定量した（平均±S.D.）。

【図3】先端へのSYNJ2の誘導的転位が乳腺細胞の移動および侵襲に付随して起こることを示す図である。図3A-MDA-MB-231細胞を、対照shRNA（shCtrl）またはSYNJ2に対するshRNA（shSYNJ2）と共に、LacZ（Ctrl）またはV5タグ付SYNJ2（SYNJ2-V5）をコードするレンチウイルス粒子に感染させた。V5-SYNJ2および内因性SYNJ2のタンパク質レベルを、免疫ブロッティングにより決定した。等量のタンパク質を、AKTに関する免疫ブロッティングにより確認した。図3B-SYNJ2、または対照としてのLacZを安定に過剰発現するMDA-MB-231細胞の位相画像（左パネル）および侵襲画像（右パネル）である。侵襲能力を、侵襲アッセイを用いて3回反復で決定し、侵襲細胞を定量し、対照（Ctrl）に対して正規化した。スケールバーは50μmである。図3C-MDA-MB-231細胞に、SYNJ2に対するsiRNAオリゴヌクレオチド（またはsiCtrl）をトランスフェクトした。36時間後、SYNJ2のタンパク質レベルを、免疫ブロッティングにより決定した。等量のタンパク質を、Ras-GAPに関する免疫ブロッティングにより確認した。図3D-Cからの細胞を移動または侵襲チャンバー中に播種し、18時間インキュベートした。移動および侵襲シグナルを定量し、EGF処理されたsiCtrl細胞に対して正規化した。示されるデータは、トリプリケートの平均±S.D.である。図3E-GFP-SYNJ2を一過的に発現するMDA-MB-231細胞を、ガラスカバースリップ上に播種し、TGF（10ng/mL）で刺激した。低速度撮影顕微鏡写真を撮影した（10秒毎）。示される画像は反転されており、黒色の点はSYNJ2および葉状仮足の基部でのその集合を表す。スケールバーは10μmである。図3F-MDA-MB-231細胞を、TRITC-ファロイジンを用いて内因性SYNJ2およびF-アクチンについて免疫染色した。四角の領域は拡大されている。スケールバーは10μmである。図3G-MCF10A細胞をEGFで18時間刺激した後、TRITC-ファロイジンを用いて内因性SYNJ2について免疫染色し、F-アクチンについて対抗染色した。スケールバーは10μmである。

【図4】SYNJ2の触媒活性が侵襲的増殖にとって必須であることを示す図である。図4A~B-SYNJ2（SYNJ2-OX）またはSYNJ2に対するshRNA（shSYNJ2）を発現するMDA-MB-231細胞、ならびに対照細胞を、5%Matrigel中に播種した。6日後に画像を捕捉し、侵襲的スフェロイドを定量した（平均±S.D.）。スケールバーは50μmである。図4C~D-shSYNJ2を発現するMDA-MB-231細胞を、WT-SYNJ2（shSYNJ2+SYNJ2<sup>WT</sup>）または触媒によって機能しなくなった突然変異体（shSYNJ2+SYNJ2<sup>CD</sup>）に感染させた。細胞を、示されたように抽出し、免疫プロットしたか、またはそれらを侵襲チャンバー中で18時間侵襲させた。侵襲した細胞の画像およびその正規化された定量を示す（平均±S.D.）。図4E-フィブロネクチン上で増殖させたshCtrlおよびshSYNJ2細胞の走査型電子顕微鏡写真を示す。スケールバーは2μmである。図4F-ファロイジンおよびDAPIで染色された示されたMDA-MB-231細胞中のF-アクチンの画像である。Z軸切片（線）および拡大された領域を示す。矢頭は膨張した構造を示す。スケールバーは10μmである。

【図5】SYNJ2の細胞内局在化を示す図である。図5A-GFP-SYNJ2を発現するMDA-MB-231細胞に、RFP-クラスリンをトランスフェクトし、フィブロネクチンで被覆されたプレート上に播種した。回転顕微鏡を用いて、細胞を5秒毎に画像化した。矢頭は新しく形成された先端を示す。スケールバーは5μmである。図5B-先端（上2行）および細胞体の下部でのSYNJ2の集合および分解を示す代表的な時間枠である。下の行については、細胞にmCherry-lifeACTプラスミドをトランスフェクトし、コラーゲン上に播種した。その後、細胞を1分間隔で画像化した。矢頭を参照のために挿入した。時間尺度の差異に留意されたい。スケールバーは1μmである。図5C-細胞をTIRFおよび落射蛍光顕微鏡により同時に画像化し、シグナルをキモ

10

20

30

40

50

グラフに変換した (X 軸)。矢頭はシグナルの開始を示す。スケールバーは  $5 \mu\text{m}$  である。図 5 D - D y n g o - 4 a (  $30 \mu\text{M}$ ; ダイナミン - 2 阻害剤 ) を用いる処理の 5 分前および 5 分後に回転盤共焦点顕微鏡を用いて、細胞を画像化した。スケールバーは  $5 \mu\text{m}$  である。図 5 E - G F P - S Y N J 2 を安定に発現する M D A - M B - 2 3 1 細胞を、D y n g o - 4 a (  $30 \mu\text{M}$ ;  $30 \text{min}$  )、または溶媒 ( D M S O ) と共に予備インキュベートした。細胞溶解物を、抗 G F P 抗体 ( または抗体なし; - A b ) を用いる免疫沈降にかけた後、細胞溶解物の試料 (  $5\%$  ) と共に、示された抗体で免疫プロットした。図 5 F - 細胞をフィブロネクチン上に播種し、固定し、内因性 R a c 1 について免疫染色した。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$  である。図 5 G - N S C - 2 3 7 6 6 (  $5 \mu\text{M}$  ) を用いる  $30 \text{min}$  の長さの処理の 5 分前および 5 分後に共焦点顕微鏡を用いて、細胞を画像化した。スケールバーは  $5 \mu\text{m}$  である。図 5 H - M D A - M B - 2 3 1 細胞を、示された s i R N A オリゴヌクレオチドで処理した。細胞抽出物を S Y N J 2 および R a s - G A P についてプロットした。G T P - R a c 1 レベルを、E L I S A に基づくアッセイ ( 細胞骨格 ) を用いて決定した。

【図 6】先端への S Y N J 2 の局在化が、カベオリン分布と異なり、F - アクチン、コレステロールおよび P I 3 K に依存することを示す図である。図 6 A - G F P - S Y N J 2 を発現し、R F P - C a v 1 を同時発現する M D A - M B - 2 3 1 細胞を、経時的に同時に画像化し、シグナルをキモグラフに変換した ( X および Y 軸 )。S Y N J 2 集合体の一過的性質およびカベオリン 1 の安定な出現に留意されたい。スケールバーは  $5 \mu\text{m}$  である。図 6 B - 左パネルは、図 5 A におけるように画像化された ( 5 秒間隔、単一面、回転盤共焦点 )、 $150$  の無作為に選択された S Y N J 2 集合体の分布 ( ピット % 対寿命 ) を示す。右パネルは、 $55$  秒の寿命を示した集合体の平均 (  $\pm$  S E M ) 相対強度を示す。図 6 C - G F P - S Y N J 2 を安定に発現する M D A - M B - 2 3 1 細胞を、M C D (  $10 \text{mM}$ 、 $15 \text{分}$  ) またはウォルトマンニン (  $500 \text{nM}$ 、 $15 \text{分}$  ) で処理した。同じ選択された細胞の画像を、処理の前または後に  $6$  秒毎に捕捉し、シグナルをキモグラフ ( 左パネル中の四角の差込み図である ) に変換した。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$  である。図 6 D - G F P - S Y N J 2 および l i f e A C T - m C h e r r y を安定に同時発現する M D A - M B - 2 3 1 細胞を、ラトランクリン B (  $1 \mu\text{M}$ 、 $15 \text{分}$  ) で処理した。処理の前または後に画像を獲得した。スケールバーは  $5 \mu\text{m}$  である。

【図 7】S Y N J 2 枯渇が細胞内小胞中の E G F R を停止させることを示す図である。図 7 A - s h R N A 対照 ( s h C t r l ) または S Y N J 2 に特異的な s h R N A ( s h S Y N J 2 ) を安定に発現する M C F 1 0 A 細胞を、E G F 含有培地中に播種した 3 日後に抽出した。免疫プロットを、S Y N J 2、E G F R、E G F R のリン酸化チロシン  $1068$  ( p E G F R )、リン酸化 E R K ( p E R K )、およびローディング対照としての R a s - G A P について精査した。図 7 B - M C F 1 0 A 細胞に、E G F の存在下で、s i R N A 対照、または S Y N J 2 に対する s i R N A をトランスフェクトした。E G F R および S Y N J 2 抗体を用いて、共焦点免疫蛍光分析を実施した。S Y N J 2 枯渇細胞 ( 星印 ) のみが E G F R 輸送の欠陥を示すことに留意されたい。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$  である。図 7 C - M D A - M B - 2 3 1 細胞の 3 つの誘導体を、E G F R について免疫染色し、D A P I および F - アクチンについて対抗染色した: ( i ) S Y N J 2 がノックダウンされた細胞 ( s h S Y N J 2 ; 左列 )、( i i ) 触媒により死んだ形態に対応するレンチウイルス遺伝子導入により感染した同じ細胞 ( s h S Y N J 2 + S Y N J 2 <sup>C D</sup> ; 中央列 )、および ( i i i ) S Y N J 2 がノックダウンされ、野生型形態が感染により導入された細胞 ( s h S Y N J 2 + S Y N J 2 <sup>W T</sup> ; 右列 )。スケールバーは  $20 \mu\text{m}$  である。図 7 D - ユビキチン化された E G F R のレベルである ( 密度測定 )。図 7 E - M D A - M B - 2 3 1 誘導体を、 $488$  - T f n (  $5 \text{分}$ 、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  ) で刺激した。細胞を氷上で固定し、酸で洗浄し、シグナル強度について分析した。

【図 8】S Y N J 2 が E G F R の輸送および走化性を調節することを示す図である。図 8 A - 示された s i R N A をトランスフェクトされた M D A - M B - 2 3 1 細胞の全抽出物を、示されたように免疫プロットした。図 8 B - 示された M D A - M B - 2 3 1 サブクロ

ーン中での表面EGFRのFACS（左）および<sup>125</sup>I-EGF結合（右；3回反復）分析。図8C-shCtrlおよびshSYNJ2細胞をフィブロネクチン上で増殖させ、EGFRおよびF-アクチンについて免疫染色した。バーは20μmである。図8D-EGF勾配への曝露時に走化性チャンパー中で移動したshCtrlおよびshSYNJ2MDA-MB-231細胞の軌跡のRoseプロットである。赤色の軌跡は、EGFに向かって移動する細胞を示す。図8E-飢餓状態のMDA-MB-231誘導体を、EGF（10ng/mL）で処理し、細胞溶解物を示されたように免疫沈降および免疫ブロッキングにかけた。図8F-細胞をCに記載のように培養し、活性EGFR（pY1045）およびF-アクチンについて免疫染色した。バーは10μmである。図8G-示されたMDA-MB-231誘導体を、EGF（10ng/mL）で5時間処理し、抽出物を示されたように免疫プロットした。図8H-示されたMDA-MB-231誘導体をAlexa Fluor 488-Tfn（25μg/mL；5min）に曝露し、酸で洗浄して表面結合したリガンドを除去し、示された間隔で画像を撮影した。正規化された蛍光シグナルを示す。バーは10μmである。図8I-siCtrlまたはsiSYNJ2で予備処理されたMDA-MB-231細胞を、Alexa Fluor 488-EGF（20μg/mL；10min）で刺激し、酸で洗浄し、示された間隔で37℃でインキュベートし、FACSにより分析した。

【図9】SYNJ2が小胞輸送と接着斑形成の両方にとって必要であることを示す図である。図9A-MDA-MB-231誘導体（shCtrlおよびshSYNJ2）を固定し、EEA1、F-アクチンおよび核（DAPI）について染色した。スケールバーは10μmである。図9B-MDA-MB-231誘導体、すなわち、shCtrlおよびshSYNJ2細胞を、インテグリンベータ-1、F-アクチンおよびDAPI（スケールバー、20μm）について精査した。図9C-MDA-MB-231細胞をsiCtrlおよびsiSYNJ2で48時間処理した後、インテグリンベータ-1およびリン酸化EGFRについて免疫染色した。図9D-パキシリン、核（DAPI）、およびF-アクチン（TRITC-ファロイジンを用いる）に関するMDA-MB-231誘導体の免疫蛍光分析である。パキシリンシグナルを、接着斑と比較した細胞質領域中で定量し、細胞あたりの接着斑の数も定量した。さらに、接着斑の形状を、完全な円からの逸脱（離心率）を決定することにより定量した。スケールバーは10μmである。

【図10】SYNJ2枯渇がホスホイノシチド恒常性を混乱させ、初期エンドソームに浸潤し、接着斑を分解することを示す図である。図10A-shCtrlまたはshSYNJ2を発現するMDA-MB-231細胞に、GFP-Rab4プラスミドをトランスフェクトし、48時間後、細胞を固定し、TRITC-ファロイジンを用いてF-アクチンについて対抗染色した。図10B-MDA-MB-231誘導体をRab5、F-アクチンおよび核（DAPI）について免疫染色した。画像を、Rab5-陽性小胞のサイズおよび数について、ならびに平均細胞面積について定量した。スケールバーは10μmである。図10C-MDA-MB-231細胞の<sup>3</sup>H-ホスホイノシトール標識された誘導体から抽出されたホスホイノシチドをクロマトグラフィーにより分離し、そのレベルを3つの異なる実験において決定した（シグナルをshCtrl細胞に対して正規化した）。図10D-shCtrlおよびshSYNJ2MDA-MB-231細胞を、pY1068-EGFR、パキシリンおよびF-アクチンについて精査した（同時局在化シグナルは白色である）。スケールバーは10μmである。図10E-shCtrlおよびshSYNJ2MDA-MB-231細胞を播種した。付着しなかった細胞を20min後に除去し、付着した細胞を画像化し、表面積について定量した。図10F-shCtrlまたはshSYNJ2を安定に発現するMDA-MB-231細胞をRTCA Eプレート上に播種し、リアルタイム電気抵抗測定を5sec間隔で80min記録した後、10min間隔でさらに80min記録した。2回反復の平均（±S.D.）を示す。

【図11】SYNJ2がプロテアーゼ分泌および浸潤突起集合を調節することを示す図である。図11A-shCtrlおよびshSYNJ2MDA-MB-231細胞を、Matrigel中で5日間培養し、固定し、MMP-9について免疫染色した。シグナル

強度をヒートマップに変換し、コロニーコアからの距離に対してプロットした。矢頭はスフェロイドの境界を示す。バーは50  $\mu\text{m}$ である。図11B - 対照MDA - MB - 231細胞およびSYNJ2を安定に過剰発現する細胞からの上清を、ゼラチンザイモグラフィを用いてMMP - 2およびMMP - 9活性について3回反復で分析した。図11C - GFP - SYNJ2を安定に発現するMDA - MB - 231細胞を、架橋蛍光ゼラチンで予め被覆されたカバースリップ上に播種した。3時間後、細胞をGFPおよびF - アクチンについて精査し、浸潤突起構造を検出した(矢頭)。バーは10  $\mu\text{m}$ である。図11D - SYNJ2を過剰発現するMDA - MB - 231細胞(SYNJ2 - OX)ならびに*siCtrl*または*siSYNJ2*オリゴヌクレオチドで予備処理された細胞を、架橋蛍光ゼラチンで予め被覆されたカバースリップ上に播種し、浸潤突起構造を3回の独立した実験において定量した。図11E - 示された*siRNA*で処理されたMDA - MB - 231細胞の浸潤突起構造を、ゼラチン分解、ならびにF - アクチンまたはTKS5に関する染色によって検出した。矢頭(Z軸画像)は浸潤突起を示す。バーは10  $\mu\text{m}$ である。図11F - *siCtrl*または*siSYNJ2*を発現するMDA - MB - 231細胞をゼラチン被覆カバースリップ上に播種し、ファロイジンおよびリン酸化型EGFR(チロシン1068)に対する抗体を用いてCに記載のように加工した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ である。図11G - 示されたMDA - MB - 231誘導体により3日間にわたって条件付けられた培地を、EGF様リガンドに関するELISAに基づくアッセイを用いて検査した。

【図12】SYNJ2がマトリックス分解および浸潤突起集合を調節することを示す図である。図12A - 示された*siRNA*で処理されたMDA - MB - 231細胞を3回反復で播種し、3日間培養し、その条件化培地をゼラチン(0.1%)埋込みゲルを用いて電気泳動により分離した後、MMP - 2およびMMP - 9タンパク質分解活性を定量するためにタンパク質染色を行った。図12B - GFPコンジュゲート化ビーズおよびGFP - SYNJ2を安定に発現するMDA - MB - 231細胞の清澄化された抽出物を用いる同時免疫沈降分析。図12C - GFP - SYNJ2を安定に発現するMDA - MB - 231細胞に、RFP - コルタクチンプラスミドをトランスフェクトし、コラーゲンプレート上に播種した。生細胞画像分析を48時間後に実施し、末梢および中枢細胞領域の両方の代表的なスナップショット画像を捕捉した。スケールバーは5  $\mu\text{m}$ である。図12D - MDA - MB - 231細胞の示された誘導体に、Tapp1(P1(3,4)P<sub>2</sub>結合剤)のMycタグ付PHドメインをコードするプラスミドをトランスフェクトし、48時間後、それらをゼラチン被覆表面上に播種した。F - アクチン、凝集したTKS5およびP1(3,4)P<sub>2</sub>(Tapp1)の同時分布を可視化し、共焦点顕微鏡を用いて定量した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ である。図12E - *siCtrl*または*siSYNJ2*を発現するMDA - MB - 231細胞を、FITC - ゼラチン被覆ガラスカバースリップ上に播種し、3時間インキュベートした。次いで、細胞を固定し、CD44について免疫染色し、TRITC - ファロイジンを用いてF - アクチンについて対抗染色した。細胞を蛍光顕微鏡を用いて可視化し、FITC - ゼラチンマトリックス中の穴を観察することにより、浸潤突起を検出した。枠付の領域を拡大する。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ である。図12F - CD44に対する抗体を、*shCtrl*および*shSYNJ2*細胞による表面発現のFACS分析のために用いた。示されるのは、枠付の領域に対応する細胞の画分である。図12G - *siCtrl*または*siSYNJ2*で予備処理されたMDA - MB - 231細胞を、FITC - ゼラチン被覆ガラスカバースリップ上に播種し、3時間インキュベートした。次いで、細胞を固定し、MT1 - MMPについて免疫染色し、TRITC - ファロイジンを用いてF - アクチンについて対抗染色した。スケールバーは10  $\mu\text{m}$ である。

【図13】SYNJ2の酵素活性が乳腺腫瘍細胞の転移拡散を推進することを示す図である。図13A - RFPを発現するMDA - MB - 231細胞の示された誘導体(2 × 10<sup>6</sup>個/マウス)を、雌のSCIDマウス(10 ~ 11匹/群)の脂肪体中に埋込んだ。腫瘍サイズ(平均 ± S.D.)を、埋込みの2および6週間後に測定した。図13B ~ C - 腋窩リンパ節および遠隔リンパ節(図13B)、または肺(図13C)への埋込みの6週間後に出現した転移を示す。星印はp値: \* < 0.05、\*\* < 0.01および\*\*\* <

10

20

30

40

50

0.001を示す。図13D~F - 対照(LacZ)およびSYNJ2を過剰発現する(SYNJ2-OX)RFP標識されたMDA-MB-231細胞を、Aに記載のように動物中に埋込み、腫瘍サイズ(図13D)、ならびにリンパ節(図13E)および肺(図13F)への転移を、埋込みの6および8週間後に定量した。図13G~H - 示されたMDA-MB-231-RFP誘導体を、5週齢の雌のSCIDマウスの静脈内( $1.5 \times 10^5$ 個/マウス; 尾静脈)、または乳腺脂肪体( $2.5 \times 10^6$ 個/マウス)中に注入した。4週間後、静脈中に注入されたマウスからの肺を、RFPシグナルについて検査した(左および中央パネル)。末梢血を、4週間後に脂肪体処理群から採取した。試料をフィコールの勾配上で精製し、 $1 \times 10^6$ のFACS読取り値あたりのRFP陽性循環腫瘍細胞(CTC)の数をスコア化し、腫瘍重量に対して正規化した。

10

【図14】局部および遠隔リンパ節転移の*in vivo*での画像化の図である。MDA-MB-231-RFP細胞を接種し、6週間後に分析したマウスにおける局部(同側)および遠隔(反対側)リンパ節転移の代表的な画像(図13Bを参照されたい)。画像化の前に、マウスを麻酔し、リンパ節における転移の可視化および定量化のためにその毛皮を除去した。

【図15】細胞移動および侵襲におけるSYNJ2の総合的な作用を描くワーキングモデルの図である。EGFRを充填したりサイクルしているエンドソームは腹側膜に活性な受容体を位置させ、次いで、PI3Kの局部活性化を行う。PI3Kによる膜のPI(4,5) $P_2$ のリン酸化はPI(3,4,5) $P_3$ を生成し、SYNJ2によりPI(3,4) $P_2$ に脱リン酸化される。後者は、コルタクチンを固定し、アクチン重合の核となるTKS5を動員する。同時に、SYNJ2はCD44などの接着分子、およびMT1-MMPなどのプロテアーゼの送達を制御し、細胞外マトリックス(ECM)を分解し、新しい侵襲構造、浸潤突起を確立する。類似する方法で、細胞周辺へのEGFRの送達は、SYNJ2(およびホスホリパーゼC)によるPI(4,5) $P_2$ の破壊をもたらし、ダイナミンおよびコフィリンなどのアクチン切断酵素を局部的に活性化して、皮質アクチン繊維を溶解し、葉状仮足と呼ばれる、アクチンが充填され、インテグリンに富む突出を開始させる。水平の矢印は、細胞移動の方向を示す。形質膜の色分けされた部分は、特異的PIリン脂質を示す。

20

【図16】SYNJ2が侵襲性乳腫瘍において高度に発現されることを示す図である。図16A - 免疫組織化学および組織マイクロアレイを用いて、SYNJ2存在量に従って331の侵襲性乳がん腫を階層化した(高い、中程度および低い)。腫瘍の相対画分を、臨床サブタイプに従って提示する。図16B - 内腔の場合(星印は対照としての内皮細胞による発現を示す)、および基底様とHER2過剰発現乳腫瘍の両方において観察された強度およびパターンを示すSYNJ2染色の代表的画像である(右列は拡大画像)。図16C - 286人(左: GSE2034)または99人(右: GSE19783)の乳がん患者のコホートにおけるSYNJ2 mRNA発現に従って階層化されたKaplan-Meier曲線である。

30

【図17】SYNJ2の5'-ホスファターゼ活性を測定するのに用いられる蛍光偏光アッセイの原理を示す図である。図17Aは、未結合のPI(3,4) $P_2$ 蛍光プローブは低い偏光読取り値を生じさせるが、結合したPI(3,4) $P_2$ 蛍光プローブは偏光読取り値を増加させる一般原理を示すスキームである。図17Bは、偏光値(mP)により測定されたSYNJ2 5'-ホスファターゼ活性検出を示す代表的な棒グラフである。

40

【図18】pET28プラスミド中にクローニングされ、大腸菌中で発現されたFlag-TAPP1 PHドメイン-Hisのアミノ酸および核酸配列(それぞれ、配列番号13および14)の図である。TAPP1 PHドメインは黄色で示す。

【発明を実施するための形態】

【0031】

本発明は、そのいくつかの実施形態において、腫瘍転移を防止し、がんを処置および予後診断し、推定転移阻害剤である薬剤を同定する方法に関する。

【0032】

50

本発明の少なくとも1つの実施形態を詳細に説明する前に、本発明は、その出願において、以下の説明に記載されるか、または実施例により例示される詳細に限定されとは限らないことが理解されるべきである。本発明は、他の実施形態または様々な方法で実施もしくは実行されることを可能にする。

【0033】

増殖因子は細胞移動および転移を推進するが、基礎となる機構は完全には理解されていない。

【0034】

本発明者らは、ここで、*in vitro*で浸潤突起および葉状仮足を調節し、*in vivo*でがん転移を調節する優れたモジュールとしてシナプトジャニン-2 (SYNJ 2)を同定した。

10

【0035】

以下およびその後の実施例の節で例示されるように、本発明者らは、*in vitro*、動物、および患者標本においてその知見を実証した。特に、EGFで刺激した乳腺細胞を用いて、本発明者らは、脂質ホスファターゼシナプトジャニン2 (SYNJ 2)を、侵襲的表現型と関連付け、高いSYNJ 2をがん患者の短い生存率と関係付けた。SYNJ 2のノックダウンは、動物モデルにおいて乳腺腫瘍細胞の転移を確実に悪化させた。*in vitro*では、SYNJ 2枯渇細胞は、EGFRおよびインテグリンの逸脱した輸送を示し、接着斑の変形、葉状仮足の停止および浸潤突起の消失をもたらした。理論に束縛されるものではないが、能動的なEGFRのリサイクルが特定のホスホイノシトール脂質のSYNJ 2媒介性脱リン酸化を局所的に促進することによって、浸潤突起と葉状仮足の両方の形成を引き起こし、腫瘍進行を容易にすることが示唆される(図15を参照されたい)。

20

【0036】

よって、本発明の態様によれば、腫瘍がグリオーマではないという条件で腫瘍転移を防止する方法であって、腫瘍転移の防止を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン2 (SYNJ 2)の阻害剤を投与することによって、腫瘍転移を防止するステップを含む、方法が提供される。

【0037】

本明細書で用いられる語句「腫瘍転移」とは、その原発部位から身体他の部分へ拡散する悪性腫瘍、例えば、肺に転移する乳がんを指す。

30

【0038】

本明細書で用いられる用語「がん」および「腫瘍」は、互換的に用いられる。この用語は、異常な、および未制御の細胞分裂により引き起こされる悪性増殖または腫瘍を指す。

【0039】

本明細書で用いられる用語「防止すること」とは、転移プロセスまたは進行およびその後の転移を停止させること、休止させること、阻害することを指す。

【0040】

さらに別の態様によれば、がんを処置する方法であって、がんの処置を必要とする対象に治療上有効量のシナプトジャニン2 (SYNJ 2)の阻害剤およびがんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤を投与することによって、がんを処置するステップを含む、方法が提供される。

40

【0041】

本明細書で用いられる用語「処置すること」は、ある状態の進行を無効化すること、実質的に阻害すること、遅延させること、もしくは逆転させること、ある状態の臨床もしくは美的症状を実質的に改善すること、またはある状態の臨床もしくは美的症状の出現を実質的に防止することを含む。

【0042】

本発明のいくつかの実施形態に従って処置(または予後診断)することができるがんの非限定例としては、限定されるものではないが、消化管の腫瘍(結腸がん腫、直腸がん腫

50

、結腸直腸がん腫、結腸直腸がん、結腸直腸腺腫、遺伝性非腺腫性1型、遺伝性非腺腫性2型、遺伝性非腺腫性3型、遺伝性非腺腫性6型；結腸直腸がん、遺伝性非腺腫性7型、小腸およびノもしくは大腸がん腫、食道がん腫、食道がんを伴う肝臓症、胃がん腫、脾臓がん腫、脾内分泌腫瘍）、子宮内膜がん腫、隆起性皮膚線維肉腫、胆嚢がん腫、胆管腫瘍、前立腺がん、前立腺腺がん、腎臓がん（例えば、ウィルムス腫瘍2型もしくは1型）、肝臓がん（例えば、肝芽腫、肝細胞がん腫、肝細胞がん）、膀胱がん、胎児性横紋筋肉腫、胚細胞腫瘍、絨毛性腫瘍、精巢性胚細胞腫瘍、卵巣、子宮、上皮性卵巣の未熟型奇形腫、仙尾部腫瘍、絨毛がん腫、胎盤部位絨毛性腫瘍、上皮性成人腫瘍、卵巣がん腫、漿液性卵巣がん、卵巣性索腫瘍、子宮頸がん腫、子宮頸部がん腫、小細胞および非小細胞肺癌がん腫、鼻咽頭がん腫、乳がん腫（例えば、乳管がん、侵襲性管内乳がん、散発性；乳がん、乳がんに対する罹患性、4型乳がん、乳がん-1、乳がん-3；乳-卵巣がん）、扁平上皮がん腫（例えば、頭部および頸部における）、神経原性腫瘍、星状細胞腫、神経節芽腫、神経芽腫、リンパ腫（例えば、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、B細胞、パーキット、皮膚T細胞、組織球性、リンパ芽球性、T細胞性、胸腺リンパ腫）、グリオーマ、腺がん、副腎腫瘍、遺伝性副腎皮質がん腫、脳の悪性腫瘍（腫瘍）、様々な他のがん腫（例えば、気管支大細胞、腺管、Ehrlich-Lettre腹水、類表皮、大細胞、Lewis肺、髓様、粘膜表皮、燕麦細胞、小細胞、紡錘細胞、有棘細胞、移行細胞、未分化、がん肉腫、絨毛がん腫、嚢胞腺がん）、上衣芽細胞腫、上皮腫、赤白血病（例えば、フレンド、リンパ芽球）、線維肉腫、巨細胞種様、グリア腫瘍、グリア芽腫（例えば、多形成、星状細胞腫）、グリオーマ、肝がん、ヘテロハイブリドーマ、ヘテロミエローマ、組織球腫、ハイブリドーマ（例えば、B細胞）、副腎腫、インスリノーマ、脾島腫瘍、角化症、平滑筋芽腫、平滑筋肉腫、白血病（例えば、急性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、前駆B細胞急性リンパ芽球性白血病、T細胞急性リンパ芽球性白血病、急性巨核芽球性白血病、単球性白血病、急性骨髄白血病、急性骨髄性白血病、好酸球増加症を伴う急性骨髄性白血病、B細胞白血病、好塩基球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性白血病、B細胞白血病、好酸球性白血病、フレンド白血病、顆粒球性もしくは骨髄細胞性白血病、ヘアリー細胞白血病、リンパ球性白血病、巨核芽球性白血病、単球性白血病、単球-マクロファージ白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄性白血病、骨髄単球性白血病、形質細胞性白血病、前駆B細胞白血病、前骨髄球性白血病、亜急性白血病、T細胞白血病、リンパ球新生物、骨髄悪性腫瘍の素因、急性非リンパ球性白血病）、リンパ肉腫、黒色腫、乳腺腫瘍、肥満細胞腫、髓芽細胞腫、中皮腫、転移腫瘍、単球性腫瘍、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、骨髄腫、腎芽細胞腫、神経組織グリア腫瘍、神経組織ニューロン腫瘍、神経線維腫症、神経芽腫、乏突起膠腫、骨軟骨腫、オステオミエローマ、骨肉腫（例えば、ユーイング肉腫）、乳頭腫、移行細胞、褐色細胞腫、下垂体部腫瘍（侵襲性）、形質細胞腫、網膜芽腫、横紋筋肉腫、肉腫（例えば、ユーイング肉腫、組織球性細胞肉腫、イエンセン肉腫、骨原性肉腫、細網肉腫）、神経鞘腫、皮下腫瘍、奇形がん腫（例えば、多能性）、奇形腫、精巢腫瘍、胸腺腫および毛包上皮腫、胃がん、線維肉腫、多形成グリア芽細胞腫；多発性グロムス腫瘍、リー-フラウメニがん症候群、脂肪肉腫、II型リンチ症候群、雄性胚細胞腫瘍、肥満細胞白血病、甲状腺髓様がん、多発性髄膜腫、内分泌新生物、粘液肉腫、非クロム親和性傍神経節腫、石灰化上皮腫、乳頭状、家族性および散発性、ラブドイド素因症候群、家族性、ラブドイド腫瘍、軟部肉腫、ならびにグリア芽腫を伴うターコット症候群などの、任意の固形または非固形のがんおよびノまたはがん転移が挙げられる。

【0043】

特定の実施形態によれば、がんは、乳がんである。

【0044】

特定の実施形態によれば、がん（またはがん転移）は、EGFにより調節される。

【0045】

別の好ましい実施形態によれば、がんは、EGFRまたはHER2などのErbB受容体分子の過剰発現または上方調節を特徴とする。

【0046】



E G F R 過剰発現（上方調節として知られる）または過剰活性をもたらす突然変異は、肺がん、肛門がんおよび多形成グリア芽細胞腫などのいくつかのがんと関連している。この後者の場合、E G F R v I I I と呼ばれる、多かれ少なかれ特異的な E G F R の突然変異が観察されることが多い。E G F R またはファミリーメンバーの突然変異、増幅または誤調節は、全ての上皮がんの約 30 % に関与している。

【 0 0 4 7 】

E G F R を含む突然変異は、その定常的な活性化をもたらし、未制御の細胞分裂 - がんの素因をもたらし得る。結果として、E G F R の突然変異がいくつかの型のがんにおいて同定され、それは拡大するクラスの前がん療法の標的である（非特許文献 2）。

【 0 0 4 8 】

E R B B 2 遺伝子の増幅または過剰発現は、約 30 % の乳がんにおいて起こる。それは疾患の再発率の増加および予後の悪化と強く関係している。過剰発現はまた、卵巣がん、胃がん、および侵襲型の子宮がん、例えば、子宮内膜漿液性腺がんにおいても起こることが知られている。

【 0 0 4 9 】

以下は、E r b B ファミリーの受容体チロシンキナーゼのメンバーが関与するがんの一覧である。

【 0 0 5 0 】

E r b B - 1 - 副腎皮質がん、胆道がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、食道がん、胆嚢がん、胃がん、グリア芽細胞腫、頭部および頸部がん、肺がん（非小細胞、扁平上皮がん腫、腺がん、および大細胞肺がん）、膵臓がん、唾液腺がん、下痢性良性新生物、侵襲性がん腫、皮膚疾患、非浸潤性乳管がん、爪周囲炎。

【 0 0 5 1 】

E r b B - 2 - 胆道がん、膀胱がん、乳がん、胆管がん、食道がん、胆嚢がん、胃がん、グリア芽細胞腫、卵巣がん、膵臓がん、唾液腺がん。特定の実施形態によれば、がんは、乳がんまたは胃がんである。

【 0 0 5 2 】

E r b B - 3 - 乳がん、肺がんおよびウイルス性白血病。

【 0 0 5 3 】

E r b B - 4 - 乳がん、ウイルス性白血病、髄芽細胞腫、肺がんおよび乳腺腫瘍。

【 0 0 5 4 】

本明細書で用いられる用語「対象」とは、がんと診断された哺乳動物（例えば、ヒト）を指す。

【 0 0 5 5 】

本明細書で用いられる場合、シナプトジャニン - 2 または S Y N J 2 とは、シナプスのイノシトール - 1 , 4 , 5 - 三リン酸 5 - ホスファターゼ 2、E C 3 . 1 . 3 . 3 6 を指す。シナプトジャニン - 2 は、普遍的に発現されるイノシトールポリリン酸 5 - ホスファターゼである（それぞれ、ポリヌクレオチドおよびコードされるポリペプチドを指す配列番号 1 および 2）。

【 0 0 5 6 】

本明細書で用いられる語句「シナプトジャニン 2（S Y N J 2）の阻害剤」とは、S Y N J 2 の発現または活性を減少させるか、または下方調節する分子を指す。

【 0 0 5 7 】

下方調節は、10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 % を超えるものであるか、または完全な阻害（以下に記載のものなどの所与のアッセイによって決定された場合、活性または発現の 100 % の喪失）であってもよい。

【 0 0 5 8 】

S Y N J 2 の発現の下方調節を、以下に記載のように D N A、R N A またはタンパク質レベルで行うことができる。S Y N J 2 活性とは、その触媒活性 [ ホスファターゼとして、P I ( 3 , 4 , 5 ) P<sub>3</sub> を P I ( 3 , 4 ) P<sub>2</sub> に変換する ]、そのシグナリング活性（

10

20

30

40

50

ダイナミン、コトラクチンと相互作用する、図 5 E ~ H を参照されたい) または細胞局在化を指す。後者の場合、SYNJ2 の阻害剤は、タンパク質の細胞局在化を変化させる。

【0059】

かくして、SYNJ2 の下方調節を、遺伝子をノックインするか、またはその転写および/もしくは翻訳を阻害する様々な分子 [ 例えば、核酸サイレンシング剤、例えば、核酸 (RNA) サイレncing 剤、例えば、アンチセンス、siRNA、shRNA、マイクロRNA、リボザイムおよびDNAザイム ] を用いてゲノムおよび/もしくは転写物レベルで、または例えば、アンタゴニスト、ポリペプチドを切断する酵素などを用いてタンパク質レベルで行うことができる。

【0060】

以下は、SYNJ2 の発現レベルおよび/または活性を下方調節することができる薬剤の一覧である。

【0061】

SYNJ2 を下方調節することができる薬剤の一例は、SYNJ2 に特異的に結合することができる抗体または抗体断片である。好ましくは、この抗体は、SYNJ2 の少なくとも1つのエピトープに特異的に結合する。SYNJ2 は細胞タンパク質であるので、抗体を細胞中に導入するための手段が取られる。本明細書で用いられる用語「エピトープ」とは、抗体のパラトープが結合する抗原上の任意の抗原決定基を指す。

【0062】

エピトープ決定基は通常、アミノ酸または炭水化物側鎖などの、分子の化学的に活性な表面基からなり、通常は特異的な三次元構造特性、ならびに特異的な電荷特性を有する。

【0063】

本発明で用いられる用語「抗体」は、マクロファージに結合することができる無傷の分子ならびに Fab、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvなどのその機能的断片を含む。これらの機能的抗体断片は、以下のように定義される：(1) Fab、この断片は抗体分子の一価抗原結合断片を含有し、パパイン酵素を用いた全抗体の消化により生成することができ、無傷の軽鎖および1つの重鎖の一部が得られる；(2) F(ab')<sub>2</sub>、この抗体分子の断片は、全抗体をペプシンで処理した後、還元することにより得ることができ、無傷の軽鎖および重鎖の一部が得られる；抗体1分子あたり2つのF(ab')<sub>2</sub>断片が得られる；(3) (F(ab')<sub>2</sub>)<sub>2</sub>、この抗体の断片は、全抗体をペプシン酵素で処理した後、還元しないことにより得ることができる；F(ab')<sub>2</sub>は、2つのジスルフィド結合により一緒に保持された2つのF(ab')<sub>2</sub>断片の二量体である；(4) Fv、2つの鎖により発現される軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子工学的に操作された断片と定義される；ならびに(5) 一本鎖抗体(「SCA」)、遺伝子的に融合された一本鎖分子として好適なポリペプチドリンカーにより連結された、軽鎖の可変領域および重鎖の可変領域を含有する遺伝子工学的に操作された分子。

【0064】

ポリクローナルおよびモノクローナル抗体ならびにその断片を生成する方法は、当業界で周知である(例えば、参照により本明細書に援用される非特許文献3を参照されたい)。

【0065】

本発明のいくつかの実施形態による抗体断片を、抗体のタンパク質分解的加水分解によるか、または断片をコードするDNAの大腸菌もしくは哺乳動物細胞中での発現(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞培養物もしくは他のタンパク質発現系)により調製することができる。抗体断片を、従来の方法による全抗体のペプシンまたはパパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体断片を、ペプシンを用いた抗体の酵素的切断により生成して、F(ab')<sub>2</sub>と命名される5Sの断片を提供することができる。この断片を、チオール還元剤、場合により、ジスルフィド結合の切断から得られるスルフヒドリル基のための遮断基を用いてさらに切断して、3.5SのF(ab')<sub>2</sub>一価断片を生成することができる。あるいは、ペプシンを用いる酵素的切断は、2つの一価F(ab')<sub>2</sub>断片とFc断

10

20

30

40

50

片とを直接生成する。これらの方法は、例えば、G o l d e n b e r gの特許文献1および特許文献2、ならびにそこに含まれる参考文献により記載されており、これらの特許はその全体が参照により本明細書に援用される。また、非特許文献4も参照されたい。断片が無傷抗体により認識される抗原に結合する限り、抗体を切断する他の方法、例えば、一価重鎖 - 軽鎖断片を形成するための重鎖の分離、断片のさらなる切断、または他の酵素的、化学的、もしくは遺伝子的技術を用いることもできる。

#### 【0066】

F v断片は、V HとV L鎖の会合を含む。この会合は、非特許文献5に記載のように、非共有的であってもよい。あるいは、可変鎖を、分子間ジスルフィド結合により連結するか、またはグルタルアルデヒドなどの化学物質により架橋することができる。好ましくは、F v断片は、ペプチドリンカーにより接続されたV HおよびV L鎖を含む。これらの一本鎖抗原結合タンパク質(s F v)は、オリゴヌクレオチドにより接続されたV HおよびV LドメインをコードするDNA配列を含む構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子は発現ベクター中に挿入され、続いて、大腸菌などの宿主細胞中に導入される。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単一ポリペプチド鎖を合成する。s F vを生成するための方法は、例えば、非特許文献6、非特許文献7、非特許文献8、および特許文献3(その全体が参照により本明細書に援用される)により記載されている。

10

#### 【0067】

別の形態の抗体断片は、単一の相補性決定領域(C D R)をコードするペプチドである。C D Rペプチド(「最小認識単位」)を、対象の抗体のC D Rをコードする遺伝子を構築することにより得ることができる。そのような遺伝子は、例えば、抗体生成細胞のRNAから可変領域を合成するためのポリメラーゼ連鎖反応を用いることにより調製される。例えば、非特許文献9を参照されたい。

20

#### 【0068】

抗S Y N J 2は市販されている。抗ヒトS Y N J 2モノクローナル抗体の供給業者の例としては、限定されるものではないが、A m s b i o、A t l a s A n t i b o d i e s、A b D S e r o t e c、U n i t e d S t a t e s B i o l o g i c a l、a n t i b o d i e s - o n l i n e . c o m、G e n w a y、P r o t e i n t e c h G r o u pなどが挙げられる。本発明の抗体は、治療適用のために非免疫原性になっている。

30

#### 【0069】

ヒト化形態の非ヒト(例えば、マウス)抗体は、免疫グロブリンのキメラ分子、免疫グロブリン鎖または非ヒト免疫グロブリンから誘導される最小配列を含有するその断片(F v、F a b、F a b'、F(a b')<sub>2</sub>もしくは抗体の他の抗原結合サブ配列)である。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(C D R)に由来する残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する、マウス、ラットまたはウサギなどの非ヒト種のC D Rに由来する残基(ドナー抗体)により置き換えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。いくつかの例においては、ヒト免疫グロブリンのF vフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられる。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体にも、輸入されたC D Rもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでもよい。一般に、ヒト化抗体は、C D R領域の全部または実質的に全部が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、F R領域の全部または実質的に全部がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体はまた、最適には、免疫グロブリン定常領域(F c)の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含む(非特許文献10、非特許文献11および非特許文献12)。

40

#### 【0070】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当業界で周知である。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである起源に由来する1つまたは複数のアミノ酸残基が導入されている。これらの

50

非ヒトアミノ酸残基は、輸入残基を指すことが多く、典型的には、輸入可変ドメインから取られる。ヒト化は、げっ歯類のCDRまたはCDR配列を、ヒト抗体の対応する配列に置換することにより、本質的にはWintersおよび共同研究者の方法（非特許文献10、非特許文献13、非特許文献14）に従って実施することができる。したがって、そのようなヒト化抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的に少ないものが、非ヒト種に由来する対応する配列によって置換された、キメラ抗体である（特許文献4）。実際、ヒト化抗体は、典型的には、いくつかのCDR残基およびおそらくいくつかのFR残基が、げっ歯類抗体中の同様の部位に由来する残基により置換されたヒト抗体である。

#### 【0071】

ヒト抗体を、ファージディスプレイライブラリーなどの、当業界で公知の様々な技術を用いて生成することもできる（非特許文献15、非特許文献16）。Cole et al.およびBoerner et al.の技術はまた、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用できる（非特許文献17、非特許文献18）。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、トランスジェニック動物、例えば、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活化されたマウスに導入することにより、ヒト抗体を作製することができる。チャレンジの際に、遺伝子再配置、集合、および抗体レパートリーなどのあらゆる点でヒトにおいて見られるものと密接に類似するヒト抗体生成が観察される。この手法は、例えば、特許文献5、特許文献6、特許文献7、特許文献8、特許文献9、特許文献10、ならびに以下の科学出版物：非特許文献19、非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22、非特許文献23および非特許文献24に記載されている。

#### 【0072】

SYNJ2の下方調節を、RNAサイレンシングにより達成することもできる。本明細書で用いられる語句「RNAサイレンシング」とは、対応するタンパク質コード遺伝子の発現の阻害または「サイレンシング」をもたらすRNA分子により媒介される調節機構群[例えば、RNA干渉(RNAi)、転写遺伝子サイレンシング(TGS)、転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)、クエリング、同時抑制、および翻訳抑制]を指す。RNAサイレンシングは、植物、動物、および菌類などの多くの種類の生物において観察されている。

#### 【0073】

本明細書で用いられる用語「RNAサイレンシング剤」とは、標的遺伝子の発現を特異的に阻害するか、または「サイレンシング」することができるRNAを指す。ある特定の実施形態においては、RNAサイレンシング剤は、転写後サイレンシング機構によりmRNA分子の完全なプロセッシング(例えば、完全な翻訳および/または発現)を防止することができる。RNAサイレンシング剤は、非コードRNA分子、例えば、対形成した鎖を含むRNA二本鎖、ならびにそのような非コードRNAを生成することができるRNA前駆体を含む。RNAサイレンシング剤の例としては、siRNA、miRNAおよびshRNAなどのdsRNAが挙げられる。一実施形態においては、RNAサイレンシング剤は、RNA干渉を誘導することができる。別の実施形態においては、RNAサイレンシング剤は、翻訳抑制を媒介することができる。

#### 【0074】

本発明のある実施形態によれば、RNAサイレンシング剤は、標的RNA(例えば、SYNJ2)に特異的であり、標的遺伝子に対する99%以下の全体的相同性、例えば、標的遺伝子に対する98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%未満の全体的相同性を発現する遺伝子またはスプライスバリエントを交叉阻害しないか、または沈黙させない。

#### 【0075】

RNA干渉とは、低分子干渉RNA(siRNA)により媒介される、動物における配列特異的転写後遺伝子サイレンシングのプロセスを指す。植物における対応するプロセスは、一般に転写後遺伝子サイレンシングまたはRNAサイレンシングと呼ばれ、菌類にお

いてはクエリングとも呼ばれる。転写後遺伝子サイレンシングのプロセスは、外来遺伝子の発現を防止するために用いられる進化的に保存された細胞防御機構であると考えられ、一般に多様な植物相および動物門によって共有される。外来遺伝子発現からのそのような保護は、ウイルス感染から、または相同な一本鎖RNAもしくはウイルスゲノムRNAを特異的に破壊する細胞応答によるトランスポゾンエレメントの宿主ゲノム中への無作為な組込みから誘導される二本鎖RNA (dsRNA) の生成に応答して進化してきたものであってもよい。

#### 【0076】

細胞中の長いdsRNAの存在は、ダイサーと呼ばれるリボヌクレアーゼIII酵素の活性を刺激する。ダイサーは、dsRNAから低分子干渉RNA (siRNA) として知られるdsRNAの短片へのプロセッシングに関与する。ダイサー活性から誘導される低分子干渉RNAは、典型的には約21~約23ヌクレオチド長であり、約19塩基対の二本鎖を含む。RNAi応答はまた、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖と相補的な配列を有する一本鎖RNAの切断を媒介する、RNAにより誘導されるサイレンシング複合体 (RISC) と一般に呼ばれる、エンドヌクレアーゼ複合体も特徴とする。標的RNAの切断は、siRNA二本鎖のアンチセンス鎖と相補的な領域の中央で起こる。

10

#### 【0077】

したがって、本発明のいくつかの実施形態は、mRNAからのタンパク質発現を下方調節するためのdsRNAの使用を企図する。

20

#### 【0078】

一実施形態によれば、dsRNAは30bpより大きい。長いdsRNA (すなわち、30bpよりも大きいdsRNA) の使用は、二本鎖RNAのこれらのより長い領域がインターフェロンおよびPKR応答の誘導をもたらすという考えのため、非常に限定されてきた。しかしながら、長いdsRNAの使用は、細胞が最適なサイレンシング配列を選択し、いくつかのsiRNAを試験する必要性を軽減することができる; 長いdsRNAがsiRNAに必要であるものよりも複雑度が低いサイレンシングライブラリーを可能にする; およびおそらく最も重要なことに、長いdsRNAが治療剤として用いられた場合にウイルスのエスケープ変異を防止することができるという点でいくつかの利点を提供することができる。

30

#### 【0079】

様々な研究が、長いdsRNAを用いて、ストレス応答を誘導するか、または有意なオフターゲット効果を引き起こすことなく遺伝子発現を沈黙化することができることを証明している。例えば、非特許文献25、非特許文献26、非特許文献27、非特許文献28、非特許文献29を参照されたい。

#### 【0080】

特に、本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明は、インターフェロン経路が活性化されない細胞 (例えば、胚細胞および卵母細胞) における遺伝子サイレンシングのための長いdsRNA (30塩基を超える転写物) の導入を企図する。例えば、非特許文献30、非特許文献31を参照されたい。

40

#### 【0081】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本発明はまた、遺伝子発現を下方調節するためにインターフェロンおよびPKR経路を誘導しないように特異的に設計された長いdsRNAの誘導を企図する。例えば、非特許文献32は、RNAポリメラーゼIII (Pol III) プロモーターから長い二本鎖RNAを発現する、pDECAPと命名されたベクターを開発した。pDECAPからの転写物は、細胞質へのdsRNAの輸出を容易にする5'-キャップ構造と3'-ポリ(A)テールの両方を欠くため、pDECAPに由来する長いdsRNAは、インターフェロン応答を誘導しない。

#### 【0082】

哺乳動物系においてインターフェロンおよびPKR経路を回避する別の方法は、トランスフェクションまたは内因性発現を介する低分子干渉RNA (siRNA) の誘導による

50

ものである。

#### 【0083】

用語「*siRNA*」とは、*RNA*干渉（*RNAi*）経路を誘導する低分子干渉*RNA*二本鎖（一般的には18～30塩基対）を指す。典型的には、*siRNA*は、中央の19bpの二本鎖領域と、末端に対称的な2塩基の3'突出とを含む21merとして化学的に合成されるが、25～30塩基長の化学的に合成された*RNA*二本鎖は同じ位置の21merと比較して、効力が100倍も増加し得ることが最近記載された。*RNAi*の誘発においてより長い*RNA*を用いて得られた観察された効力の増加は、生成物（21mer）の代わりに基質（27mer）を含むダイサーの提供から生じ、これは*siRNA*二本鎖の*RISC*中への進入の速度または効率を改善すると理論付けられる。

10

#### 【0084】

3'突出の位置は*siRNA*の効力に影響し、アンチセンス鎖上に3'突出を有する非対称性二本鎖は、センス鎖上に3'突出を有するものよりも一般に強力であることが見出された（Rose et al., 2005）。アンチセンス転写物を標的化する場合、反対の有効性パターンが観察されるため、これは*RISC*中への非対称性鎖充填に起因し得る。

#### 【0085】

二本鎖干渉*RNA*（例えば、*siRNA*）の鎖を接続して、ヘアピンまたはステムループ構造（例えば、*shRNA*）を形成することができる。かくして、記載のように、本発明のいくつかの実施形態の*RNA*サイレンシング剤は、短いヘアピン*RNA*（*shRNA*）であってもよい。

20

#### 【0086】

低分子干渉*RNA*分子の例を、Chuang et al.（上掲）におけるSJ2-1（コード領域1612～1633；5' AACGTGAACGGAGGAAGAAGCAG、配列番号3）、SJ2-2（3'非翻訳領域中の領域5419～5440；5' CTCCTTGCTGATACGCGATATT、配列番号4）；またはSYNJ2のコード領域1612～1633もしくは4925～4946に対する*siRNA*を教示する非特許文献33、非特許文献34に見出すことができる。

#### 【0087】

SYNJ2 mRNAレベルを上手く下方調節する*siRNA*配列の他の例としては、限定されるものではないが、GAAGAAACAUCUUUGAU（配列番号5）およびGGACAGCACUGCAGGUGUU（配列番号6）が挙げられる。

30

#### 【0088】

本明細書で用いられる用語「*shRNA*」とは、相補的配列の第1および第2の領域を含み、相補性の程度および領域の方向が、その領域の間で塩基対形成が起こるような十分なものであり、第1および第2の領域がループ領域によって連結され、ループが、ループ領域内のヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）間の塩基対形成の欠如の結果得られる、ステムループ構造を有する*RNA*剤を指す。ループ中のヌクレオチドの数は、3～23、または5～15、または7～13、または4～9、または9～11の間およびそれを含む数である。ループ中のヌクレオチドのいくつかは、ループ中の他のヌクレオチドとの塩基対相互作用に関与し得る。ループを形成させるために用いることができるオリゴヌクレオチド配列の例としては、5'-UUCAGAGGA-3'（非特許文献35）および5'-UUUGUGUAG-3'（非特許文献36）が挙げられる。当業者であれば、得られる一本鎖オリゴヌクレオチドが*RNAi*機構と相互作用することができる二本鎖領域を含むステムループまたはヘアピン構造を形成することを認識できる。

40

#### 【0089】

SYNJ2 mRNAレベルを上手く下方調節する*shRNA*配列の例としては、限定されるものではないが、CCGGCCCTACGATACAAAGCGACAAATCTCGAAGATTGTGCTGCTTGTATCGTAGGTTTTTG（配列番号7）；CCGGCGAGAGGAGATCATTCGGAAACTCGAGTTTTCCGAATGATCTCTCTCTCGTTTTTG（配列番号8）；CCGGCCGGAGAGAACAG

50

TTTGAGCAACTCGAGTTGCTCAAACTGTTCTTCCGGTTTT  
TG (配列番号 9) が挙げられる。

【0090】

本発明のいくつかの実施形態と共に使用するのに好適な RNA サイレンシング剤の合成を、以下のように行うことができる。第 1 に、SYNJ2 mRNA 配列を、AA ジヌクレオチド配列の AUG 開始コドンの下流で走査する。それぞれの AA および 3' に隣接する 19 ヌクレオチドの出現を、潜在的な siRNA 標的部位として記録する。非翻訳領域 (UTR) は調節タンパク質結合部位中により多いため、好ましくは、siRNA 標的部位を、オープンリーディングフレームから選択する。UTR 結合タンパク質および / または翻訳開始複合体は、siRNA エンドヌクレアーゼ複合体の結合を阻害することができる (非特許文献 37)。しかし、5' UTR を指向する siRNA が細胞内 GAPDH mRNA の約 90% の減少を媒介し、タンパク質レベルを完全に無効化した GAPDH について証明されたように (非特許文献 38)、非翻訳領域を指向する siRNA も有効であることが理解される。

10

【0091】

第 2 に、潜在的な標的部位を、NCBI サーバー (非特許文献 39) から入手可能な BLAST ソフトウェアなどの任意の配列アラインメントソフトウェアを用いて、好適なゲノムデータベース (例えば、ヒト、マウス、ラットなど) と比較する。他のコード配列に対する有意な相同性を示す推定標的部位をフィルタリングする。

20

【0092】

適格な標的配列を、siRNA 合成のための鋳型として選択する。低い G / C 含量を含むものは 55% より高い G / C 含量を含むものと比較して遺伝子サイレンシングの媒介においてより有効であることが証明されているため、好ましい配列は低い G / C 含量を含むものである。いくつかの標的部位を、好ましくは、評価のために標的遺伝子の長さに沿って選択する。選択された siRNA のより良好な評価のために、好ましくは陰性対照と一緒に用いる。陰性対照 siRNA は、好ましくは siRNA と同じヌクレオチド組成を含むが、ゲノムに対する有意な相同性を欠く。かくして、好ましくは siRNA のスクランブルされたヌクレオチド配列を用いるが、但し、それは任意の他の遺伝子に対する任意の有意な相同性を示さない。

30

【0093】

本発明のいくつかの実施形態の RNA サイレンシング剤は、RNA のみを含有する分子に限定される必要はないが、化学的に改変されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドをさらに包含することが理解される。

【0094】

いくつかの実施形態においては、本明細書で提供される RNA サイレンシング剤は、「細胞透過性ペプチド」と機能的に関連していてもよい。本明細書で用いられる場合、「細胞透過性ペプチド」は、短い (約 12 ~ 30 残基) アミノ酸配列または細胞の形質膜および / もしくは核膜を横断する膜透過性複合体の輸送と関連するエネルギー非依存的 (すなわち、非エンドサイトーシス) 転位特性を付与する機能的モチーフを含むペプチドである。本発明のいくつかの実施形態の膜透過性複合体において用いられる細胞透過性ペプチドは、好ましくは、ジスルフィド結合のために改変された二本鎖リボ核酸とのそのような結合を含まないか、またはそれを形成するように誘導体化される、少なくとも 1 つの非機能的システイン残基を含む。そのような特性を付与する代表的なアミノ酸モチーフは、その内容が参照により本明細書に明示的に援用される特許文献 11 に列挙される。本発明のいくつかの実施形態の細胞透過性ペプチドとしては、好ましくは、限定されるものではないが、ペネトラチン、トランスポータン、pI s1、TAT (48 - 60)、pVEC、MTS、および MAP が挙げられる。

40

【0095】

RNA サイレンシング剤を用いて標的化される mRNA としては、限定されるものではないが、その発現が望ましくない表現型形質と相関するものが挙げられる。標的化するこ

50

とができる mRNA の例は、トランケートされたタンパク質をコードする、すなわち、欠失を含むものである。したがって、本発明のいくつかの実施形態の RNA サイレncing 剤を、いずれかの側の欠失上の架橋領域に標的化させることができる。そのような RNA サイレncing 剤の細胞中への導入は、非突然変異タンパク質に影響しないようにしながら、突然変異タンパク質の下方調節を引き起こす。

【0096】

別の実施形態によれば、RNA サイレncing 剤は、miRNA であってもよい。

【0097】

用語「マイクロRNA」、「miRNA」および「miR」は同義語であり、遺伝子発現を調節する約19~28ヌクレオチド長の非コード一本鎖RNA分子の集合を指す。miRNAは様々な生物中に見出され(非特許文献40)、発生、恒常性、および病因において役割を果たすことが示されている。

【0098】

以下は、miRNA 活性の機構の簡単な説明である。

【0099】

miRNA をコードする遺伝子は転写され、プリ-miRNA として知られる miRNA 前駆体の生成をもたらす。プリ-miRNA は、典型的には、複数のプリ-miRNA を含む多シストロン性 RNA の一部である。プリ-miRNA は、ステムおよびループを含むヘアピンを形成することができる。ステムは、不一致の塩基を含んでもよい。

【0100】

プリ-miRNA のヘアピン構造は、RNase III エンドヌクレアーゼである Drosha によって認識される。Drosha は、典型的には、プリ-miRNA 中の末端ループを認識し、約2つのヘリックスターンをステムに切断して、プレ-miRNA として知られる60~70ヌクレオチドの前駆体を生成する。Drosha は、RNase III エンドヌクレアーゼに典型的な互い違いの切断でプリ-miRNA を切断し、5'リン酸および約2ヌクレオチドの3'突出を有するプレ-miRNA ステムループを得る。Drosha 切断部位を超えて伸長するステムのおよそ1つのヘリックスターン(約10ヌクレオチド)が効率的なプロセッシングにとって必須であると思われる。次いで、プレ-miRNA は、Ran-GTP および輸送受容体 Exportin-5 によって核から細胞質へ能動的に輸送される。

【0101】

次いで、プレ-miRNA の二本鎖ステムは、RNase III エンドヌクレアーゼでもあるダイサーによって認識される。ダイサーもまた、ステムループの基部にある5'リン酸および3'突出を認識することができる。次いで、ダイサーはステムループの基部から末端ループの2つのヘリックスターンを切断し、さらなる5'リン酸および約2ヌクレオチドの3'突出を脱離する。不一致を含んでもよい、得られる siRNA 様二本鎖は、成熟 miRNA および miRNA\* として知られる同様のサイズの断片を含む。miRNA および miRNA\* は、プリ-miRNA およびプレ-miRNA の反対側のアームから誘導することができる。miRNA\* 配列はクローニングされた miRNA のライブラリー中に見出されるが、典型的には、miRNA よりも低い頻度で見出される。

【0102】

初めは miRNA\* を含む二本鎖種として提供されるが、miRNA は最終的には一本鎖 RNA として、RNA により誘導されるサイレンシング複合体(RISC)として知られるリボ核タンパク質複合体に組み込まれるようになる。様々なタンパク質が、miRNA / miRNA\* 二本鎖に対する特異性の可変性、標的遺伝子の結合部位、miRNA の活性(抑制するか、または活性化する)を誘導することができ、miRNA / miRNA\* 二本鎖の鎖が RISC 中に充填される RISC を形成することができる。

【0103】

miRNA : miRNA\* 二本鎖の miRNA 鎖が RISC 中に充填される時、miRNA\* は除去、分解される。RISC 中に充填される miRNA : miRNA\* 二本鎖の

10

20

30

40

50



鎖は、5'末端があまり緊密ではなく対形成した鎖である。miRNA:miRNA\*の両方の末端が大まかに等価な5'対を有する場合、miRNAおよびmiRNA\*は遺伝子サイレンシング活性を有し得る。

【0104】

RISCは、特に、miRNAのヌクレオチド2~7により、miRNAとmRNAとの高レベルの相補性に基づいて標的核酸を同定する。

【0105】

いくつかの研究が、翻訳の効率的な阻害を達成するためのmiRNAとそのmRNA標的との塩基対形成要件に目を向けてきた(非特許文献41により概説される)。哺乳動物細胞において、miRNAの最初の8個のヌクレオチドが重要であり得る(非特許文献42)。しかしながら、マイクロRNAの他の部分も、mRNA結合に参画し得る。さらに、3'での十分な塩基対形成は、5'での不十分な対形成を相殺することができる(非特許文献43)。全ゲノムに関するmiRNA結合を分析するコンピュータ研究により、標的結合におけるmiRNAの5'での塩基2~7の特異的役割が示唆されたが、通常は「A」であると思われる最初のヌクレオチドの役割も認識されている(非特許文献44)。同様に、非特許文献45により、標的を同定および検証するためにヌクレオチド1~7または2~8が用いられた。

【0106】

mRNA中の標的部位は、5'UTR、3'UTR、またはコード領域中であってもよい。興味深いことに、複数のmiRNAが、同じか、または複数の部位を認識することにより、同じmRNA標的を調節することができる。多くの遺伝子的に同定された標的における複数のmiRNA結合部位の存在は、複数のRISCの共同作用が多くの効率的な翻訳阻害を提供することを示してもよい。

【0107】

miRNAは2つの機構、すなわちmRNA切断または翻訳抑制のいずれかによって、遺伝子発現を下方調節するようにRISCに指令することができる。miRNAは、mRNAがmiRNAに対するある特定の程度の相補性を有する場合、mRNAの切断を特定することができる。miRNAが切断を誘導する場合、切断は典型的にはmiRNAの残基10~11とのヌクレオチド対の間で行われる。あるいは、miRNAは、miRNAがmiRNAに対する必要な程度の相補性を有さない場合、翻訳を抑制することができる。動物はmiRNAと結合部位との間の相補性の程度が低いため、翻訳抑制は動物においてより一般的である。

【0108】

miRNAおよびmiRNA\*の任意の対の5'および3'末端に可変性があってもよいことに留意すべきである。この可変性は、切断部位に関してDroshaおよびダイサーの酵素的プロセッシングにおける可変性に起因するものであってもよい。miRNAおよびmiRNA\*の5'および3'末端での可変性もまた、プリ-miRNAおよびプレ-miRNAのステム構造の不一致に起因するものであってもよい。ステム鎖の不一致は、異なるヘアピン構造の集団をもたらし得る。ステム構造における可変性は、Droshaおよびダイサーによる切断の生成物における可変性をもたらし得る。

【0109】

用語「マイクロRNA模倣体」とは、RNAi経路に進入し、遺伝子発現を調節することができる合成非コードRNAを指す。miRNA模倣体は、内因性マイクロRNA(miRNA)の機能を模倣し、成熟二本鎖分子または模倣前駆体(例えば、またはプレ-miRNA)として設計することができる。miRNA模倣体は、改変または非改変RNA、DNA、RNA-DNAハイブリッド、または代替核酸化学物質(例えば、LNAもしくは2'-O, 4'-C-エチレン-架橋核酸(ENA))を含んでもよい。成熟二本鎖miRNA模倣体について、二本鎖領域の長さは、13~33、18~24または21~23ヌクレオチドの間で変化してもよい。miRNAはまた、合計で少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、2

10

20

30

40

50

1、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39または40個のヌクレオチドを含んでもよい。miRNAの配列は、プレ-miRNAの最初の13~33個のヌクレオチドであってもよい。miRNAの配列はまた、プレ-miRNAの最後の13~33個のヌクレオチドであってもよい。

#### 【0110】

上記に提供された説明から、がん細胞とmiRNAとの接触を、いくつかの方法で行うことができることが理解される：

1. がん細胞に、成熟二本鎖miRNAを一過的にトランスフェクトすること。  
2. がん細胞に、成熟miRNAをコードする発現ベクターを安定に、または一過的にトランスフェクトすること。

3. がん細胞に、プレ-miRNAをコードする発現ベクターを安定に、または一過的にトランスフェクトすること。プレ-miRNA配列は、45~90、60~80、または60~70個のヌクレオチドを含んでもよい。プレ-miRNA配列は、本明細書に記載のmiRNAおよびmiRNA\*を含んでもよい。プレ-miRNAの配列はまた、プリ-miRNAの5'および3'末端から0~160個のヌクレオチドを除くプリ-miRNAのものであってもよい。

4. がん細胞に、プリ-miRNAをコードする発現ベクターを安定に、または一過的にトランスフェクトすること。プリ-miRNA配列は、45~30,000、50~25,000、100~20,000、1,000~1,500または80~100個のヌクレオチドを含んでもよい。プリ-miRNAの配列は、本明細書に記載のプレ-miRNA、miRNAおよびmiRNA\*、ならびにその変異体を含んでもよい。

#### 【0111】

SYNJ2を下方調節することができる別の薬剤は、SYNJ2のmRNA転写物またはDNA配列を特異的に切断することができるDNAザイム分子である。DNAザイムは、一本鎖と二本鎖の標的配列の両方を切断することができる一本鎖ポリヌクレオチドである（非特許文献46、非特許文献47）。DNAザイムの一般的なモデル（「10-23」モデル）が提唱されている。「10-23」DNAザイムは、それぞれ7~9個のデオキシリボヌクレオチドの2つの基質認識ドメインに隣接した、15個のデオキシリボヌクレオチドの触媒ドメインを有する。この型のDNAザイムは、プリン：ピリミジン結合部でその基質RNAを効率的に切断することができる（非特許文献48；DNAザイムの概説については、非特許文献49を参照されたい）。

#### 【0112】

一本鎖および二本鎖の標的切断部位を認識する合成の操作されたDNAザイムの構築および増幅の例は、Joyce et al.の特許文献12に開示されている。ヒトウロキナーゼ受容体に対する類似する設計のDNAザイムが、ウロキナーゼ受容体発現を阻害し、*in vivo*で結腸がん細胞転移を上手く阻害することが最近観察された（非特許文献50）。別の適用においては、bcr-ablがん遺伝子と相補的なDNAザイムは、白血病細胞中でのがん遺伝子発現の阻害、ならびにCMLおよびALLの場合、自己骨髄移植における再発率の低下に成功した。

#### 【0113】

SYNJ2の下方調節を、SYNJ2をコードするmRNA転写物と特異的にハイブリダイズすることができるアンチセンスポリヌクレオチドを用いることによって行うこともできる。

#### 【0114】

SYNJ2を効率的に下方調節するために用いることができるアンチセンス分子の設計は、アンチセンス手法にとって重要な2つの態様を考慮しながら行わなければならない。第1の態様は、適切な細胞の細胞質へのオリゴヌクレオチドの送達であるが、第2の態様は、その翻訳を阻害する方法で細胞内の指定のmRNAに特異的に結合するオリゴヌクレオチドの設計である。

## 【 0 1 1 5 】

先行技術は、オリゴヌクレオチドを様々な細胞型に効率的に送達するために用いることができるいくつかの送達戦略を教示している（例えば、非特許文献 5 1、非特許文献 5 2、非特許文献 5 3、非特許文献 5 4 および非特許文献 5 5 を参照されたい）。

## 【 0 1 1 6 】

さらに、標的 mRNA とオリゴヌクレオチドの両方における構造的変化のエネルギーを構成する熱力学サイクルに基づいて、標的 mRNA に対する最も高い予測された結合親和性を有する配列を同定するためのアルゴリズムも利用可能である（例えば、非特許文献 5 6 を参照されたい）。

## 【 0 1 1 7 】

そのようなアルゴリズムは、細胞中でアンチセンス手法を実施するために上手く用いられてきた。例えば、Walton et al. により開発されたアルゴリズムにより、科学者はウサギベータ - グロビン（R B G）およびマウス腫瘍壊死因子 - アルファ（T N F アルファ）転写物のためのアンチセンスオリゴヌクレオチドを上手く設計できるようになった。同じ研究グループは、細胞培養物中の 3 モデル標的 mRNA（ヒト乳酸デヒドロゲナーゼ A および B ならびにラット g p 1 3 0）に対する合理的に選択されたオリゴヌクレオチドのアンチセンス活性が、動的 P C R 技術により評価されたように、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチド化学物質を含む 2 つの細胞型における 3 つの異なる標的に対する試験などの、ほぼ全ての事例において有効であることがわかったとより最近報告した。

## 【 0 1 1 8 】

さらに、in vitro 系を用いる特定のオリゴヌクレオチドの効率を設計および予測するためのいくつかの手法も公開された（非特許文献 5 7）。

## 【 0 1 1 9 】

例えば、SYNJ 2 mRNA（SYNJ 2 タンパク質をコードする）に対して標的化された好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドは、以下の配列：C C C T T T G T C T G C C A C C T C C T（配列番号 1 0）、A C C C A T C T T G C T C T C T C C C（配列番号 1 1）および T C T T C C T C C A C C A C A G C A C C（配列番号 1 2）のものである。

## 【 0 1 2 0 】

いくつかの臨床試験が、アンチセンスオリゴヌクレオチドの安全性、実現可能性および活性を証明してきた。例えば、がんの処置にとって好適なアンチセンスオリゴヌクレオチドが上手く用いられてきたが（非特許文献 5 8）、c - m y b 遺伝子、p 5 3 および B c l - 2 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドによる血液悪性腫瘍の処置が臨床試験に入っており、患者によって許容されることが示されている（非特許文献 5 9）。

## 【 0 1 2 1 】

より最近では、ヒトヘパラナーゼ遺伝子発現のアンチセンス媒介性抑制は、マウスモデルにおいてヒトがん細胞の胸膜への播種を阻害することが報告されている（非特許文献 6 0）。

## 【 0 1 2 2 】

かくして、現在のコンセンサスは、上記のように、正確度が高いアンチセンス設計アルゴリズムおよび様々なオリゴヌクレオチド送達系の作成をもたらしてきたアンチセンス技術の分野における最近の発達により、当業者が過度の試行錯誤実験に頼る必要なく、既知の配列の発現を下方調節するのに好適なアンチセンス手法を設計および実施することができるようになったということである。

## 【 0 1 2 3 】

SYNJ 2 を下方調節することができる別の薬剤は、SYNJ 2 をコードする mRNA 転写物を特異的に切断することができるリボザイム分子である。リボザイムは、対象のタンパク質をコードする mRNA の切断による遺伝子発現の配列特異的阻害のために益々用いられている（非特許文献 6 1）。任意の特異的標的 RNA を切断するリボザイムを設計

10

20

30

40

50

する可能性により、基礎研究と治療適用の両方においてそれらは価値ある道具になっている。治療剤の領域では、リボザイムは、感染症におけるウイルスRNA、がんにおける優性がん遺伝子および遺伝子障害における体細胞変異を標的化するために活用されてきた（非特許文献62）。最も注目すべきことに、HIV患者のためのいくつかのリボザイム遺伝子療法プロトコールが既に第1相試験に入っている。より最近では、リボザイムはトランスジェニック動物研究、遺伝子標的検証および経路解明のために用いられてきた。いくつかのリボザイムが、臨床試験の様々な段階にある。ANGIOZYMEは、ヒト臨床試験において試験される初めて化学的に合成されたりボザイムであった。ANGIOZYMEは、血管形成経路における重要な成分であるVEGF-r（血管内皮増殖因子受容体）の形成を特異的に阻害する。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. ならびに他の会社は、動物モデルにおける抗血管形成治療剤の重要性を証明した。C型肝炎ウイルス（HCV）のRNAを選択的に破壊するように設計されたりボザイムであるHEPTAZYMEは、細胞培養アッセイにおいてC型肝炎ウイルスRNAを減少させるのに有効であることがわかった（Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated - WEBホームページ）。

10

#### 【0124】

SYNJ2を下方調節することができる別の薬剤は、SYNJ2に結合する、および/またはそれを切断する任意の分子である。

#### 【0125】

本発明の教示は、細胞運動性におけるSYNJ2の役割の基礎となる一般的機構を明らかにした。

20

#### 【0126】

その原理は図15に概略される。したがって、重要な事象は、EGFにより誘導されるSYNJ2の上方調節、および3つのホスホイノシチド：PI(4,5)P<sub>2</sub>、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>およびPI(3,5)P<sub>2</sub>の結果として生じる枯渇を伴う。SYNJ2に媒介されるPI(4,5)P<sub>2</sub>の脱リン酸化は、ホスホリパーゼC-ガンマによるPI(4,5)P<sub>2</sub>の分解、およびPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を生成するPI3Kによるリン酸化と平行する。集合的に、EGFによる3つの酵素の刺激は、形質膜からPI(4,5)P<sub>2</sub>結合剤の群を解離させ、また、PI(4,5)P<sub>2</sub>を含まないエンドサイトーシス小胞を生成する。同時に、SYNJ2は、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>を、浸潤突起形成にとって必須であるPI(3,4)P<sub>2</sub>に変換する。一度、環境が整えば、PI(3,4)P<sub>2</sub>はTKS5に結合し、コフィリンが浸潤突起内でアクチン反矢尻端を生成することができるダイナミンとコルタクチン中心複合体を核とする。本発明の結果によれば、SYNJ2は次の浸潤突起成熟ステップ、すなわち、MMPの分泌ならびにMT1-MMPおよび他の表面分子、例えば、CD44の送達にも関与する。同様の方法で、SYNJ2は、先端へのEGFRおよびインテグリンの送達を制御し、コフィリンを活性化することがあり、これは葉状仮足突出の形成を指令する中枢的な事象である。

30

#### 【0127】

これらの知見は、腫瘍転移の推定阻害剤であるSYNJ2阻害剤を同定するのに利用することができる。

40

#### 【0128】

かくして、本発明の態様によれば、腫瘍転移の推定阻害剤を同定する方法であって、試験薬剤の存在下でPI(3,4,5)P<sub>3</sub>からPI(3,4)P<sub>2</sub>へのSYNJ2媒介性プロセッシングを分析するステップを含み、前記試験薬剤の前記存在下でのPI(3,4,5)P<sub>3</sub>からPI(3,4)P<sub>2</sub>へのプロセッシングの、前記試験薬剤の非存在下でのプロセッシングと比較した減少が、腫瘍転移の推定阻害剤を示す、方法が提供される。

#### 【0129】

試験薬剤は、生体分子（タンパク質、例えば、ペプチドもしくは抗体、核酸分子、例えば、サイレンシング剤、炭水化物、脂質もしくはその組合せ）または小分子（例えば、化学物質）であってもよい。

50

## 【0130】

前記方法は、*in vivo*または*in vitro*で行うことができる。後者は、細胞系中で、または無細胞系を用いて実施することができる。

## 【0131】

例示的なアッセイは、 $PI(3, 4, 5)P_3$  から  $PI(3, 4)P_2$  への *SYNJ2* 媒介性プロセッシングを競合アッセイにより分析することを含む。

## 【0132】

したがって、競合アッセイは、 $PI(3, 4)P_2$  に結合した  $PI(3, 4)P_2$  結合ドメインを含む複合体からの  $PI(3, 4)P_2$  結合ドメインの置換を試験するものである。

10

## 【0133】

例示的な実施形態によれば、蛍光偏光競合アッセイが用いられる。このアッセイは、分子が隔離するより大きいエレメント（例えば、タンパク質）に結合すると、空間中でのその移動は著しく減少するという原理に依拠する。この現象を、試料の平行面および垂直面からの測定後に蛍光偏光をアッセイすることを可能にする蛍光プローブを用いて検出および測定することができる。したがって、溶液中の未結合の蛍光分子は、非常に低い偏光読取り値を生じるが、これらの分子に結合する（隔離する）検出剤（例えば、結合タンパク質）を溶液に添加した場合、蛍光分子は溶液中での偏光読取り値を増加させる閉じ込められた組成物中で安定化される。

## 【0134】

20

例えば、前記アッセイは、組換え *SYNJ2* およびその非蛍光基質、 $PI(3, 4, 5)P_3$  と共に、 $PI(3, 4)P_2$  結合ドメイン（例えば、*PH*-ドメイン、例えば、*Tapp1 PH*ドメイン、配列番号15~16）および蛍光  $PI(3, 4)P_2$  を含んでもよい。*SYNJ2* の触媒活性の生成物は、蛍光  $PI(3, 4)P_2$  を置換し、かくして、蛍光偏光を減少させる。

## 【0135】

特定の実施形態によれば、市販の5'  $PI(3, 4, 5)P_3$  ホスファターゼ活性蛍光偏光アッセイが用いられる（例えば、*Echelon Bioscience*、カタログ番号K-1400）。

## 【0136】

30

特定の実施形態によれば、*SYNJ2* と、基質としての  $PI(3, 4, 5)P_3$  とを含む反応混合物を、*SYNJ2* の触媒活性（脱リン酸化）を可能にする条件下で、調製された試験薬剤と共に、またはそれを用いずにインキュベートする。試験薬剤は、例えば、小分子、核酸分子、ペプチド、抗体、炭水化物またはその組合せであってもよい。インキュベーション後、 $PI(3, 4)P_2$  生成物を含有する溶液を、 $PI(3, 4)P_2$  結合タンパク質（例えば、*Tapp1* の *PH*-ドメイン、配列番号15）と、蛍光  $PI(3, 4)P_2$  との混合物と混合し、蛍光偏光を測定する。結合した蛍光  $PI(3, 4)P_2$  分子は、*SYNJ2* の酵素活性により生成された未標識の  $PI(3, 4)P_2$  により置換され、溶液中の未結合の蛍光  $PI(3, 4)P_2$  分子の量が増加するため、このアッセイで測定される偏光値は減少する。試験薬剤の存在下での蛍光偏光の値が試験薬剤の非存在下での値と比較して増加する場合、試験薬剤は推定 *SYNJ2* 阻害剤である。

40

## 【0137】

同定されると、抗転移剤としての試験薬剤の機能を、以下にさらに例示されるゼラチン-ザイモグラフィアッセイ、トランスウェルアッセイおよび試験動物などの、関連アッセイを用いてさらに実証する。

## 【0138】

この方法を用いて、本発明者らは、本発明のいくつかの実施形態による *SYNJ2* 阻害剤として用いることができるいくつかの小分子を同定した。これらの分子は、図19に記載され、以下の実施例10の表2に示される。

## 【0139】

50

記載のように、SYNJ2の阻害剤は、がんの発症または進行と関連する細胞表面受容体の阻害剤に加えて投与される。本発明の実施形態によれば、受容体はがん遺伝子である。

【0140】

本発明の教示に従って標的化することができる受容体の例は、EGFR、PDGFR、VEGFR、FGFRおよびErbb-2のものなどの受容体チロシンキナーゼである。

【0141】

標的化することができる他の表面分子としては、インテグリンマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)、ダイナミン、TKS5およびCD44が挙げられる。

【0142】

細胞表面分子の阻害剤は、当業界で周知である。そのような阻害剤の非限定的一覧は、以下に提供される。

【0143】

かくして、例えば、がん遺伝子としてのEGFRの同定は、EGFRに対する抗がん治療剤の開発をもたらした。

【0144】

セツキシマブおよびパニツムマブは、モノクローナル抗体阻害剤の例である。臨床開発中の他のモノクローナルは、ザルツムマブ、ニモツズマブ、およびマツズマブである。モノクローナル抗体は、細胞外リガンド結合ドメインを遮断する。結合部位が遮断された場合、シグナル分子は最早そこに結合することができず、チロシンキナーゼを活性化することができない。

【0145】

別の方法は、受容体の細胞質側にあるEGFRチロシンキナーゼを阻害するための小分子を用いることである。キナーゼ活性がない場合、EGFRはそれ自体を活性化することができず、これは下流のアダプタータンパク質の結合のための必要条件である。表面上、増殖のためにこの経路に依拠する細胞中のシグナリングカスケードを停止させることにより、腫瘍増殖および移動は減少する。ゲフィチニブ、エルロチニブ、およびラパチニブ(EGFRとERBB2阻害剤との混合物)は、小分子キナーゼ阻害剤の例である。他の例としては、EGFRを直接標的とするイレッサおよびタルセバが挙げられる。

【0146】

HER2は、モノクローナル抗体トラスツズマブ(ハーセプチンとして販売されている)の標的である。トラスツズマブは、HER2が過剰発現されるがんにおいてのみ有効である。HER2およびHER3受容体の二量体化を阻害する、別のモノクローナル抗体、ペルツズマブが、2012年6月にトラスツズマブと一緒に使用についてFDAによって認可された。

【0147】

さらに、NeuVax(Galena Biopharma)は、HER2を発現するがん細胞を標的とし、破壊するように「キラー」T細胞に指令するペプチドに基づく免疫療法である。

【0148】

HER2の発現は、エストロゲン受容体を介するシグナリングによって調節される。エストロゲン受容体を介して作用するエストラジオールおよびタモキシフェンは、HER2の発現を下方調節する。

【0149】

本発明の教示に従って用いることができる抗体の例が以下に列挙されるが、限定を意味するものではない。

【0150】

10

20

30

40

【表 1】

表1

抗体	商標名	認可の日付	型	標的	認可された処置
アレムツズマブ	Campath	2001	ヒト化	CD52	慢性リンパ球性白血病
ベバシズマブ	Avastin	2004	ヒト化	血管内皮増殖因子	結腸直腸がん
ブレンツキシマブベドチン	Adcetris	2011	キメラ	CD30	ホジキンリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫
セツキシマブ	Erbitux	2004	キメラ	表皮増殖因子受容体	結腸直腸がん
ゲムツズマブオゾガマイシン	Mylotarg	2000	ヒト化	CD33	急性骨髄性白血病(カリケアマインシンを用いる)
イブリツモマブチウキセタン	Zevalin	2002	マウス	CD20	非ホジキンリンパ腫(イットリウム-90またはインジウム-111を用いる)
パニツムマブ	Vectibix	2006	ヒト	表皮増殖因子受容体	結腸直腸がん
リツキシマブ	Rituxan, Mabthera	1997	キメラ	CD20	非ホジキンリンパ腫
トラスツズマブ	Herceptin	1998	ヒト化	ErbB2	乳がん

S Y N J 2 の阻害剤および場合により、本明細書に記載の細胞表面受容体の阻害剤を、対象自身に投与するか、またはそれを好適な担体もしくは賦形剤と混合した医薬組成物中で投与することができる。

#### 【0151】

本明細書で用いられる「医薬組成物」とは、生理学的に好適な担体および賦形剤などの他の化学成分を含む、本明細書に記載の1つまたは複数の有効成分の調製物を指す。医薬組成物の目的は、化合物の生物への投与を容易にすることである。

#### 【0152】

ここで、用語「有効成分」とは、生物学的効果の原因となり得る S Y N J 2 の阻害剤（および場合により、細胞表面受容体の阻害剤）を指す。

## 【0153】

以後、互換的に用いることができる語句「生理学的に許容される担体」および「薬学的に許容される担体」は、生物に対して有意な刺激を引き起こさず、投与される化合物の生物活性および特性を無効化しない担体または希釈剤を指す。アジュバントはこれらの語句の下に含まれる。

## 【0154】

ここで、用語「賦形剤」とは、有効成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。賦形剤の例としては、限定されるものではないが、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およびデンプン型、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油ならびにポリエチレングリコールが挙げられる。

10

## 【0155】

薬剤の製剤化および投与のための技術は、参照により本明細書に援用される非特許文献63に見出すことができる。

## 【0156】

好適な投与経路としては、例えば、経口、直腸、経粘膜、特に、経鼻、腸または非経口送達、例えば、筋肉内、皮下および髄内注射ならびにくも膜下、直接脳室内、例えば、右もしくは左心室腔への心臓内、一般的な冠動脈中、静脈内、腹腔内、鼻内、または眼内注射が挙げられる。

## 【0157】

中枢神経系(CNS)への薬剤送達のための従来の手法としては、神経外科的戦略(例えば、大脳内注射または脳室内注入); BBBの内因性輸送経路の1つを活用する試みにおける薬剤の分子操作(例えば、それ自体ではBBBを横断することができない薬剤と共に、内皮細胞表面分子に対する親和性を有する輸送ペプチドを含むキメラ融合タンパク質の生成); 薬剤の脂質溶解性を増加させるように設計された薬理学的戦略(例えば、脂質またはコレステロール担体への水溶性薬剤のコンジュゲーション); ならびに高浸透圧性崩壊によるBBBの完全性の一時的な崩壊(頸動脈へのマンニトール溶液の注入またはアンギオテンシンペプチドなどの生物活性剤の使用の結果生じる)が挙げられる。しかしながら、これらの戦略はそれぞれ、それを送達方法として最適ではないものにする、侵襲的外科手術と関連する固有のリスク、内因性輸送系において固有の制限により課されるサイズ制限、CNSの外部で活性であり得る担体モチーフを含むキメラ分子の全身投与と関連する潜在的に望ましくない生物学的副作用、およびBBBが破壊された脳の領域内での脳損傷のリスクの可能性などの制限を有する。

20

30

## 【0158】

交互に、例えば、患者の組織領域中への医薬組成物の直接的注入により、全身様式よりもむしろ局部様式で医薬組成物を投与することができる。

## 【0159】

用語「組織」とは、機能または複数の機能を実行するように設計された細胞からなる生物の部分の指す。例としては、限定されるものではないが、脳組織、網膜、皮膚組織、肝臓組織、脾臓組織、骨、軟骨、結合組織、血液組織、筋肉組織、心臓組織、脳組織、血管組織、腎臓組織、肺組織、性腺組織、造血組織が挙げられる。

40

## 【0160】

本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物を、当業界で周知のプロセスにより、例えば、従来の混合、溶解、顆粒化、糖衣錠作製、粉末化、乳化、カプセル封入、捕捉または凍結乾燥プロセスにより製造することができる。

## 【0161】

かくして、本発明のいくつかの実施形態に従う使用のための医薬組成物を、薬学的に用いることができる、有効成分の調製物への加工を容易にする、賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理学的に許容される担体を用いる従来の様式で製剤化することができる。適切な製剤は、選択される投与経路に依存する。

## 【0162】

50



注射のために、医薬組成物の有効成分を、水性溶液、好ましくは、ハanks液、リンゲル液、または生理的塩バッファーなどの生理的に適合するバッファー中で製剤化することができる。経粘膜投与のために、障壁を透過させるのに適切な浸透剤が製剤中で用いられる。そのような浸透剤は当業界で一般的に知られている。

#### 【0163】

経口投与のために、活性化合物を当業界で周知の薬学的に許容される担体と混合することにより、医薬組成物を容易に製剤化することができる。そのような担体により、患者による経口摂取のための、錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして医薬組成物を製剤化することができる。経口使用のための薬理的調製物を、固体賦形剤を用いて作製し、場合により、得られる混合物を粉碎し、必要に応じて、好適な補助剤を添加した後に顆粒の混合物を加工して、錠剤または糖衣錠コアを取得することができる。好適な賦形剤は、特に、ラクトース、スクロース、マンニトールもしくはソルビトールを含む糖などの充填剤；例えば、トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ナトリウムカルボメチルセルロースなどのセルロース調製物；および/またはポリビニルピロリドン（PVP）などの生理的に許容されるポリマーである。必要に応じて、架橋ポリビニルピロリドン、寒天、またはアルギン酸もしくはアルギン酸ナトリウムなどのその塩などの崩壊剤を添加してもよい。

10

#### 【0164】

糖衣錠コアは、好適なコーティングと共に提供される。このために、場合によりアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液および好適な有機溶媒または溶媒混合物を含有してもよい濃縮された糖溶液を用いることができる。同定のため、または異なる組合せの活性化合物用量を特徴付けるために、錠剤または糖衣錠コーティングに染料または色素を添加してもよい。

20

#### 【0165】

経口的に用いることができる医薬組成物としては、ゼラチンから作られる押し込み式カプセルならびにゼラチンと可塑剤、例えば、グリセロールまたはソルビトールから作られる軟質密封カプセルが挙げられる。押し込み式カプセルは、ラクトースなどの充填剤、デンプンなどの結合剤、タルクまたはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および場合により、安定剤と混合した有効成分を含有してもよい。軟質カプセルにおいては、有効成分を、脂肪油、液体パラフィン、または液体ポリエチレングリコールなどの好適な液体中に溶解または懸濁することができる。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与のための全ての製剤は、選択される投与経路にとって好適な用量にあるべきである。

30

#### 【0166】

口腔投与のために、組成物は従来の様式で製剤化された錠剤またはロゼンジ剤の形態を取ってもよい。

#### 【0167】

経鼻吸入による投与のために、本発明のいくつかの実施形態による使用のための有効成分は、好適な推進剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンまたは二酸化炭素の使用と共に加圧バックまたはネブライザーからのエアロゾルスプレー提供物の形態で都合良く送達される。加圧されたエアロゾルの場合、用量単位は一定量を送達するためのバルブを提供することにより決定することができる。化合物と、ラクトースまたはデンプンなどの好適な粉末基剤との粉末混合物を含有する、例えば、ディスペンサーにおける使用のためのゼラチンのカプセルおよびカートリッジを製剤化することができる。

40

#### 【0168】

本明細書に記載の医薬組成物を、例えば、ボラス注射または連続輸液による非経口投与のために製剤化することができる。注射のための製剤を、場合により、添加された保存剤を含む、単位剤形、例えば、アンプルまたは複数用量容器中で提供することができる。

50

組成物は、油性または水性ビヒクル中の懸濁液、溶液または乳濁液であってもよく、懸濁剤、安定剤および/または分散剤などの調合剤 ( f o r m u l a t o r y a g e n t ) を含有してもよい。

【 0 1 6 9 】

非経口投与のための医薬組成物は、水溶性形態の活性調製物の水性溶液を含む。さらに、有効成分の懸濁液を、好適な油または水に基づく注射懸濁液として調製することができる。好適な親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルなどの合成脂肪酸エステル、トリグリセリドまたはリポソームが挙げられる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストランなどの懸濁液の粘度を増加させる物質を含有してもよい。場合により、懸濁液はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために有効成分の溶解度を増加させる好適な安定剤または薬剤を含有してもよい。

10

【 0 1 7 0 】

あるいは、有効成分は、使用前の、好適なビヒクル、例えば、滅菌された発熱源を含まない水に基づく溶液を用いる構成のための粉末形態であってもよい。

【 0 1 7 1 】

また、本発明のいくつかの実施形態の医薬組成物を、例えば、ココアバターまたは他のグリセリドなどの従来の坐剤基剤を用いて、坐剤または停留浣腸などの直腸組成物中で製剤化することもできる。

【 0 1 7 2 】

本発明のいくつかの実施形態の文脈における使用にとって好適な医薬組成物は、意図される目的を達成するのに有効な量の有効成分が含有される組成物を含む。特に、治療上有効量は、障害（例えば、がんもしくは転移がん）の症状を防止する、軽減するもしくは改善するか、または処置される対象の生存を延長するのに有効な有効成分 ( S Y N J 2 阻害剤 ) の量を意味する。

20

【 0 1 7 3 】

治療上有効量の決定は、特に、本明細書に提供される詳細な開示を考慮すると、当業者の能力の範囲内にある。

【 0 1 7 4 】

本発明の方法において用いられる任意の調製物について、治療上有効量または用量は、最初は *i n v i t r o* および細胞培養アッセイから見積もることができる。例えば、用量を動物モデル中で処方して、所望の濃度または力価を達成することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。

30

【 0 1 7 5 】

本明細書に記載の有効成分の毒性および治療有効性を、*i n v i t r o* で、細胞培養物中で、または実験動物において標準的な薬学的手順により決定することができる。これらの *i n v i t r o* および細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを、ヒトにおける使用のための用量範囲を処方するのに用いることができる。用量は、用いられる剤形および用いられる投与経路に応じて変化してもよい。正確な処方、投与経路および用量を、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択することができる（例えば、非特許文献 6 4 を参照されたい）。

40

【 0 1 7 6 】

投薬量および間隔を個別に調整して、生物学的効果を誘導するか、または抑制するのに十分なものである有効成分の S Y N J 2 阻害剤レベル（最小有効濃度、M E C）を提供することができる。M E C は、それぞれの調製物について変化するが、*i n v i t r o* データから見積もることができる。M E C を達成するのに必要な用量は、個々の特徴および投与経路に依存する。検出アッセイを用いて、血漿濃度を決定することができる。

【 0 1 7 7 】

処置しようとする状態の重症度および応答性に応じて、用量は単回または複数回の投与のものであってよく、処置の経過は数日から数週間、または治癒が行われるか、もしくは

50

疾患状態の縮小が達成されるまで続く。

【0178】

投与される組成物の量は、勿論、処置される対象、苦痛の重症度、投与の様式、処方する医師の判断などに依存する。

【0179】

本発明のいくつかの実施形態の組成物を、必要に応じて、有効成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含有してもよい、FDAに認可されたキットなどのバックまたはディスペンサー装置中に提供することができる。プリスターバックなどのバックは、例えば、金属またはプラスチックホイルを含んでもよい。バックまたはディスペンサー装置に、投与のための説明書を添付してもよい。また、バックまたはディスペンサー装置に、医薬品の製造、使用または販売を規制する政府機関により規定された形態の容器と関連する通知書を添付してもよく、この通知書は組成物の形態またはヒトもしくは動物への投与の当局による認可を反映するものである。そのような通知書は、例えば、処方薬に関する米国食品医薬品局により認可されたラベル、または認可された製品挿入物のものであってもよい。適合性薬学的担体中で製剤化された本発明の調製物を含む組成物を調製し、適切な容器中に入れ、上記でさらに詳述されたように、示された状態の処置のために標識することもできる。

10

【0180】

細胞移動へのSYNJ2の寄与と一致して、本発明者らは、侵襲性サブタイプのがんにおけるSYNJ2 mRNAおよびタンパク質レベルの有意な上方調節を観察したが、これはSYNJ2が予後診断マーカーとして用いることができることを示唆している。

20

【0181】

かくして、本発明の態様によれば、がんの予後診断を必要とする対象においてがんを予後診断する方法であって、対象のがん細胞中のSYNJ2のレベルまたは活性を決定するステップを含み、対象の前記がん細胞中の前記SYNJ2の前記活性のレベルの、罹患していない対照試料の細胞中のSYNJ2の活性のレベルと比較した上方調節が、予後不良を示す、方法が提供される。

【0182】

本明細書で用いられる用語「予後診断」とは、疾患（がん）の転帰を決定することを指す。

30

【0183】

本明細書で用いられる場合、「予後不良」とは、疾患の再発の危険性が高いこと、および/または疾患に起因する死亡の危険性が高いことを指す。

【0184】

本明細書で用いられる用語「レベル」とは、DNA（遺伝子増幅）、RNAまたはタンパク質の発現レベルを指す。

【0185】

本明細書で用いられる場合、「SYNJ2活性」とは、主にそのホスファターゼ活性、すなわち、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>をPI(3,4)P<sub>2</sub>に変換する活性を指す。

【0186】

特定の実施形態によれば、前記活性は、*in vitro*活性アッセイを用いてアッセイされる。

40

【0187】

*in vitro*活性アッセイ：これらの方法においては、特定の酵素（この場合、ホスファターゼ）の活性が、細胞から抽出されたタンパク質混合物中で測定される。活性は、比色分析方法を良好に用いる分光光度計中で測定するか、または非変性アクリルアミドゲル（すなわち、活性ゲル）中で測定することができる。電気泳動後、ゲルを、基質および比色分析試薬を含有する溶液に浸す。得られる染色されたバンドは、対象のタンパク質の酵素活性に対応する。良好に校正され、直線的な応答範囲にある場合、試料中に存在する酵素の量は、生成された色の量に比例する。定量精度を改善するために、一般には酵

50

素標準が用いられる。

【0188】

S Y N J 2 のための特異的アッセイは上記に記載されており、P I ( 3 , 4 , 5 ) P<sub>3</sub> から P I ( 3 , 4 ) P<sub>2</sub> への変換活性が試験される。

【0189】

タンパク質の発現および/または活性を検出する方法

S Y N J 2 のタンパク質発現は、当業界で公知の方法を用いて決定することができる。

【0190】

酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) : この方法は、マイクロタイタープレートのウェルなどの表面への、タンパク質基質を含有する試料 ( 例えば、固定された細胞またはタンパク質性溶液 ) の固定を含む。酵素と共役した基質特異的抗体を印加し、基質に結合させる。次いで、抗体の存在を検出し、抗体に共役した酵素を用いる比色分析方法により定量する。この方法で一般的に用いられる酵素としては、西洋わさびペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼが挙げられる。良好に較正され、直線的な応答範囲にある場合、試料中に存在する基質の量は、生成された色の量に比例する。定量精度を改善するために、一般には基質標準が用いられる。

10

【0191】

ウェスタンブロット : この方法は、アクリルアミドゲルを用いた他のタンパク質からの基質の分離、次いで、膜 ( 例えば、ナイロンまたは P V D F ) への基質の移転を含む。次いで、基質の存在を、基質に特異的な抗体により検出し、次いで、抗体結合試薬により検出する。抗体結合試薬は、例えば、プロテイン A、または他の抗体であってもよい。抗体結合試薬を、上記のように放射標識するか、または酵素に結合することができる。検出は、オートラジオグラフィー、比色反応または化学発光によるものであってもよい。この方法は、電気泳動中のアクリルアミドゲル中での移動距離を示す膜上での相対的位置による、基質量の定量と、その同一性の決定との両方を可能にする。

20

【0192】

ラジオイムノアッセイ ( R I A ) : 1 つのバージョンにおいては、この方法は、アガロースビーズなどの沈降性担体上に固定された特異的抗体または放射標識された抗体結合タンパク質 ( 例えば、I<sup>125</sup> で標識されたプロテイン A ) を用いる所望のタンパク質 ( すなわち、基質 ) の沈降を含む。沈降した沈殿中の計数は、基質の量に比例する。

30

【0193】

R I A の代替バージョンにおいては、標識された基質と、未標識の抗体結合タンパク質とが用いられる。未知の量の基質を含有する試料を、様々な量で添加する。標識された基質からの沈降した計数の減少は、添加された試料中の基質の量に比例する。

【0194】

蛍光活性化細胞選別法 ( F A C S ) : この方法は、基質特異的抗体による細胞における i n s i t u での基質の検出を含む。基質特異的抗体は、フルオロフォアに結合される。検出は、細胞が光線を通過する時にそれぞれの細胞から放出される光の波長を読取る細胞選別装置による。この方法は、2 つ以上の抗体を同時に用いることができる。

40

【0195】

免疫組織化学分析 : この方法は、基質特異的抗体による固定された細胞における i n s i t u での基質の検出を含む。基質特異的抗体は、酵素に結合したものであるか、またはフルオロフォアに結合したものであってもよい。検出は、顕微鏡および主観的または自動的評価による。酵素に結合した抗体を用いる場合、比色反応が必要であり得る。免疫組織化学分析を行った後、例えば、ヘマトキシリンまたはギムサ染色を用いて細胞核を対抗染色することが多いことが理解される。

【0196】

i n s i t u 活性アッセイ : この方法によれば、発色基質は、活性酵素を含有する細胞上に適用され、酵素は、基質が分解されて、光学または蛍光顕微鏡により見える発色生成物を生成する反応を触媒する。

50

## 【0197】

あるいは、またはさらに、SYNJ2のレベルは、当業界で周知である方法を用いてRNAレベルで検出され、そのいくつかを以下に記載する。

## 【0198】

RNAの発現レベルを検出する方法

本発明のいくつかの実施形態の細胞中のRNAの発現レベルを、当業界で公知の方法を用いて決定することができる。

## 【0199】

ノーザンブロット分析：この方法は、RNAの混合物中の特定のRNAの検出を含む。RNA試料を、塩基対間の水素結合を防止する薬剤（例えば、ホルムアミド）を用いる処理により変性させ、全てのRNA分子がアンフォールディングされた、直線状のコンフォメーションを有することを確保する。次いで、個々のRNA分子を、ゲル電気泳動によってサイズに従って分離し、変性したRNAが付着するニトロセルロースまたはナイロンに基づく膜に移転させる。次いで、膜を標識されたDNAプローブに曝露する。放射性同位体または酵素結合ヌクレオチドを用いて、プローブを標識することができる。検出は、オートラジオグラフィ、比色反応または化学発光を用いることであってもよい。この方法は、電気泳動中のゲル中での移動距離を示す膜上での相対的位置による、特定のRNA分子の量の定量と、その同一性の決定との両方を可能にする。

10

## 【0200】

RT-PCR分析：この方法は、比較的稀なRNA分子のPCR増幅を用いる。第1に、RNA分子を細胞から精製し、逆転写酵素（例えばMMLV-RT）およびオリゴdT、ランダムヘキサマーまたは遺伝子特異的プライマーなどのプライマーを用いて相補的DNA（cDNA）に変換する。次いで、遺伝子特異的プライマーおよびTaq DNAポリメラーゼを適用することにより、PCR増幅反応をPCR装置中で実行する。当業者であれば、特異的RNA分子を検出するのに好適である遺伝子特異的プライマーの長さおよび配列ならびにPCR条件（すなわち、アニーリング温度、サイクル数など）を選択することができる。PCRのサイクル数を調整し、増幅生成物を既知の対照と比較することにより、半定量的RT-PCR反応を用いることができることが理解される。

20

## 【0201】

RNA in situハイブリダイゼーション染色：この方法においては、DNAまたはRNAプローブを、細胞中に存在するRNA分子に結合させる。一般に、細胞を最初に顕微鏡スライドに固定して、細胞構造を保存し、RNA分子が分解されるのを防いだ後、標識されたプローブを含有するハイブリダイゼーションバッファーにかける。ハイブリダイゼーションバッファーは、プローブの非特異的結合を回避しながら、in situでDNAまたはRNAプローブの、その標的mRNA分子との特異的ハイブリダイゼーションを可能にするホルムアミドおよび塩（例えば、塩化ナトリウムおよびクエン酸ナトリウム）などの試薬を含む。当業者であれば、特異的プローブおよび細胞の型に対してハイブリダイゼーション条件（すなわち、温度、塩およびホルムアミドの濃度など）を調整することができる。ハイブリダイゼーション後、未結合のプローブを洗浄除去し、結合したプローブを公知の方法を用いて検出する。例えば、放射性標識されたプローブを用いる場合、スライドを、放射性標識されたプローブを用いて生成されたシグナルを示す写真乳剤にかける；プローブを酵素で標識した場合、比色反応の形成のために酵素特異的基質を添加する；プローブを蛍光標識を用いて標識する場合、結合したプローブを蛍光顕微鏡を用いて見る；プローブをタグ（例えば、ジゴキシゲン、ビオチンなど）を用いて標識する場合、結合したプローブを、公知の方法を用いて検出することができるタグ特異的抗体との相互作用後に検出することができる。

30

40

## 【0202】

in situ RT-PCR染色：この方法は、非特許文献65および非特許文献66に記載されている。簡単に述べると、標識されたヌクレオチドをPCR反応に組み込むことにより、RT-PCR反応を固定された細胞上で実施する。Arcurus Eng

50

engineering (Mountainview, CA) から入手可能なレーザーキャプチャーマイクロダイセクションPixCell I LCMシステムなどの特異的 in situ RT-PCR 装置を用いて、反応を実行する。

【0203】

DNA マイクロアレイ / DNA チップ :

特定の発達プロセスまたは生理学的応答の間の生物の完全な転写プログラムの分析を可能にする DNA マイクロアレイを用いて、数千個の遺伝子の発現を同時に分析することができる。DNA マイクロアレイは、ガラス顕微鏡スライドなどの支持体の表面上の密接に包装された領域に結合した数千個の個々の遺伝子配列からなる。DNA マイクロアレイを調製するための様々な方法が開発されてきた。1つの方法においては、分析のためのそれぞれの遺伝子のコード領域の約 1 キロベースのセグメントを、個別に PCR 増幅する。ロボット装置を用いてそれぞれの増幅された DNA 試料を、ガラス顕微鏡スライドの表面上の密集した領域に印加した後、熱および化学処理によって加工して、DNA 配列を支持体の表面に結合させ、それらを変性させる。典型的には、そのようなアレイは約 2 x 2 cm であり、個々の核酸の約 6000 個のスポットを含有する。この技術の変法においては、何万もの同一のオリゴヌクレオチドが支持体の表面上の小さい四角の領域中で合成されるように、通常は 20 ヌクレオチド長の複数の DNA オリゴヌクレオチドを、支持体の表面に共有結合した初期ヌクレオチドから合成する。単一の遺伝子に由来する複数のオリゴヌクレオチド配列を、その遺伝子の発現の分析のためにスライドの近隣領域中で合成する。したがって、数千個の遺伝子を 1つのガラススライド上に表示することができる。上記の「DNA マイクロアレイ」と反対に、合成オリゴヌクレオチドのそのようなアレイを、当業界では「DNA チップ」と呼ぶことができる（非特許文献 67）。

10

20

【0204】

至適基準法、例えば、画像化方法、生検サンプリング、マーカー発現、免疫組織化学分析などを用いて、予後診断を実証することができる。

【0205】

以下は、乳がんの特定例であるが、いかなる意味でも限定を意味するものではない。乳がんの予後診断は、通常、腫瘍のサイズ（T）、近隣リンパ節への転移の状態（N）、および他の臓器への遠隔転移の存在または非存在（M）を評価する、外科手術後の疾患状態（TNM ステージ）によって決定される。TNM ステージに従って分類された患者の予後診断は、同じステージにおいてさえ異なる。換言すれば、同じステージの乳がんにおいては、エストロゲンもしくはプロゲステロン受容体（ER もしくは PR）の発現および HER タンパク質の過剰発現またはその遺伝子の増幅によって、予後診断を決定することができる。

30

【0206】

SYNJ2 を検出するために上記で説明された本発明のいくつかの実施形態の薬剤を、好ましくは、がんのステージおよび / または予後を診断および / または評価するのに使用するのための適切な説明書および FDA 認可を示すラベルと共に、診断キット / 製品中に含有させることができる。

【0207】

そのようなキットは、例えば、少なくとも 1つの上記診断剤（例えば、抗 HER2 および / もしくは抗 ER またはこれらの標的のためのオリゴヌクレオチドプローブ / プライマーと共に、例えば、抗 SYNJ2 抗体）を含む少なくとも 1つの容器、および別の容器中に包装された画像化試薬（例えば、酵素、二次抗体、バッファー、発色基質、蛍光材料）を含んでもよい。キットはまた、キットの貯蔵期間を改善するための適切なバッファーおよび保存剤を含んでもよい。

40

【0208】

用語「含む（comprises）」、「含む（comprising）」、「含む（includes）」、「含む（including）」、「有する（having）」およびその活用形は、「含むが限定されるものではない（including but n

50

o t l i m i t e d t o ) 」を意味する。

【0209】

用語「からなる」は、「含み、かつ限定する」を意味する。

【0210】

用語「本質的にからなる」は、組成物、方法または構造が、さらなる成分、ステップおよび/または部分が特許請求された組成物、方法または構造の基本的特徴および新規特徴を実質的に変化させない場合に限り、さらなる成分、ステップおよび/または部分を含んでもよいことを意味する。

【0211】

本明細書で用いられる場合、単数形「a」、「an」および「the」は、本文が別途明確に記述しない限り、複数の参照を含む。例えば、用語「化合物(a compound)」または「少なくとも1つの化合物(at least one compound)」は、その混合物を含む、複数の化合物を含んでもよい。本出願を通じて、本発明の様々な実施形態を、範囲形式で提示することができる。範囲形式での記載は単に便宜上かつ簡潔さのためのものであり、本発明の範囲に関する柔軟性のない限定と解釈されるべきではないことが理解されるべきである。したがって、範囲の記載は、特に開示された全ての可能なサブ範囲ならびにその範囲内の個々の数値を有すると考えられるべきである。例えば、1～6などの範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの特に開示されたサブ範囲、ならびにその範囲内の個々の数字、例えば、1、2、3、4、5および6を有すると考えられるべきである。これは、範囲の幅に関係なく適用される。

10

20

【0212】

本明細書において数値範囲が示される場合はいつでも、それは示された範囲内の任意の記載の数字(分数または整数)を含むことを意味する。語句「第1の示された数と第2の示された数の間の範囲」と、「第1の示された数から第2の示された数までの範囲」は、本明細書では互換的に用いられ、第1および第2の示された数と、その間の全ての分数および整数を含むことを意味する。

【0213】

本明細書で用いられる用語「方法」とは、限定されるものではないが、化学、薬理学、生物学、生化学および医学業界の実務者に公知であるか、または彼らによって既知の様式、手段、技術および手順から容易に開発される様式、手段、技術および手順を含む、所与の任務を達成するための様式、手段、技術および手順を指す。

30

【0214】

本明細書で用いられる用語「処置すること」は、状態の進行を無効化すること、実質的に阻害すること、遅延させること、もしくは逆転させること、状態の臨床症状もしくは美的症状を実質的に改善すること、または状態の臨床症状もしくは美的症状の出現を実質的に防止することを含む。

【0215】

明確性のために、別々の実施形態の文脈で記載される本発明のある特定の特徴を、単一の実施形態において組合わせて提供することもできることが理解される。逆に、簡潔性のために、単一の実施形態の文脈で記載される本発明の様々な特徴を、別々に、または任意の好適なサブの組合せで、または本発明の任意の他の記載された実施形態において好適なものとして提供することもできる。様々な実施形態の文脈で記載されるある特定の特徴は、その実施形態がこれらの要素なしでは実施不可能でない限り、これらの実施形態の本質的な特徴と考えられるべきではない。

40

【0216】

上記で説明され、以下の特許請求の範囲で特許請求される本発明の様々な実施形態および態様は、以下の実施例において実験的に支持される。

【実施例】

【0217】

50

ここで、上記説明と一緒に、非限定的様式で本発明のいくつかの実施形態を例示する以下の実施例を参照する。

#### 【0218】

一般に、本明細書で用いられる命名法および本発明で用いられる実験手順は、分子、生化学、微生物学および組換えDNA技術を含む。そのような技術は、文献中で完全に説明されている。例えば、非特許文献68、非特許文献69、非特許文献70、非特許文献71、非特許文献72、非特許文献73、；特許文献13、特許文献14、特許文献15、特許文献16および特許文献17に記載の方法；非特許文献74、非特許文献75、非特許文献76、非特許文献77を参照されたい；利用可能な免疫アッセイは、特許文献および科学文献に広く記載されており、例えば、特許文献18、特許文献19、特許文献20、特許文献21、特許文献22、特許文献23、特許文献24、特許文献25、特許文献26、特許文献27、特許文献28、特許文献29、特許文献30、特許文献31、特許文献32および特許文献33；非特許文献78、非特許文献79、非特許文献80、非特許文献81、非特許文献82、非特許文献83、非特許文献84、非特許文献85、非特許文献86を参照されたい；これらは全て、あたかも完全に本明細書に記載されたかのように参照により援用される。他の一般的な参考文献は、本文献を通して提供される。その中の手順は、当業界で周知であると考えられ、読者の便宜のために提供される。その中に含まれる全ての情報は、参照により本明細書に援用される。

10

#### 【0219】

##### (実施例1)

20

##### 材料および方法

##### 細胞移動、侵襲および走化性アッセイ

細胞を、Transwellトレイ(BD Bioscience)の上側区分に3回反復で播種し、18時間、介在膜を通して移動させた。その後、細胞をバラホルムアルデヒド(3%)中で固定し、Triton X-100(0.05%)中で透過処理し、メチルバイオレット(0.02%)で染色した。フィルターの上側で増殖している非移動細胞を除去し、移動した細胞を写真撮影した。BioCoat Matrigel Chambersを用いて、侵襲アッセイを実施した。走化性については、ibidi(Munich, Germany)からのチャンバーおよび低速度撮影画像化を用いた。細胞核の位置を、ImageJを用いて追跡した。

30

#### 【0220】

##### ホスホイノシチド分析

細胞をイノシトールを含まない培地中で30分間インキュベートし、[<sup>3</sup>H]-イノシトールと透析血清(10%)の両方を添加した培地に交換した。細胞を3日間培養し、洗浄し、1M HCl、次いで、1Mメタノール中に抽出した。次いで、細胞を擦り取り、クロロホルム中に抽出した後、メタノール:0.1M EDTA pH 8.0中に抽出し、有機相を蒸発させた。その後、抽出物を脱アセチル化し、2つのパーティスフェアSAXカラム(Whatman)を縦一列に、および4段階勾配のリン酸アンモニウムpH 6.0を用いる陰イオン交換HPLC(Agilent 1200)により分離した。放射性標識された溶出液を、オンラインフローシンチレーション分析装置により検出し、ProFSAソフトウェア(Perkin-Elmer)を用いて定量した。

40

#### 【0221】

##### ゼラチンザイモグラフィー

MMP-2活性を検出するために、生物試料を10%ポリアクリルアミド/0.1%ゼラチン埋込みゲル上で電気泳動分離した。次いで、ゲルを2.5%Triton X-100中で洗浄し、0.2M NaCl、5mM CaCl<sub>2</sub>、1μM ZnCl<sub>2</sub>、0.02%Brj 35、および1mM p-アミノフェニル酢酸第二水銀を含有する50mM Tris-HCl(pH 7.5)中、37℃で36時間インキュベートした。

#### 【0222】

##### 動物における転移試験

50



雌のCB-17 SCIDマウス(Harlan Laboratories、Hasslett、MI; 1群あたり15匹)の脂肪体にMDA-MB-231細胞( $1.4 \times 10^6$ 細胞/マウス)を埋込んだ。埋込みの2および6週間後、マウスを麻酔し、腫瘍サイズを測定し、リンパ節中の転移を蛍光双眼鏡を用いて可視化した。肺転移については、マウスを犠牲にし、肺を取り出し、洗浄し、蛍光双眼鏡を用いて画像を獲得した。両側Fischerの直接確率検定を、リンパ節転移の分析のために用いた。腫瘍増殖測定には、Exact-sig[2x1-tailed]Mann-Whitney検定を用いた。

#### 【0223】

##### 試薬

指摘しない限り、ヒト組換え増殖因子および他の材料を、Sigma(St. Louis、MO、USA)から購入した。免疫ブロッティングのための放射性材料および化学発光キットを、Amersham(Buckinghamshire、UK)から取得した。EGFR-キナーゼ阻害剤AG1478、MEK阻害剤U0126およびPI3K阻害剤ウォルトマンニンは、Calbiochem(San Diego、CA)からのものとした。創傷治癒アッセイのためのプレートは、ibidi(Munich、Germany)からのものであった。低速度撮影画像化のための35mmガラス底皿は、Matek(Ashland、MA)から購入した。EGF受容体に対するマウスモノクローナル抗体(mAb)111.6は、本発明者らの実験室で作成されたものである。ウェスタンブロット分析のための抗EGFRは、Alexis(Lausen、Switzerland)からのものとした。抗Ras-GAPおよび抗AKT抗体は、Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz、CA)からのものとした。抗EEA1、抗Rab5、抗Rab4、および抗Rac1は、BD Transduction Laboratories(Franklin Lakes、NJ)からのものとした。抗SYNJ2 mAbは、Abnova(Taipei、Taiwan)からのものであった。以下の二次抗体を用いた：西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)にコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgGおよびヤギ抗ウサギIgG抗体を、Jackson ImmunoResearch Laboratories(Bar Harbor、Maine)から購入した。テキサスレッドトランスフェリン、ヤギ抗マウスAlexa-488、Alexa-555およびAlexa-647二次抗体は、Invitrogen(Carlsbad、CA)からのものとした。

#### 【0224】

siRNA対照は、「Thermo scientific Dharmacon」のカタログ番号D-001810-10-05であった；SYNJ2に対するsiRNA配列は、配列番号6に記載の通りであり、GGACAGCACUGCAGGUGUUである；全てのshRNAはSIGMA Israelからのものであった；shRNA対照はカタログ番号SHC002である；用いたSYNJ2に対するshRNA配列は、CCGGCCGGGAAGAACAGTTTGTAGCAACTCGAGTTGCTCAAACTGTTCTTTC CGGTTT TTTG(配列番号9)である。

#### 【0225】

##### 細胞系およびトランスフェクション

MCF10A細胞を、抗生物質、インスリン( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、コレラ毒素( $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、ヒドロコルチゾン( $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、熱不活化ウマ血清(5% vol/vol)、およびEGF( $10 \text{ ng}/\text{mL}$ )を添加したDMEM:F12(1:1)培地中で増殖させた。ヒト乳腺MDA-MB-231細胞を、10%熱不活化ウシ胎仔血清(Gibco)、1mMビルビン酸ナトリウムおよびペニシリン-ストレプトマイシン混合物( $100 \text{ 単位}/\text{mL}$ ;  $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$ ; Beit Haemek、Israel)を添加したRPMI-1640(Gibco BRL; Grand Island、NY)中で増殖させた。MDA-MB-231-RFP安定細胞系は、Hadasa Degani教授(The Weizmann Institute of Science、Israel)からの贈り物であった。プラスミドのトランスフェクションを、製造業者

の指針 (Roche, Mannheim, Germany) に従って Fugen-HD を用いて実施した。あるいは、siRNA オリゴヌクレオチドを用いる一過的 mRNA ノックダウン実験のために、細胞に Oligofectamine (Invitrogen) をトランスフェクトした。

#### 【0226】

レンチウイルスベクターおよびウイルス生成

非標的化 shRNA ヘアピン (対照) および ヒト SYNJ2 に対するヘアピンを、製造業者の指針 (Sigma) に従って HEK-293T 細胞中で生成した。標的細胞に、ポリブレン ( $8 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加した、shRNA をコードするレンチウイルスを感染させ、ピューロマイシン ( $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) の存在下で 4 日間培養した。ヒト SYNJ2 の安定な遺伝子特異的送達を、製造業者の指針に従って、ViraPower レンチウイルス発現系 (Invitrogen) を用いて実施した。

10

#### 【0227】

免疫蛍光および画像処理

細胞を、フィブロネクチン被覆カバースリップ上で 48 時間増殖させた。処理後、細胞を洗浄し、0.02% Triton X-100 および 3% パラホルムアルデヒドを用いて透過処理し、20 分間固定した。Slidebook (商標) のコマンドの下で、Zeiss LSM-710 顕微鏡、または回転盤顕微鏡 (Zeiss 100x、NA 1.45; Yokogawa CSU-22; Zeiss 全自動倒立型 200M; Photometrics HQ-CDD カメラ) および固体状態レーザー (473、561 および 660 nm、露出時間: 0.25 ~ 1 sec) を用いて、共焦点顕微鏡観察を実施した。圧電制御ステージ (ステップサイズ: 0.1 ~ 0.4  $\mu\text{m}$ ) の位置を変えることにより、3D 画像スタックを Z 軸に沿って 70 ~ 300 ms 毎に獲得した。あるいは、生細胞蛍光顕微鏡観察を、DeltaVision システム (Applied Precision、Issaquah, WA) を用いて実行し、画像をプリズムソフトウェアを用いて処理した。

20

#### 【0228】

EGF の放射標識

ヒト組換え EGF を、以下のように IODOGEN で標識した: EGF ( $5 \mu\text{g}$ ) を Iodogen 被覆チューブ (1 mg の試薬) 中で  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (1 mCi) と混合した。23 で 15 分間インキュベートした後、0.1 mg/ml の最終濃度となるようにアルブミンを添加し、混合物を Excellulose GF-5 カラム上で分離した。

30

#### 【0229】

受容体下方調節アッセイ

MDA-MB-231 細胞を、24 ウェルプレート中に、それぞれの時点で 3 回反復で播種し、対照のために追加のウェルに播種した。48 時間後、細胞を 4 時間飢餓状態にし、示された時間間隔で 37 で EGF ( $2 \text{ ng}/\text{mL}$ ) を用いて刺激した。続いて、それらを氷上に置き、結合バッファー (DMEM 培地、アルブミン 1%、Hepes 20 mM、pH 7.5) で 1 回洗浄し、弱酸/塩洗浄 (0.2 M 酢酸ナトリウムバッファー pH 4.5、0.5 M NaCl) にかけて、表面に結合した EGF を除去した。その後、細胞を放射標識された EGF と共に 4 で 1.5 時間インキュベートし、結合バッファーで洗浄した。対照ウェルを、放射標識された EGF および過剰の未標識の EGF と共にインキュベートした。最後に、細胞を 1 M NaOH で溶解し、 $\gamma$ -カウンターを用いて放射活性を決定した。データは、時間 0 に対する細胞表面上の受容体の割合を表す。

40

#### 【0230】

表面 EGF 受容体の決定

細胞 ( $2 \times 10^4$  個/ウェル) を、24 ウェルプレート中に 3 回反復で播種し、対照のために追加のウェルに播種した。その後、細胞を、放射標識された EGF と共に 4 で 1.5 時間インキュベートし、結合バッファーで洗浄した。対照ウェルを、放射標識された EGF および過剰の未標識の EGF と共にインキュベートした。最後に、細胞を 1 M N

50

aOH溶液中で溶解し、放射活性を決定した。データは、対照細胞に対する細胞表面上の受容体の割合を表す。

#### 【0231】

##### 免疫ブロッティング分析

細胞を、氷冷塩水で簡単に洗浄し、緩衝化界面活性剤溶液（25 mM HEPES (pH 7.5)、150 mM NaCl、0.5 % Na-デオキシコレート、1 % NP-40、0.1 % SDS、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  および 1:1000 に希釈したプロテアーゼ阻害剤カクテル）中に擦り取った。等量のゲルのために、BCA (Pierce) 試薬を用いることによりタンパク質濃度を決定した。ゲル電気泳動の後、タンパク質をニトロセルロース膜に移転する。膜を、10 % 低脂肪ミルクを含有するTBS Tバッファー（0.02 M Tris-HCl (pH 7.5)、0.15 M NaCl および 0.05 % Tween 20）中で遮断し、一次抗体で1時間ブロットし、TBS Tで洗浄し、HRPにコンジュゲートした二次抗体と共に30分間インキュベートした。

10

#### 【0232】

##### 創傷治癒（スクラッチ）アッセイ

創傷治癒アッセイを、製造業者のプロトコール（iBidi, Germany）に従って実施した。簡単に述べると、MCF10A細胞をトリプシン処理し、EGF 枯渇培地中に再懸濁（ $7.0 \times 10^5$  細胞/mL）し、70  $\mu\text{l}$  を各ウェルに播種し、24時間以内に集密層を得た。その後、滅菌ピンセットを用いることにより培養物 - 挿入物を除去し、細胞を2時間移動させた。

20

#### 【0233】

##### 走査型および透過型電子顕微鏡観察

細胞を、4 % パラホルムアルデヒドおよび2 % スクロースを添加した塩水中で固定した。試料を洗浄し、2回目の固定（1 % スクロースおよび5 mM  $\text{CaCl}_2$ 、pH 7.4 を添加した0.1 M カコジレートバッファー中の3 % パラホルムアルデヒドおよび2.5 % グルタルアルデヒド）にかけた。細胞を0.1 M カコジレートバッファー中で洗浄し、カコジレートバッファー中の1 % 四酸化オスミウムで1時間後固定した。走査型電子顕微鏡観察（SEM）のために、後固定した試料を2回洗浄し、1 % タンニン酸で5分間処理した後、もう1回洗浄し、1 % 酢酸ウラニルで30分間処理した。試料を段階的エタノール中で脱水し、金 - パラジウムフィルムをスパッタすることにより伝導性にした。走査型電子顕微鏡（Leo Supra 55 / Vp Zeiss, Thornwood, NY）を用いて、試料を写真撮影した。

30

#### 【0234】

##### 受容体リサイクルアッセイ

MDA-MB-231細胞を、Alexa Fluor 488 - トランスフェリン（無血清培地中の25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）と共に37 で30分間、またはAlexa Fluor 488 - EGF（40 ng/mL）と共に10分間予備インキュベートした。表面に結合したリガンドを、酸性バッファー（150 mM NaCl、1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.125 mM  $\text{CaCl}_2$ 、0.1 M グリシン）中、4 で30分間のインキュベーションにより分離させた後、示された時間間隔で37 に移し、内在化されたりリガンドのリサイクルを可能にした。細胞を、画像化またはFACSにより分析した。

40

#### 【0235】

##### リアルタイム細胞電気抵抗分析

RTCA-Xcellingence System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いることにより、細胞拡散および接着の測定を記録した。金微小電極E-プレート-16を、塩水中で1回洗浄した。細胞（2,500個/ウェル）を最初に播種した後、電気抵抗データ（細胞指数；測定された電気抵抗の相対変化として誘導される）を、示された間隔で記録した。製造業者により提供されたソフトウェアパッケージ1.2を用いて、データを分析した。

50

## 【0236】

TAPP1 - PHドメインの発現および精製

TAPP1 - PHドメインおよびN末端FlagタグおよびC末端6xHisタグをコードする構築物（配列番号13、図18）を、pET28プラスミド中にクローニングし、200  $\mu$ MのIPTGで誘導した後、大腸菌BL21（DE3）中で発現させた。細菌を15 で増殖させた後、細胞破壊機で溶解した。細胞破片を遠心分離により除去し、50 mM Tris pH8、0.5 M NaClおよび20 mMイミダゾールで平衡化させたNiカラム（HisPrep FF16/10、GE Healthcare）上でタンパク質を捕捉した。タンパク質を、0.5 Mイミダゾールを含有する同じバッファー中で溶出させた。TAPP1 - PHドメインを含有する画分を、50 mM Tris pH8および100 mM NaClを含有するバッファーで平衡化させたサイズ排除カラム（HiLoad 26/60 Superdex 75、GE Healthcare）中に注入した。TAPP1 - PHドメインを含有するプールされたピークを、20 mMリン酸ナトリウムバッファーpH7.2で3倍に希釈し、同じリン酸バッファーで平衡化させた陽イオン交換カラム（HiTrap SP FF 5 ml、GE Healthcare）上に充填した。1 M NaClを含有するリン酸バッファーの線形勾配を用いてカラムから純粋なタンパク質を溶出させた（TAPP1 - PHドメインは200 mM NaClで溶出する）。SDS - PAGEにより評価された純粋なTAPP1 - PHドメインを含有する画分を一緒にプールし、Bradford試薬およびOD<sub>280</sub>（20, 520の吸光係数）量子化によりタンパク質濃度を決定した。タンパク質をアリコートに分割し、液体窒素で急速凍結し、-80 で保存した。

10

20

## 【0237】

SYNJ2の5'ホスファターゼ活性

SYNJ2がPI(3,4,5)P3に由来する5 - リン酸を加水分解してPI(3,4)P2を生成する能力の測定値を、読出し値として蛍光偏光に基づいて、競合アッセイにより記録した。100  $\mu$ lのSOPS（Avanti Inc.、クロロホルム中の50 mg/ml）および50  $\mu$ lのコレステロール（Sigma Aldrich、クロロホルム中の10 mg/ml）を添加することにより、安定化SOP脂質混合物（x50）をガラス管中で調製した。混合物を、穏やかな窒素流を用いて空気乾燥して、クロロホルムを蒸発させた。次いで、蒸発させた脂質混合物を、室温で1分間のボルテックスにより、10 mlの0.25 mg/mlのC<sub>12</sub>E<sub>8</sub>（Avanti Inc.）中に再懸濁した。反応混合物は、PBS、DTT、MgCl<sub>2</sub>（全てSigma Aldrichから）、SOP脂質混合物（x50）、完全長精製SYNJ2（OriGene、カタログ番号TP315160）およびPI(3,4,5)P3（Echelon Bioscience、カタログ番号P-3908）と共に、試験化合物を含む、または試験化合物を含まない。一度、PI(3,4,5)P3が添加されたら、反応混合物を33 で8分間インキュベートして、SYNJ2の5' - ホスファターゼ活性によりPI(3,4)P2を生成させた。インキュベーション後、PBS、DTT、検出タンパク質（TAPP1のPHドメイン）、SOP脂質混合物（x50）、蛍光標識されたPI(3,4)P2（Echelon Bioscience、カタログ番号C34M6）およびEDTA（Sigma Aldrich）を含む検出混合物を添加することにより、反応を停止させた。適切なプレートリーダーおよびBODIPY（登録商標）TMR染料と適合するフィルターセット（550 nm励起/580 nm偏光放出フィルター）を用いて、蛍光偏光を測定した。未標識のPI(3,4)P2対照はEchelon Bioscienceから購入した（カタログ番号P-3408）。

30

40

## 【0238】

（実施例2）

EGFに誘導されるSYNJ2の発現の上昇は乳腺細胞侵襲を促進する

ヒト乳腺上皮細胞（MCF10A）は、EGFファミリーリガンドと共に培養した場合、強い移動および侵襲表現型を示す（図1Aおよび図1B）が、血清による処理は細胞運

50

動を推進するには不十分である。EGFと、EGFR (AG1478)、MEK (U0126) またはPI3K (ウォルトマンニン) の阻害剤との同時インキュベーションは運動性を低下させた (図1C) が、これは、MEK/ERKおよびPI3K活性の両方がEGFに誘導される移動にとって必須であることを示唆している。重要なことに、EGFRに誘導される運動表現型は、425個の遺伝子の転写上方調節と関連する (Amit et al., 2007)。転移を推進する遺伝子を同定するために、この遺伝子セットを、乳がん細胞の転移性サブクロンの *in vivo* での選択の間に上方調節を受けるより大きい遺伝子セットと交差させた (Minn et al., 2005)。23個の重複する遺伝子の群 (図1D) は、グリオーマ細胞侵襲に関与する脂質ホスファターゼであるシナプトジャニン-2 (SYNJ2) をコードする遺伝子を含んでいた (Chuang et al., 2004)。EGFに誘導される SYNJ2の上方調節を、PCRおよび免疫プロットングにより検証した (図2Aおよび図2B)。

10

#### 【0239】

次に、MCF10A細胞を形質転換し、サブクロニングして、SYNJ2を安定に過剰発現させた (GFP融合物として; SYNJ2-OX、図1E)。EGF枯渇培地中に播種した場合、SYNJ2-OX細胞は、増強された基本的およびEGF誘導性の移動および侵襲能力 (図2Dおよび図2C) と共に、膜ラフリングを特徴とする前移動表現型を示した (図2C)。逆に、低分子干渉RNA (siRNA; 図1G) を用いるSYNJ2のノックダウンは、細胞侵襲、ならびに個々のおよび集合的な移動を有意に減少させた (図2E、1Hおよび1J)。結論として、EGFに誘導されるSYNJ2の上方調節は、乳腺細胞の強固な侵襲表現型を誘導する。

20

#### 【0240】

##### (実施例3)

SYNJ2のホスファターゼ活性は乳腺細胞の侵襲性にとって必須である

*in vivo* での実験を可能にするために、高転移性MDA-MB-231乳がん赤色蛍光タンパク質 (RFP) 発現細胞を用いて、SYNJ2またはLacZ (対照) を過剰発現するサブクロン、ならびにshControlまたはSYNJ2特異的ヘアピン (shSYNJ2; 図3A) を発現するサブクロンを作成した。SYNJ2発現の増強は2D培養物中で伸長した形態を付与し (図3B)、3D培養物中で細胞を増殖させた場合は、広い侵襲アームを付与した (図4A)。逆に、SYNJ2ノックダウンは侵襲パターンを無効化した (図4B)。同様に、過剰発現は侵襲能力を約3.2倍増強し (図3B)、ノックダウン (図3C) は移動および侵襲を阻害した (図3D)。触媒ホスファターゼ活性の役割を検査するために、WT SYNJ2またはホスファターゼ/ヌクレアーゼドメイン (Pfam: PF03372) 内の保存されたWXGDYN (F/Y) Rモチーフ (Jefferson and Majerus, 1996) のそれぞれに点突然変異を担持する触媒により死んだ形態 (D388AおよびD726A; 図4C) をコードするレンチウイルス粒子を含むshSYNJ2細胞。WT SYNJ2と違って、突然変異体の再発現は、侵襲能力を回復することができなかった (図4D) が、これは、SYNJ2のホスファターゼ活性が侵襲表現型にとって必須であることを示している。

30

#### 【0241】

shSYNJ2細胞が移動できないことは、走査型電子顕微鏡観察 (図4E) およびF-アクチン染色の両方によってさらに支持され、大幅なアクチン組織化の欠陥および細胞の高さの増加を示した (図4F)。重要なことに、円形部分の周囲にクラスター化したアクチンパッチも注目すべきであった (図4F; 矢頭)。したがって、shSYNJ2細胞の低速度撮影顕微鏡観察により、異常な細胞内小胞の存在が確認されたが、これは、SYNJ2ノックダウンが小胞輸送を逸脱したことを示唆している。次に、SYNJ2の細胞内局在化を検査した。GFP-SYNJ2を発現するMDA-MB-231細胞の低速度撮影画像 (図3E)、ならびに抗SYNJ2抗体を用いる免疫蛍光 (図3F) は、SYNJ2分布の2つの主要なパターンを反映していた: 先端に局在化した小さい末梢集合体 (図3E中の黒色の矢頭)、および細胞の中心に近いところに位置するより大きい集合体の

40

50

第2集団（青色の矢頭）。注目すべきことに、EGFRリガンド（TGF-α）でMDA-MB-231細胞を刺激した直後に、SYNJ2は、形成中の先端の下に新たに発生した葉状仮足の基部に急速に集合した（図3E、図3F）。興味深いことに、MCF10A細胞を用いて実施した同様の分析は、SYNJ2は最初は細胞間結合においてF-アクチンと共に局在化するが、EGFで刺激すると、先端、典型的には、葉状仮足の基部に移行することを示した（図3G）。結論として、これらの観察は、増殖因子がSYNJ2発現のレベルだけではなく、先端へのその動的な動員をも調節することを示している。

#### 【0242】

##### （実施例4）

腹側膜へのSYNJ2の動員はダイナミンおよびRac1に依存する

10

SYNJ2の局在化部位の動力学を調査するために、安定に発現するGFP-SYNJ2 MDA-MB-231サブクローン（GFP-SYNJ2細胞）を作成し、GFP-SYNJ2点の形成および消費について分析した。これらのものを動的に異なるサブ集団に分類した：ラフリング膜に局在化した力学点および細胞中心に近い別の領域に局在化した点（図5A）。注目すべきことに、GFP-SYNJ2点は、RFP-クラスリン軽鎖A（図5A）またはRFP-カベオリン1（図6A）により印を付けた集合体との最小の重複を示したが、これは、クラスリン被覆ピットまたはカベオラへの局在化が少ないことを示唆している。重要なことに、新しく形成された末梢点は、それらの外見が葉状仮足の局部形成に先行したため、新生葉状仮足の前触れであった。対照的に、アクチンと共に局在化した、より中心的で安定な点のクラスターは、約30分間持続した（図5B）。したがって、個々の集合体の軌跡（図6B；左）は、顕著に広い分布の寿命を示した：短命（約20～40s、集合体の60%）、中間の寿命、および長寿命の集合体（集合体の約10%）。中間群の開始後、蛍光強度は連続的に増大したが、集合体は移動に関しては依然として静的であった（図6B；右）。この力学的パターンは、クラスリン被覆ピットのものと同様（Ehrlich et al., 2004）、輸送中の中間体の形成および消費を示唆している。

20

#### 【0243】

腹側膜でのGFP-SYNJ2の主に二峰性の区画化は、落射蛍光顕微鏡（赤色；Z次元における変化に対して相対的に非感受性である）と全反射照明蛍光顕微鏡（TIRF、緑色；約200nmの深さに限定される）の両方を用いる実験における蛍光シグナルの同期的出現および消失によって強化された。点はその寿命を通して黄色で出現したため（図5C）、本発明者らは、SYNJ2が腹側形質膜の平面内に集合すると結論付けた。阻害剤のパネルを用いることにより、集合はコレステロール枯渇によって劇的に阻害されることが見出され（図6C；左）、コレステロールに富む膜のマイクロドメインが腹側膜へのSYNJ2動員にとって必要であることを示唆している。同様の阻害効果は、ウォルトマンニンによっても誘導されたが（図6C；右）、これはPI3Kの役割を示唆している。別の要件は、ダイナミンの阻害剤であり、クラスリン依存のおよびクラスリン非依存的担体の切断ステップを媒介し、その阻害がU型陥入中間体の蓄積をもたらす大きなGTPaseである（Macia et al., 2006）、Dyngo-4aを用いることによって示された。Dyngo-4aは形質膜でのSYNJ2の動的集合を強く停止させたため（図5D）、本発明者らは、SYNJ2がダイナミンにより調節される新生輸送中間体に動員されると結論付けた。ダイナミンは細胞の移動および侵襲の促進因子として関与していたため（Kruchten and McNiven, 2006）、SYNJ2とのその物理的相互作用を試験した。この実験により、活性なダイナミンとSYNJ2との複合体形成が確認され（図5E）、エンドサイトーシスとアクチンに基づく移動の両方におけるダイナミンの拡張された役割と一致していた。

30

40

#### 【0244】

SYNJ2はGTPを充填したRac1と物理的に相互作用することができ（Malecz et al., 2000）、Rac1の誘導的活性化には、内在化とその後のリサイクルが必要である（Palamidessi et al., 2008）。したがって、Rac1と一致するSYNJ2の末梢点

50

の一致を試験した。実際、内因性 R a c 1 の免疫染色により、G F P - S Y N J 2 の末梢点との同時局在化が示された (図 5 F)。さらに、R a c 1 上の G R P 充填の阻害 (N S C - 2 3 7 6 6 を用いる) は、G F P - S Y N J 2 点の数を劇的に減少させた (図 5 G)。相補的に、S Y N J 2 ノックダウンは、M D A - M B - 2 3 1 細胞中での G T P を充填した R a c 1 のレベルを低下させた (図 5 H)。膜への S Y N J 2 の動員における R a c 1 およびアクチン細胞骨格の調節的役割と一致して、ラトランクリンを用いるアクチン動力学の阻害は、G F P - S Y N J 2 動力学を無効化した (図 6 D)。総合すると、これらの結果は、末梢 S Y N J 2 集合を、コレステロール、3' - ホスホイノシチド、アクチンおよび活性 R a c 1 に依存するダイナミン媒介性エンドサイトーシス経路と関連付ける。注目すべきことに、この経路は、移動する線維芽細胞の先端での急速な膜および接着代謝回転を可能にするクラスリン非依存的担体といくつかの属性を共有する (Howes et al., 2010)。

10

## 【 0 2 4 5 】

## ( 実施例 5 )

S Y N J 2 は細胞表面受容体の小胞輸送を制御する

E G F で処理された s h S Y N J 2 - M C F 1 0 A 細胞は、対照細胞と比較してより高いレベルの全 E G F R およびリン酸化 E G F R を示したが、これは、E R K のより高いというよりもむしろ低い活性化ということであった (図 7 A)。この線に沿って、S Y N J 2 ノックダウンが拡大した細胞内小胞中で E G F R を捕捉することは注目すべきことであった (図 7 B)。捕捉と一致して、M D A - M B - 2 3 1 細胞の免疫プロットングも同様に、E G F R レベルが s i S Y N J 2 細胞中で安定化されることを示したが (図 8 A)、2 つの方法を用いることによる表面 E G F R の定量化は有意により低い表面レベルを示した (図 8 B)。E G F R の細胞内捕捉は、機能的結果を有する：そのよく特徴付けられた走化性機能 (Mouneimne et al., 2006; van Rheenen et al., 2007) と一致して、E G F R は乳腺細胞の先端に局在化したが、s h S Y N J 2 細胞の E G F R はその偏向した分布を失い、大きい、アクチンに飾られた小胞中に蓄積した (図 8 C)。注目すべきことに、s h S Y N J 2 細胞中で観察された E G F R 輸送の欠陥は W T S Y N J 2 によって救助することができたが、触媒的に死んだ形態によっては救助できず (図 7 C)、これは S Y N J 2 のホスファターゼ活性が先端からの、および先端への E G F R の小胞輸送にとって必須であり、E G F の勾配に対する走化性応答を媒介することを示している。このモデルと一致して、s h S Y N J 2 細胞は E G F の勾配に沿って移動する能力を大幅に失った (図 8 D)。

20

30

## 【 0 2 4 6 】

S Y N J 2 枯渴細胞中の E G F R の異常な蓄積は、E G F R 送達欠陥、リサイクルの停止、またはユビキチン化により調節されるプロセスである分解のための選別の障害を反映し得る (Goh et al., 2010)。選別の障害と一致して、S Y N J 2 枯渴細胞は有意により高い基本的 E G F R ユビキチン化を示し、E G F に応答してわずかに弱く変化した (図 8 E および図 7 D)。さらに、チロシン 1 0 4 5 (ユビキチンリガーゼ c - C b l のためのドッキング部位; 図 8 F) のリン酸化による分解のためにタグ付けられるにも拘らず、E G F 刺激実験により、正常な活性化 (チロシン 1 0 6 8 のリン酸化) が確認されたが、s h S Y N J 2 細胞における分解の欠陥が確認された (図 8 G)。リサイクルの欠陥に対処するために、蛍光リガンドを用いて、トランスフェリン受容体 (T f R) の大規模なリサイクル、ならびにより弱い E G F R のリサイクルを追跡した。T f R 内在化は影響されなかったが、リサイクルは s h S Y N J 2 細胞中では顕著に低下し、逆に、S Y N J 2 - O X 細胞中では顕著に加速した (図 8 H および図 7 E)。同様に、フローサイトメトリー分析により、蛍光 E G F のリサイクルの欠陥が示され (図 8 I)、生細胞画像化により、S Y N J 2 枯渴細胞の大きい小胞内でのリガンド蓄積が確認された。結論として、これらの結果は、S Y N J 2 が E G F R と T f R の両方の適切なリサイクルにとって必須であることを示している。

40

## 【 0 2 4 7 】

50

## (実施例 6)

S Y N J 2 ノックダウンはホスホイノシトール脂質の恒常性をかく乱し、エンドサイトーシスと接着の両方を変化させる

エンドサイトーシス系は、特定のホスホイノシチド ( P I ) ( Gruenberg and Stenmark、2004 ) により定義される、いくつかの異なる区画を維持し、現在の分析は S Y N J 2 に対する強い依存性を明らかにした。例えば、P I ( 3 ) P - 結合剤である E E A 1 のための初期エンドソームを精査することにより、その空間的組織化が S Y N J 2 枯渇細胞中で顕著に変化することが見出された ( 図 9 A )。同様に、G F P タグ付 R a b 4 を用いてリサイクル区画を精査することにより、s h S Y N J 2 細胞の円形アクチンパッチとの強い会合が明らかとなった ( 図 10 A )。初期エンドソームの別のマーカー、R a b 5 の分布も、S Y N J 2 に対する依存性を反映していた ( 図 10 B )。R a b 5 陽性小胞の数は s h S Y N J 2 枯渇細胞中では有意により低かったが、その平均サイズは増大し、それらは一部、円形アクチンパッチに局在化していた ( 図 9 A )。ホスホイノシチドにおける基礎的な変化を明らかにするために、s h C t r l と生合成的に標識された s h S Y N J 2 M D A - M B - 2 3 1 細胞を比較し、その後、そのリン脂質を抽出した ( 図 10 C )。その結果は、主に P I ( 3 ) P だけでなく、P I ( 4 , 5 ) P<sub>2</sub> および P I ( 3 , 5 ) P<sub>2</sub> も s h S Y N J 2 細胞中でより高レベルで存在するが、P I ( 4 ) P レベルは未変化のままであり、P I ( 3 , 4 ) P<sub>2</sub> および P I ( 3 , 4 , 5 ) P<sub>3</sub> の両方のレベルはこの方法によっては検出困難であることを示していた。これらの結果は、S Y N J 2 が P I の D 5 位を主な標的とするという意見を確認するものであるが、本発明者らは、観察されたむしろ限られた全体的効果がより大きい局所的な相違であると推測する。結論として、これらの観察は、S Y N J 2 が初期エンドソームにおける、ならびにその後のリサイクルステップにおけるカーゴ選別を制御することを再確認するものである。

10

20

30

## 【 0 2 4 8 】

E G F R のような R T K のリサイクルと共に、インテグリンの小胞輸送およびパキシリンなどの下流のパートナーとのその相互作用は、細胞移動および接着斑 ( F A ) 成熟において主要な役割を果たす ( Guo and Giancotti、2004 )。したがって、ベータ - 1 インテグリンおよびリン酸化された E G F R ( p E G F R ) は、M D A - M B - 2 3 1 細胞の F A に局在化した。対照的に、大きい小胞中での異常な蓄積のため、両タンパク質は S Y N J 2 枯渇細胞の末梢に局在化することができなかった ( 図 10 D、S 5 B および S 5 C )。さらに、成熟 F A のマーカーとしてパキシリンを用いて、F A が s h S Y N J 2 細胞中では丸く、比較的短い外見を取ることがわかった ( 図 9 D )。総合すると、これらの観察は、S Y N J 2 が、2つの方法を用いて細胞拡散を測定することによって検査される状況である基質接着にとって必要であることを暗示するものである ( 図 10 E および 図 10 F )。この結果は、インテグリンと R T K の両方の F A への送達の欠陥に起因する、s h S Y N J 2 細胞の弱まった接着を証明していた。

## 【 0 2 4 9 】

## (実施例 7)

S Y N J 2 は浸潤突起の集合を調節する

M D A - M B - 2 3 1 細胞のマトリックスに基づく 3 D 培養物は、通常、くさび形状の突出を示すが、s h S Y N J 2 細胞は丸みのある伸長を示し ( 図 11 A )、これはマトリックス分解の欠陥を示唆している。これを試験するために、M M P - 9 の共焦点免疫蛍光画像を取得したところ、s h S Y N J 2 スフェロイドが、おそらく分泌の障害のため、その境界で M M P - 9 存在量の比較的鋭い減少を示すことがわかった ( 図 11 A )。実際、条件化培地に対して行ったザイモグラフィアッセイにより、s i S Y N J 2 オリゴヌクレオチドで処理した細胞による M M P - 9 分泌の欠陥が確認されたが、M M P - 2 分泌は未変化のままであった ( 図 12 A )。逆に、S Y N J 2 を過剰発現する細胞により条件付けられた培地は、M M P - 9 活性の実質的な増加を示し ( 図 11 B )、これは M M P 分泌における S Y N J 2 の関与と一致していた。

40

## 【 0 2 5 0 】

50



限局性のタンパク質分解を可視化するために、細胞を架橋蛍光ゼラチン上に播種し、浸潤突起と呼ばれるアクチン中心のマトリックス分解オルガネラについて精査した (Murphy and Courtneidge, 2011)。以前の報告と一致して、活性マトリックスタンパク質分解は、細胞体の下に局在化したアクチンドットと一致していた。重要なことに、SYNJ2-GFP点はこの構造と同時局在化し (図11C、矢頭)、図5Bに提示されるアクチンと関連する長寿命の点と類似していた。SYNJ2の発現レベルは、浸潤突起発生と明確に相関するが、SYNJ2過剰発現は浸潤突起を含有する細胞の画分をほぼ倍加し、siSYNJ2は浸潤突起の発生を有意に減少させ (図11D)、因果関係を暗示している。次に、SYNJ2と、浸潤突起のよく特徴付けられたマーカーであるコルタクチンとの潜在的な物理的関係を検査したところ、SYNJ2とコルタクチンが同時に免疫沈降し (図12B)、ならびに浸潤突起と先端の両方に同時に局在化する (図12C) ことがわかった。SYNJ2の誘導的役割を確固たるものにするために、PI(3,4)P<sub>2</sub>であり、浸潤突起の道標として働くコルタクチンの結合剤であるTKS5を観察した (Courtneidge et al., 2005)。予想通り、内因性TKS5は対照MDA-MB-231細胞中のマトリックス分解の複数の腹側部位に局在化した。が、siSYNJ2細胞中には活性部位はほとんど認められず、TKS5はその腹側位置を失った (図6E; X-YおよびZパネル)。さらに、PI(3,4)P<sub>2</sub>-結合ドメイン、すなわち、Tapp1のPHドメインであるPI(3,4)P<sub>2</sub> (Oikawa et al., 2008)での浸潤突起TKS5アンカーを、プローブとして用いた。以前の報告と一致して、PHドメインの異所性発現は浸潤突起の数を減少させたが、それにも拘らず、残存するシグナルはTKS5およびアクチンコアと同時に局在化していた (図12D)。結論として、SYNJ2は、TKS5の関与に先行するステップで必要であると考えられ、それぞれ、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>および次いで、PI(3,4)P<sub>2</sub>を生成して、PI3KのEGFR誘導性活性化の部位にTKS5を固定する、PI3K (Yamaguchi et al., 2011) およびSYNJ2の連続的作用と一致する。

10

20

30

40

#### 【0251】

EGFR-PI3K-SYNJ2の状況と一致して、活性型のEGFR (pEGFR) がタンパク質分解的に活性な浸潤突起中で検出されたが、SYNJ2枯渇細胞のEGFRは膨張した小胞に局在化した (図11F)。局部受容体活性化を担う機構は依然として不明である。1つのモデルによれば、MMP-7およびCD44を含む複合体による、ヘパリン-結合EGF (HB-EGF) などのプロ-リガンドの切断は、EGFRを局部的に刺激し得る (Yu et al., 2002)。このモデルと一致して、SYNJ2の存在量は、EGFRリガンドの分泌と相関し (図11G)、浸潤突起のアクチンコアとのCD44の同時局在化を検出した (図12E)。同様に、フローサイトメトリーを用いて、CD44の表面発現は対照細胞と比較してshSYNJ2細胞中で強く抑制されることがわかった (図12F)。浸潤突起の成熟におけるさらに別の重要なステップは、可溶性MMPを活性化し、膜1型マトリックスメタロプロテイナーゼ (MT1-MMP) の動員である (Wang and McNiven, 2012)。したがって、対照細胞において、MT1-MMPは浸潤突起突出の部位に一致するが、siSYNJ2細胞のMT1-MMP分子はマトリックス分解と関連しない大きい凝集体を形成することがわかった (図9E)。総合すると、これらの観察は、SYNJ2が浸潤突起のプライミングにとって、ならびにプロテアーゼと、2つの以前には認識されていなかった居住物、CD44および活性EGFRとの両方をこのオルガネラに標的化するのに必須であることを暗示する。

#### 【0252】

##### (実施例8)

SYNJ2は哺乳動物モデルにおける腫瘍増殖および転移拡散を促進する

in vivoでの転移性播種に対するSYNJ2の効果を評価するために、MDA-MB-231-RFP細胞 (および誘導体) を、雌マウスの乳腺脂肪体に埋込み、2または6週間後、腫瘍サイズ (図13A) と転移 (図13B) の両方を測定した。一次腫瘍増殖は、shSYNJ2および「不活性救助」 (shSYNJ2 + SYNJ2<sup>C<sub>D</sub></sup>) 群と比

50

較して、*shCtrl* および *shSYNJ2 + SYNJ2<sup>WT</sup>* (「活性救助」) 群において有意により速かった。転移挙動も同様に *SYNJ2* と関連した: *shSYNJ2* および「不活性救助」群は局部および遠隔リンパ節への転移拡散の有意な減少を示した (図 13 B および 図 14)。遠隔転移を検査するために、マウスを犠牲にし、その肺を評価した。*shSYNJ2* 細胞、または「不活性救助」細胞を埋込んだ動物の肺は、*shCtrl* または「活性救助」細胞を接種した動物と比較して、転移の数およびサイズの劇的な減少を示した (図 13 C)。総合すると、これらの結果は、*SYNJ2* を転移促進に關与させるものである。

#### 【0253】

同様に、*SYNJ2* を過剰発現する異種移植片をモニタリングした。予想通り、*SYNJ2* - *OX* 細胞は、より速く増殖する腫瘍を生じ (図 13 D)、それらはまた、結節転移のより早い開始を示した (図 13 E)。強固なリンパ節侵襲と一致して、*SYNJ2* - *OX* 細胞を埋込んだ動物の肺は、転移の数の増加を示した (図 13 F)。次に、脈管内侵入または溢出に対する *SYNJ2* の効果を試験した。したがって、MDA - MB - 231 - RFP 細胞のサブクローンを、雌マウスの循環 (尾静脈) に直接注射し、肺定着 (溢出) についてスコア化したか、またはそれらを脂肪体に埋込んで、循環腫瘍細胞 (CTC; 脈管内侵入) として血液中でスコア化した。これらの実験はそれぞれの原発腫瘍間のサイズの相違を考慮に入れたものであることに留意されたい。正規化された結果により、*SYNJ2* が脈管内侵入 ( $p = 0.0031$ ) と溢出 ( $p = 0.0082$ ; 図 13 G) の両方にとって必要であることが示された。この結論を、GFP - *SYNJ2* を過剰発現する細胞を用いることによりさらに試験した (図 13 H)。注目すべきことに、この実験で得られた脈管内侵入の結果は、統計的有意性を示したが、*SYNJ2* - *OX* 細胞がより良好に溢出し、遠隔臓器に定着する能力は有意性に達しなかったが、これは局部および遠隔転移に対する *SYNJ2* の観察された強力な効果が主にリンパ管および血管への脈管内侵入の増強に起因するものであることを示唆している。

#### 【0254】

(実施例 9)

*SYNJ2* は侵襲性ヒト乳腫瘍と関連する

ヒトがんとの *SYNJ2* の関連性に取り組むために、*SYNJ2* の転写物レベルを 60 個のヒトがん細胞系の NCI - 60 パネルにおいて分析した。移動表現型への寄与と一致して、*SYNJ2* の高い転写物レベルは間葉表現型と関連することがわかった。次に、乳がん腫 *SYNJ2* の 331 のパラフィン包埋試料のセットを免疫染色した (図 16 A)。重要なことに、*SYNJ2* の発現強度は、HER2 過剰発現 ( $p < 0.001$ ) および / またはエストロゲン受容体の欠如 ( $p < 0.001$ ) により定義される予後的に好ましくないサブタイプと正の関連を示した。しかしながら、*SYNJ2* 存在量と、年齢、組織学的サブタイプ、腋窩リンパ節状態、および分化等級との間には有意な関連は認められなかった。興味深いことに、*SYNJ2* の染色パターンも変化したが、HER2 + 腫瘍はほとんど膜染色を示したが、内腔腫瘍および三種陰性腫瘍は細胞質染色を示した (図 16 B)。この知見を支持するために、*SYNJ2* mRNA レベルを、乳がん標本の 2 つのコホートにおいて分析したところ、より短い患者生存率との関連が見出された (図 16 C)。要するに、これらの観察は、乳がんの進行における *SYNJ2* の関与を支持するが、それらは転写上方調節の背後にある機構を未解明のままにしておく。

#### 【0255】

まとめると、臨床データおよび *in vitro* 実験と共に、動物において行われた観察は、主に浸潤突起および先端への、およびそれからの細胞表面分子の輸送においてホスホイノシチドにより果たされる主要な役割のため、*SYNJ2* によるイノシトール脂質の脱リン酸化が転移プロセスにとって重要であることを明確に示す。以下は、ワーキングモデル (図 15) であり、腫瘍進行の広い文脈における *SYNJ2* の複数の機能を考察するものである。

#### 【0256】

## (実施例 10)

## SYNJ2 の 5' ホスファターゼ活性の選択的阻害剤

SYNJ2 ホスファターゼ活性の選択的阻害剤を同定するために、本発明者らは、分子が空間中で定常的に回転および運動しているが、一度別のより大きいエレメント（例えば、タンパク質）に結合したら、それらの運動が劇的に制限されるという原理に依拠する蛍光偏光競合アッセイを用いた。これらの運動における変化は、未結合の状態では非常に低い偏光読取り値を生じる蛍光分子（すなわち、プローブ）を用いて検出および測定することができるが、これらの分子に結合する検出剤（例えば、結合タンパク質）を溶液に添加した場合、蛍光分子は溶液中での偏光読取り値を増加させる限定された組成物中で安定化される（図 17A を参照されたい）。

10

## 【0257】

予備形成されたスクリーニングにおいて、本発明者らは、異なる化合物の存在下で、PI(3, 4, 5)P3 の 5' 位を脱リン酸化して PI(3, 4)P2 を生成する SYNJ2 の酵素活性を測定した。一度、酵素反応が完了 / 停止したら、PI(3, 4)P2 生成物を含む溶液を、PI(3, 4)P2 結合タンパク質（検出剤）と蛍光 PI(3, 4)P2（プローブ）との混合物と混合した。用いた検出タンパク質は、PI(3, 4)P2（配列番号 15）に選択的に結合する Tapp1 の精製された PH - ドメインであった。図 17B に示されるように、結合した PI(3, 4)P2 蛍光プローブが SYNJ2 の酵素活性により生成された未標識の PI(3, 4)P2 により置換され、溶液中の未結合の蛍光プローブの量が増加するにつれて、このアッセイで測定された偏光値は減少した。

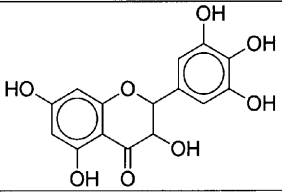
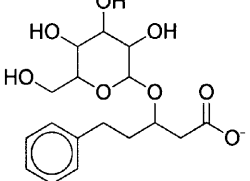
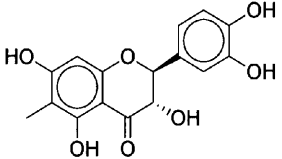
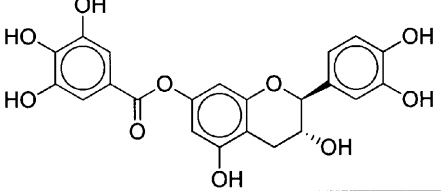
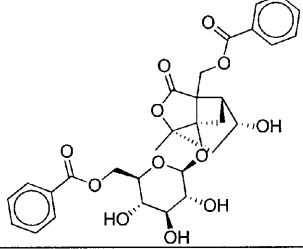
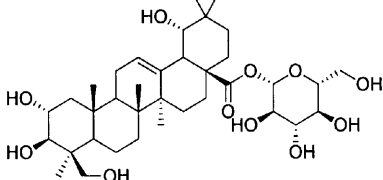
20

## 【0258】

以下の表 2 は、SYNJ2 による PI(3, 4)P2 の生成を阻害することができるこの方法を用いて同定された様々な化合物を記載する。

【表 2】

表2: 同定されたSYNJ2の選択的阻害剤

番号	カタログ番号 [CAS No.]	化合物名	IC50 ( $\mu$ M)	構造
1	NP-001872	アンペロプシン	3.17	
2	NP-003195	3-ヒドロキシ- 5-フェニルペン タン酸3-D-グル コピラノシド	1.87	
3	NP-012228	セデオダリン	2.19	
4	NP-014109	(-)-カテキン-7- ガラート	3.44	
5	NP-015304	ペオニバイン	6.02	
6	NP-003491	セリコシド	3.52	

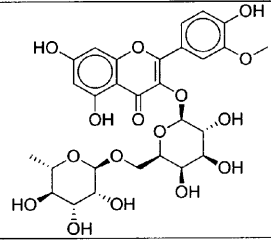
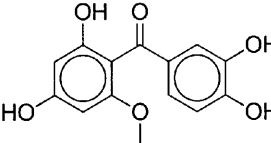
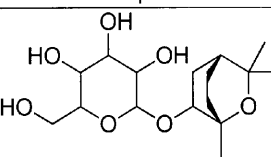
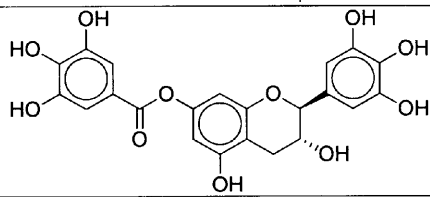
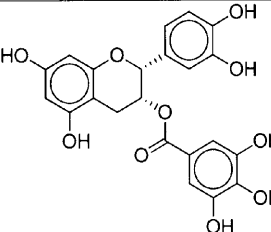
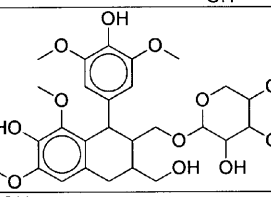
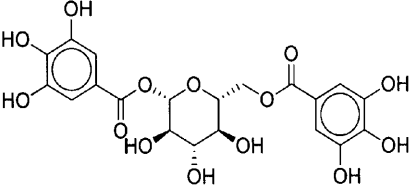
10

20

30

【表 3】

表2: 同定されたSYNJ2の選択的阻害剤

番号	カタログ番号 [CAS No.]	化合物名	IC50 ( $\mu$ M)	構造
7	NP-000303	ケイオシド	3.4	
8	NP-005201	2,4,3',4'-テトラヒドロキシ-6-メトキシ-ベンゾフェノン	2.84	
9	NP-001585	2-ヒドロキシ-1,8-シネオレグルコピラノシド	1.98	
10	NP-014110	(-)-ガロカテキン-7-ガラート	1.075	
11	NP-002326	(-)-エピカテキン-3-ガラート	2.88	
12	NP-000360		1.67	
13	NP-002973	1,6-ジガロイルグルコース	7.53	

10

20

30

40

【表 4】

表2: 同定されたSYNJ2の選択的阻害剤

番号	カタログ番号 [CAS No.]	化合物名	IC50 ( $\mu$ M)	構造
14	NP-015222	3,7-ジメチルオクタ-2-エン-1,4,7-トリオール1- $\beta$ -D-グルコピラノシド	1.24	
15	NP-000181	ピラカントシド	0.874	
16	NP-008708	イソビフロリン	2.71	
17	[CAS: 55-56-1]	クロルヘキシジン	10	
18	[CAS: 3546-41-6]	ピルビニウムパモエート	1.25	
19	NP-003299	ケルシトリンガラート	2.94	
20	NP-013254	4'-O-メチル-3,5-ジ-O-カフェオイルキナ酸	3.17	

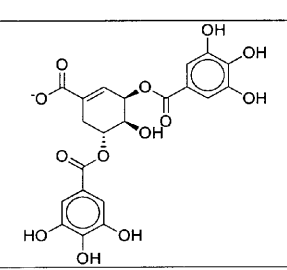
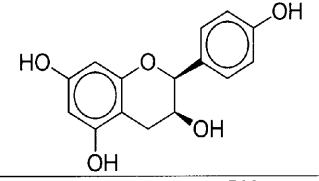
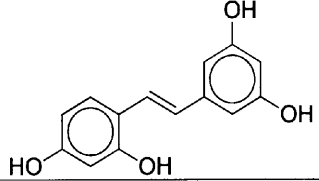
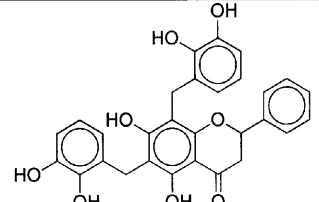
10

20

30

【表 5】

表2: 同定されたSYNJ2の選択的阻害剤

番号	カタログ番号 [CAS No.]	化合物名	IC50 ( $\mu$ M)	構造
21	NP-012429	3,5-ジ-O-ガロ イルシキミ酸	3.75	
22	NP-002325	エピアフゼレシ ン	15.9	
23	NP-003143	オキシレスペラ トロール	6.65	
24	NP-012649	6,8-ジ-(2,3-ジ ヒドロキシベン ジル)-ピノセン プリン	10.3	

## 【0259】

## 考察

おそらくセカンドメッセンジャーと、特異的膜サブドメインの同一性を決定する道標の両方として作用するPIリン脂質のレベルを制御するSYNJ2の能力のため、細胞移動および腫瘍転移の統合的な優れた調節因子としてのSYNJ2の機能が示される。SYNJ2の作用の多様性の別の反映は、浸潤突起および葉状仮足への主に二峰性の腹側局在化である。したがって、SYNJ2は、アクチン動力学的の顕著な調節因子（例えば、ダイナミン、コルタクチンおよびRac1）との物理的複合体を形成する。SYNJ2の作用を理解するための1つの鍵は、エンドサイトーシス輸送を制御する能力である。アクチンに基づく突出を定常的に供給する小胞中の形質膜の部分の頻繁なパッケージングは、細胞移動を推進する（Ridley、2011）。葉状仮足のSYNJ2は顕著なダイナミズムを示し（図3B）、生細胞画像化は、SYNJ2動員が新しい葉状仮足形成の部位を示すことを暗示する。先端に位置するSYNJ2分子はダイナミン、Rac1、アクチン重合およびコレステロールに依存するが、その分布はカベオリン-1およびクラスリンのものとは異なるため、本発明者らは、それが先端での膜の代謝回転を持続させるクラスリン非依存的担体（CLIC）のダイナミン依存的変異体であると推測する（Howes et al., 2010）。

## 【0260】

一連の素晴らしい研究によって、SYNJ1がニューロンのシナプス小胞のリサイクルに関連づけられている（Cremona et al., 1999）。マウスにおいては、SYNJ1の欠失は、安定状態のPI(4,5)P<sub>2</sub>の上昇、クラスリン被覆小胞の蓄積、およびエンドサイトーシス後の小胞の再利用性の遅延を引き起こした（Mani et al., 2007）。これらの観察は、小胞外被脱落を可能にするPI(4,5)P<sub>2</sub>の脱リン酸化が表現型の基礎にあ

ることを示唆している。同様に、本発明のSYNJ2枯渇乳腺細胞は活性EGFRの細胞内蓄積を示した。受容体ユビキチン化状態およびエンドサイトーシス経路のマーカは、内在化された受容体が通常はリサイクルまたは分解に分岐する選別エンドソームで輸送が停止することを示した。考えられる限りでは、その欠陥は小胞の外被またはそのアクチンコメット尾部と会合したPI(4,5)P<sub>2</sub>結合タンパク質を分解することができないことに起因する(Kaksonen et al., 2003)。かくして、SYNJ1切断時に観察されるシナプス伝達における欠陥と同様、SYNJ2の喪失は、運動にとって必須の表面分子の輸送停止のため細胞の移動および侵襲を大幅に損なう。

#### 【0261】

SYNJ2枯渇細胞における、それぞれ初期および後期エンドソームの調節因子であるPI(3)PおよびPI(3,5)P<sub>2</sub>の観察された上昇(図5C)は、さらなる輸送機構を提唱する。PI(3,5)P<sub>2</sub>の調節的役割は、インテグリンおよびいくつかのRabタンパク質などの複数の結合剤の同定によって補強された(Catime et al., 2008)。PI(3)Pは、MT1-MMPを浸潤突起に送達する経路である、エンドソームとtrans-ゴルジ体ネットワークとの間の循環に参与する5-キナーゼであるPIKfyveによりリン酸化される(Poincloux et al., 2009)。したがって、PI(4,5)P<sub>2</sub>の脱リン酸化に加えて、SYNJ2はPI(3,5)P<sub>2</sub>を加工して、初期エンドソームのPI(3)Pプールを微調整し、MT1-MMPのエキソサイトーシスと、インテグリン、ならびにEGFRのリサイクルとの両方を連係させる可能性がある。

#### 【0262】

動物中に導入された場合、shSYNJ2MDA-MB-231細胞は、リンパ節および血管に到達する能力の低下のため、転移能力を大幅に失った(図13A~H)。これらの結果およびin vitroでの表現型を統合する試みにおいて、図15に概略されるのは、細胞運動におけるSYNJ2の役割の基礎となる機構である。したがって、重要な事象は、SYNJ2のEGFにより誘導される上方調節、結果として、3つのホスホイノシチド:PI(4,5)P<sub>2</sub>、PI(3,4,5)P<sub>3</sub>およびPI(3,5)P<sub>2</sub>の枯渇を必要とする。SYNJ2により媒介されるPI(4,5)P<sub>2</sub>脱リン酸化は、ホスホリパーゼC-ガンマによるPI(4,5)P<sub>2</sub>の分解、およびPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を生成するPI3Kによるリン酸化と平行する。集合的に、EGFによる3つの酵素の刺激は、形質膜からPI(4,5)P<sub>2</sub>結合剤群を解離させ、また、PI(4,5)P<sub>2</sub>を含まないエンドサイトーシス小胞を生成する。同時に、SYNJ2はPI(3,4,5)P<sub>3</sub>を、浸潤突起形成にとって必須であるPI(3,4)P<sub>2</sub>に変換する。このモデルと一致して、PI3Kが浸潤突起形成にとって必要であることが報告されている。一度、環境が整えば、PI(3,4)P<sub>2</sub>はTKS5に結合し、コフィリンが浸潤突起内でアクチン反矢尻端を生成することができるダイナミンとコルタクチン中心複合体を核とする。本発明の結果によれば、SYNJ2は次の浸潤突起成熟ステップ、すなわち、MMPの分泌ならびにMT1-MMPおよび他の表面分子、例えば、CD44の送達にも関与する。同様の方法で、SYNJ2は、先端へのEGFRおよびインテグリンの送達を制御し、コフィリンを活性化する可能性があり、これは葉状仮足突出の形成を指令する中枢的な事象である。

#### 【0263】

in vitroでの細胞移動および動物における転移へのSYNJ2の寄与と一致して、乳がん標本の本発明における調査により、疾患の侵襲性サブタイプにおけるSYNJ2 mRNAおよびタンパク質レベルの有意な上方調節が観察された。さらに、2つのコホートからのデータを用いて、乳がん患者の高いSYNJ2 mRNA発現と、より短い生存期間との関係が観察された。

#### 【0264】

まとめると、本研究は、本質的な転移開始事象を、PI(4,5)P<sub>2</sub>に対する一連の作用が先端でアクチン動力学を調節し、ならびに浸潤突起の道標であるPI(3,4)P<sub>2</sub>を生成する、PI3KのEGFに誘導される局部活性化およびSYNJ2の全体的上方

10

20

30

40

50



調節に帰する。さらに本研究によりSYNJ2によるPI(3,4)P2の生成を選択的に阻害する様々な化合物が同定された。

#### 【0265】

本発明をその特定の実施形態と共に説明してきたが、多くの代替物、改変および変更が当業者には明らかであることが明白である。したがって、添付の特許請求の範囲の趣旨および広い範囲内にあるそのような代替物、改変および変更を全て包含することが意図される。

#### 【0266】

本明細書に記載される全ての刊行物、特許および特許出願は、あたかもそれぞれ個々の刊行物、特許または特許出願が具体的かつ個別に参照により本明細書に援用されると示されるのと同程度に、その全体が参照により本明細書に援用される。さらに、本出願における任意の参考文献の引用または同定は、そのような参考文献が本発明に対する先行技術として利用可能であるとの承認と解釈されるべきではない。セクションの見出しが用いられる程度で、それらは必ずしも限定と解釈されるべきではない。

#### 【0267】

参考文献（他の参考文献は本文中に含まれる）

- Amit, I., Citri, A., Shay, T., Lu, Y., Katz, M., Zhang, F., Tarcic, G., Siwak, D., Lahad, J., Jacob-Hirsch, J., et al. (2007). A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat Genet* 39, 503-512.
- Augoff, K., Das, M., Bialkowska, K., McCue, B., Plow, E.F., and Sossey-Alaoui, K. (2011). miR-31 is a broad regulator of beta1-integrin expression and function in cancer cells. *Molecular cancer research : MCR* 9, 1500-1508.
- Bos, P.D., Zhang, X.H., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., et al. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459, 1005-1009.
- Catimel, B., Schieber, C., Condrón, M., Patsiouras, H., Connolly, L., Catimel, J., Nice, E.C., Burgess, A.W., and Holmes, A.B. (2008). The PI(3,5)P2 and PI(4,5)P2 interactomes. *J Proteome Res* 7, 5295-5313.
- Chuang, Y.Y., Tran, N.L., Rusk, N., Nakada, M., Berens, M.E., and Symons, M. (2004). Role of synaptojanin 2 in glioma cell migration and invasion. *Cancer research* 64, 8271-8275.
- Courtneidge, S.A., Azucena, E.F., Pass, I., Seals, D.F., and Tesfay, L. (2005). The SRC substrate Tks5, podosomes (invadopodia), and cancer cell invasion. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 70, 167-171.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M.R., Luthi, A., Kim, W.T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S.B., Flavell, R.A., et al. (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188.
- Ehrlich, M., Boll, W., Van Oijen, A., Hariharan, R., Chandran, K., Nibert, M.L., and Kirchhausen, T. (2004). Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits. *Cell* 118, 591-605.
- Gewinner, C., Wang, Z.C., Richardson, A., Teruya-Feldstein, J., Etemadmoghadam, D., Bowtell, D., Barretina, J., Lin, W.M., Rameh, L., Salmena, L., et al. (2009). Evidence that inositol polyphosphate 4-phosphatase type II is a tumor suppressor that inhibits PI3K signaling. *Cancer cell* 16, 115-125.
- Goh, L.K., Huang, F., Kim, W., Gygi, S., and Sorkin, A. (2010). Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *The Journal of cell biology* 189, 871-883.
- Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 317-323.
- Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progressi

on. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.

Howes, M.T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P.J., Simpson, F., Hill, M.M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M.R., et al. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *The Journal of cell biology* 190, 675-691.

Jefferson, A.B., and Majerus, P.W. (1996). Mutation of the conserved domains of two inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochemistry* 35, 7890-7894.

Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* 115, 475-487.

Kruchten, A.E., and McNiven, M.A. (2006). Dynamin as a mover and pincher during cell migration and invasion. *Journal of cell science* 119, 1683-1690. 10

Macia, E., Ehrlich, M., Massol, R., Boucrot, E., Brunner, C., and Kirchhausen, T. (2006). Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 10, 839-850.

Malecz, N., McCabe, P.C., Spaargaren, C., Qiu, R., Chuang, Y., and Symons, M. (2000). Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol* 10, 1383-1386.

Mani, M., Lee, S.Y., Lucast, L., Cremona, O., Di Paolo, G., De Camilli, P., and Ryan, T.A. (2007). The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* 56, 1004-1018. 20

Minn, A.J., Gupta, G.P., Siegel, P.M., Bos, P.D., Shu, W., Giri, D.D., Viale, A., Olshen, A.B., Gerald, W.L., and Massague, J. (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436, 518-524.

Mosesson, Y., Mills, G.B., and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 835-850.

Mouneimne, G., DesMarais, V., Sidani, M., Scemes, E., Wang, W., Song, X., Eddy, R., and Condeelis, J. (2006). Spatial and temporal control of cofilin activity is required for directional sensing during chemotaxis. *Curr Biol* 16, 2193-2205.

Muller, P.A.J., Caswell, P.T., Doyle, B., Iwanicki, M.P., Tan, E.H., Karim, S., Lukashchuk, N., Gillespie, D.A., Ludwig, R.L., Gosseline, P., et al. (2010). Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell* 139, 1327-1341. 30

Murphy, D.A., and Courtneidge, S.A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 413-426.

Oikawa, T., Itoh, T., and Takenawa, T. (2008). Sequential signals toward podosome formation in NIH-src cells. *The Journal of cell biology* 182, 157-169.

Oser, M., Yamaguchi, H., Mader, C.C., Bravo-Cordero, J.J., Arias, M., Chen, X., Desmarais, V., van Rheenen, J., Koleske, A.J., and Condeelis, J. (2009). Cortactin regulates cofilin and N-WASP activities to control the stages of invadopodium assembly and maturation. *The Journal of cell biology* 186, 571-587. 40

Palamidessi, A., Frittoli, E., Garre, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Di Spro, A., Lanzetti, L., Scita, G., and Di Fiore, P.P. (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* 134, 135-147.

Poincloux, R., Lizarraga, F., and Chavrier, P. (2009). Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia. *Journal of cell science* 122, 3015-3024.

Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145, 1012-1022.

Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev* 90, 259- 50

289.

Sossey-Alaoui, K., Downs-Kelly, E., Das, M., Izem, L., Tubbs, R., and Plow, E.F. (2011). WAVE3, an actin remodeling protein, is regulated by the metastasis suppressor microRNA, miR-31, during the invasion-metastasis cascade. *International journal of cancer Journal international du cancer* 129, 1331-1343.

Valastyan, S., Chang, A., Benaich, N., Reinhardt, F., and Weinberg, R.A. (2011). Activation of miR-31 function in already-established metastases elicits metastatic regression. *Genes & development* 25, 646-659.

Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szasz, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* 137, 1032-1046.

van Rheenen, J., Song, X., van Roosmalen, W., Cammer, M., Chen, X., Desmarais, V., Yip, S.C., Backer, J.M., Eddy, R.J., and Condeelis, J.S. (2007). EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *The Journal of cell biology* 179, 1247-1259.

Wang, Y., and McNiven, M.A. (2012). Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *The Journal of cell biology*.

Yamaguchi, H., Yoshida, S., Muroi, E., Yoshida, N., Kawamura, M., Kouchi, Z., Nakamura, Y., Sakai, R., and Fukami, K. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110alpha regulates invadopodia formation. *The Journal of cell biology* 193, 1275-1288.

Yu, W.H., Woessner, J.F., Jr., McNeish, J.D., and Stamenkovic, I. (2002). CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes & development* 16, 307-323.

Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.

【配列表フリーテキスト】

【 0 2 6 8 】

配列番号 3 : コード領域 1 6 1 2 ~ 1 6 3 3 ( S J 2 - 1 ) を標的とする、低分子干渉 RNA 分子配列の例

配列番号 4 : 3' 非翻訳領域 ( S J 2 - 2 ) を標的とする、低分子干渉 RNA 分子配列の例

配列番号 5 : S Y N J 2 mRNA レベルのダウンレギュレートに成功する siRNA 配列の例

配列番号 6 : S Y N J 2 mRNA レベルのダウンレギュレートに成功する siRNA 配列の例

配列番号 7 : S Y N J 2 mRNA レベルのダウンレギュレートに成功する shRNA 配列の例

配列番号 8 : S Y N J 2 mRNA レベルのダウンレギュレートに成功する shRNA 配列の例

配列番号 9 : S Y N J 2 mRNA レベルのダウンレギュレートに成功する shRNA 配列の例

配列番号 10 : コード領域 1 4 9 4 ~ 1 4 7 5 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの例 ; ホスホロチオエート骨格

配列番号 11 : 3' UTR 配列を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの例 ; ホスホロチオエート骨格

配列番号 12 : コード領域 2 4 2 8 ~ 2 4 0 9 を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの例 ; ホスホロチオエート骨格

配列番号 13 : ヒト由来の組み換え T A P P 1 P H ドメイン  
配列番号 14 : ヒト由来の組み換え T A P P 1 P H ドメイン

【図 1】

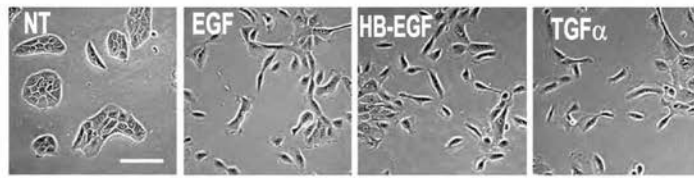


図 1A

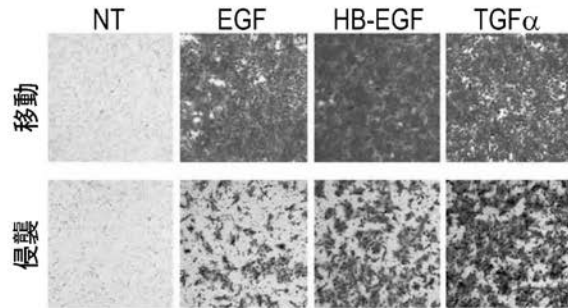


図 1B

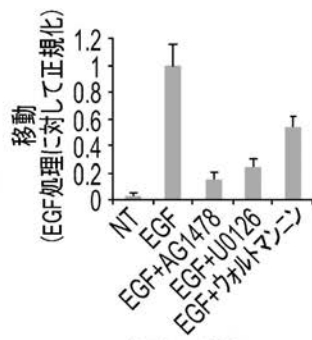
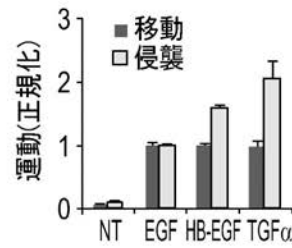


図 1C

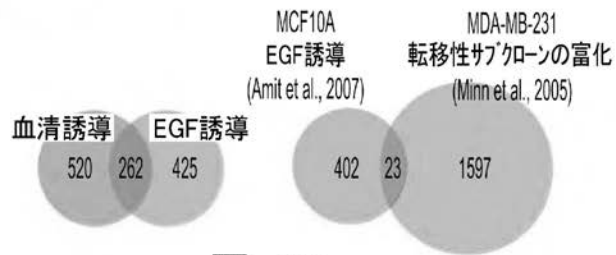


図 1D

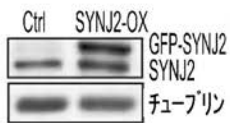


図 1E

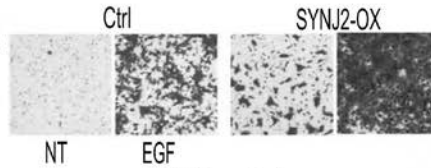


図 1F

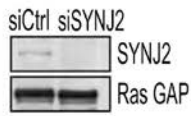


図 1G

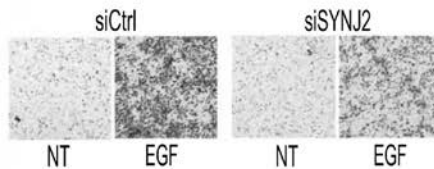


図 1H

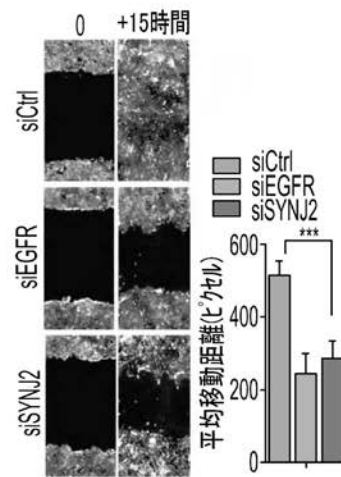
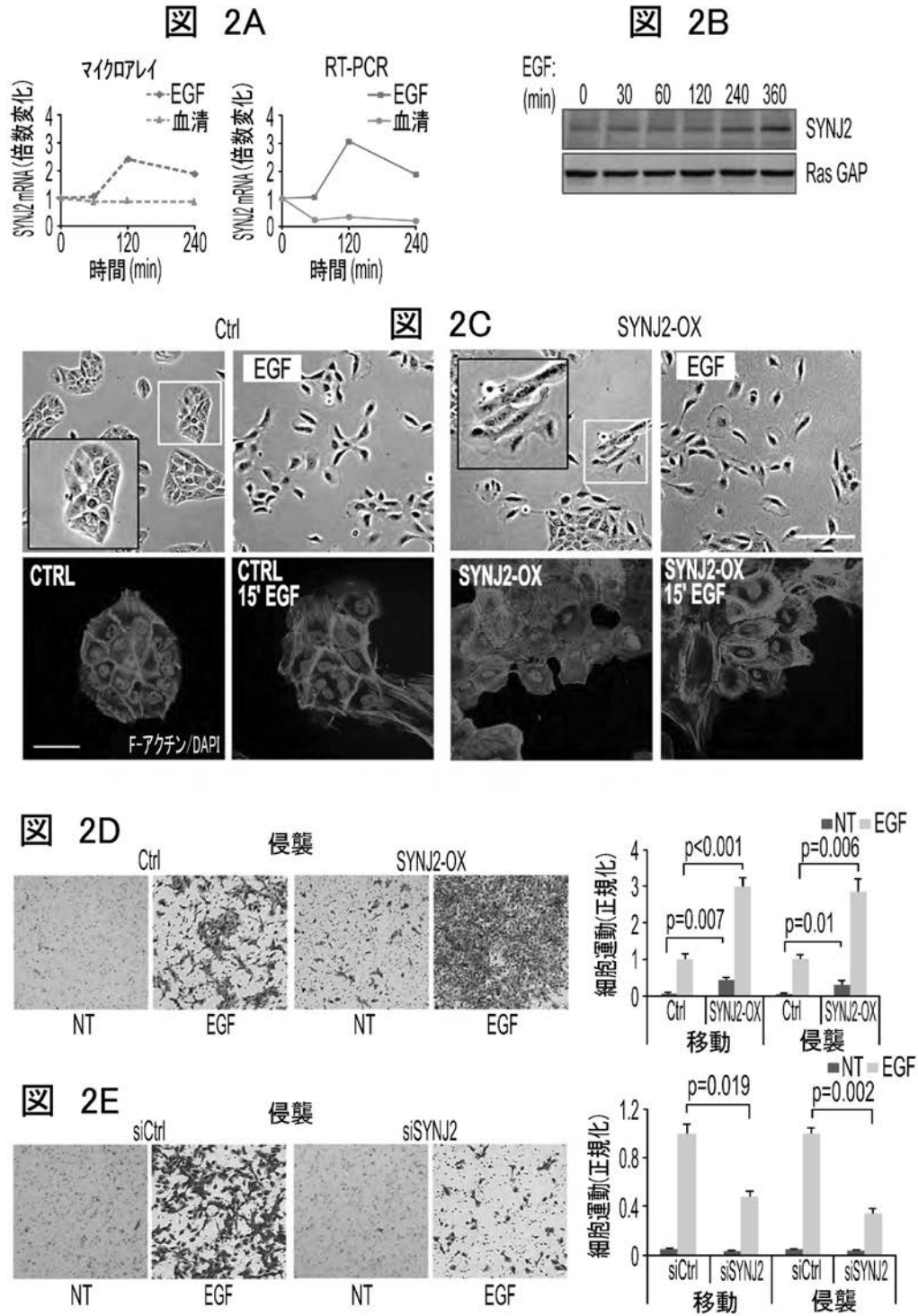


図 1I

【 図 2 】



【 図 3 】



図 3A

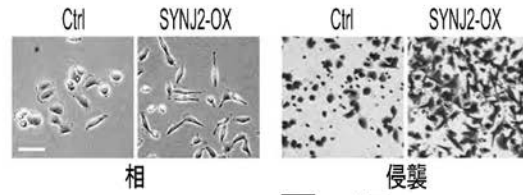


図 3B

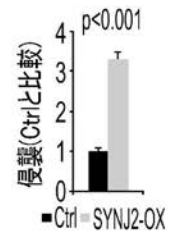


図 3C

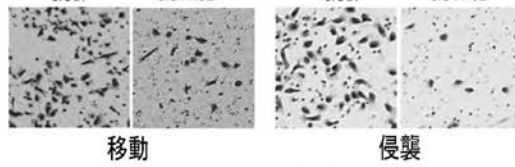


図 3D

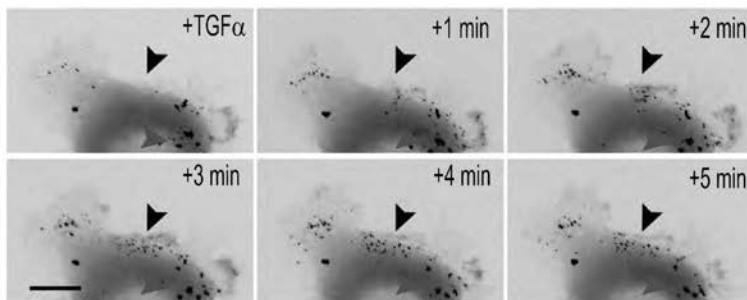
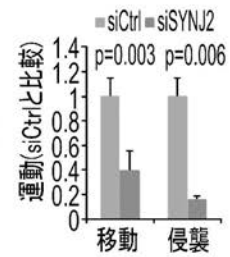


図 3E



図 3F

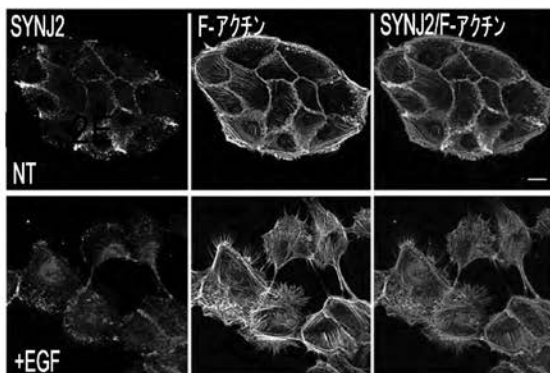


図 3G

【 図 4 】

図 4A

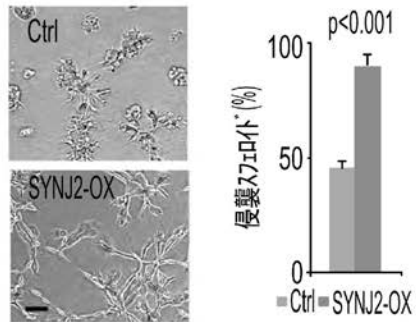


図 4B

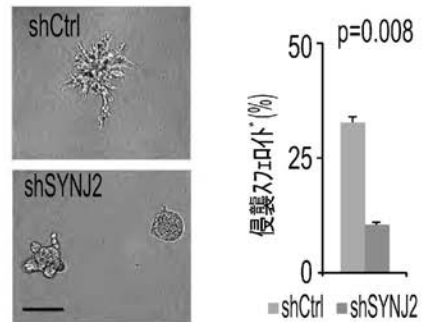


図 4C



図 4D

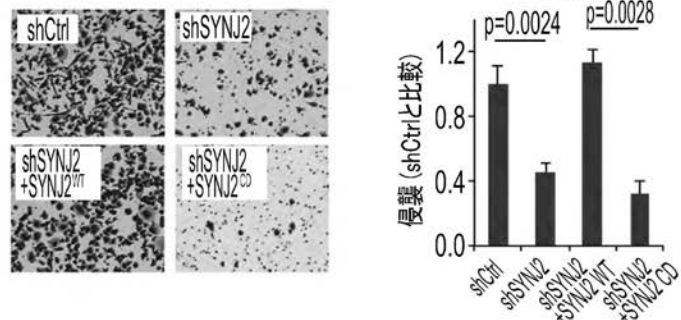


図 4E

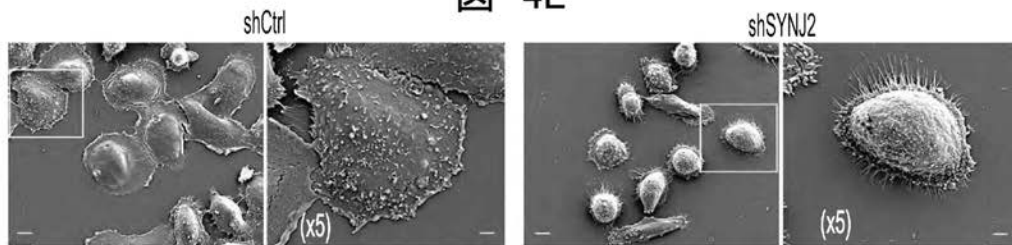
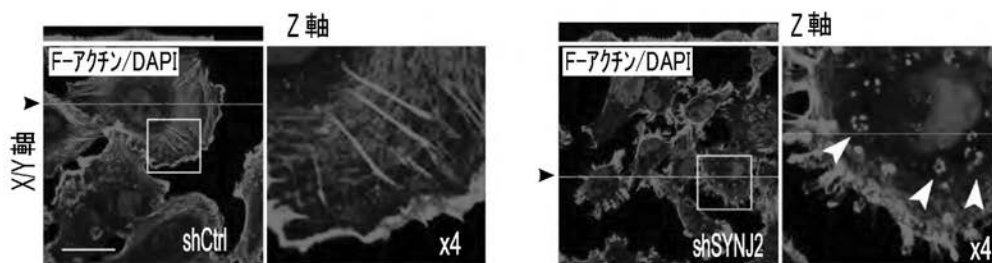


図 4F





【 図 5 】

図 5A

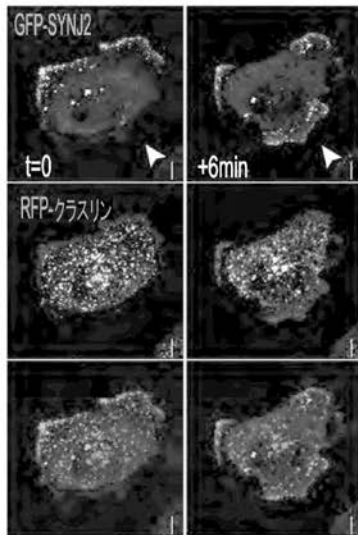


図 5B

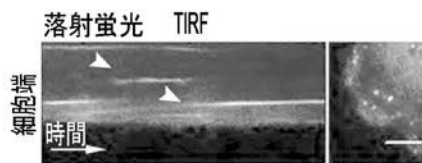
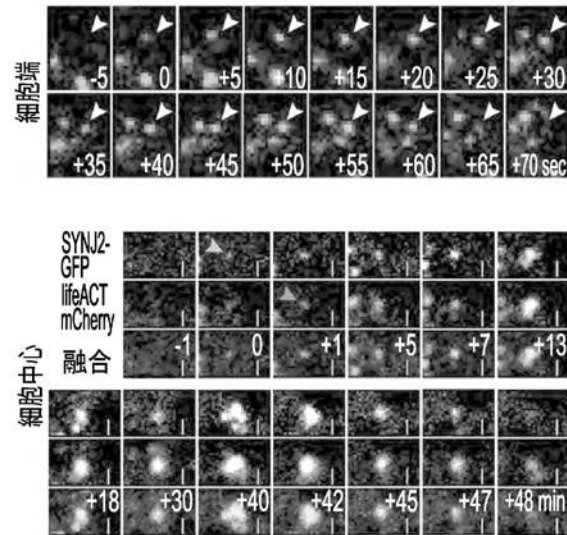


図 5C

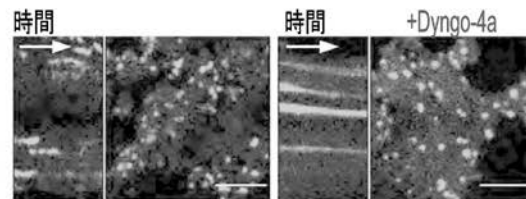


図 5D

図 5E

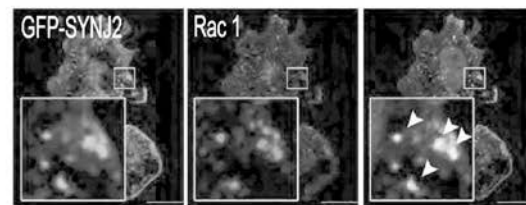
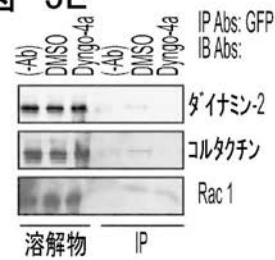


図 5F

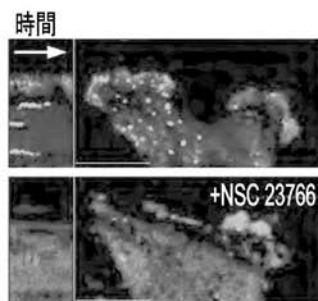


図 5G

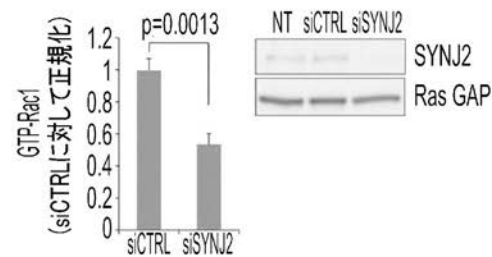


図 5H

【図 6】

図 6A

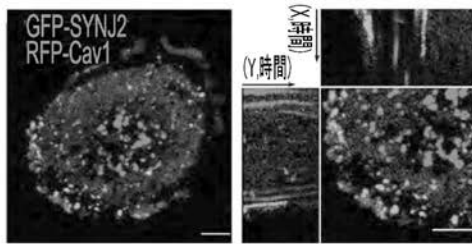


図 6B

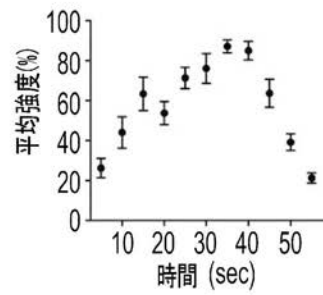
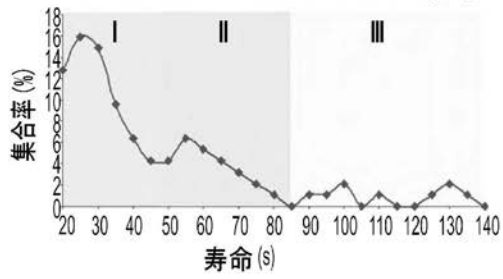


図 6C

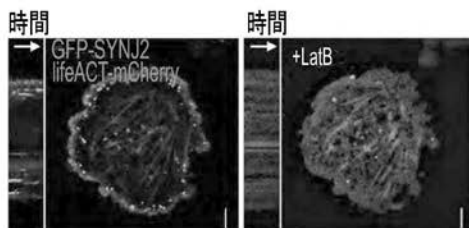
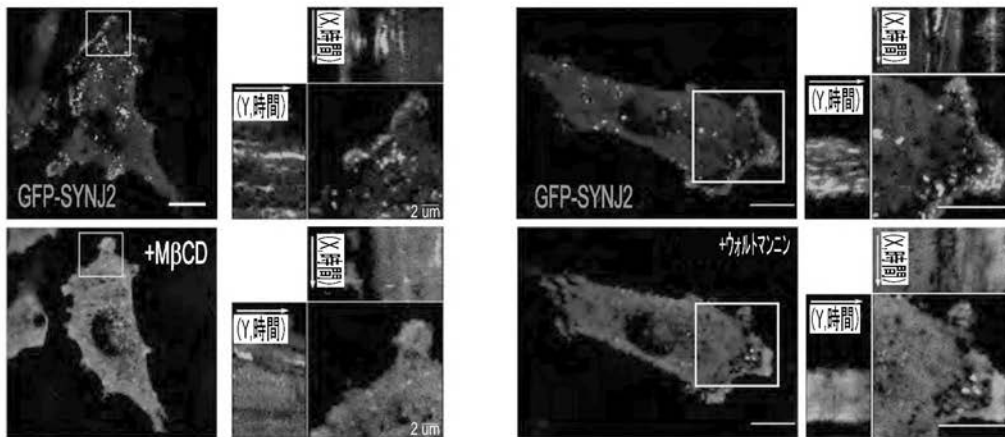


図 6D

【 図 7 】

図 7B

図 7A

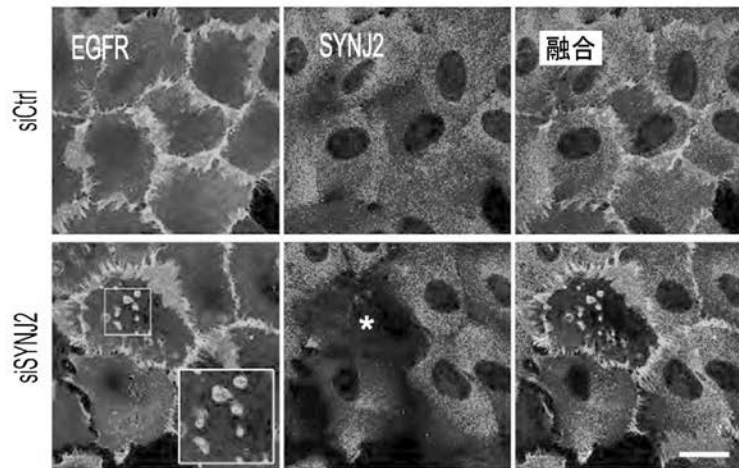


図 7C

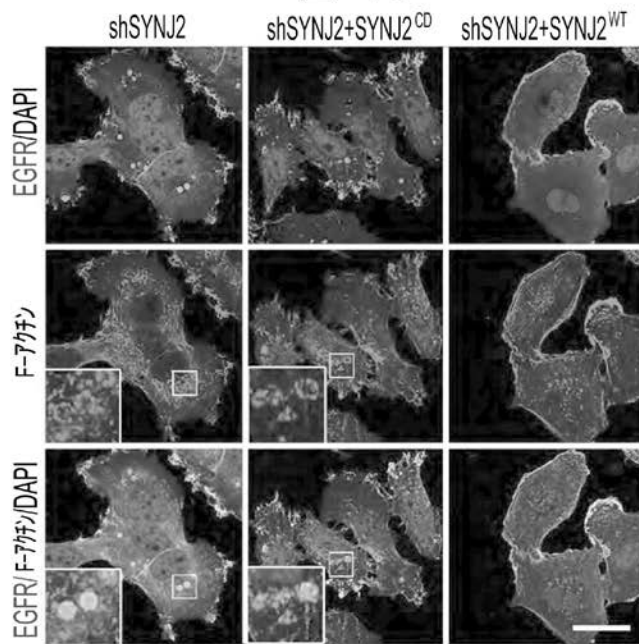


図 7D

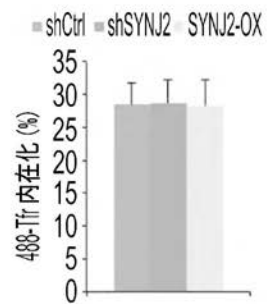
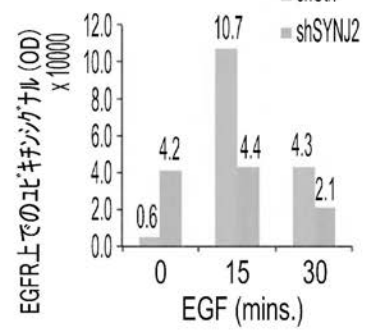
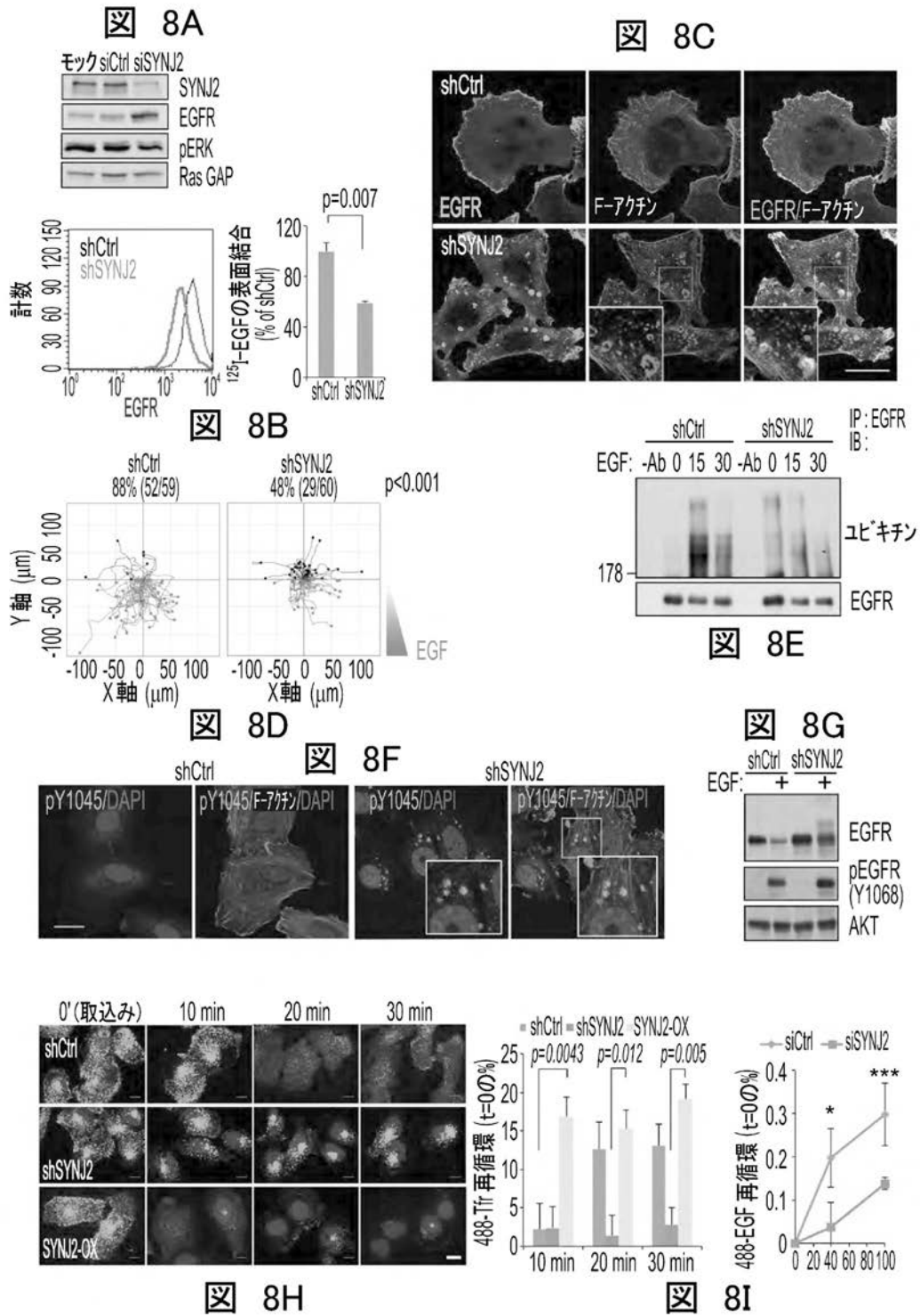
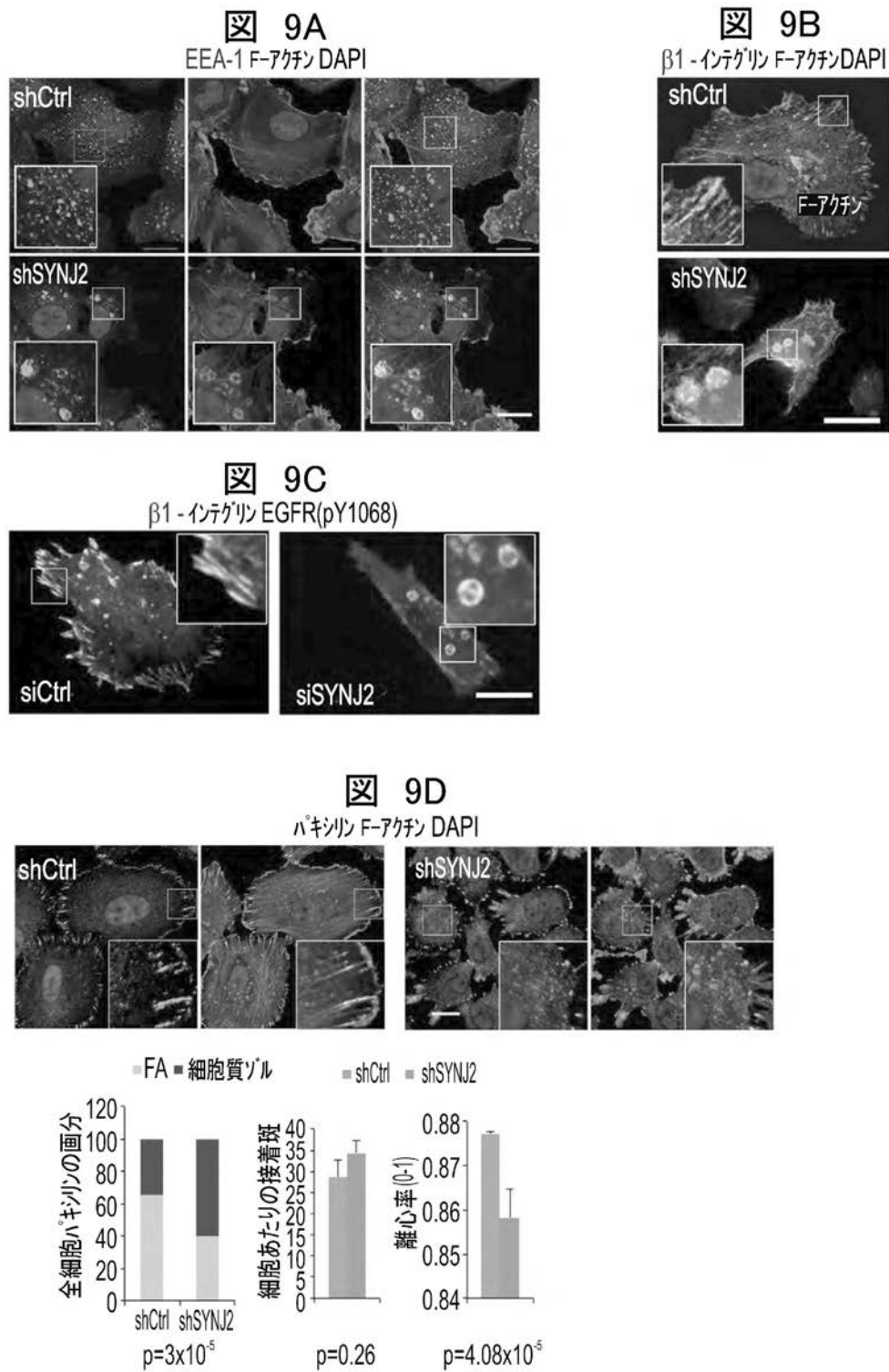


図 7E

【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】

図 10A

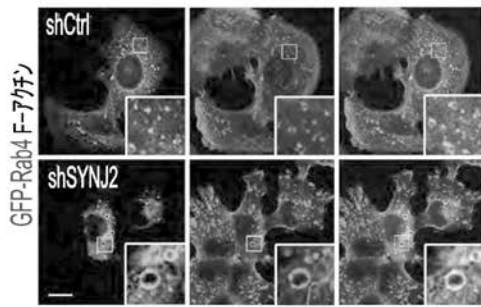


図 10B

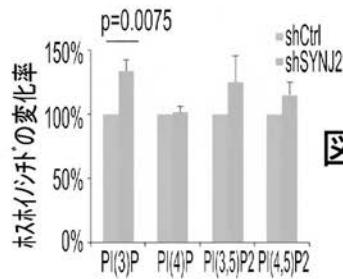
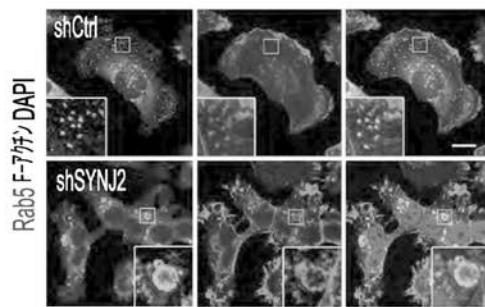


図 10C

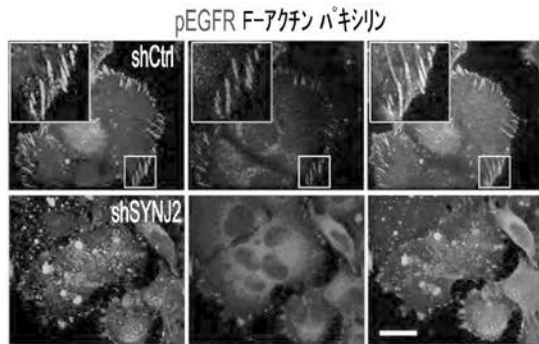
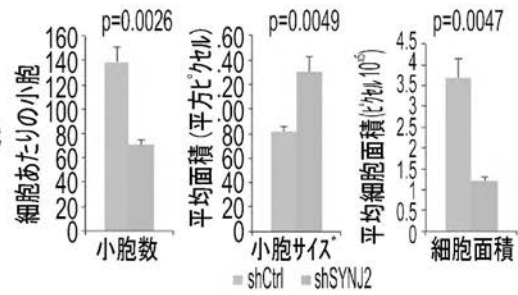


図 10D

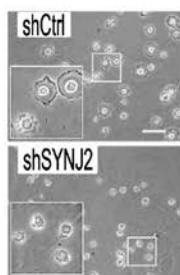


図 10E

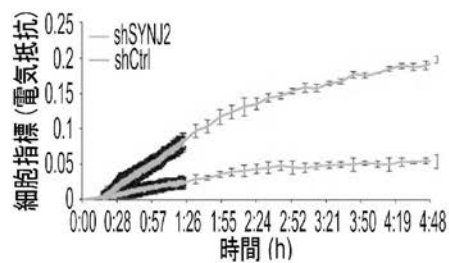
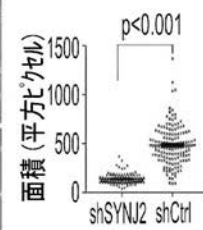
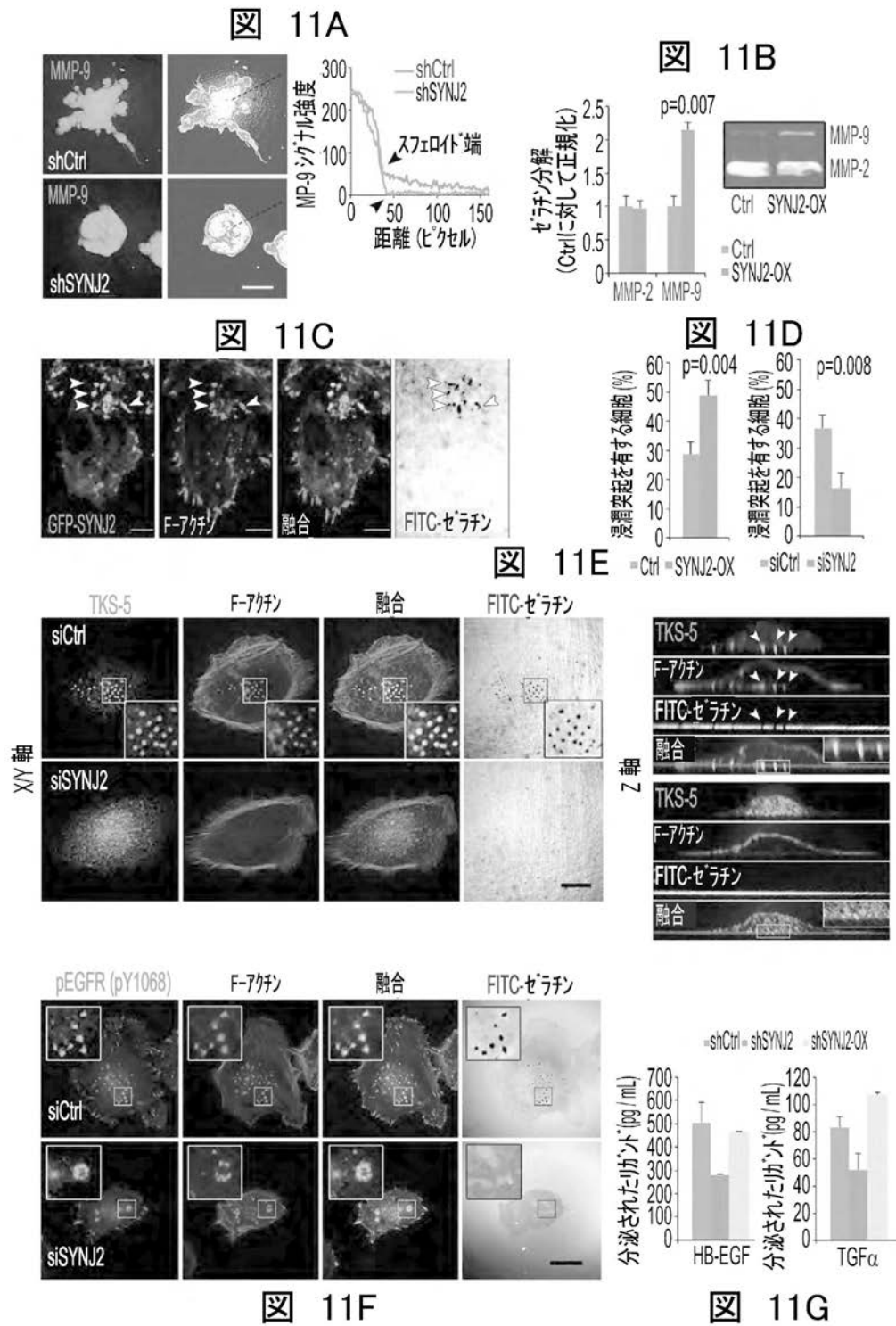
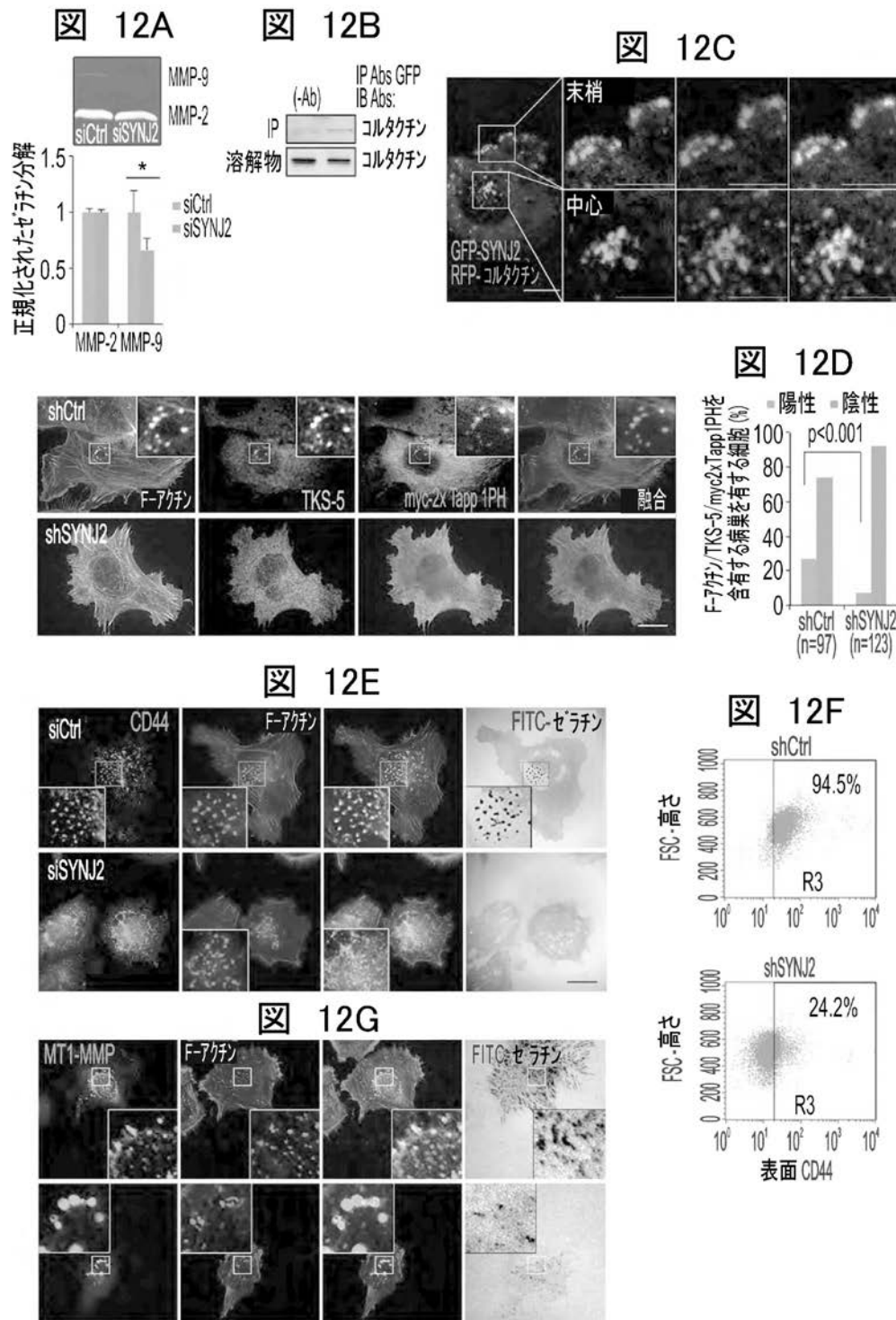


図 10F

【 図 1 1 】

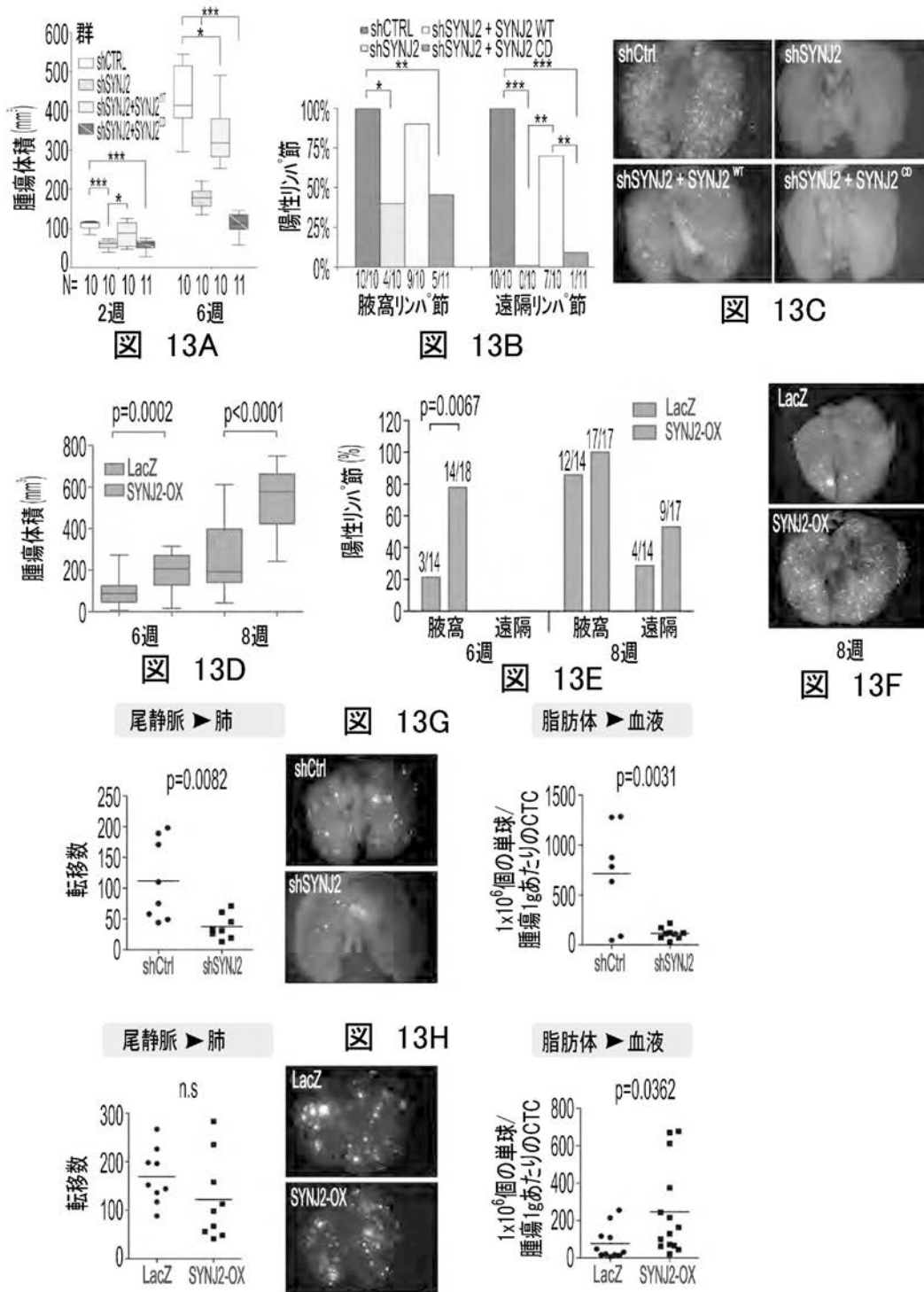


【 図 1 2 】

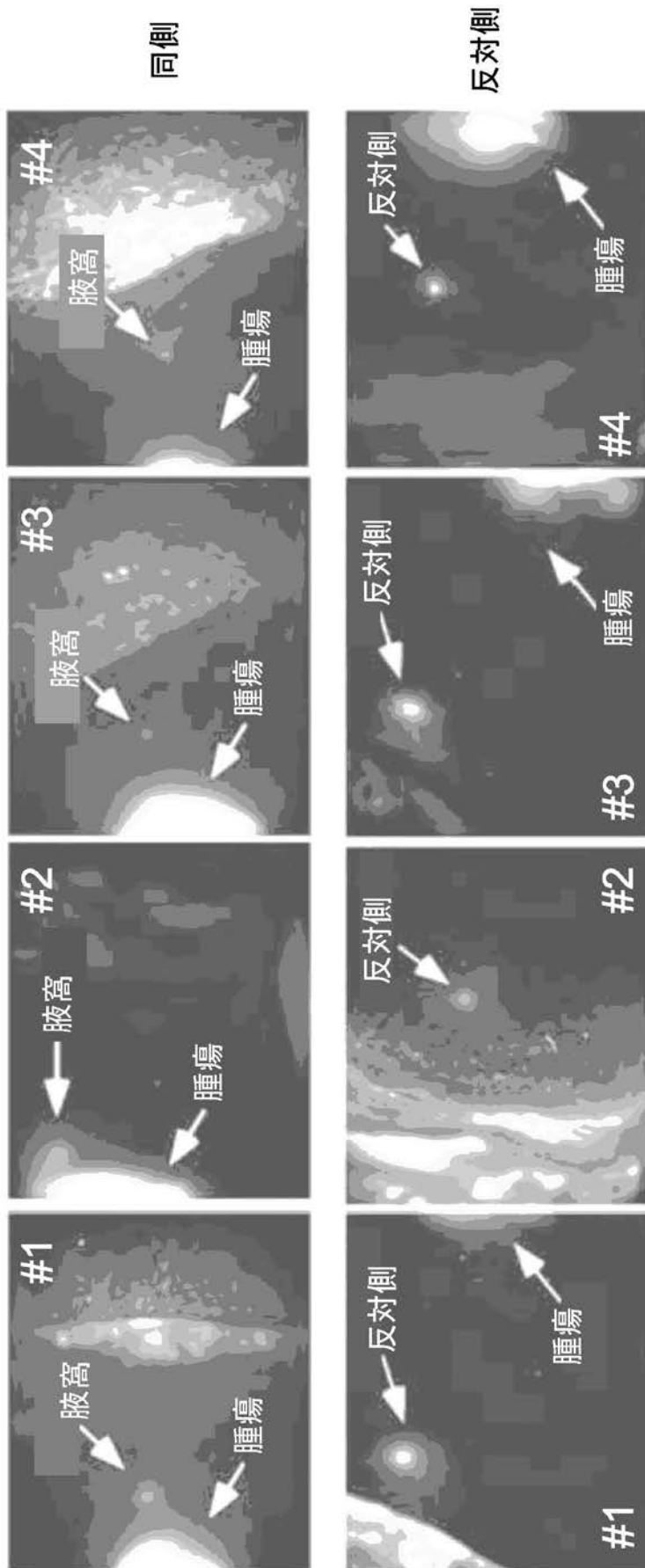




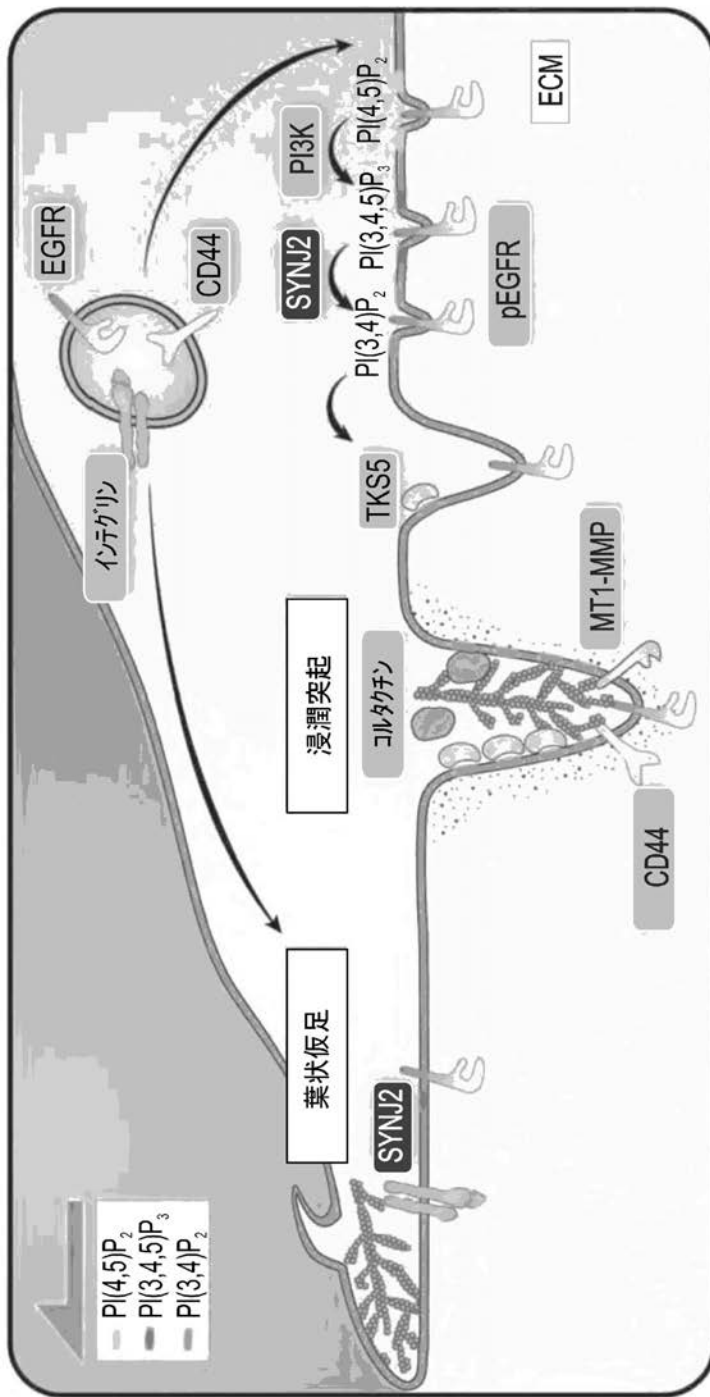
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【図 15】



【図 16】

図 16A

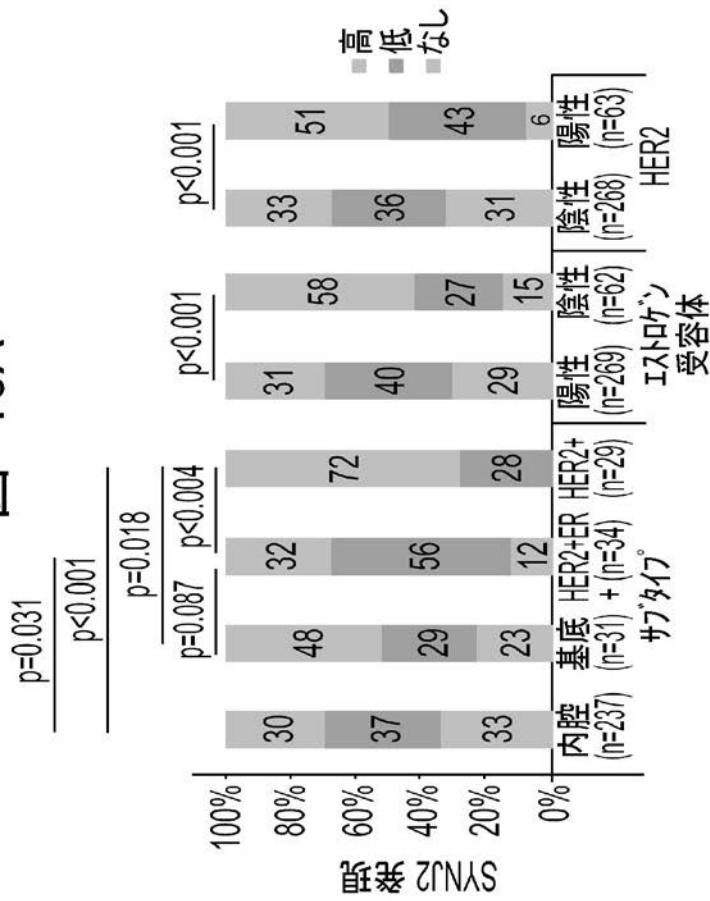


図 16B

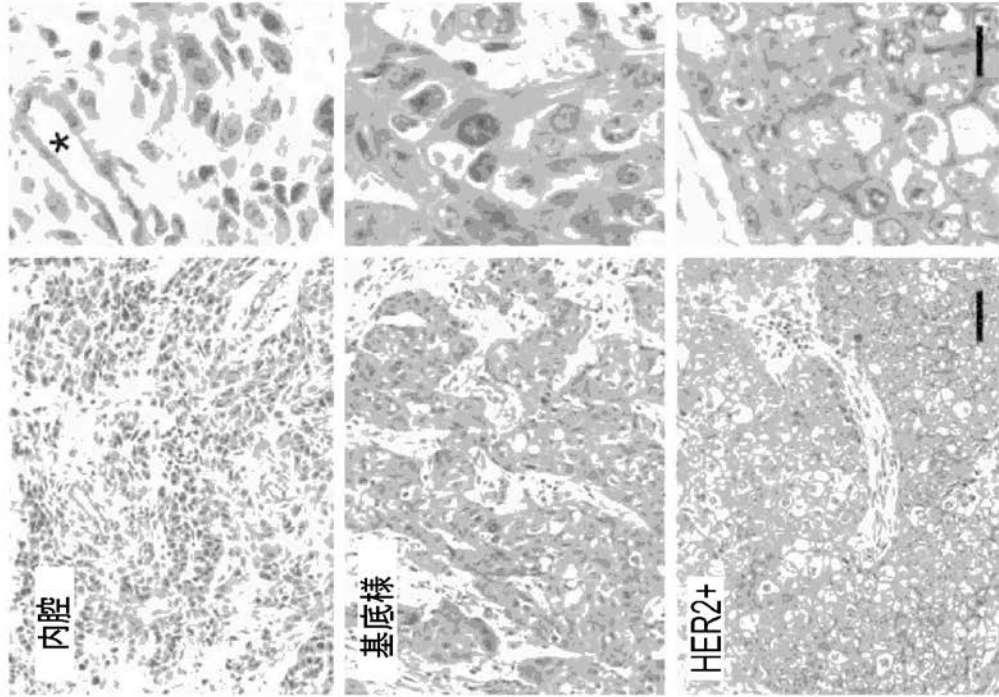
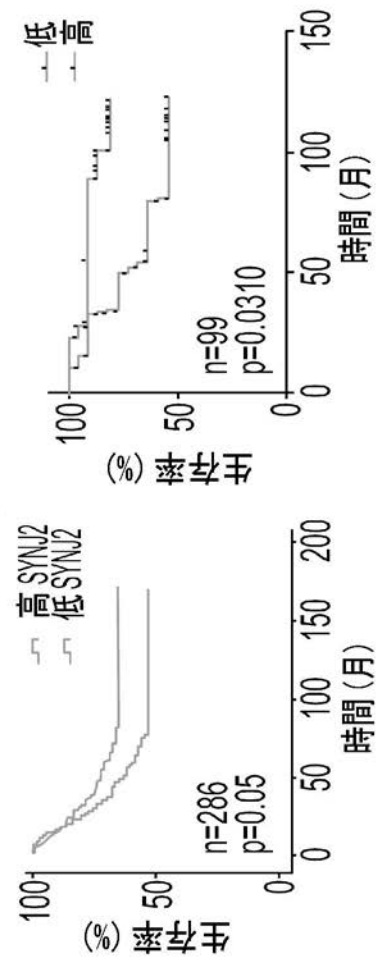


図 16C



【 図 1 7 】

図 17A

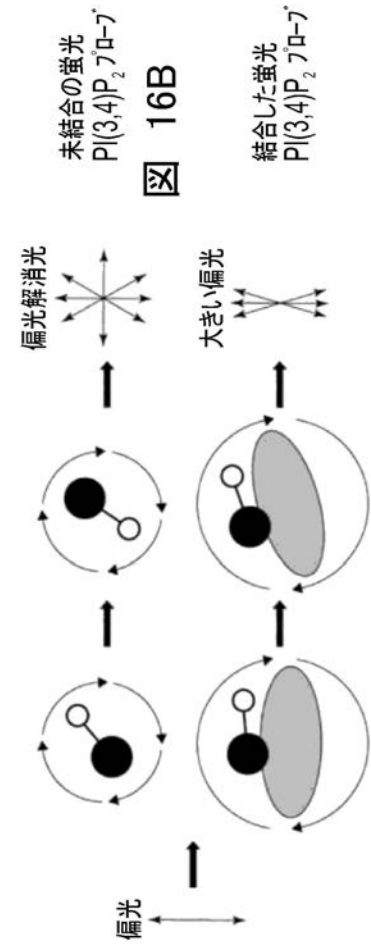
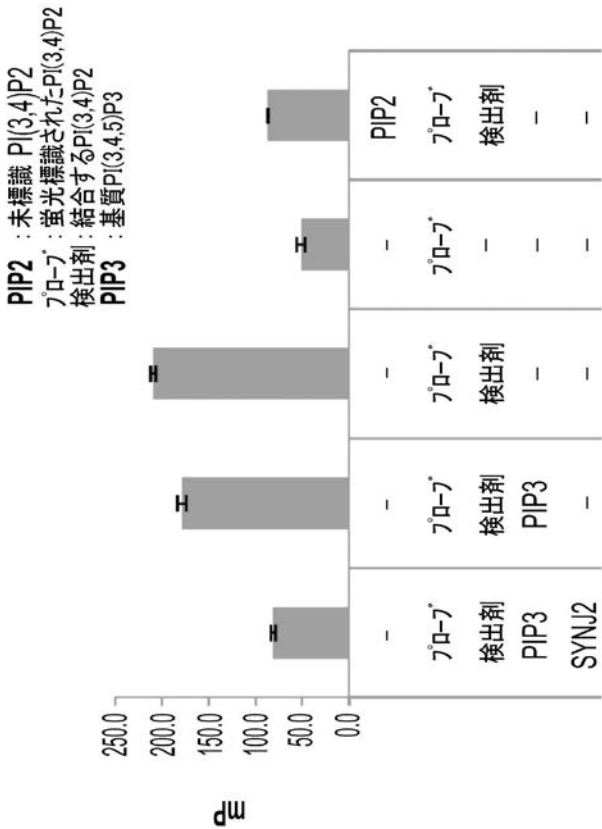


図 16B

図 17B



【 図 1 8 】

1/1 | gat tac aag gac gac gat aag ggc gga tcc cct tac ttt act cct aaa cca cct caa gat agt acg gtt atc aaa gct gga tat  
 M D Y K D D D D K G S 31/11 | 61/21  
 91/31 | gta aaa caa gga gca glg atg aaa aac tgg aag aga aga tat ttt caa ttg gat gaa aac aca ala ggc tac ttc aaa tct gaa ctg  
 C V K Q G A V M K N W K R R Y F Q L D E N T I G Y F K S E L 151/51  
 181/61 | gaa aag qaa cct ctt cgc gla ala cca ctt aaa gag gtt cat aaa glc cag gaa tgt aag caa agc gac ala atg atg agg gac aac ctc  
 E K E P L R V I P L K E V H K V Q E C K Q S D I M M R D N L 241/81  
 271/91 | ttt gaa att gla aca acg tct cga act ttc tat glg cag gct gat agc cct gaa gag alg cac agt tgg att aaa gca glc tct ggc gcc  
 F E I V T T S R T F Y V Q A D S P E M H S W I K A V S G A 331/111  
 361/121 | att gla gca cag cgg ggt ccc ggc aga tct gog tct tct gag cat ccc ccc ggt cct tca gaa tcc aaa cac gct ttc cgt cct acc aac  
 I V A Q R G P G R S A S S E H P P G P S E S K H A F R P T H 421/141  
 451/151 | gca gcc acc gcc acc tca cat tcc aca gcc tct cgc agc aac tct ttg glc tca acc ttt acc alg gag aag cga gga ttt tac gag tct  
 A A T A T S H S T A S R S N S L V S T F T M E K R G F Y E S 511/171  
 541/181 | ctt gcc aag gtc aag cca ggg aac ttc aag gtc cag act gtc tct cca aga gaa cca gct tcc aaa glg act gaa caa gct ctg tta aga  
 L A K V K P G N F K V Q T V S P R E P A S K V T E Q A L L R 601/201  
 631/211 | cct caa agt aaa aat ggc cct cag gaa aaa gat tgt gac cta gla gac ttg qac gat gcg agc ctt ccg glc agt gac glg ctc gag cac  
 P Q S K N G P Q E K D C D L V D L D D A S L P V S D V L E H 691/231  
 721/241 | cac cac cac cac cac tga\*  
 H H H H H H

【 配 列 表 】

2016502536000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL2013/050985

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K39/395 A61K45/06 A61K31/353 A61K31/7048 A61P35/00 A61P35/04 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FENG NI ET AL: "Flavonoid Ampelopsin Inhibits the Growth and Metastasis of Prostate Cancer In Vitro and in Mice", PLOS ONE, vol. 7, no. 6, 5 June 2012 (2012-06-05), pages 1-8, XP055098872, ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0038802 page 1, right-hand column, last paragraph - page 2, left-hand column, paragraph 2 page 4, left-hand column, paragraph 1 ----- -/--	1,2,16, 18,19
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 January 2014		Date of mailing of the international search report 26/05/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Haider, Ursula

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/IL2013/050986

## Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

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

1-7, 18-22(completely); 16, 17(partially)

## Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IL2013/050985

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ya-Yu Chuang ET AL: "Role of Synaptojanin 2 in Glioma Cell Migration and Invasion", Cancer Research, 15 November 2004 (2004-11-15), pages 8271-8275, XP055098695, Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/64/22/8271.full.pdf [retrieved on 2014-01-27] the whole document	1,16,18, 19
X	WO 03/057239 A1 (RES DEV FOUNDATION [US]) 17 July 2003 (2003-07-17) claims 2, 3 page 17, lines 19-24 page 30, lines 14-17	1,2,18, 19
X	MEPUR H. RAVINDRANATH ET AL: "Differential Growth Suppression of Human Melanoma Cells by Tea (Camellia sinensis) Epicatechins (ECG, EGC and EGCG)", CANCER EPIDEMIOLOGY, BIOMARKERS & PREVENTION, vol. 158, no. 1, 22 October 2007 (2007-10-22), pages 523-530, XP055098877, ISSN: 1055-9965, DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-03-0040 the whole document page 525, right-hand column, paragraph 3	3-7, 18-22
X	MIN-HSIUNG PAN ET AL: "Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate", FOOD & FUNCTION, vol. 2, no. 2, 1 January 2011 (2011-01-01), page 101, XP055098881, ISSN: 2042-6496, DOI: 10.1039/c0fo00174k the whole document page 105	1,2,18, 19
X	WO 2008/156644 A2 (FRANK DAVID A [US]) 24 December 2008 (2008-12-24) claim 1 page 12, line 20 page 25, lines 24-25 page 33, lines 18-21 page 41, lines 13-21	1,2,18, 19
X	WO 00/57875 A1 (PURDUE RESEARCH FOUNDATION [US]) 5 October 2000 (2000-10-05) page 7, lines 19-27 page 36 - page 37	3-7, 17-22
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IL2013/050985

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>STYLLI S S ET AL: "Invadopodia: At the cutting edge of tumour invasion", JOURNAL OF CLINICAL NEUROSCIENCE, vol. 15, no. 7, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 725-737, XP022689319, CHURCHILL LIVINGSTONE, GB ISSN: 0967-5868, DOI: 10.1016/J.JOCN.2008.03.003 [retrieved on 2008-05-12] abstract page 731, right-hand column, paragraph 4 page 726, left-hand column, paragraph 1 page 726, right-hand column, paragraph 3 -----</p>	1,2,16, 18
A	<p>MALECZ NICOLE ET AL: "Synaptojanin 2, a novel Rac1 effector that regulates clathrin-mediated endocytosis", CURRENT BIOLOGY, vol. 10, no. 21, 2 November 2000 (2000-11-02), pages 1383-1386, XP002373482, the whole document -----</p>	3-7, 17-19, 21,22

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2013/050986

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03057239	A1	17-07-2003	AU 2002357399 A1 24-07-2003
			CA 2471750 A1 17-07-2003
			EP 1458404 A1 22-09-2004
			US 2003175834 A1 18-09-2003
			WO 03057239 A1 17-07-2003
-----			
WO 2008156644	A2	24-12-2008	NONE
-----			
WO 0057875	A1	05-10-2000	AU 4043900 A 16-10-2000
			US 6410061 B1 25-06-2002
			US 2002176897 A1 28-11-2002
			WO 0057875 A1 05-10-2000
-----			

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-7, 18-22(completely); 16, 17(partially)

A method of preventing tumor metastasis with the proviso that said tumour is not glioma, the method comprising administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of an inhibitor of synaptojanin 2 (SYNJ2), thereby preventing tumor metastasis.

A method of treating cancer the method comprising, administering to a subject in need thereof a therapeutically effective amount of an inhibitor of synaptojanin 2 (SYNJ2) and an inhibitor of a cell surface receptor associated with an onset or progression of cancer, thereby treating cancer. An article of manufacture for the treatment of cancer or prevention of cancer metastasis, comprising a packaging material packaging an inhibitor of SYNJ2 and an inhibitor of a cell surface receptor associated with an onset or progression of cancer.

---

2. claims: 8-11

A method of identifying a putative inhibitor of tumor metastasis, the method comprising analyzing SYNJ2-mediated processing of PI(3,4,5)P3 to PI(3,4)P2 in the presence of a test agent, wherein a decreased processing of PI(3,4,5)P3 to PI(3,4)P2 in said presence of said test agent as compared to same in an absence thereof is indicative of a putative inhibitor of tumor metastasis.

---

3. claims: 12-15(completely); 16, 17(partially)

A method of prognosing cancer in a subject in need thereof, the method comprising determining a level or activity of SYNJ2 in a cancer cell of the subject, wherein an upregulation in said level of activity of said SYNJ2 in said cancer cell of the subject compared to same in a cell of an unaffected control sample, is indicative of a poor prognosis.

---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 K 31/7024 (2006.01)	A 6 1 K 31/7024	
A 6 1 K 31/12 (2006.01)	A 6 1 K 31/12	
A 6 1 K 31/351 (2006.01)	A 6 1 K 31/351	
A 6 1 K 31/7032 (2006.01)	A 6 1 K 31/7032	
A 6 1 K 31/155 (2006.01)	A 6 1 K 31/155	
A 6 1 K 31/4709 (2006.01)	A 6 1 K 31/4709	
A 6 1 K 31/216 (2006.01)	A 6 1 K 31/216	
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K 31/05	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N 33/68	

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

(72)発明者 ベン - チェトリト ニル  
 イスラエル国 7 6 1 0 0 0 2 レホヴォト ピー . オー . ボックス 9 5 アット ザ ワイン  
 ツマン インスティテュート オブ サイエンス イェダ リサーチ アンド デベロップメント  
 カンパニー リミテッド内

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA14 BB24 CB01 CB02 CB21 DA14 DA36 DA61  
 FA11 FA16 FA29 FB01 FB02 FB03 FB12 GB01 GB03 GC12  
 GC15  
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR58 QS03 QS25 QS32 QX02  
 4C084 AA17 AA20 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC412  
 4C086 AA01 AA02 BA08 BC28 EA05 EA07 EA11 GA07 MA01 MA02  
 MA04 MA09 NA05 NA14 ZB26 ZC41  
 4C206 AA01 AA02 CA19 CB15 DB20 DB56 HA10 MA01 MA02 MA04  
 MA14 MA28 NA05 NA14 ZB26 ZC41