



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104822390 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 05

(21) 申请号 201380062068. 6

A61K 45/06(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 28

A61K 31/353(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/7048(2006. 01)

61/731, 003 2012. 11. 29 US

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/04(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 05. 28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IL2013/050986 2013. 11. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/083567 EN 2014. 06. 05

(71) 申请人 耶达研究及发展有限公司

地址 以色列霍沃特

(72) 发明人 优素福·亚登 尼尔·本切特里特

(74) 专利代理机构 北京京万通知识产权代理有

限公司 11440

代理人 齐晓静

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书2页 说明书45页

序列表18页 附图18页

(54) 发明名称

预防肿瘤转移、癌症治疗和预后及鉴定为推
定转移抑制剂的试剂的方法

(57) 摘要

提供了一种预防肿瘤转移的方法,条件是所述肿瘤不是神经胶质瘤。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶2(SYNJ2) 抑制剂,从而预防肿瘤转移。同样,提供了一种治疗癌症的方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶2(SYNJ2) 抑制剂和与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂,从而治疗癌症。

1. 一种预防肿瘤转移的方法,条件是所述肿瘤不是神经胶质瘤,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂,从而预防肿瘤转移。

2. 一种用于预防肿瘤转移的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂,条件是所述肿瘤不是神经胶质瘤。

3. 一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂和与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂,从而治疗癌症。

4. 一种突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂和一种与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂,用于治疗癌症。

5. 根据权利要求 3 所述的方法,其中所述的与癌症发作或进展相关的细胞表面受体为受体酪氨酸激酶。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中所述受体酪氨酸激酶为 ErbB 受体。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其中所述 ErbB 受体为表皮生长因子受体 (EGFR)。

8. 一种肿瘤转移的推定抑制剂的鉴定方法,所述方法包括在试验试剂的存在下分析 SYNJ2 介导的 $PI(3,4,5)P_3$ 向 $PI(3,4)P_2$ 的变化,其中在所述试验试剂的所述存在下 $PI(3,4,5)P_3$ 向 $PI(3,4)P_2$ 的变化与所述试验试剂不存在时相比的减少是肿瘤转移的推定抑制剂的指示。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述分析 SYNJ2 介导的 $PI(3,4,5)P_3$ 向 $PI(3,4)P_2$ 的变化通过竞争测定法进行。

10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述竞争测定法由包含与 $PI(3,4)P_2$ 结合的所述 $PI(3,4)P_2$ 结合结构域的复合物来测定 $PI(3,4)P_2$ 结合结构域的位移。

11. 根据权利要求 9-10 中任一项所述的方法,其中所述竞争测定法为荧光偏振竞争测定法。

12. 一种在有需要的受试者中癌症预后的方法,所述方法包括测定受试者癌细胞中 SYNJ2 的水平或活性,其中,与在未受影响的对照样品的细胞中相比,在所述受试者癌细胞中所述 SYNJ2 的所述活性水平的上调是预后不良的指示。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,还包括使用金标法增进所述预后。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述金标法包括标记的检测。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述标记选自由 HER-2 和雌激素受体 (ER) 所组成的组。

16. 根据权利要求 1 或 12 所述的方法,其中所述转移为 EGF 依赖型。

17. 根据权利要求 3 或 12 所述的方法,其中所述癌症为乳腺癌。

18. 根据权利要求 1 或 3 所述的方法,其中所述 SYNJ2 抑制剂选自由小分子、抗体、肽和核酸沉默剂所组成的组。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述小分子选自表 2 中所列的分子。

20. 一种用于治疗癌症或预防癌转移的制品,其包括包装材料,所述包装材料包装有 SYNJ2 抑制剂和与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂。

21. 根据权利要求 3 所述的方法或根据权利要求 20 所述的制品,其中所述的与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂为抗体。

22. 根据权利要求 3 所述的方法或根据权利要求 20 所述的制品,其中所述的与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂为小分子抑制剂。

预防肿瘤转移、癌症治疗和预后及鉴定为推定转移抑制剂的试剂的方法

[0001] 技术领域和发明背景

[0002] 本发明,在其一些实施方案中,涉及预防肿瘤转移、癌症治疗和预后及鉴定为推定转移抑制剂的试剂的方法。

[0003] 细胞运动性支持包括肿瘤转移在内的各种生理和病理过程 (Ridley, 2011)。迁移的开始由肌动蛋白聚合和促使板状伪足和丝状伪足形成的 Rho 家族 GTP 酶驱动。越来越多的证据使得另一类肌动蛋白驱动的突出,称为侵袭伪足牵连于基质降解中 (Murphy 和 Courtneidge, 2011)。为进行转移,乳腺癌游走细胞形成侵袭伪足并渗入附近血管中。旨在表征与乳腺癌细胞向肺部 (Minn 等, 2005) 和脑部 (Bos 等, 2009) 转移相关的基因表达特征的研究鉴定了成为定点转移基础的多组基因。有趣的是,两组均包括表皮生长因子 (EGF) 家族的成员,表明通过共用受体 EGFR 发信号支持转移性传播。

[0004] 胞内运输作为细胞迁移和肿瘤进展的关键特征出现 (Mosesson 等, 2008)。例如,已经证实突变体 p53 通过增强型整联蛋白和取决于 Rab 偶联蛋白 (RCP) 的 EGFR 运输促进转移 (Muller 等, 2010)。随同 Rab 蛋白一起,磷酸肌醇通过确定囊泡同一性在细胞区域化中起关键作用 (Yuan 和 Cantley, 2008)。例如,在 $PI(4, 5)P_2$ (磷脂酰肌醇-4, 5 二磷酸) 的 D3 位置通过磷脂酰肌醇 3- 激酶 (PI3K) 的磷酸化生成侵袭伪足形成所必需的 $PI(3, 4, 5)P_3$ (Yamaguchi 等, 2011)。类似地, $PI(4, 5)P_2$ 调节控制胞吞作用和肌动蛋白动力学特性的多种蛋白质 (Saarikangas 等, 2010), 但是其水平受另外两类酶严格控制: 磷脂酶 C (PLC γ) 促进 $PI(4, 5)P_2$ 水解, 这样激活丝切蛋白 (Cofilin) (一种肌动蛋白切割蛋白) 并且驱动乳腺癌细胞迁移 (van Rheenen 等, 2007)。同样, 肌醇多磷酸 5- 磷酸酶, 例如突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2), 为肌醇环的 D5 位置脱去磷酸并且控制神经胶质瘤细胞迁移 (Chuang 等, 2004; Malecz 等, 2000)。另外在某些前列腺癌样品中鉴定出纯合突变, Rossi 等 Cancer Genet Cytogenet. 2005 年 9 月; 161 (2): 97-103。

发明内容

[0005] 根据本发明一些实施方案的一方面, 提供了一种预防肿瘤转移的方法, 条件是所述肿瘤不是神经胶质瘤, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂, 从而预防肿瘤转移。

[0006] 根据本发明一些实施方案的一方面, 提供了一种治疗癌症的方法, 所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂和与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂, 从而治疗癌症。

[0007] 根据本发明一些实施方案的一方面, 提供了一种用于预防肿瘤转移的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂, 条件是所述肿瘤不是神经胶质瘤。

[0008] 根据本发明一些实施方案的一方面, 提供了一种用于治疗癌症的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂和一种用于治疗癌症与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂。

[0009] 根据本发明的一些实施方案, 与癌症发作或进展相关的细胞表面受体为受体酪氨

酸激酶。

[0010] 根据本发明的一些实施方案,所述受体酪氨酸激酶为 ErbB 受体。

[0011] 根据本发明的一些实施方案,所述 ErbB 受体为表皮生长因子受体 (EGFR)。

[0012] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了一种鉴定肿瘤转移的推定抑制剂的方法,所述方法包括在试验试剂的存在下,分析 SYNJ2 介导的 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工,其中在试验试剂的存在下 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工与试验试剂不存在时相比减少,表明为肿瘤转移的推定抑制剂。

[0013] 根据本发明的一些实施方案,所述分析 SYNJ2 介导的 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工通过竞争测定法进行。

[0014] 根据本发明的一些实施方案,所述竞争测定法测定 PI (3, 4)P₂结合结构域从包含与 PI (3, 4)P₂结合的 PI (3, 4)P₂结合结构域的复合物的位移。

[0015] 根据本发明的一些实施方案,所述竞争测定法为荧光偏振竞争测定法。

[0016] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了一种在有需要的受试者中癌症预后的方法,所述方法包括测定受试者癌细胞中 SYNJ2 的水平或活性,其中在受试者癌细胞中所述 SYNJ2 的活性水平与在未受影响的对照样品的细胞中相比上调,表明预后不良。

[0017] 根据本发明的一些实施方案,所述方法还包括使用金标法增进预后。

[0018] 根据本发明的一些实施方案,所述金标法包括标记的检测。

[0019] 根据本发明的一些实施方案,所述标记选自 HER-2 和雌激素受体 (ER)。

[0020] 根据本发明的一些实施方案,所述转移为 EGF 依赖型。

[0021] 根据本发明的一些实施方案,所述癌症为乳腺癌。

[0022] 根据本发明的一些实施方案,所述 SYNJ2 抑制剂选自小分子、抗体、肽和核酸沉默剂。

[0023] 根据本发明的一些实施方案,所述小分子选自表 2 中所列的分子。

[0024] 根据本发明一些实施方案的一方面,提供了一种用于治疗癌症或预防癌转移的制品,其包括包装 SYNJ2 抑制剂和与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂的包装材料。

[0025] 根据本发明的一些实施方案,与所述癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂为抗体。

[0026] 根据本发明的一些实施方案,与所述癌症发作或进展相关的所述细胞表面受体的所述抑制剂为小分子抑制剂。

[0027] 除非另有定义,本文使用的所有技术和 / 或科学术语具有与本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义。虽然与本文所述相似或等效的方法和材料可用于本发明实施方案的实践或试验中,但下面对示例性方法和 / 或材料进行了描述。如有冲突,以包括定义在内的专利说明书为准。另外,材料、方法和实例仅为说明性而非旨在必定限制。

[0028] 附图简述

[0029] 本文仅以举例的方式,参考附图描述本发明的一些实施方案。现详细地具体参考附图,应强调的是所示细节是举例而言并且是为了说明性讨论本发明的实施方案。在这点上,以附图做出的描述使得本发明的实施方案可如何实践对本领域的技术人员显而易见。

[0030] 图中 :

[0031] 图 1A-I 显示 EGF 促进乳腺细胞的侵袭性生长并诱导了一组特定的基因。图 1A- 在生长因子不存在时接种 MCF10A 细胞并使其形成细胞团。72h 后,用指定生长因子(各 10ng/mL)处理细胞并在 24h 后拍摄相衬图像(比例尺,50 μ m)。图 1B- 按指示,在指定配体(10ng/mL)的存在下,在迁移或侵袭小室内接种 MCF10A 细胞,并且在 18h 后,迁移到下部隔室的细胞经结晶紫染色(左图)。示出了迁移和侵袭信号的量化,归一化为 EGF 处理的效应。数据表示三份生物样品来自重复两次的代表性实验的平均值 $\pm$ S. D. (右图)。图 1C- 在 transwell 插件中将 MCF10A 细胞接种于含 EGF,没有或有抑制剂 AG-1478(1 μ M)、U0126(5 μ M) 或渥曼青霉素(Wortmannin)(200nM)的培养基中,并使其迁移 18h。数据表示三份样品的平均值 $\pm$ S. D.。实验重复两次。图 1D- 人乳腺 MCF10A 细胞中受 EGF(而不是受血清(Amit 等,2007))特异性诱导的一系列 425 个基因与在 MDA-MB-231 细胞转移的情况下上调的基因(1,597 个基因)交叉(Minn 等,2005)。23 个重叠基因中的一个编码 5'- 磷脂酰肌醇脂质磷酸酶突触囊泡磷酸酶-2(SYNJ2)。图 1E- 用编码 LacZ(Ctrl) 或 SYNJ2-GFP(SYNJ2-0X) 的慢病毒粒子感染 MCF10A 细胞。通过免疫印迹法测定内源 SYNJ2 和 SYNJ2-GFP 融合蛋白的表达水平,并通过对微管蛋白的探测确认蛋白质负荷相等。图 1F- 在 EGF 不存在(NT) 或存在(10ng/mL) 时在迁移小室内接种 MCF10A 细胞的 Ctrl 和 SYNJ2-0X 克隆(5×10^4 个细胞 / 孔) 并使其迁移 22h。到达滤器另一侧的迁移细胞经结晶紫染色并拍摄图像。图 1G- 用 siRNA 对照(siCtrl) 或针对 SYNJ2 的 siRNA(siSYNJ2) 转染 MCF10A 细胞,并且在 36h 后通过免疫印迹法测定 SYNJ2 的蛋白质水平。通过对 Ras-GAP 的免疫印迹确认蛋白质负荷相等。图 1H- 在 EGF 不存在(NT) 或存在(10ng/mL) 时在迁移小室内接种 G 中提供的细胞(5×10^4 个细胞 / 孔) 并使其迁移 22h。到达滤器下表面的迁移细胞经结晶紫染色并捕捉图像。图 1I- 用指定 siRNA 处理 MCF10A 细胞的铺满培养物。一旦形成单层,就使其进入监测擦伤闭合速率的自动化擦伤系统。

[0032] 图 2A-E 显示 EGF 对 SYNJ2 的转录诱导促进侵袭性生长。图 2A- 用 EGF(20ng/mL) 或血清(5%) 刺激血清饥饿 MCF10A 细胞,并且使用微阵列或 RT-qPCR 测定 SYNJ2 mRNA 表达。图 2B- 按指示用 EGF 刺激 MCF10A 细胞,提取并做免疫印迹。图 2C- 在 EGF 不存在或存在时,培养感染了编码 GFP-SYNJ2(SYNJ2-0X) 或作为对照(Ctrl) 的 LacZ 的病毒的 MCF10A 细胞 4 天。使用鬼笔环肽和 DAPI 获得相衬图像(上,比例尺:100 μ m) 和共聚焦图像(下,比例尺:20 μ m)。图 2D-E- 在 EGF 不存在(NT) 或存在(10ng/mL) 时在迁移或侵袭小室内培养 MCF10A 细胞($5-6 \times 10^4$ 个细胞 / 孔) 22h。到达滤器底部的细胞染色并且量化滤器的覆盖范围(平均值 $\pm$ S. D.)。

[0033] 图 3A-G 显示乳腺细胞迁移和侵袭伴有 SYNJ2 向前缘的诱导型易位。图 3A- 用编码 LacZ(Ctrl) 或 V5 标记的 SYNJ2(SYNJ2-V5) 的慢病毒粒子,连同对照 shRNA(shCtrl) 或针对 SYNJ2 的 shRNA(shSYNJ2) 一起,感染 MDA-MB-231 细胞。通过免疫印迹法测定 V5-SYNJ2 和内源 SYNJ2 的蛋白质水平。通过对 AKT 的免疫印迹确认蛋白质负荷相等。图 3B- 稳定过表达 SYNJ2 或作为对照的 LacZ 的 MDA-MB-231 细胞的相位图像(左图) 和侵袭图像(右图)。使用侵袭测定法测定侵袭能力,一式三份,并且量化侵袭细胞并归一化为对照(Ctrl)。比例尺,50 μ m。图 3C- 用针对 SYNJ2 的 siRNA 寡聚核苷酸(或 siCtrl) 转染 MDA-MB-231 细胞。36h 后,通过免疫印迹法测定 SYNJ2 的蛋白质水平。通过对 Ras-GAP 的免疫印迹确认蛋白质负荷相等。图 3D- 在迁移或侵袭小室内接种来自 C 的细胞并培养 18h。量化迁移和侵

袭信号并归一化为经 EGF 处理的 siCtrl 细胞。所示数据为三份样品的平均值 $\pm$ S. D.。图 3E- 将瞬时表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞涂到盖玻片上并用 TGF α (10ng/mL) 刺激。(每 10s) 拍摄延时显微照片。倒置所示图像, 黑斑表示 SYNJ2 及其在板状伪足基部的组件。比例尺, 10 μ m。图 3F- 使用 TRITC- 鬼笔环肽对 MDA-MB-231 细胞的内源 SYNJ2 和 F- 肌动蛋白免疫染色。正方形区域放大。比例尺, 10 μ m。图 3G- 用 EGF 刺激 MCF10A 细胞 18h, 然后使用 TRITC- 鬼笔环肽对内源 SYNJ2 免疫染色而 F- 肌动蛋白复染。比例尺, 10 μ m。

[0034] 图 4A-F 显示 SYNJ2 的催化活性对于侵袭性生长必不可少。图 4A-B- 在 5% Matrigel 中接种表达 SYNJ2(SYNJ2-OX) 或针对 SYNJ2 的 shRNA(shSYNJ2) 的 MDA-MB-231 细胞以及对照细胞。6 天后捕捉图像, 并量化侵袭性球体(平均值 $\pm$ S. D.)。比例尺, 50 μ m。图 4C-D- 用野生型 SYNJ2(shSYNJ2+SYNJ2^{WT}) 或用催化失能的突变体(shSYNJ2+SYNJ2^{CD}) 感染表达 shSYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞。按指示提取细胞并做免疫印迹, 或使其在侵袭小室内侵袭 18h。示出了侵袭细胞及其标准量化的图像(平均值 $\pm$ S. D.)。图 4E- 示出了在纤连蛋白上生长的 shCtrl 和 shSYNJ2 细胞的扫描电子显微照片。比例尺, 2 μ m。图 4F- 指定 MDA-MB-231 细胞中经鬼笔环肽和 DAPI 染色的 F- 肌动蛋白的图像。示出了 Z 轴部分(线)和放大区域。箭头标记溶胀结构。比例尺, 10 μ m。

[0035] 图 5A-H 示出了 SYNJ2 的亚细胞定位。图 5A- 用 RFP- 网格蛋白转染表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞并接种于涂有纤连蛋白的板上。使用转盘式显微镜术, 每 5s 为细胞成像。箭头标记新形成的前缘。比例尺, 5 μ m。图 5B- 描绘 SYNJ2 在前缘(上面两行)和细胞体下面装配和分解的代表时帧。对于下面的行而言, 细胞经 mCherry-lifeACT 质粒转染并接种于胶原上。之后, 间隔 1min 为细胞成像。插入箭头以便参考。注意时间尺度的差异。比例尺, 1 μ m。图 5C- 同时通过 TIRF 和落射荧光显微镜术为细胞成像并将信号转换成波动曲线(X 轴)。箭头标记信号起始。比例尺, 5 μ m。图 5D- 在用 Dyngo-4a(30 μ M; 一种发动蛋白-2 抑制剂) 处理前 5min 和处理后 5min, 使用转盘式共聚焦显微镜术为细胞成像。比例尺, 5 μ m。图 5E- 用 Dyngo-4a(30 μ M; 30min) 或用溶剂(DMSO) 预培养稳定表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞。用抗 GFP 抗体(或不用抗体; -Ab) 使细胞裂解物进行免疫沉淀, 然后连同细胞裂解物样品(5%) 一起, 用指定抗体做免疫印迹。图 5F- 将细胞接种于纤连蛋白上, 固定并免疫染色内源 Rac1。比例尺, 10 μ m。图 5G- 在用 NSC-23766(5 μ M) 进行 30min 长的处理前 5min 和处理后 5min, 使用共聚焦显微镜术为细胞成像。图 5H- 用指定 siRNA 寡聚核苷酸处理 MDA-MB-231 细胞。为细胞提取物的 SYNJ2 和 Ras-GAP 做印迹。使用基于 ELISA 的测定法测定 GTP-Rac1 水平(细胞骨架)。

[0036] 图 6A-D 显示 SYNJ2 向前缘的定位与小窝蛋白分布不同并且取决于 F- 肌动蛋白、胆固醇和 PI3K。图 6A- 随时间推移同时为表达 GFP-SYNJ2 和共表达 RFP-Cav1 的 MDA-MB-231 细胞成像, 并将信号转换成波动曲线(X 和 Y 轴)。注意 SYNJ2 组件的瞬时性质和小窝蛋白 1 的稳定外观。比例尺, 5 μ m。图 6B- 左图描绘了如图 5A 中成像(间隔 5s, 单平面、转盘式共聚焦) 的 150 种随机选择的 SYNJ2 组件的分布(相对于寿命的小窝%)。右图描绘了显示 55s 寿命的组件的平均($\pm$ SEM) 相对强度。图 6C- 用 M β CD(10mM, 15min) 或渥曼青霉素(500nM, 15min) 处理稳定表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞。在处理之前或之后每 6s 捕捉所选相同细胞的图像, 并将信号转换成波动曲线(表示左图中的正方形插图)。比例尺, 20 μ m。图 6D- 用拉春库林 B(Latrunculin B)(1 μ M, 15min) 处理稳定共表达 GFP-SYNJ2 和

lifeACT-mCherry 的 MDA-MB-231 细胞。在处理之前或之后获取图像。比例尺, 5 μ m。

[0037] 图 7A-E 显示 SYNJ2 损耗使 EGFR 留在细胞内囊泡中。图 7A- 接种于含 EGF 的培养基中 3 天后, 提取稳定表达 shRNA 对照 (shCtrl) 或对 SYNJ2 有特异性的 shRNA (shSYNJ2) 的 MCF10A 细胞。探测 SYNJ2、EGFR、EGFR 磷酸化酪氨酸 1068 (pEGFR)、磷酸化 ERK (pERK) 和作为上样对照的 Ras-GAP 的免疫印迹。图 7B- 在 EGF 的存在下, 用 siRNA 对照或针对 SYNJ2 的 siRNA 转染 MCF10A 细胞。使用 EGFR 和 SYNJ2 抗体进行共聚焦免疫荧光分析。注意仅 SYNJ2 缺乏型细胞 (星号) 显示出 EGFR 运输缺陷。比例尺, 10 μ m。图 7C- 为 MDA-MB-231 细胞的三种衍生细胞的 EGFR 免疫染色而 DAPI 和 F- 肌动蛋白复染: (i) 其中 SYNJ2 敲减的细胞 (shSYNJ2; 左边一列), (ii) 通过与催化非活性形式相对应的慢病毒基因转移感染的相同细胞 (shSYNJ2+SYNJ2^{CD}; 中间一列), 和 (iii) 其中 SYNJ2 敲减并通过感染引入野生型形式的细胞 (shSYNJ2+SYNJ2^{WT}; 右边一列)。比例尺, 20 μ m。图 7D- 泛素化 EGFR 水平 (密度测定法)。图 7E- 用 488-Tfn 刺激 MDA-MB-231 衍生细胞 (5min, 10 μ g/mL)。将细胞于冰上固定, 经酸洗并分析信号强度。

[0038] 图 8A-I 显示 SYNJ2 调节 EGFR 运输和趋化性。图 8A- 按指示, 为用指定 siRNA 转染的 MDA-MB-231 细胞的全部提取物做免疫印迹。图 8B- 指定 MDA-MB-231 亚克隆的表面 EGFR 的 FACS (左) 和 ¹²⁵I-EGF 结合 (右; 一式三份) 分析。图 8C- 使 shCtrl 和 shSYNJ2 细胞在纤连蛋白上生长并对 EGFR 和 F- 肌动蛋白免疫染色。比例尺, 20 μ m。图 8D- 暴露于 EGF 梯度后, 在趋化小室内迁移的 shCtrl 和 shSYNJ2 MDA-MB-231 细胞的轨迹玫瑰图。红色轨迹指细胞向 EGF 迁移。图 8E- 用 EGF (10ng/mL) 处理饥饿 MDA-MB-231 衍生细胞并且按指示将细胞裂解物进行免疫沉淀和免疫印迹。图 8F- 与 C 中一样, 培养细胞并对活性 EGFR (pY1045) 和 F- 肌动蛋白免疫染色。比例尺, 10 μ m。图 8G- 用 EGF (10ng/mL) 处理指定 MDA-MB-231 衍生细胞 5h 并且按指示为提取物做免疫印迹。图 8H- 将指定 MDA-MB-231 衍生细胞暴露于 Alexa Fluor 488-Tfn (25 μ g/mL; 5min), 酸洗以去除表面结合的配体, 并以指定时间间隔拍摄图像。示出了归一化荧光信号。比例尺, 10 μ m。图 8I- 用 Alexa Fluor 488-EGF (20 μ g/mL; 10min) 刺激经 siCtrl 或 siSYNJ2 预处理的 MDA-MB-231 细胞, 酸洗, 在 37°C 下培养指定时间间隔并通过 FACS 分析。

[0039] 图 9A-D 显示 SYNJ2 对于囊泡运输和粘着斑形成是必需的。图 9A- 固定 MDA-MB-231 衍生细胞 (shCtrl 和 shSYNJ2) 并对 EEA1、F- 肌动蛋白和细胞核 (DAPI) 染色。比例尺, 10 μ m。图 9B- 为 MDA-MB-231 衍生细胞, 即 shCtrl 和 shSYNJ2 细胞探测整联蛋白 β -1、F- 肌动蛋白和 DAPI (比例尺, 20 μ m)。图 9C- 用 siCtrl 和 siSYNJ2 处理 MDA-MB-231 细胞 48h, 然后对整联蛋白 β -1 和磷酸化 EGFR 免疫染色。图 9D- MDA-MB-231 衍生细胞的桩蛋白、细胞核 (DAPI) 和 F- 肌动蛋白的免疫荧光分析 (使用 TRITC- 鬼笔环肽)。在胞质区内相对于粘着斑量化桩蛋白信号, 并且还量化了每个细胞粘着斑的数量。另外, 通过测定与完整圆的偏差 (偏心率) 量化粘着斑的形状。

[0040] 图 10A-F 显示 SYNJ2 损耗扰乱了磷酸肌醇体内平衡, 使初级内体充气并分解粘着斑。图 10A- 用 GFP-Rab4 质粒转染表达 shCtrl 或 shSYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞并且在 48h 后固定细胞并使用 TRITC- 鬼笔环肽对 F- 肌动蛋白复染。图 10B- 对 MDA-MB-231 衍生细胞的 Rab5、F- 肌动蛋白和细胞核 (DAPI) 免疫染色。量化图像中 Rab5 阳性囊泡的尺寸和数量以及平均细胞面积。比例尺, 10 μ m。图 10C- 通过色谱法分离从 ³H- 磷酸酰肌醇标记的

MDA-MB-231 细胞衍生细胞中提取的磷酸肌醇并且在 3 次不同实验中测定其水平（信号归一化为 shCtrl 细胞）。图 10D- 探测 shCtrl 和 shSYNJ2 MDA-MB-231 细胞的 pY1068-EGFR、桩蛋白和 - 肌动蛋白（共定位信号为白色）。比例尺, 10 μ m。图 10E- 接种 shCtrl 和 shSYNJ2 MDA-MB-231 细胞。20min 后去除独立细胞并且为贴壁细胞成像并量化其表面积。图 10F- 在 RTCA E 板上接种稳定表达 shCtrl 或 shSYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞并且间隔 5s 记录实时阻抗测量 80min, 然后间隔 10min 再记录 80min。示出了 2 次重复的平均值 ($\pm$ S.D.)。

[0041] 图 11A-G 显示 SYNJ2 调节蛋白酶分泌和侵袭伪足装配。图 11A- 在 Matrigel 中培养 shCtrl 和 shSYNJ2 MDA-MB-231 细胞 5 天, 固定并对 MMP-9 免疫染色。将信号强度转换成热图并根据与菌落核心的距离绘图。箭头标记球体边界。比例尺, 50 μ m。图 11B- 使用明胶酶谱法分析来自对照 MDA-MB-231 细胞和稳定表达 SYNJ2 的细胞的上清液的 MMP-2 和 MMP-9 活性, 一式三份。图 11C- 将稳定表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞涂到预先涂有交联荧光明胶的盖玻片上。3h 后, 探测细胞的 GFP 和 F- 肌动蛋白, 并检测侵袭伪足结构（箭头）。比例尺, 10 μ m。图 11D- 将过表达 SYNJ2 (SYNJ2-OX) 的 MDA-MB-231 细胞以及经 siCtrl 或 siSYNJ2 寡聚核苷酸预处理的细胞涂到预先涂有交联荧光明胶的盖玻片上并且在 3 次独立实验中量化侵袭伪足结构。图 11E- 通过明胶降解, 以及通过对 F- 肌动蛋白或 TKS5 染色检测经指定 siRNA 处理的 MDA-MB-231 细胞的侵袭伪足结构。箭头 (Z 轴图像) 标记侵袭伪足。比例尺, 10 μ m。图 11F- 将表达 siCtrl 或 siSYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞涂到涂有明胶的盖玻片上并且与 C 中一样使用鬼笔环肽和 EGFR 磷酸化形式（酪氨酸 1068）的抗体加工。比例尺, 10 μ m。图 11G- 使用基于 ELISA 的测定法检查用指定 MDA-MB-231 衍生细胞调节 3 天的培养基的 EGF 样配体。

[0042] 图 12A-G 显示 SYNJ2 调节基质降解和侵袭伪足装配。图 12A- 接种经指定 siRNA 处理的 MDA-MB-231 细胞, 培养 3 天并且使用明胶 (0.1%) 包埋凝胶经电泳分离其条件培养基, 接着蛋白质染色以量化 MMP-2 和 MMP-9 蛋白水解活性。图 12B- 使用稳定表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞的 GFP 偶联珠粒和澄清提取物进行的免疫共沉淀分析。图 12C- 用 RFP- 皮动蛋白质粒转染稳定表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞并接种于胶原板上。48h 后进行活细胞图像分析, 并且捕捉外围和中央细胞区域的代表性快照图像。比例尺, 5 μ m。图 12D- 用编码 Tapp1 (一种 PI (3, 4)P₂ 结合剂) 的经 Myc 标记的 PH 结构域的质粒转染 MDA-MB-231 细胞的指定衍生细胞并且在 48h 后, 将其接种在涂有明胶的表面。使用共聚焦显微镜术目测 F- 肌动蛋白、聚集的 TKS5 和 PI (3, 4)P₂ (Tapp1) 的共同分布并且量化。比例尺, 10 μ m。

[0043] 图 12E- 将表达 siCtrl 或 siSYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞接种到涂有 FITC- 明胶的盖玻片上并培养 3h。然后固定细胞并对 CD44 免疫染色, 并且用 TRITC- 鬼笔环肽对 F- 肌动蛋白复染。使用荧光显微镜术目测细胞, 并且在 FITC- 明胶基质中通过观察孔检测侵袭伪足。加框区域放大。比例尺, 10 μ m。图 12F- CD44 的抗体用于 shCtrl 和 shSYNJ2 细胞表面表达的 FACS 分析。指出了与加框区域相对应的细胞的分分数。图 12G- 将用 siCtrl 或 siSYNJ2 预处理的 MDA-MB-231 细胞接种到涂有 FITC- 明胶的盖玻片上并培养 3h。然后固定细胞并对 MT1-MMP 免疫染色, 并且用 TRITC- 鬼笔环肽对 F- 肌动蛋白复染。比例尺, 10 μ m。

[0044] 图 13A-H 显示 SYNJ2 的酶活性驱使乳腺肿瘤细胞转移扩散。图 13A- 在雌性 SCID 小鼠（每组 10-11 只）的脂肪垫上植入表达 RFP 的 MDA-MB-231 细胞的指定衍生细胞 (2×10^6

个/只小鼠)。移植 2 和 6 周后测量肿瘤大小(平均值 $\pm$ S.D.)。图 13B-C 示出了移植 6 周后在腋窝和远侧淋巴结(图 13B)或肺部(图 13C)中出现的转移。星号标记 p 值: $* < 0.05$, $** < 0.01$ 和 $*** < 0.001$ 。图 13D-F 与 A 中一样,在动物体内植入过表达对照(LacZ)和 SYNJ2(SYNJ2-0X)、经 RFP 标记的 MDA-MB-231 细胞并且在移植 6 和 8 周后量化肿瘤大小(图 13D)以及向淋巴结(图 13E)和肺部(图 13F)的转移。图 G-H 经静脉(1.5×10^5 个/只小鼠;尾静脉)或在 5 周龄雌性 SCID 小鼠的乳腺脂肪垫内(2.5×10^6 个/只小鼠),注射指定 MDA-MB-231-RFP 衍生细胞。4 周后,检查来自经静脉注射的小鼠的肺部的 RFP 信号(左侧和中间的图)。4 周后从脂肪垫处理组收集外周血。按 ficol 梯度纯化样品并且每 1×10^6 个 FACS 读数为 RFP 阳性循环肿瘤细胞的数量评分并归一化为肿瘤重量。

[0045] 图 14 为局部和远侧淋巴结转移的活体成像。接种了 MDA-MB-231-RFP 细胞并于 6 周后分析的小鼠体内局部(同侧)和远侧(对侧)淋巴结转移的代表性图像(见图 13B)。成像之前,麻醉小鼠并去除其毛皮以便目测和量化淋巴结内的转移。

[0046] 图 15 是描绘 SYNJ2 在细胞迁移和侵袭中的综合作用的工作模型。载 EGFR 的再循环核内体将活性受体定位在腹侧膜处,并且在这之后局部激活 PI3K。PI3K 对膜 PI(4,5) P_2 的磷酸化生成 PI(3,4,5) P_3 , PI(3,4,5) P_3 经 SYNJ2 脱去磷酸成为 PI(3,4) P_2 。后者募集 TKS5, 这样锚定皮动蛋白并对肌动蛋白聚合起核心作用。同时,SYNJ2 控制粘着分子如 CD44 和蛋白酶如 MT1-MMP 的递送,以降解细胞外基质(ECM)并建立新的侵袭结构,侵袭伪足。以类似方式,EGFR 向细胞外周的递送导致 PI(4,5) P_2 受 SYNJ2(和磷脂酶 C)分解,这样局部激活了发动蛋白和肌动蛋白切割酶如丝切蛋白以溶解皮层肌动蛋白纤维并引发肌动蛋白填充的、富含整联蛋白的突出,称为板状伪足。水平箭头标记细胞迁移的方向。质膜的彩色编码部分指特定 PI 磷脂。

[0047] 图 16A-C 显示 SYNJ2 在侵蚀性乳腺肿瘤中高度表达。图 16A- 根据 SYNJ2 丰度(高、中和低),使用免疫组织化学和组织微阵列为 331 例侵袭性乳腺癌分层。根据临床亚型提出肿瘤的相对分数。图 16B- 展示在细胞腔情况下(星号标记作为对照的内皮细胞的表达)及在基底样和 HER2 过表达乳腺肿瘤中观察到的强度和模式(右侧一列放大)的 SYNJ2 染色的代表性图像。图 16C- 根据 286 名(左侧;GSE2034)或 99 名(右侧;GSE19783)乳腺癌患者组群中的 SYNJ2 mRNA 表达分层的 Kaplan-Meier 曲线。

[0048] 图 17A-B 示出了用于测量 SYNJ2 的 5'-磷酸酶活性的荧光偏振测定法的原理。图 17A 是展示未结合 PI(3,4) P_2 荧光探针产生低偏振读数,而结合 PI(3,4) P_2 荧光探针使偏振读数增大的一般原理的示意图。图 17B 是显示通过偏振度(mP)测量的 SYNJ2 5'-磷酸酶活性检测的代表性柱状图。

[0049] 图 18 描绘了克隆到 pET28 质粒中并且在大肠杆菌(E. coli)中表达的 Flag-TAPP1 PH 结构域-His 的氨基酸和核酸序列(分别为 SEQ ID NO:13 和 14)。TAPP1-PH 结构域标记为黄色。

具体实施方式

[0050] 本发明,在其一些实施方案中,涉及预防肿瘤转移、癌症治疗和预后及鉴定为推定转移抑制剂的试剂的方法。

[0051] 详细解释本发明的至少一个实施方案之前,应理解本发明在其应用上不一定限于

以下描述中提出或实施例中举例说明的详情。本发明能够有其它实施方案或能够以各种方式实践或实施。

[0052] 生长因子驱使细胞迁移和转移,但根本机制未完全了解。

[0053] 本发明现已鉴定突触囊泡磷酸酶-2 (SYNJ2) 为调节体外侵袭伪足和板状伪足和体内癌转移中的主要模块。

[0054] 如下文和之后的实施例部分所述,本发明人在动物和患者样本中证实了其在体外的发现。具体地,采用经 EGF 刺激的乳腺细胞,本发明人将脂质磷酸酶突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 与侵袭性表现型联系起来,并且将高 SYNJ2 于癌症患者的短期存活率关联起来。SYNJ2 的敲减稳健地削弱了动物模型中乳腺肿瘤细胞的转移。在体外,SYNJ2 缺乏型细胞表现出 EGFR 和整联蛋白脱轨运输,导致粘着斑变形、板状伪足受阻和侵袭伪足消失。不受理论约束,表明活性 EGFR 的再循环局部促进 SYNJ2 介导的特定磷酸肌醇脂质脱磷酸,从而促使侵袭伪足和板状伪足形成并促进肿瘤进展 (见图 15)。

[0055] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种预防肿瘤转移的方法,条件是所述肿瘤不是神经胶质瘤,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂,从而预防肿瘤转移。

[0056] 如本文所使用,术语“肿瘤转移”指从其首发位置扩散到身体其它部位的恶性肿瘤,例如转移到肺部的乳腺癌。

[0057] 如本文所使用,术语“癌症”和“肿瘤”可交换使用。该术语指异常且不受控制的细胞分裂引起的恶性生长或肿瘤。

[0058] 如本文所使用,术语“预防”指阻止、中断、抑制转移过程或进展和后续转移。

[0059] 根据另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的突触囊泡磷酸酶 2 (SYNJ2) 抑制剂和与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂,从而治疗癌症。

[0060] 如本文所使用,术语“治疗”包括消除、大体上抑制、减缓或逆转病状的进展,大体上改善病状的临床或审美症状,或大体上预防病状的临床或审美症状出现。

[0061] 可根据本发明的一些实施方案治疗 (或预后) 的癌症的非限制性实例包括任何实体或非实体癌和 / 或癌转移,包括但不限于胃肠道肿瘤 (结肠癌、直肠癌、结直肠癌瘤、结直肠癌、结直肠腺瘤、1 型遗传性非息肉病、2 型遗传性非息肉病、3 型遗传性非息肉病、6 型遗传性非息肉病、结直肠癌、7 型遗传性非息肉病、小肠和 / 或大肠癌瘤、食道癌、伴有食道癌的胛胝症、胃癌、胰腺癌、胰腺内分泌肿瘤)、子宫内膜癌、隆凸性皮肤纤维肉瘤、胆囊癌、胆道肿瘤、前列腺癌、前列腺腺瘤、肾癌 (例如,2 型或 1 型维尔姆斯氏瘤 (Wilms' tumor))、肝癌 (例如,肝胚细胞瘤、肝细胞癌瘤、肝细胞癌)、膀胱癌、胚胎性横纹肌肉瘤、胚细胞瘤、滋养细胞瘤、睾丸生殖细胞瘤、卵巢未成熟畸胎瘤、子宫、卵巢上皮性、骶尾瘤、绒毛膜癌、胎盘部位滋养细胞瘤、成人上皮细胞瘤、卵巢癌、浆液性卵巢癌、卵巢性索肿瘤、宫颈癌、子宫颈瘤、小细胞和非小细胞肺癌、鼻咽、乳腺癌 (例如,乳腺导管癌、乳腺浸润性导管癌、散发性乳腺癌、乳腺癌敏感性、4 型乳腺癌、乳腺癌 -1、乳腺癌 -3、乳腺 - 卵巢癌)、鳞状细胞癌 (例如,在头颈部)、神经源性肿瘤、星形细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、成神经细胞瘤、淋巴瘤 (例如,霍奇金病 (Hodgkin's disease)、非霍奇金淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)、B 细胞瘤、伯基特淋巴瘤 (Burkitt)、皮肤 T 细胞瘤、组织细胞瘤、淋巴细胞瘤、T 细胞瘤、胸

腺肿瘤)、神经胶质瘤、腺癌、肾上腺瘤、遗传性肾上腺皮质癌、脑部恶性(肿瘤)、各种其它癌(例如,支气管原大细胞癌、导管癌、Ehrlich-Letter 腹水、表皮样癌、大细胞癌、Lewis 肺癌、髓样癌、粘膜表皮样瘤、燕麦细胞癌、小细胞癌、梭形细胞癌、棘细胞癌、移行细胞癌、未分化癌、癌肉瘤、绒毛膜癌、囊腺癌)、室管膜母细胞瘤、上皮瘤、红白血病(例如,弗兰德红白血病(Friend)、淋巴母细胞红白血病)、纤维肉瘤、巨细胞瘤、胶质瘤、成胶质细胞瘤(例如,多形性、星形细胞瘤)、神经胶质瘤、肝细胞瘤、异种杂交瘤、杂交骨髓瘤、组织细胞瘤、杂交瘤(例如,B细胞)、肾上腺样瘤、胰岛瘤、岛细胞瘤、角质瘤、成平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、白血病(例如,急性淋巴细胞白血病、急性淋巴母细胞白血病、急性淋巴母细胞性前B细胞白血病、急性淋巴母细胞性T细胞白血病、急性成巨核细胞白血病、单核细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓性白血病、伴有嗜酸粒细胞增多的急性髓性白血病、B细胞性白血病、嗜碱细胞性白血病、慢性髓性白血病、慢性白血病、B细胞性白血病、嗜酸细胞性白血病、弗兰德白血病(Friend)、粒细胞或髓细胞性白血病、毛细胞白血病、淋巴细胞性白血病、巨核细胞白血病、单核细胞白血病、单核-巨噬细胞白血病、成髓细胞性白血病、骨髓性白血病、慢性骨髓单核细胞性白血病、浆细胞白血病、前B细胞白血病、前髓细胞性白血病、亚急性、T细胞、淋巴瘤、髓系恶性肿瘤素因、急性非淋巴细胞性白血病)、淋巴瘤、黑素瘤、乳腺肿瘤、肥大细胞瘤、成神经管细胞瘤、间皮瘤、转移瘤、单核细胞瘤、多发性骨髓瘤、骨髓发育异常综合征、骨髓瘤、肾母细胞瘤、神经组织胶质瘤、神经组织神经元肿瘤、神经鞘瘤、成神经细胞瘤、少突神经胶质瘤、骨软骨瘤、骨骨髓瘤、骨肉瘤(例如,尤文氏肉瘤(Ewing's))、乳头状瘤、移行细胞瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤(侵袭型)、浆细胞瘤、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤(例如,尤文氏肉瘤、组织细胞肉瘤、延森氏肉瘤(Jensen)、骨原性肉瘤、网状细胞肉瘤)、神经鞘瘤、皮下瘤、畸胎瘤(例如,多能畸胎瘤)、畸胎瘤、睾丸瘤、胸腺瘤和毛发上皮瘤、胃癌、纤维肉瘤、多形性成胶质细胞瘤;多发性血管球瘤、李-佛美尼综合征(Li-Fraumeni syndrome)、脂肪肉瘤、Lynch 癌家族综合征 II、男性生殖细胞肿瘤、肥大细胞白血病、甲状腺髓样癌、多发性脑膜瘤、内分泌瘤病粘液肉瘤、副神经节瘤、家族性嗜铬瘤、毛母质瘤、乳头瘤、家族性和分散性、横纹肌样瘤易感综合征、家族性、横纹肌样瘤、软组织肉瘤和伴有成胶质细胞瘤的 Turcot 综合征。

[0062] 根据一特定实施方案,所述癌症为乳腺癌。

[0063] 根据一特定实施方案,所述癌症(或癌转移)为受 EGF 调节。

[0064] 根据另一优选实施方案,所述癌症的特征在于 ErbB 受体分子例如 EGFR 或 HER2 过表达或上调。

[0065] 已经将导致 EGFR 过表达(称为上调)或过度活性的突变与许多癌症,包括肺癌、肛门癌和多形性成胶质细胞瘤相联系起来。在后一种情况下,常常观察到 EGFR 或多或少的特异性突变,称为 EGFRvIII。在所有上皮癌的约 30% 中牵涉到 EGFR 或家族成员的突变、扩增或误调节。

[0066] 牵涉 EGFR 的突变可导致其不断活化,这样可导致细胞分裂不受控制-癌症素因。相反,已经在几个类型的癌症中鉴定出 EGFR 的突变,并且是一类不断扩大的抗癌疗法的目标 [Zhang 2007 J. Clin. Invest. 117(8):2051-8]。

[0067] 在约 30% 的乳腺癌中出现 ERBB2 基因扩增或过表达。与疾病复发增加和预后较差有极大关联。还了解到在卵巢癌、胃癌和侵蚀形式的子宫癌,例如浆液性子宫内膜癌中出现

过表达。

[0068] 下面是癌症列表,其中涉及了受体酪氨酸激酶 ErbB 家族的成员。

[0069] ErbB-1- 肾上腺皮质癌、胆管癌、宫颈癌、结直肠癌、食道癌、胆囊癌、胃癌、成胶质细胞瘤、头颈癌、肺癌(非小细胞、鳞状细胞癌、腺癌和大细胞肺癌)、胰腺癌、唾液腺癌、腹泻、良性赘生物、浸润性癌、皮肤病、导管原位癌、甲沟炎。

[0070] ErbB-2- 胆管癌、膀胱癌、乳腺癌、胆管细胞癌、食道癌、胆囊癌、胃癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、胰腺癌、唾液腺癌。根据一特定实施方案,所述癌症为乳腺癌或胃癌。

[0071] ErbB-3- 乳腺癌、肺癌和病毒性白血病。

[0072] ErbB-4- 乳腺癌、病毒性白血病、髓母细胞瘤、肺癌和乳腺肿瘤。

[0073] 如本文所使用,术语“受试者”指已经诊断患有癌症的哺乳动物(例如,人)。

[0074] 如本文所使用,突触囊泡磷酸酶-2 或 SYNJ2 指突触肌醇-1,4,5-三磷酸 5-磷酸酶 2, EC 3.1.3.36。突触囊泡磷酸酶-2 为泛表达磷酸肌醇 5-磷酸酶(SEQ ID NO:1 和 2 分别指多聚核苷酸和编码的多肽)。

[0075] 如本文所使用,短语“突触囊泡磷酸酶 2(SYNJ2)抑制剂”指降低或下调 SYNJ2 的表达或活性的分子。

[0076] 下调可超过 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或完全抑制(通过给定测定法,例如下文所述测定法测定活性或表达 100%损失)。

[0077] 下调 SYNJ2 的表达可如下文所述在 DNA、RNA 或蛋白质水平上实现。SYNJ2 活性指其催化活性[作为磷酸酶,将 $PI(3,4,5)P_3$ 转化为 $PI(3,4)P_2$]、其信号活性(与发动蛋白、皮动蛋白相互作用,见图 5E-H)或细胞定位。在后一种情况下,SYNJ2 抑制剂将改变蛋白质的细胞定位。

[0078] 因此,可在基因组和/或转录产物水平上使用敲入所述基因或干扰其转录和/或翻译的各种分子[例如,核酸沉默剂例如核酸(RNA)沉默剂(例如反义、siRNA、shRNA、微 RNA、核酶和 DNA 酶)],或在蛋白质水平上使用例如拮抗剂、裂解多肽的酶等实现 SYNJ2 的下调。

[0079] 以下是一系列能够下调 SYNJ2 的表达水平和/或活性的试剂。

[0080] 能够下调 SYNJ2 的试剂的一个实例为能够特异性结合 SYNJ2 的抗体或抗体片段。优选地,所述抗体特异性结合 SYNJ2 的至少一个表位。当 SYNJ2 为细胞蛋白时,采取措施将抗体引入细胞内。如本文所使用,术语“表位”指抗体结合部位在抗原上结合的任何抗原决定簇。

[0081] 表位决定簇通常由分子化学活性表面分组,例如氨基酸或碳水化合物侧链组成并且通常具有特定三维结构特征以及特定电荷特征。

[0082] 如本发明中所使用,术语“抗体”包括完整分子及其能够与巨噬细胞结合的功能片段,例如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv。这些功能性抗体片段定义如下:(1)Fab,可通过用木瓜蛋白酶消化全抗体得到完整轻链和一条重链的一部分生成的含抗体分子的单价抗原结合片段的片段;(2)Fab',可通过用胃蛋白酶处理全抗体,接着还原得到完整轻链和重链的一部分获得的抗体分子片段;每个抗体分子获得两个 Fab' 片段;(3)(Fab')₂,可通过用胃蛋白酶处理全抗体,无需后续还原得到的抗体片段;F(ab')₂ 是通过两个二硫键结合在一起的两个 Fab' 片段的二聚体;(4)Fv,定义为含表示成两条链的轻链可变区和重链可变区的基因工

程化片段；和 (5) 单链抗体 (“SCA”), 含有轻链可变区和重链可变区, 通过适合多肽接头连接成基因融合单链分子的基因工程化分子。

[0083] 生产多克隆和单克隆抗体及其片段的方法在本领域众所周知 (见例如, Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988, 其以引用的方式并入本文)。

[0084] 根据本发明一些实施方案所述的抗体片段可通过抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞 (例如中国仓鼠卵巢细胞培养物或其它蛋白表达系统) 中表达编码所述片段的 DNA 制备。可用传统方法通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化全抗体获得抗体片段。例如, 可通过用胃蛋白酶酶促裂解抗体生成抗体片段以提供 5S 片段表示的 F(ab')₂。可使用硫醇还原剂, 和任选地由二硫键裂解产生的巯基的封端基团进一步裂解该片段, 以生成 3.5S Fab' 单价片段。可选地, 使用胃蛋白酶酶促裂解直接生成两个单价 Fab' 片段和一个 Fc 片段。例如, Goldenberg, 美国专利第 4,036,945 号和第 4,331,647 号及其中所含参考文献中描述了这些方法, 所述专利特此以引用的方式整体并入。同样见 Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73:119-126(1959)]。也可使用其它裂解抗体的方法, 例如分离重链形成单价轻链-重链片段, 进一步裂解片段或其它酶促、化学或基因技术, 只要所述片段与完整抗体所识别的抗原结合。

[0085] Fv 片段包含 VH 和 VL 链的缔合。这种缔合可为非共价, 如 Inbar 等 [*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659-62(1972)] 所述。可选地, 可变链可通过分子间二硫键连接或通过化学物质例如戊二醛交联。优选地, Fv 片段包含通过肽接头连接的 VH 和 VL 链。通过构建包含通过寡聚核苷酸连接的编码 VH 和 VL 结构域的 DNA 序列的结构基因制备这些单链抗原结合蛋白 (sFv)。将结构基因插入表达载体中, 随后将表达载体引入宿主细胞例如大肠杆菌。重组宿主细胞合成带有桥接两个 V 结构域的接头肽的多肽链。例如, [Whitlow 和 Filpula, *Methods* 2:97-105(1991); Bird 等, *Science* 242:423-426(1988); Pack 等, *Bio/Technology* 11:1271-77(1993); 和美国专利第 4,946,778 号描述了生成 sFv 的方法, 其特此以引用的方式整体并入。

[0086] 抗体的另一种形式是编码单个互补决定区 (CDR) 的肽。可通过构建编码目标抗体的 CDR 的基因获得 CDR 肽 (“最小识别单位”)。例如, 通过使用聚合酶链式反应制备此类基因, 以由抗体生成细胞的 RNA 合成可变区。见, 例如, Larrick 和 Fry [*Methods*, 2:106-10(1991)]。

[0087] 抗 SYNJ2 市场上可买到。抗人 SYNJ2 单克隆抗体的供应商实例包括但不限于 Amsbio、Atlas Antibodies、AbD Serotec、United States Biological、antibodies-online.com、Genway、Proteintech Group 等。致使本发明的抗体为非免疫原性, 以供治疗应用。

[0088] 非人 (例如, 鼠) 抗体的人源化形式为含有源自非人类免疫球蛋白的最小序列的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段 (例如 Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合子序列) 的嵌合分子。人源化抗体包括人免疫球蛋白 (受者抗体), 其中形成受者互补决定区 (CDR) 的残基由形成非人类物种 (供体抗体), 例如小鼠、大鼠或兔的具有所需特异性、亲和力和容量的 CDR 的残基置换。在一些情况下, 人免疫球蛋白的 Fv 骨架残基由相应的非人类残基置换。人源化抗体可能还包含在受者抗体或导入的 CDR 或骨

架序列中都不存在的残基。一般而言,人源化抗体将大体上包含至少一个并且通常两个可变结构域的全部,其中所有或大体上所有的 CDR 区与非人类免疫球蛋白的 CDR 区相对应并且所有或大体上所有的 FR 区为人免疫球蛋白共有序列的 FR 区。人源化抗体最好还将包含免疫球蛋白恒定区 (Fc),通常为人免疫球蛋白恒定区的至少一部分 [Jones 等, *Nature*, 321:522-525(1986) ;Riechmann 等, *Nature*, 332:323-329(1988) ;和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596(1992)]。

[0089] 人源化非人抗体的方法在本领域众所周知。通常,人源化抗体具有一个或多个从非人类来源引入其中的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基常常称为导入残基,其通常从导入可变结构域获得。基本上可按照 Winter 和同事的方法 [Jones 等, *Nature*, 321:522-525(1986) ;Riechmann 等, *Nature* 332:323-327(1988) ;Verhoeyen 等, *Science*, 239:1534-1536(1988)],通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列取代人抗体的相应序列进行人源化。相应地,此类人源化抗体为嵌合抗体(美国专利第 4,816,567 号),其中已经用来自非人类物种的相应序列取代了大体上不大完整的人可变结构域。在实践中,人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基和可能一些 FR 残基由来自啮齿动物抗体中类似位点的残基取代的人抗体。

[0090] 也可使用本领域已知的各种技术,包括噬菌体展示库生成抗体 [Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991) ;Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991)]。Cole 等和 Boerner 等的技术也可用于制备人单克隆抗体 (Cole 等, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 页 (1985) 和 Boerner 等, *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991)]。类似地,可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如内源免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的小鼠体内,制成人抗体。激发后,观察到人抗体生成,这在各个方面,包括基因重排、装配和抗体谱,这都非常类似于在人类中所见。例如,在美国专利第 5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、5,661,016 号和下列科技出版物: Marks 等, *Bio/Technology* 10, :779-783(1992) ; Lonberg 等, *Nature* 368:856-859(1994) ;Morrison, *Nature* 368 812-13(1994) ;Fishwild 等, *Nature Biotechnology* 14,845-51(1996) ;Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996) ;和 Lonberg 和 Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13,65-93(1995)。中描述了这种方法。

[0091] 也可通过 RNA 沉默实现 SYNJ2 的下调。如本文所使用,短语“RNA 沉默”指由导致相应的蛋白质编码基因的表达抑制或“沉默”的 RNA 分子介导的一组调控机制 [例如, RNA 干扰 (RNAi)、转录基因沉默 (TGS)、转录后基因沉默 (PTGS)、压制、共抑制和翻译阻遏]。已经在许多类型的生物,包括植物、动物和真菌中观察到 RNA 沉默。

[0092] 如本文所使用,术语“RNA 沉默剂”指能够特异性抑制或“沉默”靶基因的表达的 RNA。在某些实施方案中, RNA 沉默剂能够通过转录后沉默机制防止 mRNA 分子完全加工(例如,全部翻译和 / 或表达)。RNA 沉默剂包括非编码 RNA 分子,例如包含配对链的 RNA 双链体,以及可由其生成如此小的非编码 RNA 的前体 RNA。示例性 RNA 沉默剂包括 dsRNA 例如 siRNA、miRNA 和 shRNA。在一个实施方案中, RNA 沉默剂能够诱导 RNA 干扰。在另一实施方案中, RNA 沉默剂能够介导翻译阻遏。

[0093] 根据本发明的一个实施方案, RNA 沉默剂对靶 RNA(例如, SYNJ2) 有特异性并不

交叉抑制或沉默与靶基因表现出 99% 或更低总体同源性, 例如与靶基因表现出低于 98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81% 总体同源性的基因或剪接变体。

[0094] RNA 干扰指动物中由短干扰 RNA (siRNA) 介导的序列特异性转录后基因沉默过程。植物中的相应过程通常称为转录后基因沉默或 RNA 沉默并且在真菌中也称为压制。转录后基因沉默的过程被认为是用于防止外源基因表达的进化上保守的细胞防御机制并且通常由不同区系和门共用。可能已经响应于经由特异性破坏同源单链 RNA 或病毒基因组 RNA 的细胞反应, 源自病毒感染或转座子元件向宿主基因组的随机整合的双链 RNA (dsRNA) 生成, 进化出这种对外源基因表达的防护。

[0095] 细胞中长 dsRNA 的存在刺激称为 dicer 的核糖核酸酶 III 的活性。在将 dsRNA 加工成称为短干扰 RNA (siRNA) 的 dsRNA 短片段中涉及到 dicer。源自 dicer 活性的短干扰 RNA 通常长度为约 21 至约 23 个核苷酸并且包含约 19 个碱基对的双链体。RNAi 反应也是通常称为 RNA 诱导沉默复合物 (RISC) 的核酸内切酶复合物的特征, 所述复合物介导具有与 siRNA 双链体的反义链互补的序列的单链 RNA 裂解。在与 siRNA 双链体的反义链互补的区域中间发生靶 RNA 裂解。

[0096] 相应地, 本发明的一些实施方案考虑到 dsRNA 下调由 mRNA 表达蛋白质的用途。

[0097] 根据一个实施方案, dsRNA 大于 30bp。由于相信双链 RNA 的这些较长区域将导致诱导干扰素和 PKR 反应, 所以长 dsRNA (即大于 30bp 的 dsRNA) 的使用已经非常受限。然而, 使用长 dsRNA 可以提供许多优势, 细胞可以选择减少试验许多 siRNA 的需要的最佳沉默序列; 长 dsRNA 将允许沉默库具有比对于 siRNA 而言所需更低的复杂性; 并且, 可能最重要的是, 长 dsRNA 在用作治疗剂时可防止病毒逃避突变。

[0098] 各种研究证明长 dsRNA 可用于沉默基因表达, 不会诱导应激反应或产生显著的脱靶效应 - 见例如 [Strat 等, *Nucleic Acids Research*, 2006 年, 第 34 卷, No. 13 3803 - 3810; Bhargava A 等, *Brain Res. Protoc.* 2004; 13:115 - 125; Diallo M. 等, *Oligonucleotides*. 2003; 13:381 - 392; Paddison P. J. 等, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99:1443 - 1448; Tran N. 等, *FEBS Lett.* 2004; 573:127 - 134]。

[0099] 具体而言, 本发明根据其一些实施方式考虑到在干扰素途径未激活的细胞 (例如胚细胞和卵母细胞) 中引入长 dsRNA (超过 30 个碱基的转录产物) 用于基因沉默, 见例如 Billy 等, *PNAS* 2001, 第 98 卷, 第 14428-14433 页和 Diallo 等, *Oligonucleotides*, 2003 年 10 月 1 日, 13(5):381-392. doi:10.1089/154545703322617069。

[0100] 本发明根据其一些实施方式还考虑到引入特别设计为不诱导干扰素和 PKR 途径的长 dsRNA 用于下调基因表达。例如, Shinagwa 和 Ishii [*Genes & Dev.* 17(11):1340-1345, 2003] 已经研发出称为 pDECAP 的载体, 以从 RNA 聚合酶 II (Pol II) 启动子表达长双链 RNA。因为来自 pDECAP 的转录产物缺乏促进 ds-RNA 输出到细胞质的 5' - 帽结构和 3' - 聚 (A) 尾部, 所以来自 pDECAP 的长 ds-RNA 不诱导干扰素反应。

[0101] 在哺乳动物体系中避开干扰素和 PKR 途径的另一种方法是经由转染或内源性表达引入小抑制性 RNA (siRNA)。

[0102] 术语“siRNA”指诱导 RNA 干扰 (RNAi) 途径的小抑制性 RNA 双链体 (通常介于 18-30 个碱基对之间)。虽然最近已经描述 25-30 个碱基长度的化学合成 RNA 双链体与相

同位置的 21mer 相比,效力增强可高达 100 倍,但是通常 siRNA 经化学合成为 21mer,具有中间 19bp 双链体区和末端的对称 2- 碱基 3'- 突出。观察到在引发 RNAi 中使用较长 RNA 获得的更强效力经推理是由于为 Dicer 提供底物 (27mer) 而非产物 (21mer) 产生并且这提高了 siRNA 双链体进入 RISC 的速率或效率。

[0103] 已经发现 3'- 突出的位置影响 siRNA 的效力并且在反义链上具有 3'- 突出的非对称双链体通常比在有义链上具有 3'- 突出的非对称双链体更有效 (Rose 等, 2005)。因为在靶向反义转录产物时观察到相反的功效模式,所以这可归因于非对称链载入 RISC 中。

[0104] 双链干扰 RNA (例如, siRNA) 的链可连接形成发夹或茎- 环结构 (例如, shRNA)。因此,正如提到的那样,本发明一些实施方案的 RNA 沉默剂也可为短发夹 RNA (shRNA)。

[0105] 可在 Chuang 等 (同上) SJ2 - 1 (编码区 1612 - 1633 ;5' AACGTGAACGGAGGAAAGCAG, SEQ ID NO:3)、SJ2 - 2 (3' 非翻译区内的区域 5419 - 5440 ;5' CTCTTGCTGATACGCGATATT, SEQ ID NO:4) ;或传授 SYNJ2 的编码区 1612-1633 或 4925-4946 的 siRNA 的 Rusk 等 [Curr Biol. 2003 年 4 月 15 日 ;13(8):659-63. Erratum in: Curr Biol. 2003 年 9 月 30 日 ;13(19):1746] 中找到小干扰 RNA 分子的实例。

[0106] 成功下调 SYNJ2 mRNA 水平的 siRNA 序列的其它实例包括但不限于 GAAGAAACAUCCCUUGAU (SEQ ID NO:5) 和 GGACAGCACUGCAGGUGUU (SEQ ID NO:6)。

[0107] 术语“shRNA”,如本文所使用,指具有茎- 环结构,包含互补序列的第一和第二区域,所述区域的互补程度和定向足够使得在所述区域之间发生碱基配对,第一和第二区域通过环区连接,由于环区内核苷酸 (或核苷酸类似物) 之间缺乏碱基配对而产生环的 RNA 剂。环内核苷酸的数量是介于并包括 3-23 或 5-15 或 7-13 或 4-9 或 9-11 的数量。环内一些核苷酸可涉及与环内其它核苷酸的碱基- 对相互作用。可用于形成环的寡核苷酸的实例包括 5'-UUCAAGAGA-3' (Brummelkamp, T. R. 等 (2002) Science 296:550) 和 5'-UUUGUGUAG-3' (Castanotto, D. 等 (2002) RNA 8:1454)。本领域的技术人员将认识到所生成的单链寡核苷酸形成包含能够与 RNAi 机制相互作用的双链区的茎- 环或发夹结构。

[0108] 成功下调 SYNJ2 mRNA 水平的 shRNA 序列的实例包括但不限于 CCGGCCTACGATACAA GCGACAAATCTCGAAGATTTGTCGCTTGTATCGTAGGTTTTTG (SEQ ID NO:7) ;CCGGCGAGAGGAGATCATTC GGAAACTCGAGTTTCCGAATGATCTCCTCTCGTTTTTG (SEQ ID NO:8) ;CCGGCCGAAGAAGAGTTTGAGCA CTCGAGTTGCTCAAACTGTTCTTCCGGTTTTTG (SEQ ID NO:9)。

[0109] 适合与本发明的一些实施方案一起使用的 RNA 沉默剂的合成可如下实现。第一,在 AUG 起始密码子下游扫描 SYNJ2 mRNA 序列的 AA 二核苷酸序列。将每个 AA 和 3' 相邻的 19 个核苷酸的出现记录为潜在 siRNA 靶位点。优选地,因为非翻译区 (UTR) 更富含调节蛋白结合位点,所以 siRNA 靶位点选自开放阅读框。UTR 结合蛋白和 / 或翻译起始复合物可能干扰 siRNA 内切核酸酶复合物的结合 [Tuschl ChemBiochem. 2:239-245]。不过应认识到,正如对于 GAPDH 所证明那样,其中对准 5' UTR 的 siRNA 介导细胞 GAPDH mRNA 减少约 90% 并且完全去除了蛋白质含量 (www.dotambiondotcom/techlib/tn/91/912dothtml),对准非翻译区的 siRNA 也可能有效。

[0110] 第二,使用任何序列比对软件,例如可从 NCBI 服务器 (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 获得的 BLAST 软件,将潜在靶位点与适当的基因组数据库 (例如,人、小鼠、大鼠等) 作比较。筛选出表现出与其它编码序列的显著同源

性的推定靶位点。

[0111] 选择合格靶序列作为 siRNA 合成的模板。优选的序列是包括低 G/C 含量的序列，因为已经证实与 G/C 含量高于 55% 的序列相比，其介导基因沉默更有效。沿着靶基因的长度优选几个靶位点做评价。为了更好地评价所选 siRNA，优选一起使用阴性对照。阴性对照 siRNA 优选包括与 siRNA 相同的核苷酸组成，但是与基因组没有显著同源性。因此，优选使用 siRNA 的乱序核苷酸序列，条件是其未显示出与其它任何基因的任何显著同源性。

[0112] 应认识到，本发明一些实施方案的 RNA 沉默剂无需限制为仅含 RNA 的那些分子，但是进一步涵盖经化学修饰的核苷酸和非核苷酸。

[0113] 在一些实施方案中，本文提供的 RNA 沉默剂可与细胞穿透肽在功能上相关。如本文所使用，“细胞穿透肽”是包含赋予与跨细胞质和 / 或细胞核膜运输膜渗透性复合物相关的非能量依赖性（即，非胞吞）易位性质的短（约 12-30 个残基）氨基酸序列或功能基序。在本发明一些实施方案的膜渗透性复合物中使用的细胞穿透肽优选包含至少一个非功能性半胱氨酸残基，其游离或经衍生化与为这样连接已经修饰的双链核糖核酸形成二硫键。在美国专利第 6,348,185 号中列出了赋予此类性质的代表性氨基酸基序，其内容明确地以引用的方式并入本文。本发明一些实施方案的细胞穿透肽优选包括但不限于 penetratin、transportan、pIsl、TAT(48-60)、pVEC、MTS 和 MAP。

[0114] 要使用 RNA 沉默剂靶向的 mRNA 包括但不限于其表达与不良表型性状相关的 mRNA。可能靶向的示例性 mRNA 是编码截短蛋白，即包含缺失的 mRNA。相应地，本发明一些实施方案的 RNA 沉默剂可靶向所述缺失任一侧的桥接区。向细胞中引入此类 RNA 沉默剂会引起突变蛋白下调，同时使非突变蛋白不受影响。

[0115] 根据另一实施方案，RNA 沉默剂可为 miRNA。

[0116] 术语“微 RNA”、“miRNA”和“miR”同义并且指长度约 19-28 个核苷酸，调节基因表达的非编码单链 RNA 分子的总称。在各种生物（viruses dot f d a r w d o t h u m a n s）中发现 miRNA 并且已经证实发育、体内稳态和疾病病因学上起作用。

[0117] 下面是对 miRNA 活性机制的简单描述。

[0118] 编码 miRNA 的基因转录，导致称为 pri-miRNA 的 miRNA 前体生成。pri-miRNA 通常是包含多个 pri-miRNA 的多顺反子 RNA 的一部分。pri-miRNA 可与茎和环形成发夹。茎可能包含错配碱基。

[0119] pri-miRNA 的发夹结构由 RNA 酶 III 核酸内切酶的 Drosha 识别。Drosha 通常识别 pri-miRNA 中的末端环并且将约两个螺旋角裂解成茎以生成称为 pre-miRNA 的 60-70 个核苷酸的前体。Drosha 以 RNA 酶 III 核酸内切酶典型的交错切口裂解 pre-miRNA，产生带 5' 磷酸和 ~ 2 个核苷酸的 3' 突出的 pre-miRNA 茎环。据估计茎（~ 10 个核苷酸）伸出 Drosha 裂解位点的约一个螺旋角对有效加工必不可少。然后 pre-miRNA 通过 Ran-GTP 和输出受体输出蛋白 -5 从细胞核主动运输到细胞质。

[0120] 然后 pre-miRNA 的双链茎由也是 RNA 酶 III 核酸内切酶的 Dicer 识别。Dicer 也可识别在茎环基部的 5' 磷酸和 3' 突出。然后 Dicer 裂解掉末端环，两个螺旋角离开茎环基部，留下另外的 5' 磷酸和 ~ 2 个核苷酸的 3' 突出。所生成的可能包含错配的 siRNA 样双链体包含成熟 miRNA 和称为 miRNA* 的相似大小的片段。miRNA 和 miRNA* 可能源自 pri-miRNA 和 pre-miRNA 的相对臂。可在克隆 miRNA 库中找到 miRNA* 序列，但是通常频率

比 miRNA 低。

[0121] 虽然最初与 miRNA* 一起作为双链物种存在,但是 miRNA 最终作为单链 RNA 并入称为 RNA 诱导沉默复合物 (RISC) 的核糖核蛋白复合物中。各种蛋白质均可形成 RISC,这样可在对 miRNA/miRNA* 双链体的特异性、靶基因结合位点、miRNA 活性 (阻遏或激活) 和 miRNA/miRNA* 双链体的哪一条链载入 RISC 的方面导致可变性。

[0122] 当 miRNA:miRNA* 双链体的 miRNA 链载入 RISC 时,去除并降解 miRNA*。miRNA:miRNA* 双链体中载入 RISC 的链是其 5' 末端配对不太牢固的链。在 miRNA:miRNA* 的两端具有大致相当的 5' 配对的情况下,miRNA 和 miRNA* 可能都具有基因沉默活性。

[0123] RISC 基于 miRNA 和 mRNA 之间的高互补性水平,特别是通过 miRNA 的核苷酸 2-7 识别靶核酸。

[0124] 许多研究已着眼于为实现翻译的有效抑制,miRNA 及其 mRNA 靶标之间的碱基配对要求 (经 Bartel 2004 年审核,Cell 116-281)。在哺乳动物细胞中,miRNA 的前 8 个核苷酸可能很重要 (Doench&Sharp 2004 GenesDev 2004-504)。然而,微 RNA 的其它部分也可能参与 mRNA 结合。而且,3' 处足够的碱基配对可补偿 5' 处的配对不足 (Brennecke 等,2005 PLoS 3-e85)。分析全基因组上 miRNA 结合的计算研究已经表明在靶标结合中对 miRNA 的 5' 处的碱基 2-7 的特定作用,但是也公认了通常发现为“A”的第一个核苷酸的作用 (Lewis 等 2005 Cell 120-15)。类似地,Krek 等使用核苷酸 1-7 或 2-8 鉴定和验证靶标 (2005, Nat Genet 37-495)。

[0125] mRNA 中的靶位点可能在 5' UTR、3' UTR 或编码区内。有趣的是,多个 miRNA 可通过识别相同或多个位点调节相同 mRNA 靶标。大多数基因识别靶标中多个 miRNA 结合位点的存在可能表明多个 RISC 的协同作用提供了最有效的翻译抑制。

[0126] miRNA 可指示 RISC 通过两种机制中的任一种下调基因表达:mRNA 裂解或翻译阻遏。如果 mRNA 与 miRNA 有一定程度的互补性,则 miRNA 可指定 mRNA 的裂解。当 miRNA 指导裂解时,切口通常介于与 miRNA 的残基 10 和 11 的核苷酸配对之间。可选地,如果 miRNA 与 mRNA 没有必要程度的互补性,则 miRNA 可阻遏翻译。翻译阻遏可能在动物中更普遍,因为动物可能在 miRNA 和结合位点之间具有更低程度的互补性。

[0127] 应该注意的是,在任一对 miRNA 和 miRNA* 的 5' 和 3' 末端可能存在可变性。这种可变性可能是由于 Drosha 和 Dicer 对于裂解位点酶促加工的可变性。miRNA 和 miRNA* 的 5' 和 3' 末端的可变性也可能是由于 pri-miRNA 和 pre-miRNA 茎结构中的错配。茎链的错配可能产生一群不同的发夹结构。茎结构的可变性也可能导致 Drosha 和 Dicer 裂解产物的可变性。

[0128] 术语“微 RNA 模拟物”指能够进入 RNAi 途径并调节基因表达的合成非编码 RNA。miRNA 模拟物模仿内源微 RNA (miRNA) 的功能并且可设计成成熟、双链分子或模拟物前体 (例如, pre-miRNA)。miRNA 模拟物可由经修饰或未经修饰的 RNA、DNA、RNA-DNA 杂交体或替代核酸化学物质 (例如, LNA 或 2'-O, 4'-C- 乙烯 - 桥接核酸 (ENA)) 构成。对于成熟、双链 miRNA 模拟物而言,双链体区的长度可在 13-33、18-24 或 21-23 个核苷酸之间变化。miRNA 也可包含总计至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 个核苷酸。miRNA 的序列也可能是 pre-miRNA 的前 13-33 个核苷酸。miRNA 的序列也可能是 pre-miRNA 的后 13-33 个核苷

酸。

[0129] 从上文提供的描述应认识到,可按许多方式实现癌细胞与 miRNA 接触:

[0130] 1. 用成熟双链 miRNA 瞬时转染癌细胞。

[0131] 2. 用编码成熟 miRNA 的表达载体稳定或瞬时转染癌细胞。

[0132] 3. 用编码 pre-miRNA 的表达载体稳定或瞬时转染癌细胞。pre-miRNA 序列可能包含 45-90、60-80 或 60-70 个核苷酸。pre-miRNA 序列可能包含如本文所述的 miRNA 和 miRNA*。pre-miRNA 序列也可能是从 pri-miRNA 的 5' 和 3' 末端排除 0-160 个核苷酸的 pri-miRNA 序列。

[0133] 4. 用编码 pri-miRNA 的表达载体稳定或瞬时转染癌细胞。pri-miRNA 序列可能包含 45-30,000、50-25,000、100-20,000、1,000-1,500 或 80-100 个核苷酸。pri-miRNA 序列可能包含如本文所述的 pre-miRNA、miRNA 和 miRNA* 及其变体。

[0134] 能够下调 SYNJ2 另一种试剂是能够特异性裂解 SYNJ2 的 mRNA 转录产物或 DNA 序列的 DNA 酶分子。DNA 酶是能够裂解单链和双链靶序列的单链多聚核苷酸 (Breaker, R. R. 和 Joyce, G. Chemistry and Biology 1995 ;2:655 ;Santoro, S. W. & Joyce, G. F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 1997 ;943:4262)。已经提出了 DNA 酶的一般模型 (“10-23”模型)。“10-23”DNA 酶具有一个 15 个脱氧核糖核苷酸的催化结构域,其侧面是两个各 7-9 个脱氧核糖核苷酸的底物识别结构域。这类 DNA 酶可在嘌呤:嘧啶接点处有效裂解其底物 (Santoro, S. W. & Joyce, G. F. Proc. Natl, Acad. Sci. USA 199 ;对 DNA 酶的评论,见 Khachigian, LM [Curr Opin Mol Ther 4:119-21 (2002)]。

[0135] 在 Joyce 等的美国专利第 6,326,174 号中已经公开了构建和扩增识别单链和双链靶裂解位点的合成、工程化 DNA 酶的实例。最近观察到针对人尿激酶受体的类似设计的 DNA 酶抑制尿激酶受体表达,并且成功抑制体内结肠癌细胞转移 (Itoh 等, 20002, Abstract 409, Ann Meeting Am Soc Gen Ther www.dotasgtdotorg)。在另一种应用中,与 bcr-abl 致癌基因互补的 DNA 酶在白血病细胞中成功抑制致癌基因表达,并且在 CML 和 ALL 的情况下减小了在自身骨髓移植中的复发率。

[0136] 也可使用能够与编码 SYNJ2 的 mRNA 转录产物特异性杂交的反义多聚核苷酸实现 SYNJ2 的下调。

[0137] 必须在考虑对反义方法重要的两个方面的同时实现可用于有效下调 SYNJ2 的反义分子的设计。第一方面是寡核苷酸向适当细胞的细胞质的递送,而第二方面是以抑制其翻译的方式特异性结合细胞内指定 mRNA 的寡核苷酸的设计。

[0138] 现有技术传授了许多可用于有效地将寡核苷酸递送到各种细胞类型的递送策略 [见,例如, Luft J Mol Med 76:75-6 (1998) ;Kronenwett 等 Blood 91:852-62 (1998) ;Rajur 等 Bioconjug Chem 8:935-40 (1997) ;Lavigne 等 Biochem Biophys Res Commun 237:566-71 (1997) 和 Aoki 等 (1997) Biochem Biophys Res Commun 231:540-5 (1997)]。

[0139] 另外,根据说明靶 mRNA 和寡核苷酸中结构改变的能量学的热力学循环,鉴定对其靶 mRNA 的预测结合亲和力最高的序列的算法也可用 [见,例如, Walton 等 Biotechnol Bioeng 65:1-9 (1999)]。

[0140] 此类算法已经成功用于在细胞中实现反义方法。例如, Walton 等研发的算法使得科学家们能够成功设计兔 β -珠蛋白 (RBG) 和小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF α) 转录产物的

反义寡核苷酸。同一研究小组新近已报道,通过动力学 PCR 技术评估,在细胞培养物中对三种模型靶 mRNA(人乳酸脱氢酶 A 和 B 和兔 gp130) 合理选择的寡核苷酸的反义活性证明在几乎所有情况下,包括在具有磷酸二酯和硫代磷酸酯寡核苷酸化学性质的两种细胞类型中对三种不同靶标的试验中有效。

[0141] 另外,还公开了使用体外系统设计和预测特定寡核苷酸的效率的几种方法(Matveeva 等, *Nature Biotechnology* 16:1374-1375(1998))。

[0142] 例如,靶向 SYNJ2 mRNA(其编码 SYNJ2 蛋白)的适合反义寡核苷酸将具有以下序列:CCCTTTGTCTGCCACCTCCT(SEQ ID NO:10)、ACCCATCTTGCTCTCTCCC(SEQ ID NO:11) 和 TCTTCCTCCACCACAGCACC(SEQ ID NO:12)。

[0143] 几项临床试验已经证明反义寡核苷酸的安全性、可行性和活性。例如,已经成功使用了适合治疗癌症的反义寡核苷酸[Holmund 等, *Curr Opin Mol Ther* 1:372-85(1999)],而经由靶向 c-myc 基因、p53 和 Bcl-2 的反义寡核苷酸治疗血液恶性肿瘤已进入临床试验并且已经证实患者耐受[Gerwitz *Curr Opin Mol Ther* 1:297-306(1999)]。

[0144] 最近,已经报道在小鼠模型中反义介导的人乙酰肝素酶基因表达抑制,抑制了人癌细胞的胸膜种植转移[Uno 等, *Cancer Res* 61:7855-60(2001)]。

[0145] 因此,目前的共识是在如上所述,已导致产生高度精确的反义设计算法和各种寡核苷酸递送系统的反义技术领域的最新发展,使得普通技术人员能够设计并实现适合下调已知序列的表达,而无需采取不当试验和错误实验的反义方法。

[0146] 能够下调 SYNJ2 的另一种试剂是能够特异性裂解编码 SYNJ2 的 mRNA 转录产物的核酶分子。核酶正越来越多地用于通过裂解编码目标蛋白的 mRNA,序列特异性抑制基因表达[Welch 等, *Curr Opin Biotechnol* 9:486-96(1998)]。将核酶设计为裂解任何特定靶 RNA 的可能性已使其在基础研究和治疗应用中成为宝贵的工具。在治疗领域,核酶已开发用于靶向传染病中的病毒 RNA、癌症中的显性致癌基因和遗传病中的特定体细胞突变[Welch 等, *Clin Diagn Virol* 10:163-71(1998)]。最为显著的是, HIV 患者的几种核酶基因疗法已经处于 1 期试验。最近,核酶已经用于转基因动物研究、基因靶标验证和途径说明。几种核酶处于临床试验的不同阶段。ANGIOZYME 是要在人类临床试验中研究的首个经化学合成的核酶。ANGIOZYME 特异性抑制 VEGF-r(血管内皮生长因子受体),血管生成途径中的一种关键组分的形成。Ribozyme Pharmaceuticals, Inc. 以及其它公司已经证明了抗血管生成疗法在动物模型中的重要性。在细胞培养测定法中发现 HEPTAZYME,设计为选择性破坏丙型肝炎病毒(HCV)RNA 的一种核酶,减少丙型肝炎病毒 RNA 有效(Ribozyme Pharmaceuticals, Incorporated-WEB 首页)。

[0147] 能够下调 SYNJ2 的另一种试剂将为结合和 / 或裂解 SYNJ2 的任何分子。

[0148] 本发明揭开了成为 SYNJ2 在细胞运动中的作用基础的一般机理。

[0149] 图 15 中列出了原理。相应地,关键事件需要 EGF 诱导的 SYNJ2 上调及由此引起的 3 种磷酸肌醇损耗:PI(4, 5)P₂、PI(3, 4, 5)P₃和 PI(3, 5)P₂。SYNJ2 介导的 PI(4, 5)P₂脱磷酸与 PI(4, 5)P₂受磷脂酶 C- γ 降解和受 PI3K 磷酸化并行,这样生成 PI(3, 4, 5)P₃。总的来说, 3 种酶受 EGF 的刺激使一组 PI(4, 5)P₂结合剂从质膜离解,并且还生成无 PI(4, 5)P₂的内吞囊泡。同时, SYNJ2 将 PI(3, 4, 5)P₃转化成侵袭伪足形成所必需的 PI(3, 4)P₂。一旦到位, PI(3, 4)P₂就结合 TKS5 并且使以发动蛋白和皮动蛋白为中心的复合物成核,该复合物使得

丝切蛋白能够在侵袭伪足内产生肌动蛋白钩端。根据本结果,SYNJ2 也涉及下一侵袭伪足突变步骤,即 MMP 分泌及 MT1-MMP 和其它表面分子例如 CD44 的递送。以类似方式,SYNJ2 控制 EGFR 和整联蛋白向前缘的递送,并且很可能激活丝切蛋白,这是指示板状伪足突出形成的关键事件。

[0150] 这些发现可用于鉴定为肿瘤转移推定抑制剂的 SYNJ2 抑制剂。

[0151] 因此,根据本发明的一方面,提供了一种鉴定肿瘤转移的推定抑制剂的方法,所述方法包括在试验试剂的存在下,分析 SYNJ2 介导的 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工,其中在所述试验试剂的所述存在下 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工,与其不存在时 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工相比减少,表明为肿瘤转移的推定抑制剂。

[0152] 试验试剂可为生物分子(蛋白质(例如肽或抗体)、核酸分子(例如沉默剂)、碳水化合物、脂质或其组合)或小分子(例如,化学品)。

[0153] 所述方法可在体内或体外实现。后者可在细胞体系中使用无细胞体系执行。

[0154] 示例性测定法牵涉通过竞争测定法分析 SYNJ2 介导的 PI (3, 4, 5)P₃向 PI (3, 4)P₂的加工。

[0155] 相应地,竞争测定法测试 PI (3, 4)P₂结合结构域从包含与 PI (3, 4)P₂结合的 PI (3, 4)P₂结合结构域的复合物的位移。

[0156] 根据一示例性实施方案,采用荧光偏振竞争测定法。所述测定法依赖一旦分子结合更大的隔绝元件(例如,蛋白质),其在空间上的运动就显著降低的原理。可使用允许在从样品的平行和垂直平面测量后,测定荧光偏振的荧光探针检测和测量这种现象。相应地,溶液中未结合的荧光分子产生极低偏振读数,但是向溶液添加结合(隔绝)这些分子的检测剂(例如,结合蛋白)时,荧光分子在增大溶液中的偏振读数的受限组合物中稳定。

[0157] 例如,所述测定法可包括 PI (3, 4)P₂结合结构域(例如,PH- 结构域例如 Tapp1PH 结构域,SEQ ID NO:15-16)和荧光 PI (3, 4)P₂,连同重组 SYNJ2 及其非荧光底物,PI (3, 4, 5)P₃。SYNJ2 催化活性的产物置换荧光 PI (3, 4)P₂,从而降低荧光偏振。

[0158] 根据特定实施方案,使用商业 5'PI (3, 4, 5)P₃ 磷酸酶活性荧光偏振测定法(例如, Echelon Bioscience,产品目录号 K-1400)。

[0159] 根据特定实施方案,在准备或不准备试验试剂,允许 SYNJ2 催化活性(脱磷酸)的条件下温育包含 SYNJ2 和作为底物的 PI (3, 4, 5)P₃ 的反应混合物。例如,试验试剂可为小分子、核酸分子、肽、抗体、碳水化合物或其组合。温育后,将含 PI (3, 4)P₂ 产物的溶液与 PI (3, 4)P₂ 结合蛋白(例如, Tapp1 的 PH- 结构域, SEQ ID NO:15)和荧光 PI (3, 4)P₂ 的混合物混合并测量荧光偏振。该测定法中测得的偏振值在由通过 SYNJ2 酶活性生成的未标记 PI (3, 4)P₂ 置换结合的荧光 PI (3, 4)P₂ 分子时减小并且未结合荧光 PI (3, 4)P₂ 分子的量增加。在试验试剂的存在下荧光偏振值与试验试剂不存在时的值相比增大的情况下,试验试剂为推定 SYNJ2 抑制剂。

[0160] 一经鉴定,就使用如以下进一步举例说明的相关测定法,例如明胶酶谱测定法、transwell 测定法和试验动物进一步证实试验试剂作为抗转移药物的功能性。

[0161] 使用这种方法,本发明人已经根据本发明的一些实施方案鉴定了许多可用作 SYNJ2 抑制剂的小分子。图 19 中描绘了这些分子并于下文,实施例 10 的表 2 中示出。

[0162] 正如提到的那样,除与癌症发作或进展相关的细胞表面受体的抑制剂外,还施用

SYNJ2 抑制剂。根据本发明的一个实施方案,受体为致癌基因。

[0163] 可根据本发明靶向的受体的实例为受体酪氨酸激酶,例如 EGFR、PDGFR、VEGFR、FGFR 和 ErbB-2。

[0164] 可靶向的其它表面分子包括整联蛋白基质金属蛋白酶 (MMP)、发动蛋白、TKS5 和 CD44。

[0165] 细胞表面分子的抑制剂在本领域众所周知。下文提供了此类抑制剂的非限制性列表。

[0166] 因此例如,鉴定 EGFR 为致癌基因已导致针对 EGFR 的抗癌疗法的发展。

[0167] 西妥昔单抗 (cetuximab) 和帕尼单抗 (panitumumab) 是单克隆抗体抑制剂的实例。临床研究的其它单克隆抗体为扎鲁木单抗 (zalutumumab)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab) 和马妥珠单抗 (matuzumab)。单克隆抗体阻滞细胞外配体结合结构域。阻滞结合位点后,信号分子再也无法附着于此和激活酪氨酸激酶。

[0168] 另一种方法是使用小分子抑制在受体胞质一侧的 EGFR 酪氨酸激酶。没有激酶活性,EGFR 自身无法活化,这是下游衔接蛋白结合的先决条件。表面上通过中断依赖于该途径生长的细胞内的信号级联,减少肿瘤增殖和迁移。吉非替尼 (gefitinib)、埃罗替尼 (erlotinib) 和拉帕替尼 (lapatinib) (混合的 EGFR 和 ERBB2 抑制剂) 是小分子激酶抑制剂的实例。其它实例包括直接靶向 EGFR 的易瑞沙 (Iressa) 和特罗凯 (Tarceva)。

[0169] HER2 是单克隆抗体曲妥珠单抗 (trastuzumab) (作为 Herceptin 在市场上出售) 的靶标。曲妥珠单抗仅在 HER2 过表达的癌症中有效。另一种抑制 HER2 和 HER3 受体二聚化的单克隆抗体,帕妥珠单抗 (Pertuzumab),于 2012 年 6 月经 FDA 批准与曲妥珠单抗组合使用。

[0170] 另外,NeuVax (Galena Biopharma) 是指示“杀伤”T 细胞靶向并破坏表达 HER2 的癌细胞的肽基免疫疗法。

[0171] 通过雌激素受体发信号调节 HER2 的表达。通过雌激素受体作用的雌二醇 (estradiol) 和它莫西芬 (tamoxifen) 下调 HER2 的表达。

[0172] 下面列出了可根据本发明使用的抗体的实例而决非意在为限制性。

[0173] 表 1

[0174]

抗体	商标名称	批准日期	类型	靶标	批准治疗
阿仑单抗(Alemtuzumab)	Campath	2001 年	人源化	CD52	慢性淋巴细胞性白血病
贝伐单抗(Bevacizumab)	Avastin	2004 年	人源化	血管内皮生长因子	结直肠癌
贝伦妥单抗维多汀(Brentuximab vedotin)	Adcetris	2011 年	嵌合	CD30	霍奇金淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤
西妥昔单抗(Cetuximab)	Erbix	2004 年	嵌合	表皮生长因子受体	结直肠癌
吉妥珠单抗奥唑米星(Gemtuzumab ozogamicin)	Mylotarg	2000 年	人源化	CD33	急性髓性白血病(连同卡里奇霉素(calicheamicin))
替伊莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)	Zevalin	2002 年	鼠	CD20	非霍奇金淋巴瘤(连同钇-90 或铟-111)
帕尼单抗(Panitumumab)	Vectibix	2006 年	人	表皮生长因子受体	结直肠癌
利妥昔单抗(Rituximab)	Rituxan、Mabthera	1997 年	嵌合	CD20	非霍奇金淋巴瘤
曲妥珠单抗(Trastuzumab)	Herceptin	1998 年	人源化	ErbB2	乳腺癌

[0175] SYNJ2 的抑制剂和任选如本文所述的细胞表面受体的抑制剂可本身或呈与适合载体或赋形剂混合的药物组合物施用给受试者。

[0176] 如本文所使用,“药物组合物”指本文所述一种或多种活性成分与其它化学组分例如生理上适合的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的目的是利于向生物施用化合物。

[0177] 本文中术语“活性成分”指可解释生物效应的 SYNJ2 抑制剂(和任选细胞表面受体的抑制剂)。

[0178] 在下文中,可交换使用的短语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”指不会对生物产生显著刺激并且不会消除施用化合物的生物活性和特性的载体或稀释剂。佐剂包括在这些短语下。

[0179] 本文中术语“赋形剂”指添加到药物组合物中以更利于施用活性成分的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0180] 在“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co.,Easton,PA 最新版中可找到配制和施用药物的技术,其以引用的方式并入本文。

[0181] 适合的施用途径可能包括(例如)口服、直肠、透粘膜,尤其是经鼻、肠内或肠胃外递送,包括肌肉、皮下和髓内注射以及胸内、直接心室内、心脏内递送到(例如)右或左心室腔、常见冠状动脉内,经静脉、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0182] 向中枢神经系统(CNS)递送药物的传统方法包括:神经外科策略(例如,脑内注射或脑室灌注);试剂的分子操纵(例如,生成包含对内皮细胞表面分子有亲和力的转运肽结合本身不能够跨过 BBB 的试剂的嵌合融合蛋白)以试图利用 BBB 的其中一个内源运输途径;设计用于增加试剂的脂溶性的药理学策略(例如,水溶性试剂与脂质或胆固醇载体偶联);和通过高渗破坏(由向颈动脉注入甘露糖醇溶液或使用生物活性剂例如血管紧张素

肽引起)暂时破坏 BBB 的完整性。然而,这些策略中的每一种都有局限性,例如与侵入性外科手术相关的固有风险,内源运输体系固有局限性强加的尺寸限制,与全身施用由在 CNS 外可具活性的载体基序构成的嵌合分子相关的潜在有害生物副作用和 BBB 受破坏的脑部区域内脑损伤的可能风险,这使其成为次优递送方法。

[0183] 可选地,可能以局部而非全身方式施用药物组合物,例如通过向患者的组织区域直接注射药物组合物。

[0184] 术语“组织”指由为进行一种功能或多种功能而设计的细胞组成的生物体的一部分。实例包括但不限于脑组织、视网膜、皮肤组织、肝组织、胰腺组织、骨、软骨、结缔组织、血液组织、肌肉组织、心脏组织、脑组织、血管组织、肾组织、肺组织、性腺组织、造血组织。

[0185] 可通过本领域众所周知的工艺,例如借助于常规混合、溶解、造粒、糖衣制备、研磨、乳化、封装、包埋或冻干工艺生产本发明一些实施方案的药物组合物。

[0186] 因此可按传统方式使用包含利于将活性成分加工成药学上可用的制剂的赋形剂和助剂的生理上可接受的载体配制根据本发明一些实施方案使用的药物组合物。适当的制剂取决于所选施用途径。

[0187] 对于注射,可将药物组合物的活性成分配制于水溶液,优选于生理上相容的缓冲液中例如 Hank 溶液、林格氏溶液或生理盐缓冲液。对于透粘膜施用,在制剂中使用适于要透过的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域中已知。

[0188] 对于口服施用,通过将活性化合物与本领域众所周知的药学上可接受的载体合并,可容易地配制药组合物。此类载体使得能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、混悬液等,供患者口服。可使用固体赋形剂,在需要时添加适合助剂后任选研磨所得混合物,并加工颗粒混合物,以获得片剂或糖衣丸核,制成供口服使用的药物制剂。适合的赋形剂尤其为填料例如糖类,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基-纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理上可接受的聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。若需要,可添加崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐例如海藻酸钠。

[0189] 为糖衣丸核提供了适合包衣。为了这个目的,可使用可能任选含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液和适合有机溶剂或溶剂混合物的浓糖溶液。可向片剂或糖衣丸包衣添加着色剂或色素以鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0190] 可口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合胶囊以及由明胶和增塑剂,例如甘油或山梨糖醇制成的软密封胶囊。推入配合胶囊可能含有与填料例如乳糖、粘合剂例如淀粉、润滑剂例如滑石或硬脂酸镁和任选稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性成分可溶解或悬浮于适合液体,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可添加稳定剂。供口服施用的所有制剂都应呈适合所选施用途径的剂量。

[0191] 对于口腔施用,所述组合物可呈以传统方式配制的片剂或锭剂形式。

[0192] 对于通过鼻吸入施用,根据本发明一些实施方案使用的活性成分便于呈气溶胶喷雾呈现形式,借助于适合的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯-四氟乙烷或二氧化碳从加压包或喷雾器中递送。在为加压气溶胶的情况下,可通过提供递送计量好的量

的阀门测定剂量单位。可配制含化合物和适合粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物,例如用于分配器中的明胶胶囊和药筒。

[0193] 可配制本文所述的药物组合物供肠胃外施用,例如通过快速浓注或持续输注。注射用制剂可呈单位剂型,例如于任选添加了防腐剂的安瓿或多剂量容器中呈现。所述组合物可能是于油性或水性媒介物中的混悬液、溶液或乳液,并且可能含有配方剂,例如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0194] 供肠胃外施用的药物组合物包括呈水溶性形式的活性制剂的水溶液。另外,活性成分的混悬液可制备成适当的油或水基注射混悬液。适合的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油例如芝麻油,或合成脂肪酸酯例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。含水注射混悬液可含有增加混悬液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,混悬液还可能含有适合稳定剂或增加活性成分的溶解性的试剂以允许制备高浓溶液。

[0195] 可选地,活性成分可能呈粉末形式,以在使用之前用适合媒介物例如无菌、无热原水基溶液复水。

[0196] 也可使用(例如)传统栓剂基质例如可可油或其它甘油酯将本发明一些实施方案的药物组合物配制成直肠组合物,例如栓剂或保留灌肠剂。

[0197] 适合在本发明一些实施方案的情况下使用的药物组合物包括其中含实现预期目的的有效量的活性成分的组合物。更具体地,治疗有效量指活性成分(SYNJ2抑制剂)预防、减轻或改善病症(例如,癌症或转移癌)的症状或延长受治受试者的存活期有效的量。

[0198] 特别是根据本文提供的详细公开内容,治疗有效量的测定在本领域技术人员的能力范围内。

[0199] 对于用于本发明的方法的任何制剂而言,最初由体外和细胞培养测定法估计治疗有效量。例如,在动物模型中可配制一剂量以达到所需浓度或滴度。这种信息可用于更精确地测定在人类中的有用剂量。

[0200] 可在体外、细胞培养或实验动物中,通过标准制药程序测定本文所述活性成分的毒性和疗效。从这些体外和细胞培养测定法和动物研究获得的数据可用于配制用于人类的一系列剂量。剂量可根据采用的剂型和利用的施用途径改变。确切的配方、施用途径和剂量可由个别医师鉴于患者的状况选择(见例如,Fingl等,1975年在“The Pharmacological Basis of Therapeutics”,第1章第1页)。

[0201] 可单独调节剂量和间隔以提供足以诱导或抑制生物效应的 SYNJ2 抑制剂水平的活性成分(最低有效浓度,MEC)。对于每种制剂 MEC 将不同,但是可由体外数据估计。达到 MEC 所必需的剂量将取决于个体特征和施用途径。检测测定法可用于测定血浆浓度。

[0202] 根据待治病状的严重程度和反应性,给药可分单次或多次施用,疗程持续几天至几周或直至达到治愈或实现疾病状态减轻。

[0203] 当然,要施用的组合物的量将取决于受治受试者、痛苦严重程度、施用方式、处方医师的判断等。

[0204] 若需要,本发明一些实施方案的组合物可于可能装有含活性成分的一种或多种单位剂型的包装或分配器装置,例如 FDA 批准的试剂盒中呈现。所述包装可能(例如)包含金属或塑料箔,例如泡罩包装。所述包装或分配器装置可能附有施用说明书。所述包装或分配器还可能提供有与容器相伴的呈管制医药品的生产、使用或销售的政府机关规定形式的

通知,所述通知反映组合物形式或人或兽医施用受该机关批准。例如,此类通知可能具有经美国食品和药物管理局批准用于处方药物的标记或具有经批准的产品说明书。如以上所进一步详述,也可制备包含配制于相容药物载体中的本发明制剂的组合物,置于适当容器中,并且标记用于治疗指定病状。

[0205] 根据 SYNJ2 对细胞迁移的贡献,本发明人观察到在侵袭性癌症亚型中 SYNJ2 mRNA 和蛋白质水平显著上调,表明 SYNJ2 可用作预后指标。

[0206] 因此,根据本发明的一方面,通过了一种在有需要的受试者中癌症预后的方法,所述方法包括测定受试者癌细胞中 SYNJ2 的水平或活性,其中在所述受试者癌细胞中所述 SYNJ2 的所述水平或活性与在未受影响的对照样品的细胞中相比上调,表明预后不良。

[0207] 如本文所使用,术语“预后”指确定疾病(癌症)的结果。

[0208] 如本文所使用,“预后不良”指疾病复发风险增加和/或因疾病死亡的风险增加。

[0209] 如本文所使用,术语“水平”指 DNA(基因扩增)、RNA 或蛋白质的表达水平。

[0210] 如本文所使用,“SYNJ2 活性”主要指其磷酸酶活性,即将 $PI(3,4,5)P_3$ 转化为 $PI(3,4)P_2$ 。

[0211] 根据一个特定实施方案,使用体外活性测定法测定活性。

[0212] 体外活性测定法:在这些方法中,测量从细胞提取的蛋白质混合物中特定酶(在这种情况下为磷酸酶)的活性。可在分光光度计孔内使用比色法测量活性或可在非变性聚丙烯酰胺凝胶(即,活性凝胶)中测量。电泳后,将凝胶浸入含底物和比色试剂的溶液中。所产生的染色带与目标蛋白质的酶活性相对应。如果精确校准并且在线性反应范围内,则样品中存在的酶量与产生颜色的量成正比。通常采用酶标准品来提高定量精确性。

[0213] 以上描述了 SYNJ2 的特定测定法,其中试验了 $PI(3,4,5)P_3$ 向 $PI(3,4)P_2$ 的转化活性。

[0214] 检测蛋白质表达和/或活性的方法

[0215] 可使用本领域中已知的方法测定 SYNJ2 的蛋白质表达。

[0216] 酶联免疫吸附测定法(ELISA):这种方法涉及将含有蛋白质底物的样品(例如,固定细胞或蛋白质溶液)固定到表面例如微量滴定板的孔上。涂覆与酶偶联的底物特异性抗体并使其与底物结合。然后检测抗体的存在并采用与抗体偶联的酶,通过比色反应进行量化。这种方法中常用的酶包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。如果精确校准并且在线性反应范围内,则样品中存在的底物的量与产生颜色的量成正比。通常采用底物标准品来提高定量精确性。

[0217] 蛋白质印迹:这种方法涉及借助于聚丙烯酰胺凝胶将底物与其它蛋白质分开,接着将底物转移到膜(例如,尼龙或 PVDF)上。然后用对底物有特异性的抗体检测底物的存在,依次用抗体结合试剂检测抗体的存在。例如,抗体结合试剂可为蛋白 A 或其它抗体。如上文所述,抗体结合试剂可经放射性标记或经酶联。可通过放射自显影术、比色反应或化学发光检测。这种方法允许通过膜上表示电泳期间在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移距离的相对位置量化底物的量并测定其同一性。

[0218] 放射免疫测定法(RIA):在一种型式中,这种方法涉及用特定抗体和固定在可沉淀载体例如琼脂糖珠粒上的放射标记抗体结合蛋白(例如经 I^{125} 标记的蛋白 A)沉淀所需蛋白(即,底物)。沉淀团粒中计数数量与底物的量成正比。

[0219] 在 RIA 的替代型式中,采用标记底物和未标记的抗体结合蛋白。按不同量添加含未知量的底物的样品。从标记底物沉淀的计数减少量与所加样品中底物的量成正比。

[0220] 荧光激活细胞分选术 (FACS):这种方法涉及用底物特异性抗体检测细胞内的原位底物。底物特异性抗体与荧光团相联。通过在每个细胞穿过光束时读取从每个细胞发射的光的波长的细胞分选仪检测。

[0221] 免疫组织化学分析:这种方法涉及用底物特异性抗体检测固定细胞内的原位底物。底物特异性抗体经酶联或与荧光团相联。通过显微镜术和主观或自动评价检测。如果采用酶联抗体,则可能需要比色反应。将认识到免疫组织化学分析后常常是使用例如苏木精或姬姆萨染液 (Giemsa stain) 对细胞核复染。

[0222] 原位活性测定法:根据这种方法,在含有活性酶的细胞上涂生色底物并且所述酶催化分解底物以生成用光或荧光显微镜可见的生色产物的反应。

[0223] 可选地或另外,使用本领域众所周知并且一些在下文中有描述的方法,在 RNA 水平检测 SYNJ2 的水平。

[0224] 检测 RNA 表达水平的方法

[0225] 可使用本领域中已知的方法测定本发明一些实施方案的细胞中 RNA 的表达水平。

[0226] RNA 印迹分析:这种方法涉及检测 RNA 混合物中的特定 RNA。通过用防止碱基对之间氢键结合的试剂(例如,甲醛)处理使 RNA 样品变性,确保所有 RNA 分子具有未折叠、线性构象。然后根据尺寸通过凝胶电泳分离单个的 RNA 分子并转移到变性 RNA 所附着的确化纤维素或尼龙膜上。然后将膜暴露于标记 DNA 探针。可使用放射性同位素或酶联核苷酸标记探针。可使用放射自显影术、比色反应或化学发光检测。这种方法允许通过膜上表示电泳期间在凝胶中的迁移距离的相对位置量化特定 RNA 分子的量并测定其同一性。

[0227] RT-PCR 分析:这种方法使用相对罕见 RNA 分子的 PCR 扩增。首先,从细胞中纯化 RNA 分子并使用逆转录酶(例如 MMLV-RT)和引物例如寡聚 dT、随机六聚体或基因特异性引物转化成互补 DNA (cDNA)。然后通过应用基因特异性引物和 Taq DNA 聚合物酶,在 PCR 仪中进行 PCR 扩增反应。本领域的技术人员能够选择基因特异性引物的长度和序列及适合检测特定 RNA 分子的 PCR 条件(即,退火温度、循环次数等)。应认识到,可通过调节 PCR 循环次数并将扩增产物与已知对照比较,采用半定量 RT-PCR 反应。

[0228] RNA 原位杂交染色:在这种方法中,DNA 或 RNA 探针附着于细胞内存在的 RNA 分子上。通常,首先将细胞固定到显微镜载玻片上以保护细胞结构并防止 RNA 分子降解,然后受到含标记探针的杂交缓冲液。杂交缓冲液包括使得 DNA 或 RNA 探针与其原位靶 mRNA 分子的特异性杂交成为可能,同时避免探针非特异性结合的试剂,例如甲酰胺和盐(例如,氯化钠和柠檬酸钠)。本领域的技术人员能够为特定探针和细胞类型调节杂交条件(即,温度、盐和甲酰胺的浓度等)。杂交后,洗掉所有未结合的探针并使用已知方法检测结合的探针。例如,如果使用放射性标记探针,则使载玻片受到显示出使用放射性标记探针生成的信号的照相乳胶;如果用酶标记探针,则添加酶特异性底物以形成比色反应;如果使用荧光标记物标记探针,则使用荧光显微镜显示结合的探针;如果使用标签(例如,地高辛、生物素等)标记探针,则可按照可使用已知方法检测的与标签特异性抗体的相互作用检测结合的探针。

[0229] 原位 RT-PCR 染色:在 Nuovo GJ 等 [Intracellular localization of

polymerase chain reaction(PCR)-amplified hepatitis C cDNA. Am J Surg Pathol. 1993, 17:683-90] 和 Komminoth P 等 [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] 中描述了这种方法。简言之,通过将标记核苷酸并入 PCR 反应中,对固定细胞进行 RT-PCR 反应。使用特定原位 RT-PCR 仪例如可从 Arcturus Engineering(Mountainview, CA) 获得的激光捕获显微切割 PixCell I LCM 系统进行反应。

[0230] DNA 微阵列 /DNA 芯片:

[0231] 可使用 DNA 微阵列同时分析成千上万个基因的表达,允许分析特定发育过程或生理反应期间生物体的完整转录程序。DNA 微阵列由成千上万个附着于支撑物例如显微镜载玻片表面上的密集区的单独基因序列组成。已经研发出各种方法用于制备 DNA 微阵列。在一种方法中,单独 PCR 扩增用于分析的每个基因的编码区的约 1kb 片段。采用机器人装置将每种扩增 DNA 样品涂到显微镜载玻片表面上的密集区域,随后通过热和化学处理加工以使 DNA 序列与支撑物表面结合并使其变性。通常,此类阵列约 2×2cm 并且含有约 6000 个单独核酸斑点。在所述技术的变型中,由与支撑物表面共价结合的初始核苷酸合成通常长度为 20 个核苷酸的多个 DNA 寡核苷酸,以致在支撑物表面的小正方形区域内合成数万个相同寡核苷酸。在载玻片的相邻区域合成来自单个基因的多个寡核苷酸序列,以分析该基因的表达。因此,在一张载玻片上可出现成千上万个基因。此类合成寡核苷酸阵列在本领域中可称为“DNA 芯片”,与上述“DNA 微阵列”相对 [Lodish 等(编辑)第 7.8 章:DNA Microarrays:Analyzing Genome-Wide Expression. In:Molecular Cell Biology,第 4 版, W. H. Freeman, New York. (2000)]。

[0232] 可使用金标法例如成像法、活检取样、标志表达、免疫组织化学等证实预后。

[0233] 以下是乳腺癌的具体实例,但决非意为限制性。通常在评估肿瘤大小(T)、向相邻淋巴结转移的状态(N)和存在或不存在向其它器官远距离转移(M)的手术后,按疾病分期(TNM 分期)确定乳腺癌预后。即使在同分期,根据 TNM 分期分类的患者的预后也不同。换言之,在乳腺癌的同分期,可通过雌激素或孕激素受体(ER 或 PR)表达和 HER2 蛋白过表达或基因扩增确定预后。

[0234] 在诊断试剂盒/制品中,可能优选连同适当使用说明书和表明 FDA 批准用于诊断和/或评估癌症分期和/或预后的标签一起,包括上文描述的本发明一些实施方案的用于检测 SYNJ2 的试剂。

[0235] 例如,此类试剂盒可包括至少一个包括上述至少一种诊断剂(例如,抗 SYNJ2,例如连同抗 HER2 和/或抗 ER 或这些靶标的寡核苷酸探针/引物一起)的容器和包装在另一容器中的显像剂(例如,酶、二次抗体、缓冲液、生色底物、荧光材料)。所述试剂盒还可能包括用于提高试剂盒保质期的适当缓冲液和防腐剂。

[0236] 术语“包含”、“包括”、“具有”及其同根词意为“包括但不限于”。

[0237] 术语“由……组成”意为“包括并且限于”。

[0238] 术语“基本上由……组成”意为所述组合物、方法或结构可能包括另外的成分、步骤和/或部分,但只有在另外的成分、步骤和/或部分不会实质上改变要求保护的组合物、

方法或结构的基本和新型特征时。

[0239] 如本文所使用,除非上下文中另有明确规定,单数形式“一种”、“一个”和“所述”包括复数个指示物。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物。在本申请各处,本发明的各实施方案可呈范围形式呈现。应理解,呈范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁而不得解释为对本发明范围的硬性限制。相应地,对范围的描述应视为具有特别公开的所有可能子范围以及该范围内的单个数值。例如,对范围例如 1-6 的描述应视为具有特别公开的子范围,例如 1-3、1-4、1-5、2-4、2-6、3-6 等,以及该范围内的单个数,例如 1、2、3、4、5 和 6。不管范围宽度如何,这都适用。

[0240] 当本文指出数值范围时,意为包括指定范围内引用的所有数字(分数或整数)。短语“范围/范围介于”第一指定数量和第二指定数量之间和“范围/范围从”第一指定数量“到”第二指定数量可交换使用并且意为包括第一和第二指定数量及之间的所有分数和整数数字。

[0241] 如本文所使用,术语“方法”指完成给定认为的方式、手段、技术和程序,包括但不限于化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的从业者已知或易于由已知方式、手段、技术和程序研发的方式、手段、技术和程序。

[0242] 如本文所使用,术语“治疗”包括消除、大体上抑制、减缓或逆转病状的进展,大体上改善病状的临床或审美症状,或大体上预防病状的临床或审美症状出现。

[0243] 应认识到,为清楚起见在单独实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可在单个实施方案组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征也可单独地或在任何适合的子组合或如其所应在所述本发明任何其它实施方案中提供。除非没有那些要素,实施方案无效,否则不得将各实施方案的上下文中描述的某些特征视为那些实施方案的基本特征。

[0244] 上文描绘了本发明的各实施方案和方方面面并且如以下权利要求部分中所要求那样,在下列实施例中找到实验支持。

[0245] 实施例

[0246] 现参考下列实施例,其连同以上描述一起以非限制性方式说明了本发明的一些实施方案。

[0247] 通常,本文使用的命名法和本发明利用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组 DNA 技术。文献中透彻讲解了此类技术。见,例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook 等, (1989); “Current Protocols in Molecular Biology” I-III 卷 Ausubel, R. M. 编辑 (1994); Ausubel 等, “Current Protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 等, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren 等 (编辑) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利第 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 号中提出的方法; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, I-III 卷 Cellis, J. E. 编辑 (1994); “Current Protocols in Immunology” I-III 卷 Coligan J. E. 编辑 (1994); Stites 等 (编辑), “Basic and Clinical Immunology” (第 8 版), Appleton & L.

ange, Norwalk, CT(1994); Mishell 和 Shiigi (编辑), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York(1980); 在专利和科学文献中广泛描述了可用免疫测定法, 见, 例如, 美国专利第 3, 791, 932、3, 839, 153、3, 850, 752、3, 850, 578、3, 853, 987、3, 867, 517、3, 879, 262、3, 901, 654、3, 935, 074、3, 984, 533、3, 996, 345、4, 034, 074、4, 098, 876、4, 879, 219、5, 011, 771 和 5, 281, 521 号; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J. 编辑 (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编辑 (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. 和 Higgins S. J. 编辑 (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I. 编辑 (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) 和 "Methods in Enzymology" 1-317 卷, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA(1990); Marshak 等, "Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual" CSHL Press(1996); 其全部以引用的方式如同本文完全阐述一样并入。在本文件各处提供了一般参考文献。据信其中的程序在本领域众所周知并且是为了方便读者而提供。其中所含的全部信息以引用的方式并入本文。

[0248] 实施例 1

[0249] 材料和方法

[0250] 细胞迁移、侵袭和趋化性测定

[0251] 将细胞接种在 Transwell 盘 (BD Bioscience) 的上部隔室内, 一式三份, 并使其迁移 18h 通过插入膜。之后, 将细胞固定于多聚甲醛 (3%) 中, 于 Triton X-100 (0.05%) 中透性化并用甲基紫 (0.02%) 染色。去除在过滤器上侧生长的非迁移细胞并且为迁移细胞拍照。使用 BioCoat Matrigel 小室进行侵袭测定。使用来自 ibidi (München, Germany) 的趋化小室和延时成像。使用 ImageJ 追踪细胞核的位置。

[0252] 磷酸肌醇分析

[0253] 在无肌醇的培养基中培养细胞 30min, 将无肌醇的培养基更换为补充了 [³H]-肌醇和透析血清 (10%) 的培养基。细胞培养 3 天, 冲洗并且于 1M HCl 中提取, 接着用 1M 甲醇提取。然后刮取细胞并于氯仿, 然后于甲醇 0.1M EDTA pH8.0 中提取, 并蒸发有机相。之后, 提取物去乙酰化, 使用两个串联的 partisphere SAX 柱 (Whatman) 和磷酸铵四步梯度 pH 6.0, 通过阴离子交换 HPLC (Agilent 1200) 分离。用在线流量闪烁分析仪检测放射性标记洗脱物并且使用 ProFSA 软件 (Perkin-Elmer) 量化。

[0254] 明胶酶谱法

[0255] 为检测 MMP-2 活性, 在 10% 聚丙烯酰胺 / 0.1% 明胶包埋凝胶上电泳分离生物样品。然后于 2.5% Triton X-100 中洗涤凝胶, 并且在 37°C 下于含有 0.2M NaCl、5mM CaCl₂、1 μM ZnCl₂、0.02% Brij 35 和 1mM 对氨基苯汞乙酸盐的 50mM Tris-HCl (pH 7.5) 中温育 36h。

[0256] 动物转移试验

[0257] 雌性 CB-17SCID 小鼠 (Harlan Laboratories, Haslett, MI; 15 只 / 组) 在脂肪垫内植入 MDA-MB-231 细胞 1.4 × 10⁶ 个细胞 / 只小鼠)。植入 2 周和 6 周后, 麻醉小鼠, 测量肿瘤大小并使用荧光双目镜目测淋巴结内的转移。对于肺部转移, 处死小鼠, 取出肺部、洗

涤,并使用荧光双目镜获取图像。用双侧费歇尔精确检验 (Two-sided Fischer's exact test) 分析淋巴结转移。肿瘤生长测量使用精确显著性 [2x1- 尾])Mann-Whitney 检验。

[0258] 试剂

[0259] 除非有指示,人重组生长因子和其它材料购自 Sigma(St. Louis, MO, USA)。用于免疫印迹的放射性物质和化学发光试剂盒从 Amersham(Buckinghamshire, UK) 获得。EGFR- 激酶抑制剂 AG1478、MEK 抑制剂 U0126 和 PI3K 抑制剂渥曼青霉素来自于 Calbiochem(San Diego, CA)。用于伤口愈合测定的板来自于 ibidi(Munich, Germany)。用于延时成像的 35-mm 玻璃底盘购自 MaTek(Ashland, MA)。在我们的实验室内生成 EGF 受体的鼠单克隆抗体 (mAb) 111.6。用于蛋白质印迹分析的抗 EGFR 来自于 Alexis(Lausen, Switzerland)。抗 Ras-GAP 和抗 AKT 抗体来自于 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)。抗 EEA1、抗 Rab5、抗 Rab4 和抗 Rac1 来自于 BD Transduction Laboratories(Franklin Lakes, NJ)。抗 SYNJ2mAb 来自于 Abnova(Taipei, Taiwan)。使用下列二次抗体:与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗兔 IgG 抗体购自 Jackson ImmunoResearch Laboratories(Bar Harbor, Maine)。德克萨斯红转铁蛋白 (Texas-red transferrin)、山羊抗小鼠 Alexa-488、Alexa-555 和 Alexa-647 二次抗体来自于 Invitrogen(Carlsbad, CA)。

[0260] siRNA 对照来自于“Thermo scientific Dharmacon”产品目录号 D-001810-10-05; 针对 SYNJ2 的 siRNA 序列如 SEQ ID NO:6-GGACAGCACUGCAGGUGUU 所示;所有 shRNA 均来自于 SIGMA Israel:shRNA 对照 - 产品目录号 SHC002;使用的针对 SYNJ2 的 shRNA 序列为 CC GGCCGGAAGAACAGTTTGTAGCAACTCGAGTTGCTCAAAGTCTTCCGGTTTTTG(SEQ ID NO:9)。

[0261] 细胞系和转染

[0262] 在补充了抗生素、胰岛素 (10 μ g/mL)、霍乱毒素 (0.1 μ g/mL)、氢化可的松 (0.5 μ g/mL)、热灭活马血清 (5% vol/vol) 和 EGF(10ng/mL) 的 DMEM:F12(1:1) 培养基中培养 MCF10A 细胞。在补充了 10%热灭活胎牛血清 (Gibco)、1mM 丙酮酸钠和青霉素 - 链霉素混合物 (100 单位/ml;0.1mg/ml;Beit Haemek, Israel) 的 RPMI-1640(Gibco BRL;Grand Island, NY) 中培养人乳腺 MDA-MB-231 细胞。MDA-MB-231-RFP 稳定细胞系是来自于 Prof. Hadasa Degani(The Weizmann Institute of Science, Israel) 的一种礼物。根据生产商的指导 (Roche, Mannheim, Germany), 使用 Fugen-HD 进行质粒转染。可选地,对于使用 siRNA 寡核苷酸的瞬时 mRNA 敲减实验,用 Oligofectamine(Invitrogen) 转染细胞。

[0263] 慢病毒载体和病毒生产

[0264] 按照生产商的指导 (Sigma), 在 HEK-293T 细胞中生成非靶向 shRNA 发夹 (对照) 和针对人 SYNJ2 的发夹。用补充了聚凝胺 (8 μ g/mL) 的 shRNA 编码慢病毒感染靶细胞,并且在嘌呤霉素 (2 μ g/mL) 的存在下培养 4 天。按照生产商的指导,使用 ViraPower 慢病毒表达系统 (Invitrogen) 进行人 SYNJ2 的稳定基因特异性递送。

[0265] 免疫荧光和图象处理

[0266] 在涂有纤连蛋白的盖玻片上培养细胞 48h。处理后,洗涤细胞,使用 0.02% Triton X-100 和 3%多聚甲醛透性化,并固定 20min。使用 Zeiss LSM-710 显微镜或转盘式显微镜 (Zeiss 100 $\times$, NA 1.45;Yokogawa CSU-22;Zeiss 全自动化、倒置 inverted 200M; Photometrics HQ-CCD 相机) 和固态激光器 (473、561 和 660nm, 曝光时间:0.25-1s), 在 Slidebook™的命令下进行共聚焦显微镜检查。每 70-300ms 沿 Z 轴,通过改变压电控制工作

台的位置（步长：0.1–0.4 μm ）获取 3D 图像栈。可选地，使用 DeltaVision 系统（Applied Precision, Issaquah, WA）进行活细胞荧光显微镜检查并且使用 priism 软件处理图像。

[0267] EGF 的放射性标记

[0268] 如下用 IODOGEN（非水溶性碘化试剂）标记人重组 EGF：使 EGF（5 μg ）在涂有 Iodogen 的管（1mg 试剂）内与 Na^{125}I （1mCi）混合。在 23°C 下温育 15min 后，添加白蛋白至 0.1mg/ml 的最终浓度，并且在 Excellulose GF-5 柱上分离混合物。

[0269] 受体下调测定

[0270] 每个时间点将 MDA-MB-231 细胞接种于 24 孔板上，一式三份，另外的孔接种用于对照。48h 后，使细胞饥饿 4h 并在 37°C 下用 EGF（2ng/ml）刺激指定时间间隔。随后，将其置于冰上，用结合缓冲液（DME 培养基、白蛋白 1%、Hepes 20mM，pH 7.5）冲洗一次，并且经受弱酸 / 盐洗涤（0.2M 醋酸钠缓冲液 pH 4.5，0.5M NaCl）以去除表面结合的 EGF。之后，在 4°C 下用放射性标记 EGF 培养细胞 1.5h 并用结合缓冲液冲洗。用放射性标记 EGF 和过量的未标记 EGF 培养对照。最后，用 1M NaOH 裂解细胞，并使用 γ - 计数仪测定放射性。数据表示相对于时间 0，细胞表面上受体的百分比。

[0271] 表面 EGF- 受体的测定

[0272] 在 24 孔板上接种细胞（ 2×10^4 个 / 孔），一式三份，另外的孔接种用于对照。之后，在 4°C 下用放射性标记 EGF 培养细胞 1.5h 并用结合缓冲液冲洗。用放射性标记 EGF 和过量的未标记 EGF 培养对照孔。最后，用 1M NaOH 裂解细胞并测定放射性。数据表示相对于对照细胞，所述细胞表面上受体的百分比。

[0273] 免疫印迹分析

[0274] 用冰冷盐水简单地洗涤细胞，并且于缓冲洗涤剂溶液（25mM HEPES（pH 7.5）、150mM NaCl、0.5% Na-脱氧胆酸盐、1% NP-40、0.1% SDS、1mM EDTA、1mM EGTA、0.2mM Na_3VO_4 和按 1:1000 稀释的蛋白酶抑制剂混合物）刮取细胞。为了凝胶上样相等，使用 BCA（Pierce）试剂测定蛋白质浓度。凝胶电泳后，将蛋白质转移到硝化纤维素膜上。膜于含 10% 低脂奶的 TBST 缓冲液（0.02M Tris-HCl（pH 7.5）、0.15M NaCl 和 0.05% 吐温 20（Tween 20））中封闭，沾一次抗体 1h，用 TBST 洗涤并且用与 HRP 偶联的二次抗体温育 30min。

[0275] 伤口愈合（刮伤）测定

[0276] 根据生产商的方法（iBidi, Germany）进行伤口愈合测定。简言之，MCF10A 细胞胰蛋白酶化，重新悬浮于缺乏 EGF 的培养基（ 7.0×10^5 个细胞 / mL）中并向每个孔接种 70 μl ，24h 内产生汇合层。之后，通过使用无菌镊子取出培养插件并且使细胞迁移 2h。

[0277] 扫描和透射电子显微镜术

[0278] 于补充了 4% 多聚甲醛和 2% 蔗糖的盐水中固定细胞。洗涤样品并经受第二种固定液（于补充了 1% 蔗糖和 5mM CaCl_2 的 0.1M 二甲胍酸盐缓冲液中的 3% 多聚甲醛和 2.5% 戊二醛，pH 7.4）。于 0.1M 二甲胍酸盐缓冲液中洗涤细胞并且用 1% 于二甲胍酸盐缓冲液中的四氧化锇后固定 1h。对于扫描电子显微镜术（SEM），洗涤后固定样品两次并用 1% 鞣酸处理 5min，接着再次洗涤并用 1% 乙酸铀酰处理 30min。样品于分级乙醇中脱水，并且通过用金 - 钼合金膜溅射使样品具导电性。使用扫描电子显微镜（Leo Supra 55/Vp Zeiss, Thornwood, NY）为样品拍照。

[0279] 受体再循环测定

[0280] 在 37℃ 下用 Alexa Fluor 488- 转铁蛋白 (25 μ g/ml 于无血清培养基中) 预培养 MDA-MB-231 细胞 30min 或用 Alexa Fluor 488-EGF (40ng/mL) 预培养 10min。通过在 4℃ 下于酸性缓冲液 (150mM NaCl、1mM MgCl₂、0.125mM CaCl₂、0.1M 甘氨酸) 中培养 30min 分离表面结合的配体, 之后转移到 37℃ 下指定时间间隔, 以允许内化配体再循环。通过成像或通过 FACS 分析细胞。

[0281] 实时细胞阻抗分析

[0282] 使用 RTCA-Xcelligence 系统 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 记录对细胞扩散和粘着的测量。于盐水中洗涤金微电极 E-plates-16 一次。先接种细胞 (2,500 个/孔), 再在指定间隔记录阻抗数据 (细胞指数; 按照测得电阻抗的相对变化推导)。使用生产商提供的软件包 1.2 分析数据。

[0283] TAPP1-PH 结构域表达和纯化

[0284] 将编码 TAPP1-PH 结构域及 N 端 Flag 标签和 C 端 6xHis 标签的构建体 (SEQ ID NO.: 13, 图 18) 克隆到 pET28 质粒中并且在用 200 μ M IPTG 培养后, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达。在 15℃ 下培养细菌, 然后用细胞破碎仪裂解。通过离心去除细胞碎片并且在经 50mM Tris pH 8、0.5M NaCl 和 20mM 咪唑平衡的 Ni 柱 (HisPrep FF 16/10, GE Healthcare) 上捕获蛋白质。在含有 0.5M 咪唑的相同缓冲液中洗脱蛋白质。将含有 TAPP1-PH 结构域的部分注入经含有 50mM Tris pH 8 和 100mM NaCl 的缓冲液平衡的尺寸排阻柱 (HiLoad_26/60_Superdex 75, GE Healthcare) 中。用 20mM 磷酸钠缓冲液 pH 7.2 稀释含 TAPP1-PH 结构域的汇集峰值部分 3 倍并载入经相同磷酸盐缓冲液平衡的阳离子交换柱 (HiTrap_SP_FF_5ml, GE Healthcare) 上。用线性梯度的含 1M NaCl 的磷酸盐缓冲液从柱上洗脱纯蛋白 (TAPP1-PH 结构域在 200mM NaCl 时洗脱)。将通过 SDS-PAGE 评定含纯 TAPP1-PH 结构域的部分汇集在一起并且通过布拉德福试剂 (Bradford reagent) 和 OD₂₈₀ (消光系数为 20,520) 量子化测定蛋白质浓度。将蛋白质分成等分试样, 用液氮速冻并储存在 -80℃ 下。

[0285] SYNJ2 的 5' 磷酸酶活性

[0286] 根据荧光偏振, 通过竞争测定法记录对 SYNJ2 水解来自 PI (3, 4, 5)P3 的 5- 磷酸生成 PI (3, 4)P2 的能力的测量, 作为读出。在玻璃管中, 添加 100 μ l 的 SOPS (Avanti Inc., 50mg/ml 于氯仿中) 和 50 μ l 胆固醇 (Sigma Aldrich, 10mg/ml 于氯仿中) 制备稳定化 SOP 脂质混合物 (x50)。使用温和氮蒸汽蒸发氯仿, 风干混合物。然后在室温下通过 1min 涡旋, 使经蒸发的脂质混合物重新悬浮于 10ml 的 0.25mg/ml C₁₂E₈ (Avanti Inc.) 中。反应混合物包含 PBS、DTT、MgCl₂ (全部来自于 Sigma Aldrich)、SOP 脂质混合物 (x50)、全长纯化 SYNJ2 (OriGene, 产品目录号 TP315160) 和 PI (3, 4, 5)P3 (Echelon Bioscience, 产品目录号 P-3908), 有或无试验化合物。一旦添加 PI (3, 4, 5)P3, 就在 33℃ 下温育反应混合物 8min 以允许通过 SYNJ2 5'- 磷酸酶活性生成 PI (3, 4)P2。温育后, 通过添加包含 PBS、DTT、检测蛋白 (TAPP1 的 PH 结构域)、SOP 脂质混合物 (x50)、经荧光标记的 PI (3, 4)P2 (Echelon Bioscience, 产品目录号 C34M6) 和 EDTA (Sigma Aldrich) 的检测混合物终止反应。使用适当的酶标仪和设置与 BODIPY® TMR 染料相容的滤波器 (550nm 激发 / 580nm 偏振发射滤波器) 测量荧光偏振。未标记的 PI (3, 4)P2 对照购自 Echelon Bioscience (产品目录号 P-3408)。

[0287] 实施例 2

[0288] EGF 诱导的 SYNJ2 表达升高促进乳腺细胞侵袭

[0289] 用 EGF 家族配体培养时,人乳腺上皮细胞 (MCF10A) 表现出强烈的迁移和侵袭表现型 (图 1A 和 1B),但是用血清处理不足以推进细胞运动。EGF 连同 EGFR(AG1478)、MEK(U0126) 或 PI3K(渥曼青霉素) 的抑制剂一起共同培养降低了运动性 (图 1C),表明 MEK/ERK 和 PI3K 活性对于 EGF 诱导的迁移必不可少。重要的是,EGF 诱导的运动表现型与 425 个基因的转录上调相关联 (Amit 等,2007)。为鉴定推进转移的基因,使该基因集与体内选择乳腺癌细胞的转移性亚克隆期间经历上调的较大基因集交叉 (Minn 等,2005)。23 个重叠基因的组 (图 1D) 包括编码突触囊泡磷酸酶 -2(SYNJ2),神经胶质瘤细胞侵袭所涉及的一种脂质磷酸酶的基因 (Chuang 等,2004)。通过 PCR 和免疫印迹验证 EGF 诱导的 SYNJ2 上调 (图 2A 和 2B)。

[0290] 接下来,转化并亚克隆 MCF10A 细胞以稳定地过表达 SYNJ2(作为 GFP 融合物;SYNJ2-OX,图 1E)。当接种于缺乏 EGF 的培养基时,SYNJ2-OX 细胞表现出特征在于膜边缘波动 (图 2C),连同基本和 EGF 诱导的迁移和侵袭能力增强的迁移前表现型 (图 2D 和 2C)。相反,使用小干扰 RNA(siRNA;图 1G) 敲减 SYNJ2 显著减少了细胞侵袭,以及单独和集体迁移 (图 2E、1H 和 1J)。总之,EGF 诱导的 SYNJ2 上调驱动了乳腺细胞的稳健侵袭表现型。

[0291] 实施例 3

[0292] SYNJ2 的磷酸酶活性对于乳腺细胞的侵袭性必不可少

[0293] 为使体内实验成为可能,用高转移性 MDA-MB-231 乳腺癌红色荧光蛋白 (RFP) 表达细胞生成过表达 SYNJ2 或 LacZ(对照) 的亚克隆,以及表达 shControl 或 SYNJ2 特异性发夹 (shSYNJ2;图 3A) 的亚克隆。SYNJ2 的表达增强在 2D 培养 (图 3B) 中赋予了细长形态,并且在 3D 培养 (图 4A) 中培养细胞时赋予了广泛的侵袭臂。相反,SYNJ2 敲减消除了侵袭模式 (图 4B)。类似地,过表达使侵袭能力增强~3.2 倍 (图 3B),而敲减 (图 3C) 抑制迁移和侵袭 (图 3D)。为检查磷酸酶催化活性的作用,使用具有编码 WT SYNJ2 或在磷酸酶/核酸酶结构域 (Pfam:PF03372) 内每个保守 WXGDXN(F/Y)R 基序 (Jefferson 和 Majerus,1996) 中隐匿有点突变的催化死亡形式 (D388A 和 D726A;图 4C) 的慢病毒颗粒的 shSYNJ2 细胞。与 WT SYNJ2 不同,突变体重新表达不能恢复侵袭能力 (图 4D),表明 SYNJ2 的磷酸酶活性对侵袭表现型必不可少。

[0294] shSYNJ2 细胞不能迁移进一步受扫描电子显微镜术 (图 4E) 和 F-肌动蛋白染色支持,其揭示了肌动蛋白组织严重缺陷和细胞高度增加 (图 4F)。重要的是,还注意到在圆形部分周围簇集的肌动蛋白补丁 (图 4F;箭头)。相应地,shSYNJ2 细胞的延时显微镜分析确认了细胞内异常囊泡的存在,表明 SYNJ2 敲减使囊泡运输脱轨。接下来,检查了 SYNJ2 的亚细胞定位。表达 GFP-SYNJ2 的 MDA-MB-231 细胞的延时图像 (图 3E) 以及使用抗 SYNJ2 抗体的免疫荧光 (图 3F),反映了 SYNJ2 分布的两种主要模式:定位于前缘的小外周组件 (图 3E 中的黑色箭头) 和第二群更靠近细胞中心定位的较大组件 (蓝色箭头)。显著地,用 EGFR 配体 (TGF- α) 刺激 MDA-MB-231 细胞后不久,SYNJ2 迅速在新出现的板状伪足的基部,在形成的前缘下方装配 (图 3E、3F)。有趣的是,用 MCF10A 细胞进行的类似分析表明 SYNJ2 最初与 F-肌动蛋白共同定位在细胞间连接处,但是在用 EGF 刺激后易位到前缘,通常易位到板状伪足基部 (图 3G)。总之,这些观察资料表明生长因子不但调节 SYNJ2 表达水平,而且调节其向前缘的动态募集。

[0295] 实施例 4

[0296] SYNJ2 向腹侧膜的募集取决于发动蛋白和 Rac1

[0297] 为研究 SYNJ2 定位位点的动力学特性,生成稳定表达 GFP-SYNJ2MDA-MB-231 亚克隆(GFP-SYNJ2 细胞)并分析 GFP-SYNJ2 斑点的形成和消耗。将这些斑点分为动力学上不同的亚群:定位到边缘波动膜的动态斑点和定位到靠近细胞中心的离散区域的斑点(图 5A)。显著地,GFP-SYNJ2 斑点显示出与 RFP- 网格蛋白轻链 A(图 5A)或 RFP- 小窝蛋白 1(图 6A)标记的组件的最小重叠,表明较少定位到网格蛋白有被小窝或细胞膜穴样内陷。重要的是,新形成的外周斑点预示初生板状伪足,因为其在局部形成板状伪足之前出现。相反,与肌动蛋白共同定位的更多中心和稳定的斑点簇持续~30min(图 5B)。相应地,追踪单独组件(图 6B;左)揭示非常广泛的寿命分布:短寿命(~20-40s,60%的组件)、中间寿命和长寿命组件(~10%的组件)。中间组起始后荧光强度不断增大,而组件在运动方面保持静止(图 6B;右)。这种动态模式类似于网格蛋白有被小窝(Ehrlich 等,2004)并且表明了运输中间体的形成和消耗。

[0298] 在采用落射荧光(红色;对维数 Z 的变化相对不敏感)和全内反射显微术(TIRF,绿色;限于~200nm 深度)的实验中,通过荧光信号的同步出现和消失加强腹侧膜处 GFP-SYNJ2 的主要双峰区域化。因为斑点在其整个寿命期呈黄色(图 5C),所以本发明人推断 SYNJ2 装配在腹侧质膜的平面上。采用一组抑制剂,发现组件明显受胆固醇损耗抑制(图 6C;左),表明 SYNJ2 募集到腹侧膜需要富胆固醇的膜微结构域。渥曼青霉素诱导类似抑制效应(图 6C;右),表明了对 PI3K 的作用。采用 Dyngo-4a,一种发动蛋白抑制剂揭示了另一种需要,介导网格蛋白依赖性和网格蛋白非依赖性载体的分离步骤并且其抑制导致 U 形内陷中间体积聚的大 GTP 酶(Macia 等,2006)。因为 Dyngo-4a 强有力地将 SYNJ2 的动态组件阻止在质膜处(图 5D),所以本发明人推断 SYNJ2 募集到受发动蛋白调节的初生运输中间体上。因为已经暗示发动蛋白为细胞迁移和侵袭的促进因子(Kruchten 和 McNiven,2006),所以测试了其 SYNJ2 的物理相互作用。该实验确认活性发动蛋白和 SYNJ2 之间的复合物形成(图 5E),对于发动蛋白而言与在胞吞作用和基于肌动蛋白的迁移中的扩展作用一致。

[0299] SYNJ2 可与载 GTP 的 Rac1 物理性相互作用(Malecz 等,2000),并且诱导性激活 Rac1 需要内化和后续再循环(Palamidessi 等,2008)。因此,测试了 SYNJ2 外周斑点与 Rac1 的重合。实际上,对内源 Rac1 的免疫染色揭示了与 GFP-SYNJ2 外周斑点的共同定位(图 5F)。而且,抑制向 Rac1 的 GTP 负载(使用 NSC-23766)明显减少了 GFP-SYNJ2 斑点的数量(图 5G)。互补地,SYNJ2 敲减降低了 MDA-MB-231 细胞中载 GTP 的 Rac1 水平(图 5H)。根据在将 SYNJ2 募集到膜上时,对 Rac1 和肌动蛋白细胞骨架的调节作用,用拉春库林抑制肌动蛋白动力学特性消除了 GFP-SYNJ2 动力学特性(图 6D)。总之,这些结果将外周 SYNJ2 组件与取决于胆固醇、3'-磷酸肌醇、肌动蛋白和活性 Rac1 的发动蛋白介导的胞吞途径联系起来。显著地,该途径与使得在迁移性成纤维细胞前缘处,快速膜和粘着物周转成为可能的网格蛋白非依赖性载体共有几种属性(Howes 等,2010)。

[0300] 实施例 5

[0301] SYNJ2 控制细胞表面受体的囊泡运输

[0302] 虽然经 EGF 处理的 shSYNJ2-MCF10A 细胞相对于对照细胞显示出较高的总 EGFR 和磷酸化 EGFR 水平,这转化成 ERK 低而非高度激活(图 7A)。沿着这样的思路,注意到 SYNJ2

敲减将 EGFR 捕集于扩大的细胞内囊泡中 (图 7B)。与捕集一致,MDA-MB-231 细胞的免疫印迹类似地揭示,在 siSYNJ2 细胞中 EGFR 水平稳定 (图 8A),但是使用两种方法对表面 EGFR 的量化显示出明显更低的表面水平 (图 8B)。EGFR 的细胞内捕集带来功能结果:与其良好表征的趋化功能一致 (Mouneimne 等,2006;van Rheenen 等,2007),EGFR 定位到乳腺细胞前缘,但是 shSYNJ2 细胞的 EGFR 失去其极化分布并积聚在大的肌动蛋白装饰囊泡内 (图 8C)。显著地,可通过 WT SYNJ2,但不是催化死亡形式挽救在 shSYNJ2 细胞中观察到的 EGFR 运输缺陷 (图 7C),表明 SYNJ2 的磷酸酶活性对 EGFR 向和从前缘的囊泡运输至关重要,在前缘其介导对 EGF 梯度的趋化反应。与这种模型一致,shSYNJ2 细胞严重丧失沿 EGF 梯度迁移的能力 (图 8D)。

[0303] EGFR 在 SYNJ2 缺乏型细胞内的异常积聚可以反映 EGFR 递送、受阻再循环或降解分选受损、受泛素化调节的过程上的缺陷 (Goh 等,2010)。与受损分选一致,SYNJ2 缺乏型细胞表现出明显更高的基本 EGFR 泛素化,这响应于 EGF 仅微弱改变 (图 8E 和 7D)。此外,尽管通过磷酸化酪氨酸 1045 (泛素连接酶 c-Cbl 的停泊位点;图 8F) 标记进行降解,但是 EGF 刺激实验确认在 shSYNJ2 细胞中正常激活 (酪氨酸 1068 磷酸化),但降解有缺陷 (图 8G)。为解决再循环缺陷,采用荧光配体跟踪转铁蛋白受体 (TfR) 的广泛再循环,以及 EGFR 较弱的再循环。虽然 TfR 内化不受影响,但是在 shSYNJ2 细胞中再循环明显降低,并且相反,在 SYNJ2-0X 细胞中明显加速 (图 8H 和 7E)。同样,流式细胞术分析表明荧光 EGF 的再循环有缺陷 (图 8I),并且干细胞成像确认了在 SYNJ2 缺乏型细胞的大囊泡内配体积聚。总之,这些结果表明 SYNJ2 对于 EGFR 和 TfR 的适当再循环必不可少。

[0304] 实施例 6

[0305] SYNJ2 敲减扰乱磷酸肌醇脂质的体内平衡并且改变胞吞作用和粘着

[0306] 胞吞系统保持了几个由特定磷酸肌醇 (PI) 限定的不同隔室 (Gruenberg 和 Stenmark,2004),并且本分析揭示了对 SYNJ2 的强依赖性。例如,通过探测 EEA1 的初级内体,一种 PI (3)P- 结合剂,发现其空间结构在 SYNJ2 缺乏型细胞中明显改变 (图 9A)。类似地,使用 GFP 标记的 Rab4 探测再循环隔室,揭示了与 shSYNJ2 细胞的环状肌动蛋白补丁的强烈关联 (图 10A)。初级内体另一种标志物 Rab5 的分布也反映了对 SYNJ2 的依赖性 (图 10B)。然而在 shSYNJ2 缺乏型细胞中 Rab5 阳性囊泡的数量明显更低,其平均尺寸增大并且其部分定位到环状肌动蛋白补丁处 (图 9A)。为揭示磷酸肌醇的根本改变,比较了经生物合成标记的 shCtrl 和 shSYNJ2 MDA-MB-231 细胞,之后提取其磷酸肌醇 (图 10C)。结果显示,主要是 PI (3)P,但还有 PI (4,5)P₂和 PI (3,5)P₂在 shSYNJ2 细胞中以较高水平存在,而 PI (4)P 水平保持不变并且通过这种方法很难检测 PI (3,4)P₂和 PI (3,4,5)P₃的水平。虽然这些结果确认了 SYNJ2 主要靶向 PI 的 D5 位置的想法,但是本发明人假定观察到的相当有限的效应表示较大的局部差异。总之,这些观察资料再次确认 SYNJ2 控制在初级内体以及后续再循环步骤的货物分选。

[0307] 随着 RTK 如 EGFR 再循环,整联蛋白的囊泡运输及其与下游伴侣例如桩蛋白的相互作用在细胞迁移和粘着斑 (FA) 突变中起重要作用 (Guo 和 Giancotti,2004)。相应地, β -1 整联蛋白和磷酸化 -EGFR (pEGFR) 定位到 MDA-MB-231 细胞的 FA 处。相反,由于在大囊泡内异常积聚,两种蛋白都难以定位到 SYNJ2 缺乏型细胞的外周 (图 10D、S5B 和 S5C)。而且,使用桩蛋白作为成熟 FA 的标志,发现 FA 在 shSYNJ2 细胞中呈现圆形且相对较短的外观 (图

9D)。总的来说,这些观察资料暗示底物粘着需要 SYNJ2,这是通过使用两种方法测量细胞扩散审查的情况(图 10E 和 10F)。结果证明 shSYNJ2 细胞的粘着力减弱,这归因于整联蛋白和 RTK 向 FA 的递送有缺陷。

[0308] 实施例 7

[0309] SYNJ2 调节侵袭伪足的装配

[0310] MDA-MB-231 细胞基于基质的 3D 培养一般显示出楔形突出,但是 shSYNJ2 细胞显示出圆形伸出部分(图 11A),表明基质降解有缺陷。为测试这一点,获得 MMP-9 的共聚焦免疫荧光图像,并且注意到 shSYNJ2 球体显示 MMP-9 丰度在其边界处相对急剧降低(图 11A),这很可能是由于分泌削弱。实际上,对条件培养基进行的明胶酶谱测定确认经 siSYNJ2 寡核苷酸处理的细胞的 MMP-9 分泌有缺陷,但是 MMP-2 分泌保持不变(图 12A)。相反,以过表达 SYNJ2 的细胞为条件的培养基显示 MMP-9 活性大幅提高(图 11B),与 MMP 分泌中涉及 SYNJ2 一致。

[0311] 为可视化焦点蛋白水解,将细胞接种在交联荧光明胶上并探测称为侵袭伪足的以肌动蛋白为中心的基质降解细胞器(Murphy 和 Courtneidge, 2011)。根据先前报道,活性基质蛋白水解与定位于细胞体下面的肌动蛋白点相对应。重要的是,SYNJ2-GFP 斑点与这些结构共同定位(图 11C,箭头),这类似于图 5B 中呈现的肌动蛋白关联的长寿命斑点。SYNJ2 的表达水平与侵袭伪足出现明显相关;而 SYNJ2 过表达使含侵袭伪足的细胞几乎翻倍,siSYNJ2 显著降低了侵袭伪足的发生率(图 11D),暗示了因果关系。接下来,检查了 SYNJ2 和侵袭伪足良好表征的标志皮动蛋白之间的潜在物理性关联并且发现 SYNJ2 和皮动蛋白共免疫沉淀(图 12B),以及共同定位到侵袭伪足和前缘(图 12C)。为牢固确定对 SYNJ2 的驱动作用,观察 TKS5, PI (3, 4)P₂和用作侵袭伪足标志物的皮动蛋白结合剂(Courtneidge 等, 2005)。不出所料,内源 TKS5 定位到对照 MDA-MB-231 细胞内基质降解的多个腹侧位点,但是在 siSYNJ2 细胞内几乎未发现活性位点,并且 TKS5 失去其腹侧位置(图 6E; X-Y 和 Z 组)。此外,因为侵袭伪足 TKS5 锚定在 PI (3, 4)P₂上(Oikawa 等, 2008),所以将 PI (3, 4)P₂结合结构域,即 Tapp1 的 PH 结构域用作探针。与先前报道一致,PH 结构域的异位表达减少了侵袭伪足的数量,然而其余信号与 TKS5 和肌动蛋白核共同定位(图 12D)。总之,SYNJ2 似乎在先于 TKS5 接合的步骤不可缺少,与分别生成 PI (3, 4, 5)P₃,再生成 PI (3, 4)P₂,以将 TKS5 锚定在 PI3K 的 EGFR 诱导活化位点的 PI3K(Yamaguchi 等 2011)和 SYNJ2 顺次作用一致。

[0312] 与 EGFR-PI3K-SYNJ2 情况一致,在具蛋白水解活性的侵袭伪足中检测到 EGFR(pEGFR)活性形式,但是 SYNJ2 缺乏型细胞的 EGFR 定位到肿胀囊泡(图 11F)。造成局部受体活化的机制仍未知。根据一种模型,通过包含 MMP-7 和 CD44 的复合物裂解前配体例如肝素结合 EGF(HB-EGF),可能局部刺激 EGFR(Yu 等, 2002)。与这种模型一致,SYNJ2 丰度与 EGFR 配体的分泌相关(图 11G),并且检测到 CD44 与侵袭伪足的肌动蛋白核共同定位(图 12E)。同样,使用流式细胞术,发现相对于对照细胞,在 shSYNJ2 细胞中 CD44 的表面表达受强烈抑制(图 12F)。侵袭伪足突变的另一关键步骤是激活可溶性 MMP 的膜 1 型基质金属蛋白酶(MT1-MMP)的募集(Wang 和 McNiven, 2012)。相应地,发现在对照细胞中 MT1-MMP 与侵袭伪足突出位点相对应,但是 siSYNJ2 细胞的 MT1-MMP 分子形成与基质降解无关的大聚集体(图 9E)。总的来说,这些观察资料暗示 SYNJ2 对侵袭伪足引发以及使两种蛋白酶和

先前未识别的两种驻留物 CD44 和活性 EGFR 靶向这种细胞器必不可少。

[0313] 实施例 8

[0314] 在哺乳动物模型中 SYNJ2 促进肿瘤生长和转移扩散

[0315] 为评估 SYNJ2 对体内转移性传播的影响,将 MDA-MB-231-RFP 细胞(和衍生细胞)植入雌性小鼠的乳腺脂肪垫内,并且在 2 或 6 周后测量肿瘤大小(图 13A)和转移(图 13B)。相对于 shSYNJ2 和‘非活性救援’(shSYNJ2+SYNJ2^{CD})组,在 shCtrl 和 shSYNJ2+SYNJ2^{WT}(‘活性救援’)组中原发性肿瘤生长明显更快。转移性行为类似地与 SYNJ2 相关:shSYNJ2 和‘非活性救援’组显示向局部和远侧淋巴结的转移扩散明显减少(图 13B 和 14)。为了检查远侧转移,处死小鼠并评价其肺部。与接种了 shCtrl 或‘活性救援’细胞的动物相比,植入了 shSYNJ2 细胞或‘非活性救援’细胞的动物的肺部显示在转移数量和大小上显著减小(图 13C)。总之,这些结果使 SYNJ2 涉及转移促进。

[0316] 类似地,监测过表达 SYNJ2 的异种移植物。不出所料,SYNJ2-0X 细胞产生增长更快的肿瘤(图 13D),并且还显示淋巴结转移更早开始(图 13E)。与稳健的淋巴侵袭一致,植入了 SYNJ2-0X 细胞的动物的肺部显示转移数量增加(图 13F)。接下来,检验 SYNJ2 对内渗或外渗的影响。因此,向雌性小鼠的循环(尾静脉)直接注射 MDA-MB-231-RFP 细胞的亚克隆并对肺部定植(外渗)评分,或将其植入脂肪垫并且在血液中作为循环肿瘤细胞(CTC;内渗)评分。注意这些实验考虑到了各原发性肿瘤之间的大小差异。归一化结果表明 SYNJ2 对于内渗($p = 0.0031$)和外渗($p = 0.0082$;图 13G)而言不可缺少。使用 GFP-SYNJ2 过表达细胞进一步检验了这个结论(图 13H)。显著地,在该实验中获得的内渗结果显示统计显著性,但是 SYNJ2-0X 细胞更好地外渗和定植远侧器官的能力未达到显著性,表明观察到的 SYNJ2 对局部和远侧转移的强烈影响主要是由于向淋巴和血管的内渗增强。

[0317] 实施例 9

[0318] SYNJ2 与侵蚀性人乳腺肿瘤相关

[0319] 为解决 SYNJ2 与人类癌症的相关性,在 60 个人类癌细胞系的 NCI-60 组中分析了 SYNJ2 的转录水平。与对运动表现型的贡献一致,发现 SYNJ2 的高转录产物水平与间充质表现型相关。接下来,为一组 331 个乳腺癌 NJ2 石蜡包埋样品免疫染色(图 16A)。重要的是,SYNJ2 的表达强度与由 HER2 过表达($p < 0.001$)和/或缺乏雌激素受体($p < 0.001$)定义的预后不利分型呈正相关。然而,在 SYNJ2 丰度与年龄、组织学分型、腋淋巴结状态和分化程度之间未发现显著关联。有趣的是,SYNJ2 的染色模式也改变;而 HER2+ 肿瘤显示主要为膜染色,管腔和三阴性肿瘤显示胞浆染色(图 16B)。为支持所述发现,在两个乳腺癌样本组群中分析 SYNJ2 mRNA 水平并且以更短的患者存活率发现关联(图 16C)。总而言之,这些观察资料支持在乳腺癌进展中涉及 SYNJ2,但使得在转录产物上调之后的机制悬而未决。

[0320] 总之,在动物中所做的观察,连同临床数据和体外实验一起,清楚地表明肌醇脂质受 SYNJ2 的脱磷酸作用对于转移过程至关重要,主要是由于磷酸肌醇在细胞表面分子向和从侵袭伪足和前缘的运输中所起到的主要作用。下面介绍了一种工作模型(图 15)并且讨论了 SYNJ2 在广泛的肿瘤进展情况下的多种功能。

[0321] 实施例 10

[0322] SYNJ2 的 5' 磷酸酶活性的选择性抑制剂

[0323] 为了鉴定 SYNJ2 磷酸酶活性的选择性抑制剂,本发明人利用荧光偏振竞争测定

法,其依靠分子在空间上不断旋转和移动,但是一旦与另一较大元件(例如,蛋白质)结合,其运动就受到极大限制的原理。可使用呈未结合状态,产生极低偏振读数的荧光分子(即,探针)检测和测量运动上的这些变化,但是向溶液中添加结合这些分子的检测剂(例如,结合蛋白)时,荧光分子在增大溶液中的偏振读数的受限组合物中稳定(见图 17A)。

[0324] 在进行的筛选中,本发明人测量了在不同化合物的存在下,SYNJ2 为 PI (3, 4, 5,) P3 的 5' 位置脱磷酸以生成 PI (3, 4)P2 的酶活性。一旦酶促反应完成/停止,就将含有 PI (3, 4)P2 产物的溶液与 PI (3, 4)P2 结合蛋白(检测剂)和荧光 PI (3, 4)P2(探针)的混合物混合。所用的检测剂蛋白为选择性结合 PI (3, 4)P2 (SEQ ID NO. :15) 的 Tapp1 纯化 PH 结构域。正如图 17B 所展示,该测定法中测得的偏振值在由通过 SYNJ2 酶活性生成的未标记 PI (3, 4)P2 置换结合的荧光 PI (3, 4)P2 荧光探针时减小并且溶液中未结合的荧光探针的量增加。

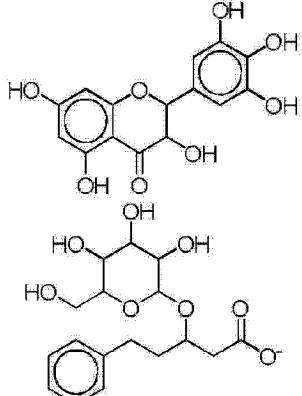
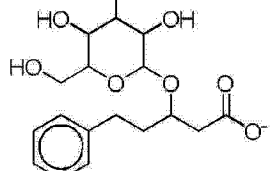
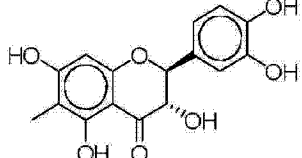
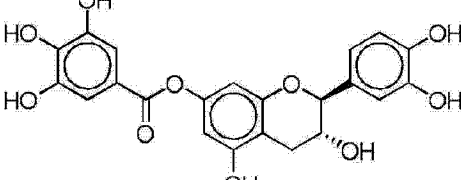
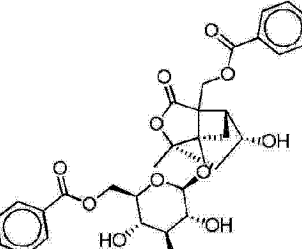
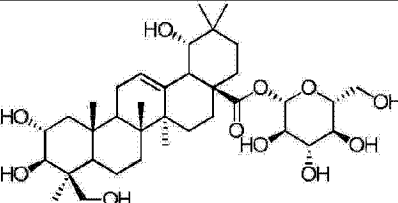
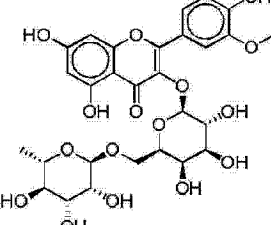
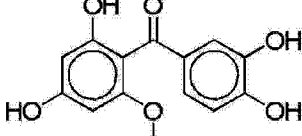
[0325] 下面表 2 描绘了使用这种方法鉴定的能够抑制 SYNJ2 生成 PI (3, 4)P2 的各种化合物。

[0326] 表 2 :鉴定的 SYNJ2 选择性抑制剂

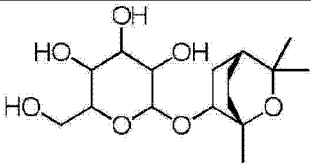
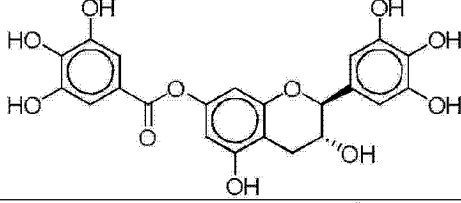
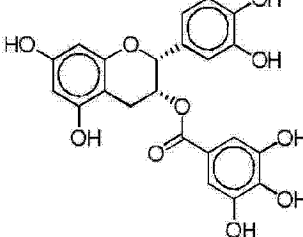
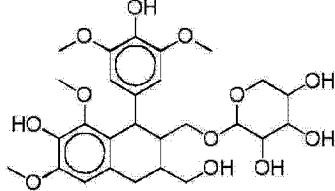
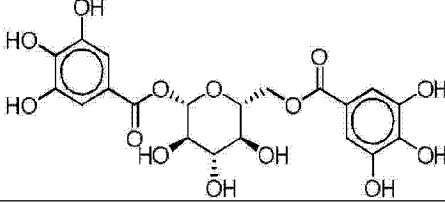
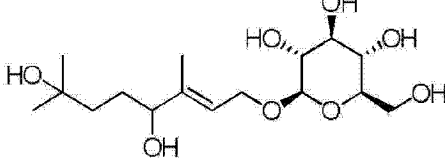
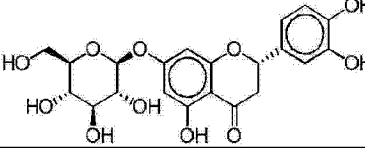
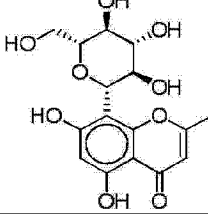
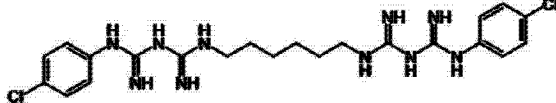
[0327]

编号	AnalytiCon [®] 品目录号 [化学文摘登]	化合物名称	IC50 (μ M)	结构
----	--	-------	--------------------	----

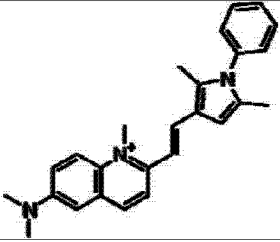
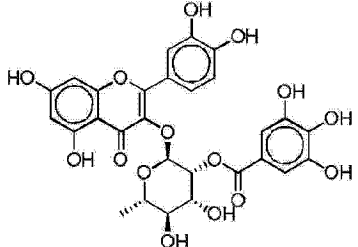
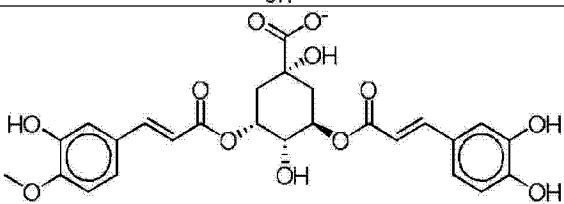
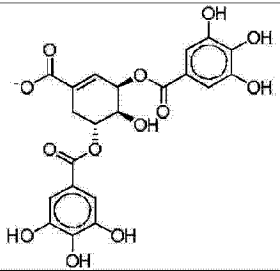
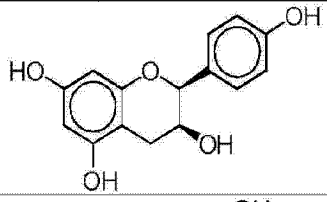
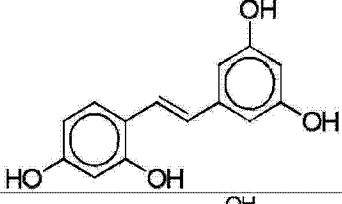
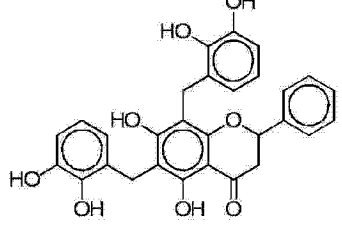
[0328]

	记号]			
1	NP-001872	白藜素 (Ampelopsin)	3.17	
2	NP-003195	3-羟基-5-苯基 戊酸 3-D-吡喃 葡萄糖苷	1.87	
3	NP-012228	6-甲基二氢榧 皮素 (Cedeodarin)	2.19	
4	NP-014109	(-)-八茶素-7-没 食子酸酯	3.44	
5	NP-015304	Paeonivayin	6.02	
6	NP-003491	绢毛榄仁苷 (Sericoside)	3.52	
7	NP-000303	铃兰黄酮苷 (Keioside)	3.4	
8	NP-005201	2,4,3',4'-四羟 基-6-甲氧基-二 苯甲酮	2.84	

[0329]

9	NP-001585	2-羟基-1,8-桉 树脑-吡喃葡萄 糖苷	1.98	
10	NP-014110	(-)-没食子儿茶 素-7-没食子酸 酯	1.075	
11	NP-002326	(-)-表儿茶素-3- 没食子酸酯	2.88	
12	NP-000360		1.67	
13	NP-002973	1,6-二没食子酰 葡萄糖	7.53	
14	NP-015222	3,7-二甲基-2- 辛烯-1,4,7-三元 醇 1-β-D-吡喃 葡萄糖苷	1.24	
15	NP-000181	Pyracanthoside	0.874	
16	NP-008708	异双花母草素 (Isobiflorin)	2.71	
17	[CAS: 55-56-1]	洗必泰 (Chlorhexidine)	10	

[0330]

18	[CAS: 3546-41-6]	恩波维铵 (Pyrvinium pamoate)	1.25	
19	NP-003299	没食子酰基槲 皮素苷	2.94	
20	NP-013254	4'-O-甲基-3,5- 二-O-咖啡酰奎 宁酸	3.17	
21	NP-012429	3,5-二-O-没食 子酸莽草酸	3.75	
22	NP-002325	表阿夫儿茶精 (Epiarfelechin)	15.9	
23	NP-003143	氧化白藜芦醇 (Oxyresveratrol)	6.65	
24	NP-012649	6,8-二-(2,3-二 羟基苄基)- 生 松素	10.3	

[0331] 讨论

[0332] SYNJ2 作为细胞迁移和肿瘤转移的主要综合调节因子的功能得以证明,很可能是由于其能够控制起第二信使和决定特定膜子结构域的同性的标志物作用的 PI 磷脂的水平。对 SYNJ2 作用多样性的另一反映是向侵袭伪足和板状伪足主要为双峰腹侧定位。相应地,SYNJ2 与肌动蛋白动力学特性的主要调节因子(例如,发动蛋白、皮动蛋白和 Rac1)形成

物理复合物。了解 SYNJ2 作用的一个关键是控制胞吞运输的能力。质膜不断供给基于肌动蛋白的突出的部分在囊泡内的频繁包装推进细胞迁移 (Ridley, 2011)。板状伪足的 SYNJ2 表现出显著活力 (图 3B), 并且活细胞成像暗示 SYNJ2 募集标记了新板状伪足形成的位点。因为位于前缘的 SYNJ2 分子依赖发动蛋白、Rac1、肌动蛋白聚合和胆固醇, 但是其分布与小窝蛋白-1 和网格蛋白不同, 所以本发明人假定其表示维持在前缘的膜翻转的网格蛋白非依赖性载体 (CLIC) 的发动蛋白依赖性变体 (Howes 等, 2010)。

[0333] 一系列一流研究使 SYNJ1 牵连于神经元中的突触囊泡再循环 (Cremona 等, 1999)。在小鼠中, SYNJ1 缺失引起稳态 PI (4, 5)P₂ 上升、网格蛋白包被囊泡积聚和胞吞后囊泡可再用性延迟 (Mani 等, 2007)。这些观察资料表明, 将使囊泡外壳脱落的 PI (4, 5)P₂ 脱磷酸化是所述表现型的原因。与此类似, 本 SYNJ2 缺乏型乳腺细胞显示活性 EGFR 细胞内积聚。受体泛素化状态和胞吞途径标志表明运输在分选内体时受阻, 其中内化受体通常分流进行再循环或降解。令人信服地, 所述缺陷是由于不能分解与囊泡外壳或与其肌动蛋白彗尾缔合的 PI (4, 5)P₂- 结合蛋白 (Kaksonen 等, 2003)。因此, 与在 SYNJ1 切除后观察到的突触传导缺陷类似, 由于对运动性必不可少的表面分子的运输受阻, SYNJ2 丢失严重损害了细胞迁移和侵袭。

[0334] 在 SYNJ2 缺乏型细胞内分别观察到的初级和次级内体的调节因子, PI (3)P 和 PI (3, 5)P₂ 升高, 提出了另外的运输机制。已经通过鉴定多种结合剂, 例如整联蛋白和几种 Rab 蛋白, 加强了对 PI (3, 5)P₂ 的调节作用 (Catime1 等, 2008)。PI (3)P 受在内体和反式高尔基体网络之间循环, 将 MT1-MMP 递送到侵袭伪足的途径所涉及的一种 5- 激酶 PIKfyve 磷酸化 (Poincloux 等, 2009)。因此, 除 PI (4, 5)P₂ 的脱磷酸化外, SYNJ2 很可能加工 PI (3, 5)P₂ 以微调初级内体的 PI (3)P 池并且协调 MT1-MMP 的胞吐作用和整联蛋白以及 EGFR 的再循环。

[0335] 引入动物体内时, shSYNJ2 MDA-MB-231 细胞由于到达淋巴结和血管的能力降低而严重丧失转移潜能 (图 13A-H)。为了将这些结果和体外表现型相结合, 图 15 中列出了为 SYNJ2 在细胞运动性中的作用基础的机制。相应地, 关键事件需要 EGF 诱导的 SYNJ2 上调及由此引起的 3 种磷酸肌醇损耗: PI (4, 5)P₂、PI (3, 4, 5)P₃ 和 PI (3, 5)P₂。SYNJ2 介导的 PI (4, 5)P₂ 脱磷酸与 PI (4, 5)P₂ 受磷脂酶 C- γ 降解和受 PI3K 磷酸化并行, 这样生成 PI (3, 4, 5)P₃。总的来说, 3 种酶受 EGF 的刺激使一组 PI (4, 5)P₂ 结合剂从质膜离解, 并且还生成无 PI (4, 5)P₂ 的内吞囊泡。同时, SYNJ2 将 PI (3, 4, 5)P₃ 转化成侵袭伪足形成所必需的 PI (3, 4)P₂。与这种模型一致, 已经报道侵袭伪足形成需要 PI3K。一旦到位, PI (3, 4)P₂ 就结合 TKS5 并且使以发动蛋白和皮动蛋白为中心的复合物成核, 该复合物使得丝切蛋白能够在侵袭伪足内产生肌动蛋白钩端。根据本结果, SYNJ2 也涉及下一侵袭伪足突变步骤, 即 MMP 分泌及 MT1-MMP 和其它表面分子例如 CD44 的递送。以类似方式, SYNJ2 控制 EGFR 和整联蛋白向前缘的递送, 并且很可能激活丝切蛋白, 这是指示板状伪足突出形成的关键事件。

[0336] 与动物中 SYNJ2 对体外细胞迁移和转移的贡献一致, 目前对乳腺癌样本的调查在疾病的侵蚀性亚型中观察到 SYNJ2 mRNA 和蛋白质水平明显上调。另外, 使用来自两个组群的数据, 观察到高 SYNJ2 mRNA 表达和乳腺癌患者存活期更短之间的关联。

[0337] 总之, 本研究将转移引发的基本事件归因于 EGF 诱导的 PI3K 局部激活和 SYNJ2 总体上调, SYNJ2 对 PI (4, 5)P₂ 的顺次作用调节前缘处的肌动蛋白动力学特性, 以及生成侵袭

伪足的标志物 PI (3, 4)P₂。此外,本研究鉴定了选择性抑制 SYNJ2 生成 PI (3, 4)P₂ 的各种化合物。

[0338] 虽然已经连同其特定实施方案描述了本发明,但是显然许多替代方案、修改和变化将对本领域的技术人员显而易见。相应地,旨在包括属于所附权利要求的精神和广泛范围内的所有此类替代方案、修改和变化。

[0339] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均以引用的方式整体并入本说明书中,如同特别单独地指出将每个单独的出版物、专利或专利申请以引用方式并入本文一样。另外,本说明书中对任何参考文献的补充、引用或鉴定不得解释为承认此参考文献可用作本发明的先前技术。就使用章节标题来说,不得将其解释为必要的限制。

[0340] 参考文献

[0341] (正文中包括其它文献)

[0342] 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.

[0343] 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.

[0344] 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.

[0345] Catimel, B., Schieber, C., Condron, 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.

[0346] 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.

[0347] 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.

[0348] 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.

[0349] 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.

[0350] 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.

- [0351] 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.
- [0352] Gruenberg, J. , and Stenmark, H. (2004). The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 317-323.
- [0353] Guo, W. , and Giancotti, F. G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826.
- [0354] 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.
- [0355] Jefferson, A. B. , and Majerus, P. W. (1996). Mutation of the conserved domains of two inositol polyphosphate 5-phosphatases. *Biochemistry* 35, 7890-7894.
- [0356] 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.
- [0357] 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.
- [0358] 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.
- [0359] 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.
- [0360] 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.
- [0361] 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.
- [0362] Mosesson, Y. , Mills, G. B. , and Yarden, Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 835-850.
- [0363] 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.
- [0364] 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.

[0365] 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.

[0366] 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.

[0367] 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.

[0368] Palamidessi, A., Frittoli, E., Garre, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Dias pro, 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.

[0369] Ridley, A. J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145,1012–1022.

[0370] Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev* 90, 259–289.

[0371] 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.

[0372] 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.

[0373] 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.

[0374] 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.

[0375] 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*.

[0376] 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.

[0377] 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.

[0378] Yuan, T. L., and Cantley, L. C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. Oncogene 27, 5497–5510.

[0001]

序列表

<110> 耶达研究及发展有限公司
 优素福·亚登
 尼尔·本切特里特

<120> 预防肿瘤转移、癌症治疗和预后及鉴定为推定转移抑制剂的试剂的方法

<130> 57296

<150> US 61/731,003

<151> 2012-11-29

<160> 16

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 8982

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

```

atggcctga gcaaagggct ggcgctgctg gggcgcttg gggcgagg ggactgttagc      60
gtgtgtgctg aggcgcgcgg ccgcgcacac tgcctgtgtg tcgaggccgg caccgtggcc      120
acgctggctc cagaagaaaa ggaagtcatt aaaggacagt atggcaagct caccgacggc      180
taaggctgcc tgggggagct gaggtgaaa tctgttgga cgtctctgag ctctcctggg      240
ttggtgacag gctgcacatc tgtgggcaga attccagatg ctgaaatcta caaaatcact      300
gccactgact ttaccctctc tcaggaagag gccaaaggagg aggaacgcct catagctttg      360
aagaaaaatc tcagctcggg ggtgttttat ttctcatggc caaacgatgg gtctcgtttt      420
gacctgactg tccgcacgca gaagcagggg gatgacagct ctgaatgggg gaactccttc      480
ttctggaacc agctgttgca cgtgcccttg aggoagcaac aggtgagctg ctgtgactgg      540
ctgtgaaga tcattctcgg ggtggtcacc atccgcaccg tgtatgcctc ccacaagcag      600
gccaaaggcct gcctcgtctc tcgcgttagc tgtgagcgca caggcaactc ctccacacc      660
cgtggcgtga acgacgacgg ccattgtgtc aacttcgtgg agacagagca gatgatctac      720
atggacgatg gagtgtcatc tttgttcag atcagaggct ccgttcctgt gttctgggaa      780
cagccagggc ttcaggtttg ctcccatcat ctgagactcc acagaggcct ggaagccaat      840
gccctgtctt tcgacaggca catggtgctt ctgaaggagc agtaacgggc gcaggtggto      900
gtgaaccttc tgggaagcag aggcggagag gaggtgtcca acagagcctt caagaagctg      960
ctctgggctt cttgcaacgc gggcgacacg cetatgatca attttgactt ccacagttt      1020
gccaaagggtg ggaagctaga gaaattggag accctcttga ggcacagtt aaagctgcac      1080
tggaagaact tcgatgtgtt cacaagggg gagaacgtca gtccacgttt tcagaaaggc      1140

```

[0002]

actttgcgga tgaactgtct tgactgcttg gaccgaacca acaactgtgca gagcttcato	1200
ggcgtcgagg tcttgcattt gcagctcaag accctggggc tgagttcaaa acccctcggt	1260
gaccgctttg tggagtcctt caaagccatg tgggtctctga atggccacag cctgagcaag	1320
gtgttcacag gcagcagagc cctggaaggg aaggccaagg tggggaagct gaaggatgga	1380
gcccgttoca tgtctogaac catccagtcc aacttcttcg acggggtgaa gcaggaggcc	1440
atcaagctgc tgcctggttg ggaactctac ggcgaggagg tggeagacaa agggggcatg	1500
ctgctggaca gcacggcgct cctgggtgact cccaggatcc tgaaagctat gactgagcgt	1560
cagtcogaat tcacaaattt caagcggatc cggattgcta tggggactg gaaagtgaac	1620
ggaggaaagc agttccggag caactgtctc aggaacggcg agctgacaga ctggctgtct	1680
gactcgcccc agctctcggg agctaccgac tcccaggatg acagcagccc agctgacata	1740
tttctctgtg ggtttgaaga gatggtggaa ttgagcgcag ggaatattgt caatgccagt	1800
actaccaaca agaagatgtg ggttgaacag cttcagaaag ccactctacg ctctcataga	1860
tacattctgt tgacttcggc acagctggtg ggcgtctgtc tttatatctt tgtactcca	1920
taccatgtcc cgttcctcag ggaactagcc atcgacacag tgaagacggg catggggggc	1980
aaggcgggga acaaggcgcc cgtcggcatc cgtctccagt tccacagcac cagcttctgc	2040
ttcatatgta gtcacctgac ggcggggcag tcccaggatg aggagcggaa tgaagactac	2100
aaggagatca ccagaaaact ctgcttccca atggggagaa atgttttttc tcatgattat	2160
gtatttttgt gtggcgattt caactaccgc attgatctta ctatgaaga agtcttctat	2220
tttggttaac gccaaagactg gaagaaaact ctggaatttg atcaactaca gctacagaaa	2280
tcaagtggaa aaatttttaa ggactttcac gaaggagcca ttaacttttg acccacctac	2340
aagtatgagc ttggctcagc cgcctacgat acaagcgaca aatgcgcac ccgcgcctg	2400
acagacaggg tgcctgtgtg gaggaagaaa catcccttg ataaaaacagc tggagaactc	2460
aaccctctag acagtgatct agatgttgac accaaagtea gacacactg gtctcctggt	2520
gccttcagct attatggtcg tgcggagcta caagcgtctg atcacagacc tgtgctggcg	2580
atcgtggagg tggaaagttc ggaagtcgat gtgggtgtctc gggagagggt ttccagga	2640
gtgtccctct tccagggccc cctggatgcc actgtttag taaaccttca atcaccgacc	2700
ttagaagaga aaaacgagtt tccagaggac ctgogtactg agctcatgca gaccttggg	2760
agttatggga caattgttct tgtcaggatc aaccaagggc agatgctggt aacttttgca	2820
gacagtcact cggctctcag tgtcctggac gtggacggta tgaagggtgaa aggcagagca	2880
gtgaagatta gacgaagac caaggactgg ctgaaagggt tggcagagga gatcattcgg	2940
aaacgagaca gcatggcccc cgtgtctccc actgccaact cctgtttgct ggaggaaaac	3000

[0003]

tttgacttca caagtttggg ctatgagtea gaaggggata ttcttgaaga ggatgaagac	3060
tacttgggtgg atgaattcaa tcagcctgga gtctcggaca gtgaactcgg gggagacgac	3120
ctctctgatg tcccgggccc cacagcactg gctcctccca gcaagtcacc tgetctcacc	3180
aaaaagaagc agcatccaac gtacaaagat gacgcggacc tgggtggagct caagcgggag	3240
ctggaagccg tcgggggagtt ccgccaccgt tctccgagca ggtctctgtc ggtecccaac	3300
cygectcggc caccctcaacc cccgcagaga cccccccctc caacccggtt aatgggtgaaa	3360
aagtcggctt cagatgcgtc catctctctc ggcacccctg gacagtatc aattttgcag	3420
acgggcaagac ttctaccagg agcacctcag caacctccca aggtctggac tggataaagt	3480
aaaccttata atgtcaagca gatcaaaaac accaatgcc agggaggcaga agcagcaatc	3540
cgtgtgtctc tggaaagccag aggaggtgcc tccgaagaag ccctaagtgc cgtggcccca	3600
agggaccttg aagcctctc tgaaccagag cccacaccgg gggcagccaa accagagacc	3660
ccacagcgcc cccactcct tcccgtcgg cccccccca gagttcctgc catcaagaag	3720
ccaaccttga gaaggacagg aaagccctg tcaccggaag aacagtttga gcaacagact	3780
gtccatttta caatcggggc cccggagaca agcgttgagg cccctcctgt cgtgacagcc	3840
cctcagatcc ctctctgttc caaaccaaga acatttcagc ctgggaaagc tgcagagagg	3900
ccaagccaca ggaagccagc atcagacgaa gccctcctg gggcaggagc ctctgtgcca	3960
ccacctctgg agggcgccgc tcttgtgcc aaggtacccc cgaggaggaa gaagtcagcc	4020
ccgcagcctt tccacctgca ggtcctgcag agcaacagcc agcttctcca gggcctcact	4080
tacaatagca gtgacagccc ctctgggcac ccacctgccg cgggcaccgt ctctccacaa	4140
ggggactttc tcagcacttc atctgtctaca agcccgcaca gcgatggcac caaagcgatg	4200
aagccagagg cagcccccact tcttgggtgat tatcaggacc cttcttgaa cttcttccac	4260
caccctaaac tgttgaataa caattggctt tctaagagct cagacccttt ggaactcagga	4320
accagagacc ccaaaagaga tcccatagac ccagtgtcag ctggcgcttc agctgccaag	4380
gcagagctgc caccagatca tgaacacaaa accttaggtc actgggtgac aatcagtgac	4440
caagaaaaga ggacagcact gcaggtgttt gaccactcgg caaaaacatg aatggccctg	4500
agcaaagggc tgcggctgct gggggcctg ggggcagag gggactgtag cgtgctgctg	4560
gaggcgcgcg gcgcgacga ctgcctgctg ttccaggccg gcacgggtggc acgcctggct	4620
ccagaagaaa aggaagtcac taaaggacag tatggcaagc tcacggacgc gtacggctgc	4680
ctggggggagc tgaggctgaa atctgggtgc acgtctctga gcttctcgtt gttggtgaca	4740
ggctgcacat ctgtgggcag aattccagat gctgaaatct acaaaatcac tgccactgac	4800
ttttaccctc ttcaggaaga ggccaaggag gaggaacgcc tcatagcttt gaagaaaatc	4860

[0004]

```

ctcagctcgg ggggtgttcta tttctcatgg ccaaacgatg ggtctcgctt tgacctgact 4920
gtccgcacgc agaagcaggg ggtgacagc tctgaatggg ggaactcctt ctcttggaac 4980
cagctgttgc acgtgccctt gaggcagcac caggtgagct gctgtgactg gctgctgaag 5040
atcatctgcg ggggtgtcac catccgcacc gtgtatgcct ccacaagca ggccaaggcc 5100
tgcctcgtct ctgcgttag ctgtgagcgc acaggcactc gctccacac ccgtggcgtg 5160
aacgacgacg gccatgtgtc caacttcgtg gagacagagc agatgattta catggacgat 5220
ggagtgtcat cttttgtcca gatcagagc tccgttcgcg tgttctggga acagccaggg 5280
cttcagggtg gctcccatca tctgagactc cacagaggcc tggaagccaa tgcccctgct 5340
ttcgacaggc acatggtgct tctgaaggag cagtaagggc agcaggtggt cgtgaacctt 5400
ctgggaagca gaggcggaga ggaggtgtc aacagagcct tcaagaaget gctctgggct 5460
tcttgccacg cgggcgacac gccatgata aattttgact tccatcagtt tgccaaaggt 5520
gggaagctag agaaattgga gacctcttgg aggcacagct taaagctgca ctgggaagac 5580
ttcgatgtgt tcacaaaggg ggagaacgtc agtccaggtt ttcagaaagg cactttgcgg 5640
atgaactgtc ttgaotgcct ggaccgaacc aacactgtgc agagcttcct cgcgctcgag 5700
gtcctgcctc tgcagctcaa gacctgggg ctgagttcaa aacctcgt tgacctctt 5760
gtggagtctt tcaaagccat gtggtctctg aatggccaca gctgagcaa ggtgttcaca 5820
ggcagcagag ccttggaagg gaaggccaag gtggggaagc tgaaggatgg agcccggtcc 5880
atgtctcgaa ccatccagtc caacttcttc gacgggggtg agcaggaggc catcaagctg 5940
ctgctgtgtg gggacgtcta cggcgaggag gtggcagaca aagggggcat gctgctggac 6000
agcacgggoc tcttggtgac tcccaggatc ctgaaagcta tgaactgagc tcagtccgaa 6060
ttcacaaatt tcaagcggat cgggattgct atggggacct ggaacgtgaa cggaggaaag 6120
cagttccgga gcaacgtgct caggacggcg gagctgacag actggtgct cgaactcgcc 6180
cagctctcgg gagetaccga ctcccaggat gacagcagcc cagctgacat atttgctgtg 6240
gggtttgaag agatggtgga attgagcgca gggaaatttg tcaatgccag taactaccaac 6300
aagaagatgt ggggtgaaca gcttcagaaa gccatctcac gctctcatag atacattctg 6360
ttgacttcgg cacagctggt gggcgtctgt ctttatatct ttgtacgtcc ataccatgtc 6420
ccgttcatca gggacgtagc catcgacaca gtgaagacgg gcatgggggg caaggcgggg 6480
aacaaggggc ccgtcggcat ccgttcacag ttccacagca ccagcttctg ctccatattg 6540
agtcacotga cggccgggca gtcccagggt aaggagcggg atgaagacta caaggagatc 6600
accagaaac tctgcttccc aatggggaga aatgtttttt ctcatgatta tgtattttgg 6660
tgtggcgatt tcaactaccg catgatctt acttatgaag aagtcttcta ttttgttaaa 6720

```

[0005]

cgccaagact ggaagaaact tctggaattt gatcaactac agctacagaa atcaagtggg	6780
aaaattttta aggactttca cgaaggagcc attaactttg gacccacctt caagtatgac	6840
gttggtctcag ccgcctacga tacaagcgac aaatgcgcga ccccgcttg gacagacagg	6900
gtgctgtggt ggaggaagaa acatcccttt gataaacag ctggagaact caacotteta	6960
gacagtgaac tagatgttga caccaaagtc agacacacct ggtctcttg tgccctgcag	7020
tattatggtc gtgcggagct acaagcgtct gatcacagac ctgtgctggc gatcgtggag	7080
gtggaagtcc aggaagtcga tctgggtgct cgggagaggg ttttccagga agtgctctcc	7140
ttccagggcc cctggatgc cactgttgta gtaaaccttc aatcacgcac cttagaagag	7200
aaaaacaggt ttccagagga cctgcgtact gagctcatgc agaccttggg gagttatggg	7260
acaattgttc ttgtcaggat caaccaaggg cagatgctgg taacttttgc agacagtca	7320
tgggtctca gtgtcctgga cgtggacggt atgaaggatg aaggcagagc agtgaagatt	7380
agaccgaaga caaggactg gctgaaagggt ttgcgagagg agatcattcg gaaacgagac	7440
agcatggccc ccgtgtctcc cactgcacac tctgttttgc tggaggaaaa ctttgacttc	7500
acaagtttgg actatgagtc agaaggggat attcttgaag acgatgaaga ctacttggtg	7560
gatgaattca atcagcctgg agtctcggac agtgaactcg ggggagacga cctctctgat	7620
gtcccgggcc ccacagcact ggtctctccc agcaagtcac ctgctctcac caaaaagaag	7680
cagcatccaa cgtacaaaga tgacgggac ctggtggagc tcaagcggga gctggaagcc	7740
gtcggggagt tccgccaccg ttctcagagc aggtctctgt cggtcgccaa ccggcctcgg	7800
ccacctcaac ccccgagag accccccct ccaaccggtt taatggtgaa aaagtccgct	7860
tcagatgcgt ccatctcttc cggcaccat ggacagtatt caattttgca gacggcaaga	7920
cttctaccag gagcacctca gcaacctccc aaggetcgga ctggaataag taaaccttat	7980
aatgtcaagc agatcaaaac caccaatgcc caggaggcag aagcagcaat ccggtgtctc	8040
ctggaagcca gaggaggtgc ctccgaagaa gccctaagtg ccgtggcccc aagggaacct	8100
gaagcatcct ctgaaccaga gccacacccg ggggcagcca aaccagagac ccacagggc	8160
ccccactcc ttcccgctcg gcccccaccc agagtctctg ccataaagaa gccaaccttg	8220
agaaggacag gaaagccct gtcaccgga gaacagtttg agcaacagac tgtccatttt	8280
acaatcgggc ccccgagac aagcgttgag gccctcctg tctgacagc ccctcgagtc	8340
cctcctgttc ccaaaccaag aacatttcag cctgggaaag ctgcagagag gccagccac	8400
aggaagccag catcagaaga agccctctct ggggcaggag cctctgtgac accacctctg	8460
gaggcgcgcg ctcttgtgac caaggtaacc ccgaggagga agaagtcagc ccccgagcc	8520
ttccacctgc aggtctgca gagcaacagc cagcttctcc agggcctcac ttacaatagc	8580

[0006]

```

agtgaacagc cctctgggca cccacctgcc gggggcaccg tcttcccaca aggggacttt      8640
ctcagcaact catctgtac aagcccgac agcgatggca ccaaagcgat gaagccagag      8700
gcagcccccac ttcttgggtga ttatcaggac cccttctgga accttcttca ccaccctaaa      8760
ctgttgaata acacttgggt ttctaagagc tcagaccctt tggactcagg aaccaggagc      8820
cccaaaagag atcccataga ccagtgtoa gctggcgctt cagctgccaa ggcagagctg      8880
ccaccagatc atgaacacaa aaccttaggt cactgggtga caatcagtga ccaagaaaag      8940
aggacagcac tgcagggtgt tgaccactg gcaaaaacat ga      8982

```

```

<210> 2
<211> 1496
<212> PRT
<213> 智人

```

```

<400> 2

```

```

Met Ala Leu Ser Lys Gly Leu Arg Leu Leu Gly Arg Leu Gly Ala Glu
1           5           10           15

```

```

Gly Asp Cys Ser Val Leu Leu Glu Ala Arg Gly Arg Asp Asp Cys Leu
                20           25           30

```

```

Leu Phe Glu Ala Gly Thr Val Ala Thr Leu Ala Pro Glu Glu Lys Glu
                35           40           45

```

```

Val Ile Lys Gly Gln Tyr Gly Lys Leu Thr Asp Ala Tyr Gly Cys Leu
                50           55           60

```

```

Gly Glu Leu Arg Leu Lys Ser Gly Gly Thr Ser Leu Ser Phe Leu Val
65           70           75           80

```

```

Leu Val Thr Gly Cys Thr Ser Val Gly Arg Ile Pro Asp Ala Glu Ile
                85           90           95

```

```

Tyr Lys Ile Thr Ala Thr Asp Phe Tyr Pro Leu Gln Glu Glu Ala Lys
                100          105          110

```

```

Glu Glu Glu Arg Leu Ile Ala Leu Lys Lys Ile Leu Ser Ser Gly Val
                115          120          125

```

```

Phe Tyr Phe Ser Trp Pro Asn Asp Gly Ser Arg Phe Asp Leu Thr Val
                130          135          140

```

```

Arg Thr Gln Lys Gln Gly Asp Asp Ser Ser Glu Trp Gly Asn Ser Phe
145          150          155          160

```

[0007]

```

Phe Trp Asn Gln Leu Leu His Val Pro Leu Arg Gln His Gln Val Ser
165                      170                      175

Cys Cys Asp Trp Leu Leu Lys Ile Ile Cys Gly Val Val Thr Ile Arg
180                      185                      190

Thr Val Tyr Ala Ser His Lys Gln Ala Lys Ala Cys Leu Val Ser Arg
195                      200                      205

Val Ser Cys Glu Arg Thr Gly Thr Arg Phe His Thr Arg Gly Val Asn
210                      215                      220

Asp Asp Gly His Val Ser Asn Phe Val Glu Thr Glu Gln Met Ile Tyr
225                      230                      235                      240

Met Asp Asp Gly Val Ser Ser Phe Val Gln Ile Arg Gly Ser Val Pro
245                      250                      255

Leu Phe Trp Glu Gln Pro Gly Leu Gln Val Gly Ser His His Leu Arg
260                      265                      270

Leu His Arg Gly Leu Glu Ala Asn Ala Pro Ala Phe Asp Arg His Met
275                      280                      285

Val Leu Leu Lys Glu Gln Tyr Gly Gln Gln Val Val Val Asn Leu Leu
290                      295                      300

Gly Ser Arg Gly Gly Glu Glu Val Leu Asn Arg Ala Phe Lys Lys Leu
305                      310                      315                      320

Leu Trp Ala Ser Cys His Ala Gly Asp Thr Pro Met Ile Asn Phe Asp
325                      330                      335

Phe His Gln Phe Ala Lys Gly Gly Lys Leu Glu Lys Leu Glu Thr Leu
340                      345                      350

Leu Arg Pro Gln Leu Lys Leu His Trp Glu Asp Phe Asp Val Phe Thr
355                      360                      365

Lys Gly Glu Asn Val Ser Pro Arg Phe Gln Lys Gly Thr Leu Arg Met
370                      375                      380

Asn Cys Leu Asp Cys Leu Asp Arg Thr Asn Thr Val Gln Ser Phe Ile
385                      390                      395                      400

Ala Leu Glu Val Leu His Leu Gln Leu Lys Thr Leu Gly Leu Ser Ser

```

[0008]

	405	410	415
Lys Pro Ile Val Asp Arg Phe Val Glu Ser Phe Lys Ala Met Trp Ser			
	420	425	430
Leu Asn Gly His Ser Leu Ser Lys Val Phe Thr Gly Ser Arg Ala Leu			
	435	440	445
Glu Gly Lys Ala Lys Val Gly Lys Leu Lys Asp Gly Ala Arg Ser Met			
	450	455	460
Ser Arg Thr Ile Gln Ser Asn Phe Phe Asp Gly Val Lys Gln Glu Ala			
	465	470	475
Ile Lys Leu Leu Leu Val Gly Asp Val Tyr Gly Glu Glu Val Ala Asp			
	485	490	495
Lys Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Thr Ala Leu Leu Val Thr Pro Arg			
	500	505	510
Ile Leu Lys Ala Met Thr Glu Arg Gln Ser Glu Phe Thr Asn Phe Lys			
	515	520	525
Arg Ile Arg Ile Ala Met Gly Thr Trp Asn Val Asn Gly Gly Lys Gln			
	530	535	540
Phe Arg Ser Asn Val Leu Arg Thr Ala Glu Leu Thr Asp Trp Leu Leu			
	545	550	555
Asp Ser Pro Gln Leu Ser Gly Ala Thr Asp Ser Gln Asp Asp Ser Ser			
	565	570	575
Pro Ala Asp Ile Phe Ala Val Gly Phe Glu Glu Met Val Glu Leu Ser			
	580	585	590
Ala Gly Asn Ile Val Asn Ala Ser Thr Thr Asn Lys Lys Met Trp Gly			
	595	600	605
Glu Gln Leu Gln Lys Ala Ile Ser Arg Ser His Arg Tyr Ile Leu Leu			
	610	615	620
Thr Ser Ala Gln Leu Val Gly Val Cys Leu Tyr Ile Phe Val Arg Pro			
	625	630	635
Tyr His Val Pro Phe Ile Arg Asp Val Ala Ile Asp Thr Val Lys Thr			
	645	650	655

[0009]

```

Gly Met Gly Gly Lys Ala Gly Asn Lys Gly Ala Val Gly Ile Arg Phe
      660                      665                      670

Gln Phe His Ser Thr Ser Phe Cys Phe Ile Cys Ser His Leu Thr Ala
      675                      680                      685

Gly Gln Ser Gln Val Lys Glu Arg Asn Glu Asp Tyr Lys Glu Ile Thr
      690                      695                      700

Gln Lys Leu Cys Phe Pro Met Gly Arg Asn Val Phe Ser His Asp Tyr
      705                      710                      715                      720

Val Phe Trp Cys Gly Asp Phe Asn Tyr Arg Ile Asp Leu Thr Tyr Glu
      725                      730                      735

Glu Val Phe Tyr Phe Val Lys Arg Gln Asp Trp Lys Lys Leu Leu Glu
      740                      745                      750

Phe Asp Gln Leu Gln Leu Gln Lys Ser Ser Gly Lys Ile Phe Lys Asp
      755                      760                      765

Phe His Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gly Pro Thr Tyr Lys Tyr Asp Val
      770                      775                      780

Gly Ser Ala Ala Tyr Asp Thr Ser Asp Lys Cys Arg Thr Pro Ala Trp
      785                      790                      795                      800

Thr Asp Arg Val Leu Trp Trp Arg Lys Lys His Pro Phe Asp Lys Thr
      805                      810                      815

Ala Gly Glu Leu Asn Leu Leu Asp Ser Asp Leu Asp Val Asp Thr Lys
      820                      825                      830

Val Arg His Thr Trp Ser Pro Gly Ala Leu Gln Tyr Tyr Gly Arg Ala
      835                      840                      845

Glu Leu Gln Ala Ser Asp His Arg Pro Val Leu Ala Ile Val Glu Val
      850                      855                      860

Glu Val Gln Glu Val Asp Val Gly Ala Arg Glu Arg Val Phe Gln Glu
      865                      870                      875                      880

Val Ser Ser Phe Gln Gly Pro Leu Asp Ala Thr Val Val Val Asn Leu
      885                      890                      895

Gln Ser Pro Thr Leu Glu Glu Lys Asn Glu Phe Pro Glu Asp Leu Arg

```

[0010]

	900	905	910
Thr Glu Leu Met Gln Thr Leu Gly Ser Tyr Gly Thr Ile Val Leu Val			
915	920	925	
Arg Ile Asn Gln Gly Gln Met Leu Val Thr Phe Ala Asp Ser His Ser			
930	935	940	
Ala Leu Ser Val Leu Asp Val Asp Gly Met Lys Val Lys Gly Arg Ala			
945	950	955	960
Val Lys Ile Arg Pro Lys Thr Lys Asp Trp Leu Lys Gly Leu Arg Glu			
965	970	975	
Glu Ile Ile Arg Lys Arg Asp Ser Met Ala Pro Val Ser Pro Thr Ala			
980	985	990	
Asn Ser Cys Leu Leu Glu Glu Asn Phe Asp Phe Thr Ser Leu Asp Tyr			
995	1000	1005	
Glu Ser Glu Gly Asp Ile Leu Glu Asp Asp Glu Asp Tyr Leu Val			
1010	1015	1020	
Asp Glu Phe Asn Gln Pro Gly Val Ser Asp Ser Glu Leu Gly Gly			
1025	1030	1035	
Asp Asp Leu Ser Asp Val Pro Gly Pro Thr Ala Leu Ala Pro Pro			
1040	1045	1050	
Ser Lys Ser Pro Ala Leu Thr Lys Lys Lys Gln His Pro Thr Tyr			
1055	1060	1065	
Lys Asp Asp Ala Asp Leu Val Glu Leu Lys Arg Glu Leu Glu Ala			
1070	1075	1080	
Val Gly Glu Phe Arg His Arg Ser Pro Ser Arg Ser Leu Ser Val			
1085	1090	1095	
Pro Asn Arg Pro Arg Pro Pro Gln Pro Pro Gln Arg Pro Pro Pro			
1100	1105	1110	
Pro Thr Gly Leu Met Val Lys Lys Ser Ala Ser Asp Ala Ser Ile			
1115	1120	1125	
Ser Ser Gly Thr His Gly Gln Tyr Ser Ile Leu Gln Thr Ala Arg			
1130	1135	1140	

[0011]

Leu Leu Pro Gly Ala Pro Gln	Gln Pro Pro Lys Ala Arg Thr Gly
1145	1155
Ile Ser Lys Pro Tyr Asn Val	Lys Gln Ile Lys Thr Thr Asn Ala
1160	1170
Gln Glu Ala Glu Ala Ala Ile	Arg Cys Leu Leu Glu Ala Arg Gly
1175	1185
Gly Ala Ser Glu Glu Ala Leu	Ser Ala Val Ala Pro Arg Asp Leu
1190	1200
Glu Ala Ser Ser Glu Pro Glu	Pro Thr Pro Gly Ala Ala Lys Pro
1205	1215
Glu Thr Pro Gln Ala Pro Pro	Leu Leu Pro Arg Arg Pro Pro Pro
1220	1230
Arg Val Pro Ala Ile Lys Lys	Pro Thr Leu Arg Arg Thr Gly Lys
1235	1245
Pro Leu Ser Pro Glu Glu Gln	Phe Glu Gln Gln Thr Val His Phe
1250	1260
Thr Ile Gly Pro Pro Glu Thr	Ser Val Glu Ala Pro Pro Val Val
1265	1275
Thr Ala Pro Arg Val Pro Pro	Val Pro Lys Pro Arg Thr Phe Gln
1280	1290
Pro Gly Lys Ala Ala Glu Arg	Pro Ser His Arg Lys Pro Ala Ser
1295	1305
Asp Glu Ala Pro Pro Gly Ala	Gly Ala Ser Val Pro Pro Pro Leu
1310	1320
Glu Ala Pro Pro Leu Val Pro	Lys Val Pro Pro Arg Arg Lys Lys
1325	1335
Ser Ala Pro Ala Ala Phe His	Leu Gln Val Leu Gln Ser Asn Ser
1340	1350
Gln Leu Leu Gln Gly Leu Thr	Tyr Asn Ser Ser Asp Ser Pro Ser
1355	1365
Gly His Pro Pro Ala Ala Gly	Thr Val Phe Pro Gln Gly Asp Phe

[0012]

1370	1375	1380
Leu Ser Thr Ser Ser Ala Thr Ser Pro Asp Ser Asp Gly Thr Lys		
1385	1390	1395
Ala Met Lys Pro Glu Ala Ala Pro Leu Leu Gly Asp Tyr Gln Asp		
1400	1405	1410
Pro Phe Trp Asn Leu Leu His His Pro Lys Leu Leu Asn Asn Thr		
1415	1420	1425
Trp Leu Ser Lys Ser Ser Asp Pro Leu Asp Ser Gly Thr Arg Ser		
1430	1435	1440
Pro Lys Arg Asp Pro Ile Asp Pro Val Ser Ala Gly Ala Ser Ala		
1445	1450	1455
Ala Lys Ala Glu Leu Pro Pro Asp His Glu His Lys Thr Leu Gly		
1460	1465	1470
His Trp Val Thr Ile Ser Asp Gln Glu Lys Arg Thr Ala Leu Gln		
1475	1480	1485
Val Phe Asp Pro Leu Ala Lys Thr		
1490	1495	
<210> 3		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 小干扰 RNA 分子序列的例子, 靶向编码区域 1612-1633 (SJ2-1)		
<400> 3		
aacgtgaacg gaggaagca g		21
<210> 4		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 小干扰 RNA 分子序列的例子, 靶向 3' 非编码区 (SJ2-2)		
<400> 4		
ctcttgetga tacgcgatat t		21
<210> 5		

[0013]

<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	成功下调 SYNJ2 mRNA 水平 的 siRNA 序列的例子	
<400>	5 gaagaaacau ccuuugau	19
<210>	6	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	成功下调 SYNJ2 mRNA 水平 的 siRNA 序列的例子	
<400>	6 ggacagcacu gcagguguu	19
<210>	7	
<211>	59	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	成功下调 SYNJ2 mRNA 水平的 shRNA 序列的例子	
<400>	7 cgggcctacg atacaagega caaatctcga agatttgctcg cttgtatcgt aggtttttg	59
<210>	8	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	成功下调 SYNJ2 mRNA 水平的 shRNA 序列的例子	
<400>	8 cgggcgagag gagatcattc ggaaactcga gtttcogaat gatctcctct cgtttttg	58
<210>	9	
<211>	58	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	成功下调 SYNJ2 mRNA 水平 的 shRNA 序列的例子	
<400>	9 cgggcggaa gaacagtttg agcaactcga gttgctcaaa ctgttcttcc ggtttttg	58

[0014]

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡核苷酸的例子, 靶向编码区域
1494-1475

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 硫代骨干

<400> 10
ccctttgtct gccacctct 20

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡核苷酸的例子, 靶向 3' UTR 序列

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> 硫代骨干

<400> 11
aaccatcttg ctctctccc 19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 反义寡核苷酸的例子, 靶向编码区域 2428-2409

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> 硫代骨干

<400> 12
tcttcctcca ccacagcacc 20

<210> 13
<211> 738
<212> DNA
<213> 人工序列

[0015]

<220>

<223> 来自智人的重组 TAPP1 PH 区域

<400> 13

```

atggattaca aggacgaaga cgataaggge ggatccccc actttactcc taaaccacct      60
caagatagta cggttatcaa agctggatat tgtgtaaaac aaggagcagt gatgaaaaac      120
tggaagagaa gatattttca attggatgaa aacacaatag gctacttcaa atctgaactg      180
gaaaaggaa cctcttcgct aataccactt aaagaggttc ataaagtcca ggaatgtaag      240
caaagcgaca taatgatgag ggacaacctc ttgtaaaattg taacaacgtc tcgaactttc      300
tatgtgcagg ctgatagccc tgaagagatg cacagttgga ttaaagcagt ctctggcgcc      360
attgtagcac agcgggggtcc cggcagatct gcgtctctctg agcatccccc cggtccttca      420
gaatccaaac acgcttttcg tcttaaccaac gcagccaccg ccacctcaca ttccacagcc      480
ctctgcagca actcttttgt ctcaaccttt accatggaga agcagaggatt ttacgagtct      540
cttgccaagg tcaagccagg gaacttcaag gtccagactg tctctccaag agaaccagct      600
tccaaagtga ctgaacaagc ctgtttaaga cctcaaagta aaaatggccc tcaggaaaaa      660
gattgtgacc tagtagactt ggacgatgcg agccttcggg tcagtgaagt gctcgagcac      720
caccaccacc accaactga                                     738

```

<210> 14

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 来自智人的重组 TAPP1 PH 区域

<400> 14

```

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys Gly Gly Ser Pro Tyr Phe Thr
1           5           10          15

Pro Lys Pro Pro Gln Asp Ser Thr Val Ile Lys Ala Gly Tyr Cys Val
20          25          30

Lys Gln Gly Ala Val Met Lys Asn Trp Lys Arg Arg Tyr Phe Gln Leu
35          40          45

Asp Glu Asn Thr Ile Gly Tyr Phe Lys Ser Glu Leu Glu Lys Glu Pro
50          55          60

Leu Arg Val Ile Pro Leu Lys Glu Val His Lys Val Gln Glu Cys Lys
65          70          75          80

Gln Ser Asp Ile Met Met Arg Asp Asn Leu Phe Glu Ile Val Thr Thr

```

[0016]

	85	90	95
Ser Arg Thr Phe Tyr Val Gln Ala Asp Ser Pro Glu Glu Met His Ser	100	105	110
Trp Ile Lys Ala Val Ser Gly Ala Ile Val Ala Gln Arg Gly Pro Gly	115	120	125
Arg Ser Ala Ser Ser Glu His Pro Pro Gly Pro Ser Glu Ser Lys His	130	135	140
Ala Phe Arg Pro Thr Asn Ala Ala Thr Ala Thr Ser His Ser Thr Ala	145	150	155
Ser Arg Ser Asn Ser Leu Val Ser Thr Phe Thr Met Glu Lys Arg Gly	165	170	175
Phe Tyr Glu Ser Leu Ala Lys Val Lys Pro Gly Asn Phe Lys Val Gln	180	185	190
Thr Val Ser Pro Arg Glu Pro Ala Ser Lys Val Thr Gly Gln Ala Leu	195	200	205
Leu Arg Pro Gln Ser Lys Asn Gly Pro Gln Glu Lys Asp Cys Asp Leu	210	215	220
Val Asp Leu Asp Asp Ala Ser Leu Pro Val Ser Asp Val Leu Glu His	225	230	235
His His His His His	245		
<210> 15			
<211> 225			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 15			
Pro Tyr Phe Thr Pro Lys Pro Pro Gln Asp Ser Thr Val Ile Lys Ala	1	5	10
Gly Tyr Cys Val Lys Gln Gly Ala Val Met Lys Asn Trp Lys Arg Arg	20	25	30
Tyr Phe Gln Leu Asp Glu Asn Thr Ile Gly Tyr Phe Lys Ser Glu Leu	35	40	45

[0017]

Glu Lys Glu Pro Leu Arg Val Ile Pro Leu Lys Glu Val His Lys Val
 50 55 60
 Gln Glu Cys Lys Gln Ser Asp Ile Met Met Arg Asp Asn Leu Phe Glu
 65 70 75 80
 Ile Val Thr Thr Ser Arg Thr Phe Tyr Val Gln Ala Asp Ser Pro Glu
 85 90 95
 Glu Met His Ser Trp Ile Lys Ala Val Ser Gly Ala Ile Val Ala Gln
 100 105 110
 Arg Gly Pro Gly Arg Ser Ala Ser Ser Glu His Pro Pro Gly Pro Ser
 115 120 125
 Glu Ser Lys His Ala Phe Arg Pro Thr Asn Ala Ala Thr Ala Thr Ser
 130 135 140
 His Ser Thr Ala Ser Arg Ser Asn Ser Leu Val Ser Thr Phe Thr Met
 145 150 155 160
 Glu Lys Arg Gly Phe Tyr Glu Ser Leu Ala Lys Val Lys Pro Gly Asn
 165 170 175
 Phe Lys Val Gln Thr Val Ser Pro Arg Glu Pro Ala Ser Lys Val Thr
 180 185 190
 Glu Gln Ala Leu Leu Arg Pro Gln Ser Lys Asn Gly Pro Gln Glu Lys
 195 200 205
 Asp Cys Asp Leu Val Asp Leu Asp Asp Ala Ser Leu Pro Val Ser Asp
 210 215 220
 Val
 225

<210> 16
 <211> 675
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 16
 ccttacttta ctctaaace acctcaagat agtacgggta tcaaagetgg atattgtgta 60
 aaacaaggag cagtgatgaa aaactggaag agaagatatt ttcaattgga tgaaaacaca 120
 ataggctact tcaaatctga actggaaaag gaacctcttc gcgtaatacc acttaaagag 180
 gttcataaag tccaggaatg taagcaaaagc gacataatga tgagggacaa cctctttgaa 240

[0018]

attgtaacaa cgtctegaac ttctatatgtg caggctgata gccctgaaga gatgcacagt	300
tggattaaag cagtctcttg cgcatttgta gcacagcggg gtcccggcag atctgcgtct	360
tctgagcatt ccccggtcc ttccagaatcc aaacacgctt tccgtcctac caacgcagcc	420
accgccacct cacattccac agcctctcgc agcaactctt tggctcctac ctttaccatg	480
gagaagcgag gatctttacga gtctcttgcg aaggctcagc cagggaactt caaggctcag	540
actgtctctc caagagaacc agcttccaaa gtgactgaac aagctctgtt aagacctcaa	600
agtaaaaatg gccctcagga aaaagattgt gacctagtag acttggacga tgcgagcctt	660
cgggtcagtg acgtg	675

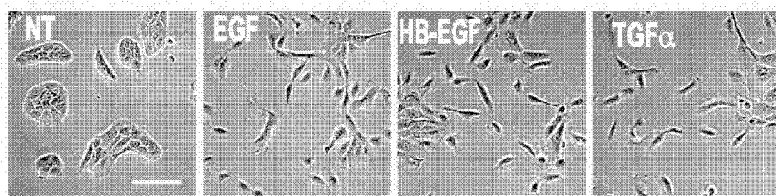


图1A

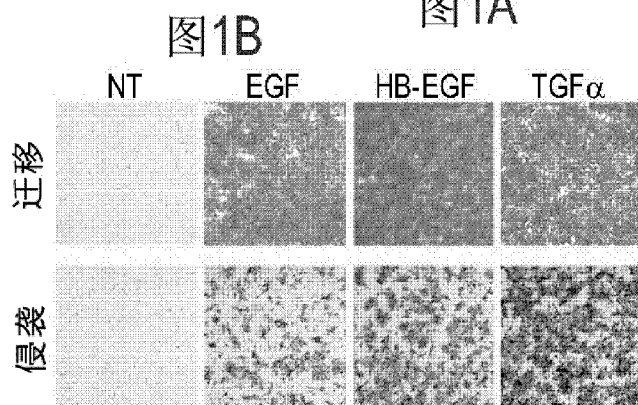


图1B

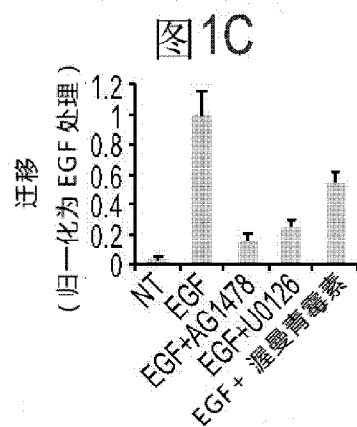
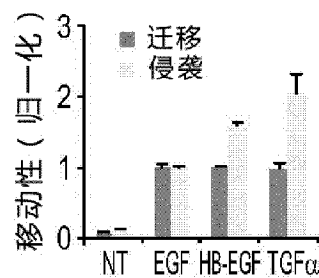


图1C

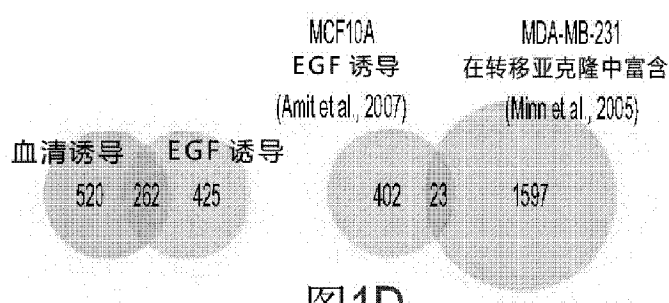


图1D

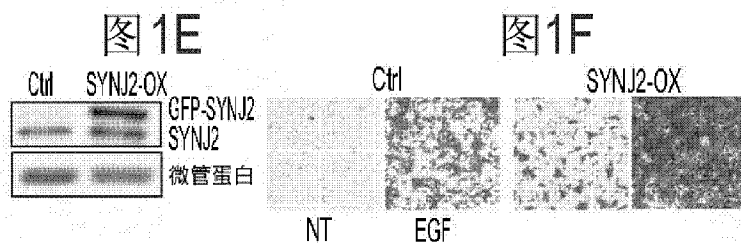


图1E

图1F

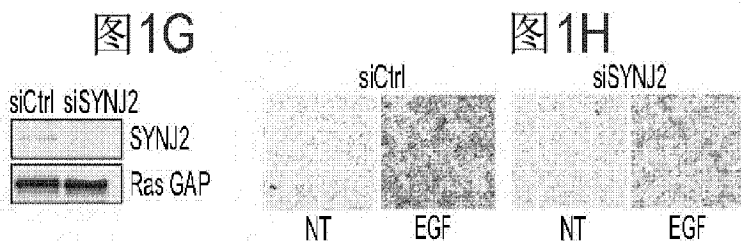


图1G

图1H

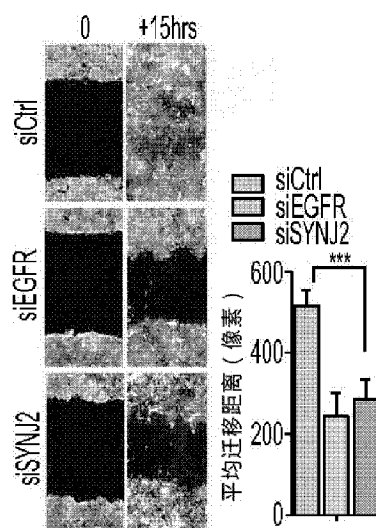


图1I

图 2A

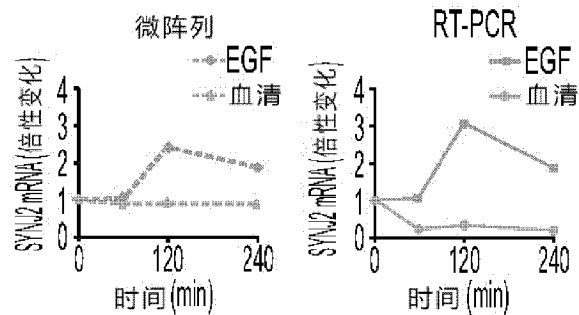


图 2B

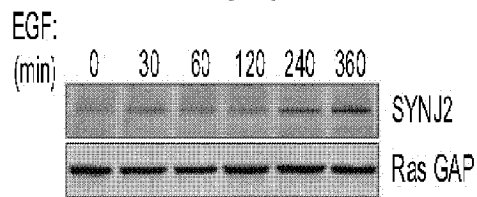


图 2C

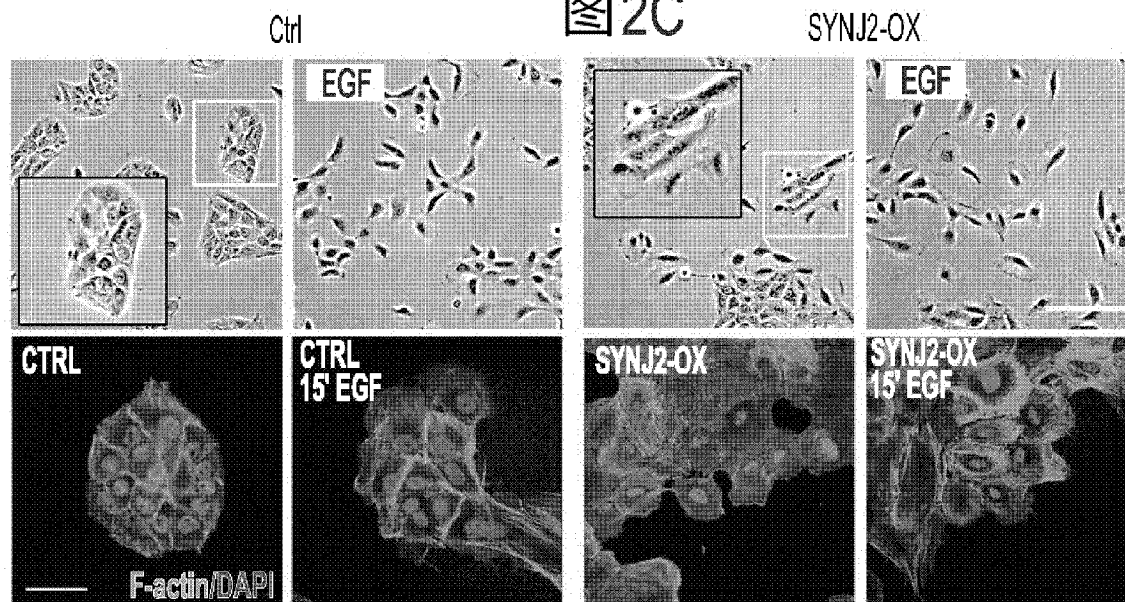


图 2D

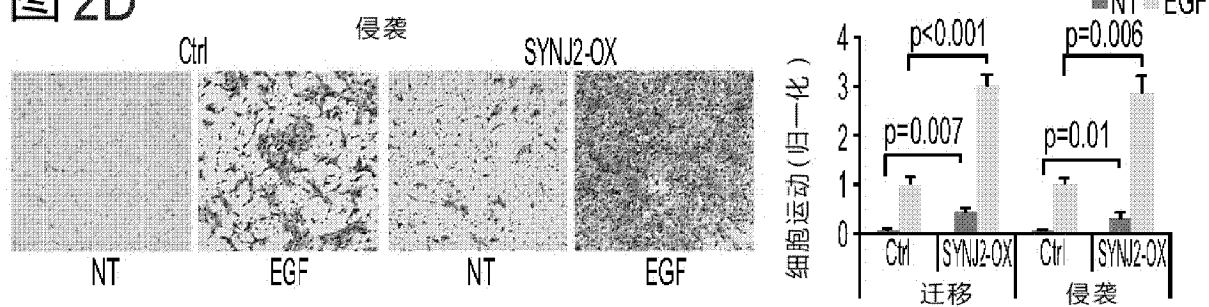
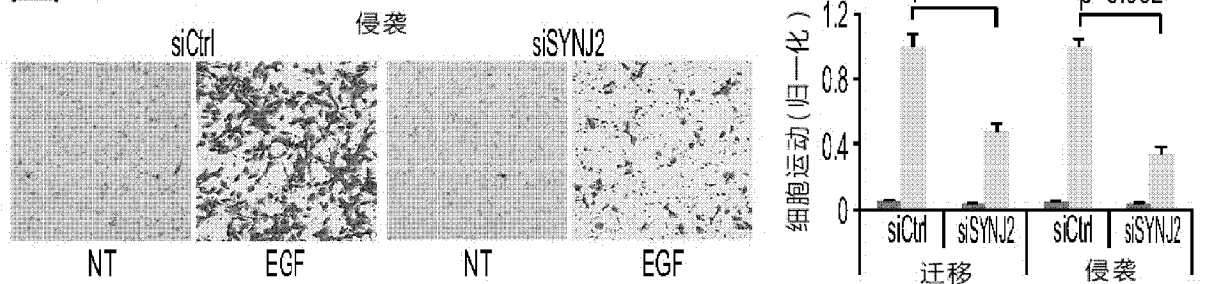


图 2E



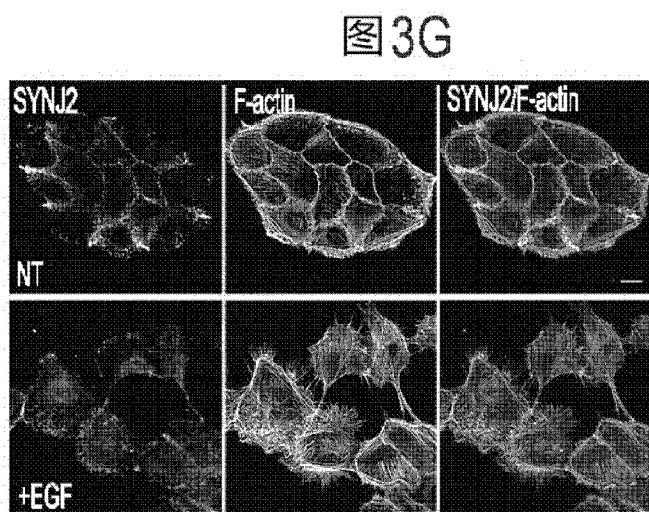
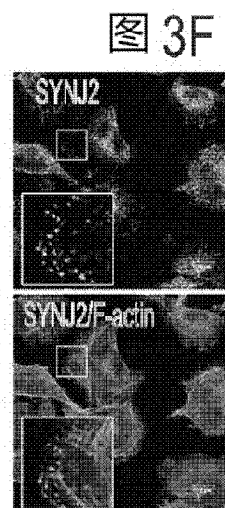
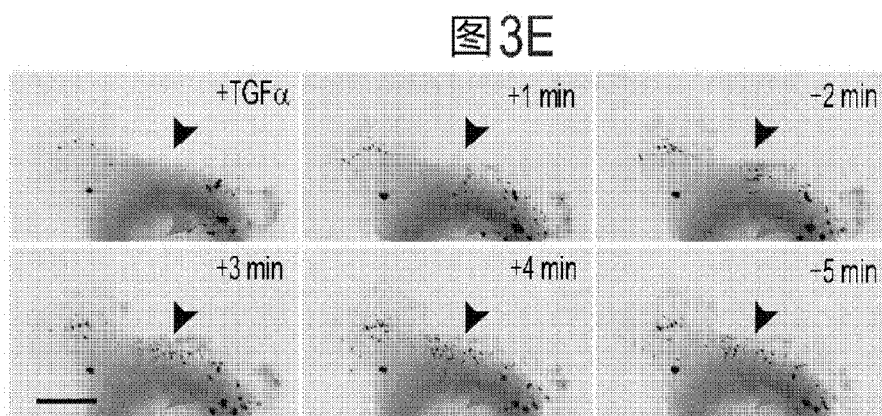
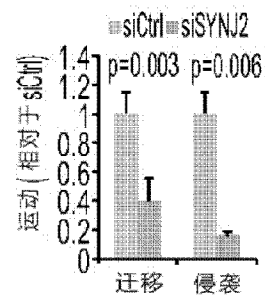
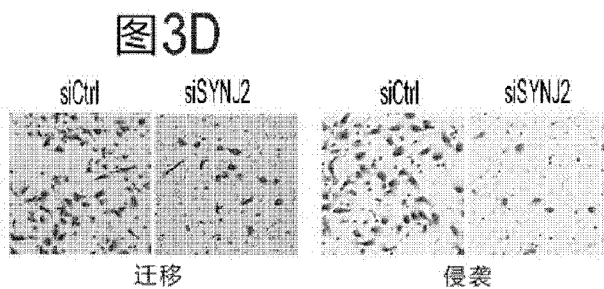
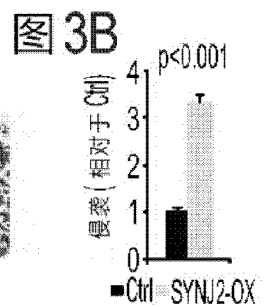
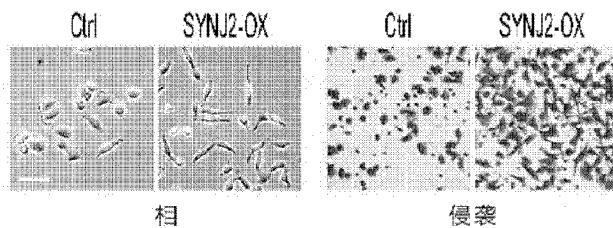
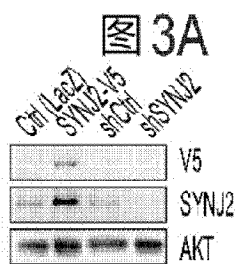


图 4A

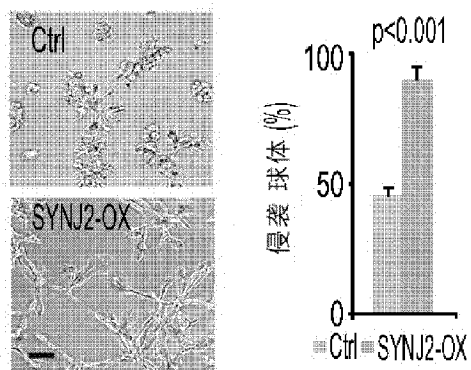


图 4B

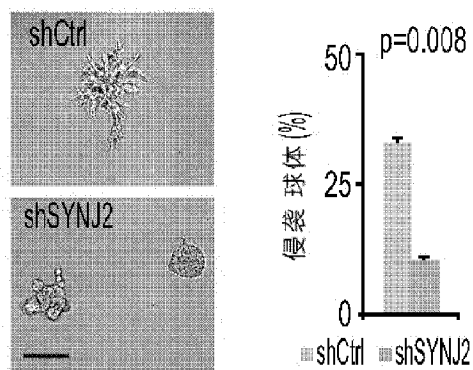


图 4C

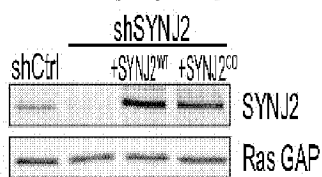


图 4D

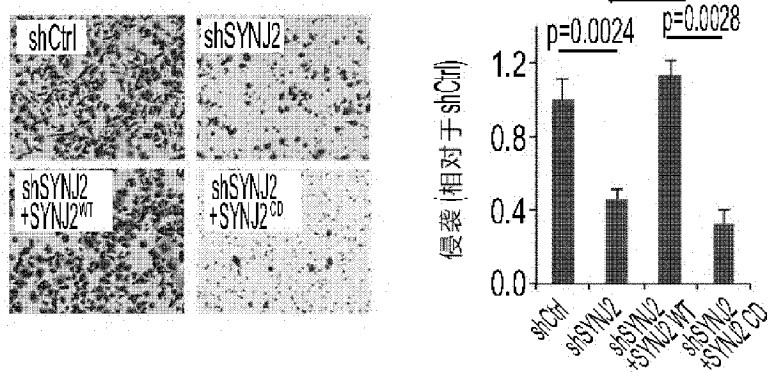


图 4E

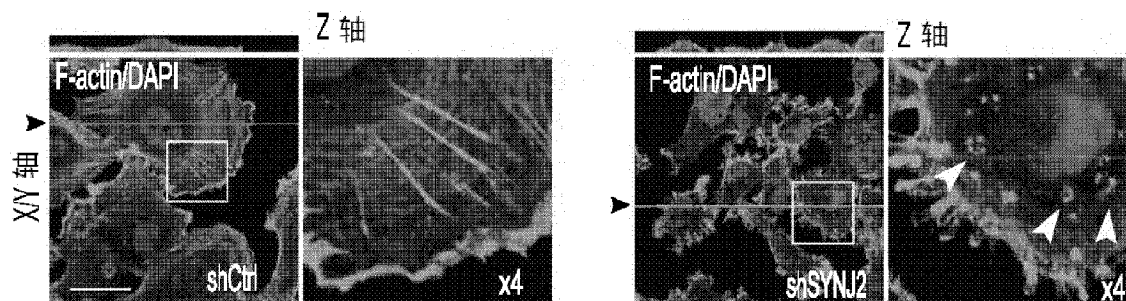
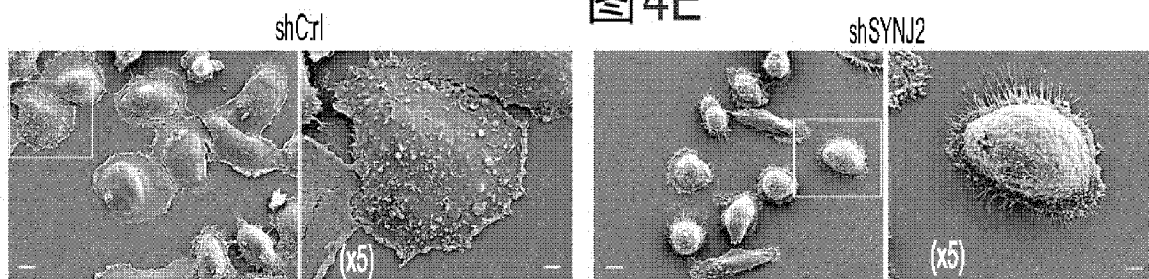


图 4F

图 5A

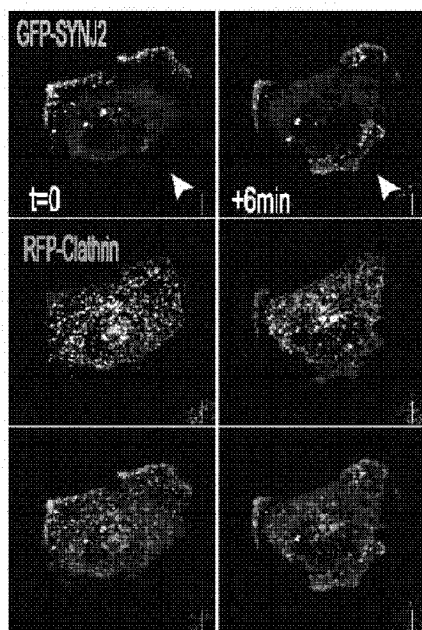


图 5B

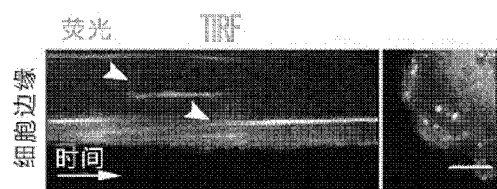
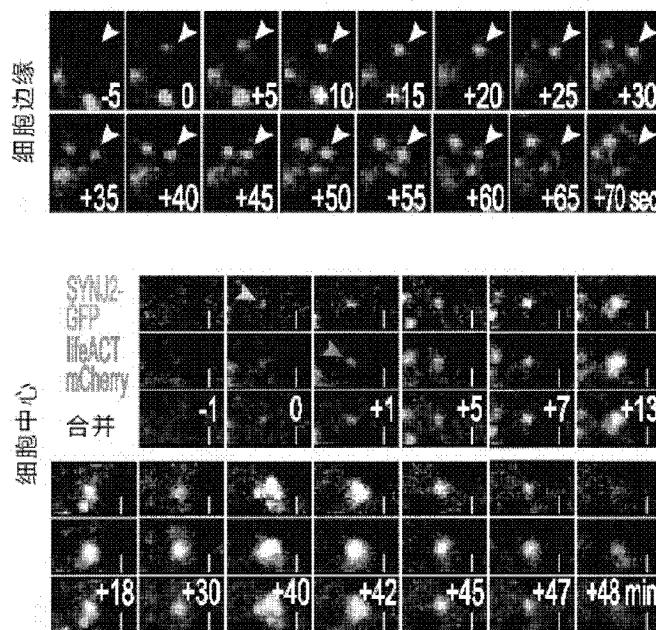


图 5C

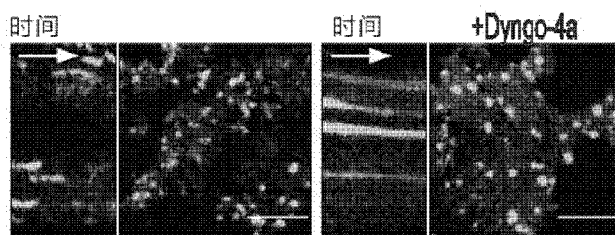


图 5D

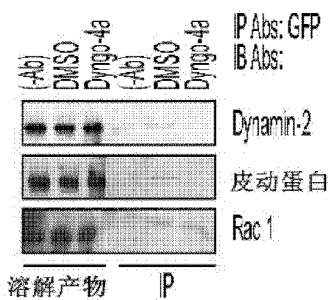


图 5E

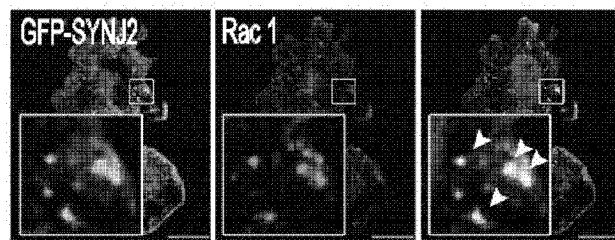


图 5F

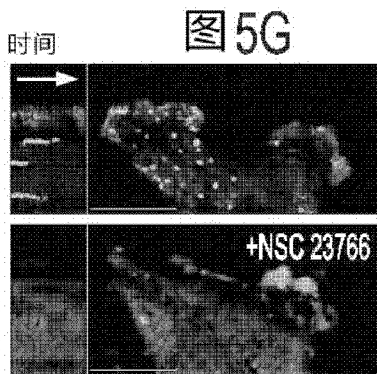


图 5G

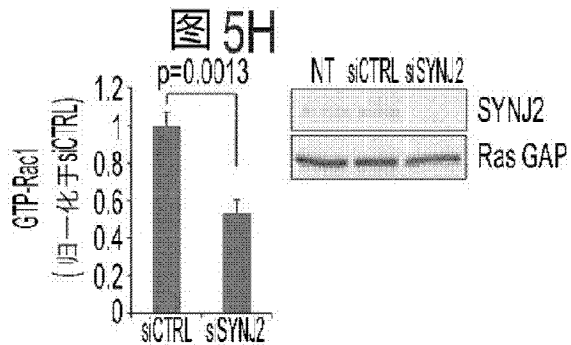


图 5H

图 6A

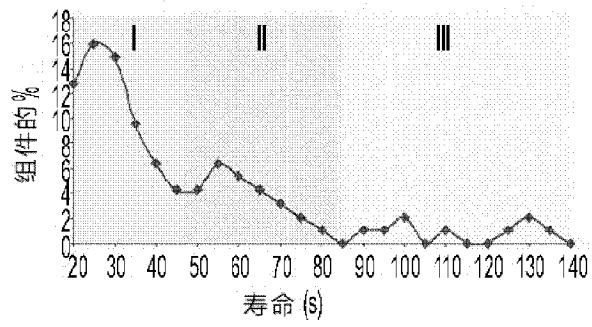
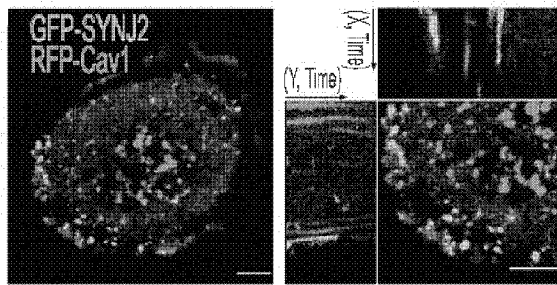


图 6B

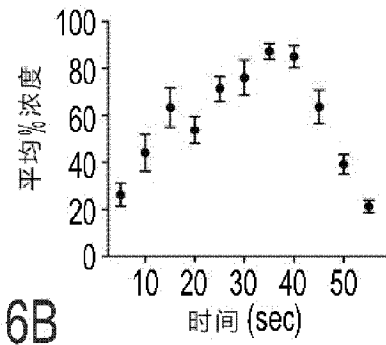


图 6C

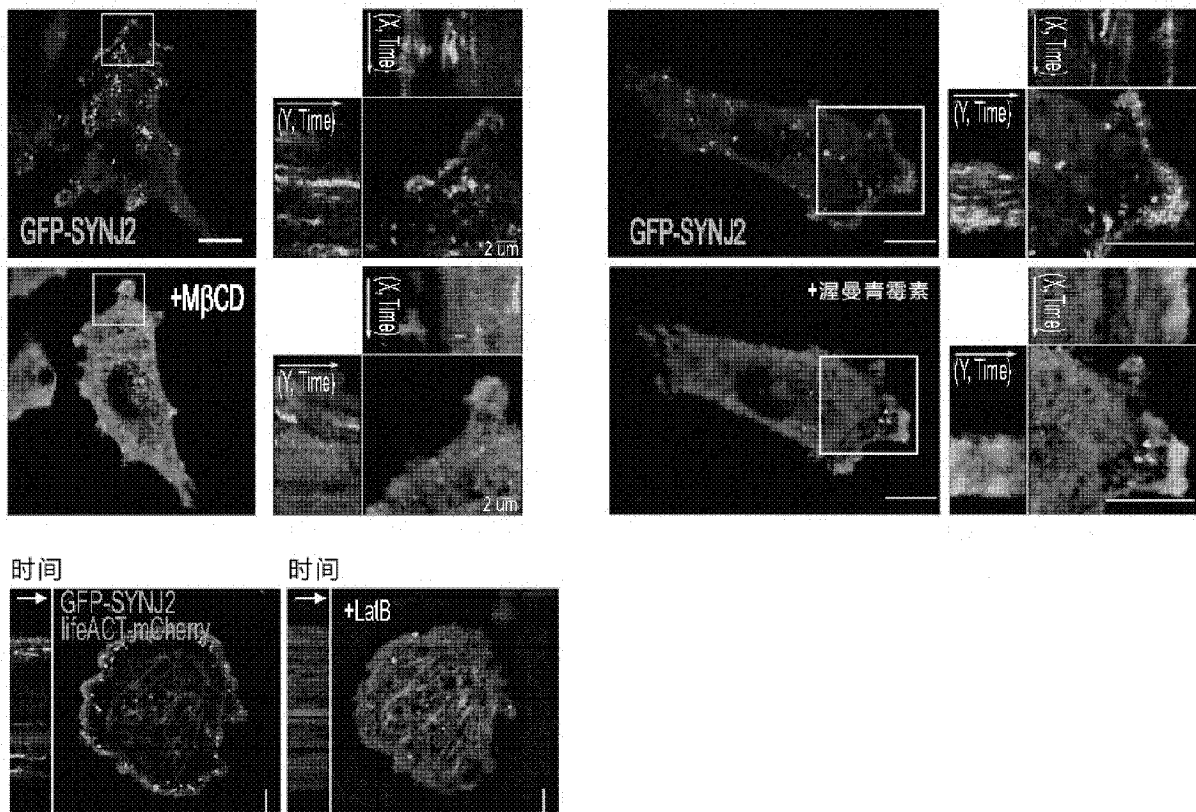


图 6D

图 7A

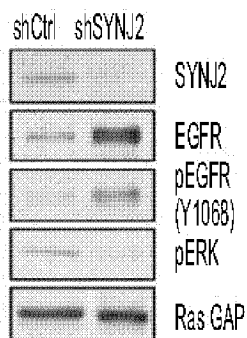


图 7B

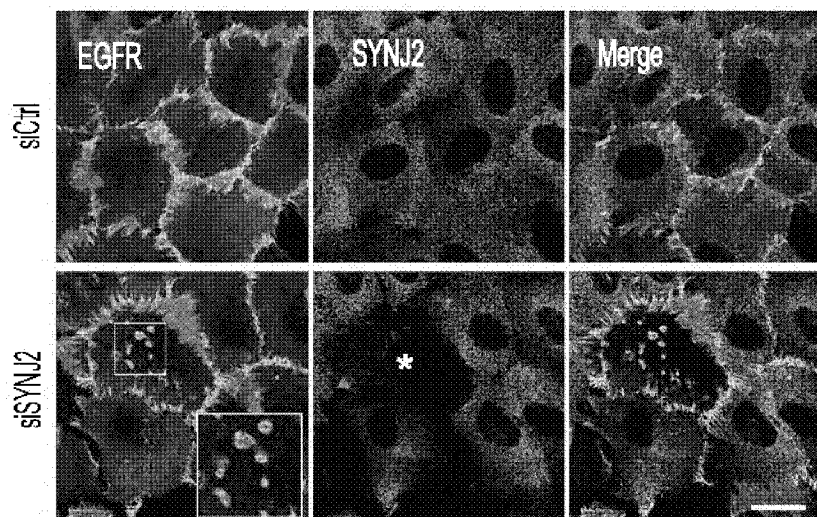


图 7C

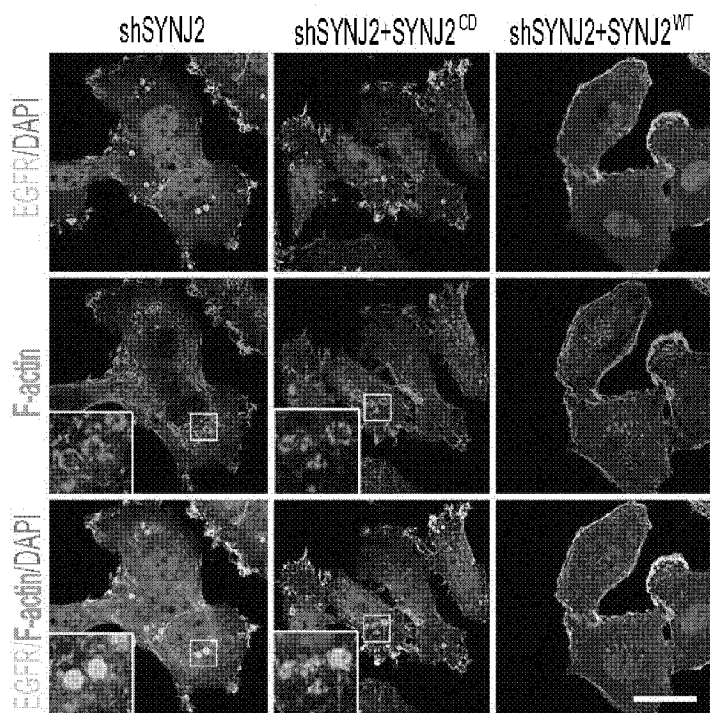


图 7D

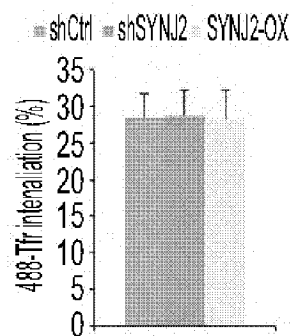
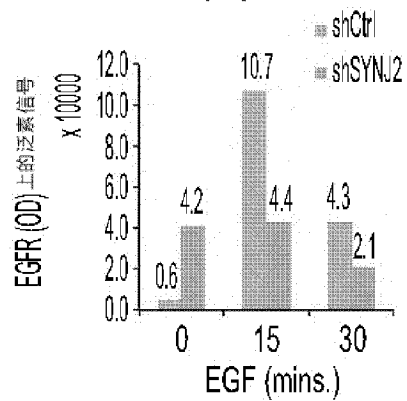


图 7E

图 8A

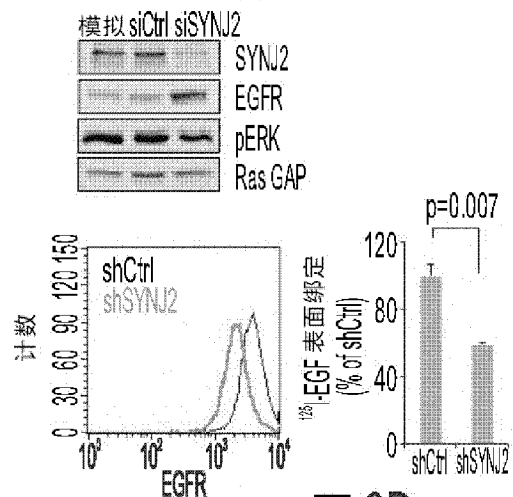


图 8C

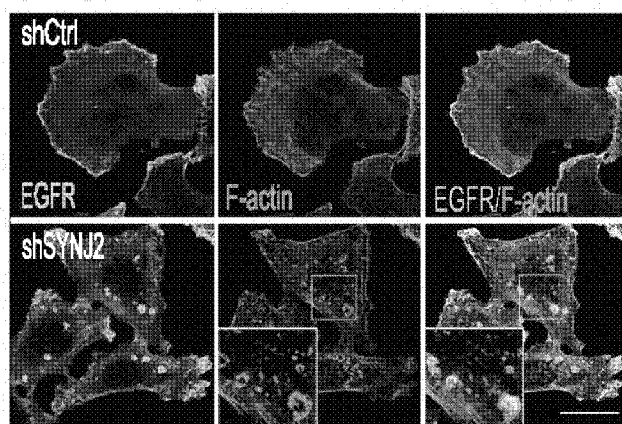


图 8B

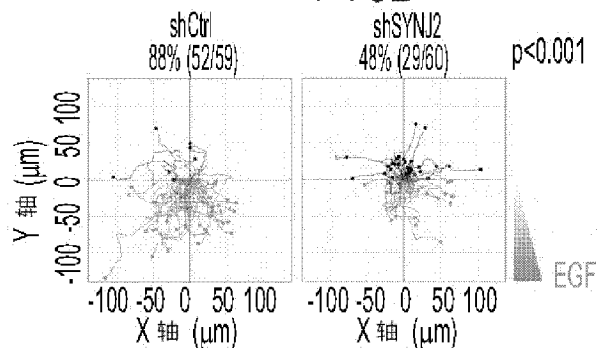


图 8D

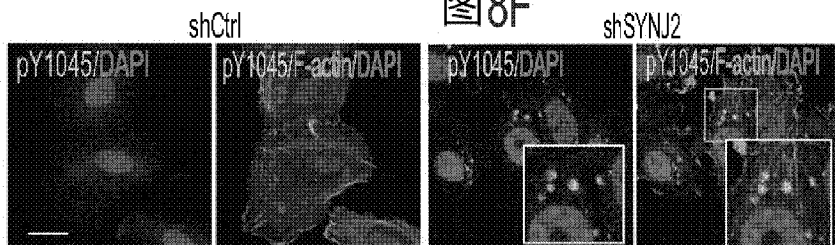


图 8F

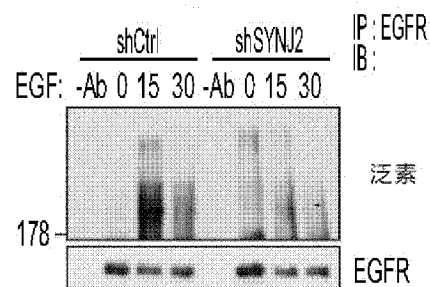


图 8E

图 8G

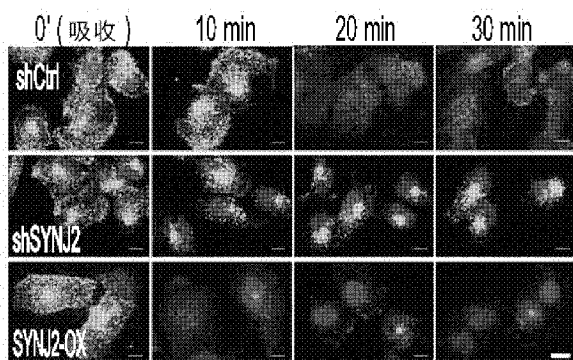
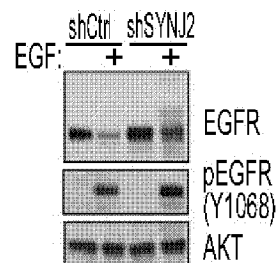


图 8H

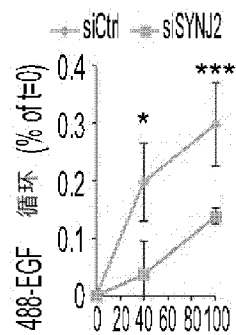
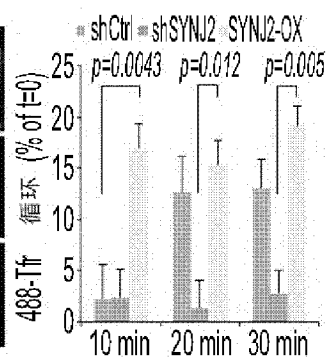


图 8I

图9A

EEA-1 F-actin DAPI

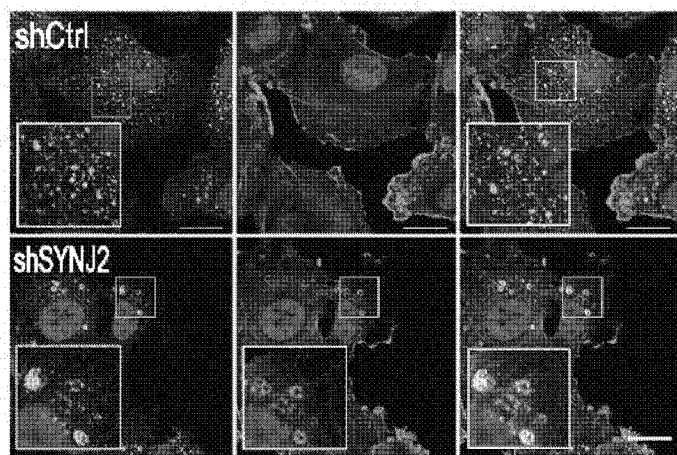


图9B

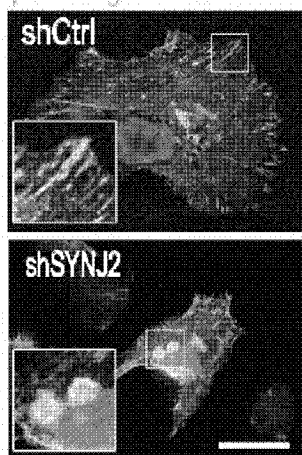
 $\beta 1$ - Integrin F-actin DAPI

图9C

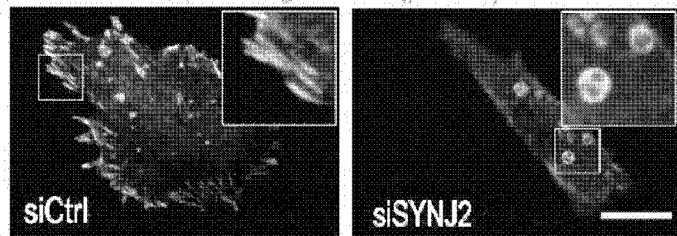
 $\beta 1$ - Integrin EGFR(pY1068)

图9D

桩蛋白 F-actin DAPI

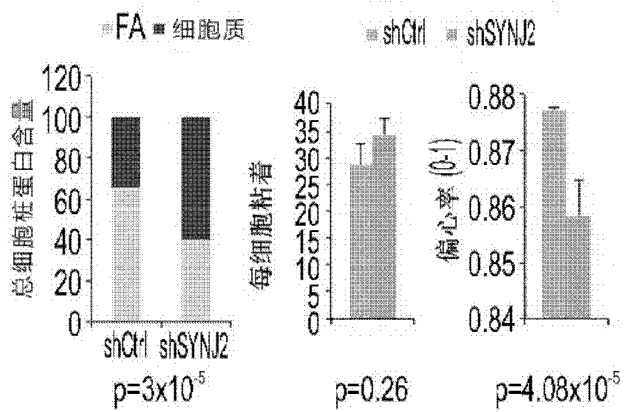
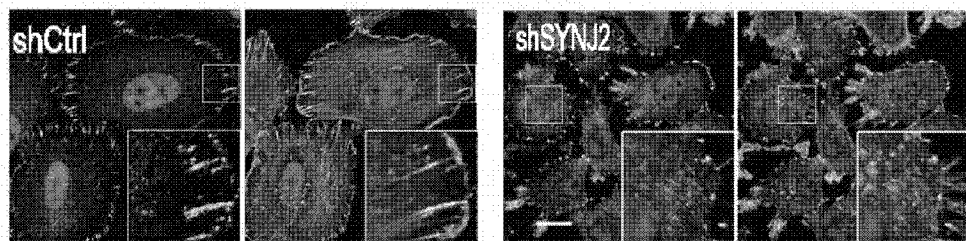


图10A

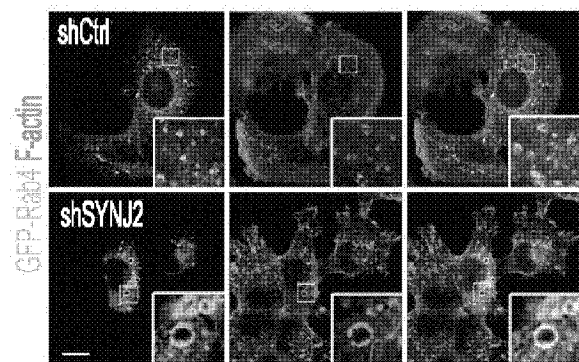


图10B

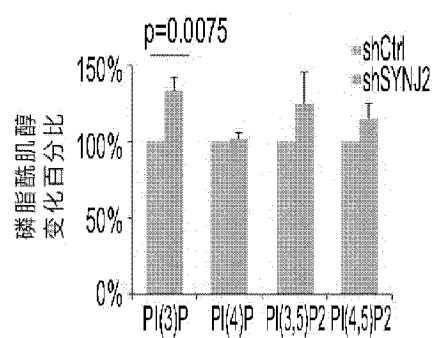
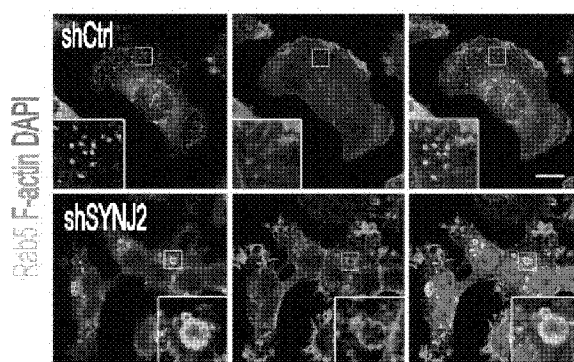


图10C

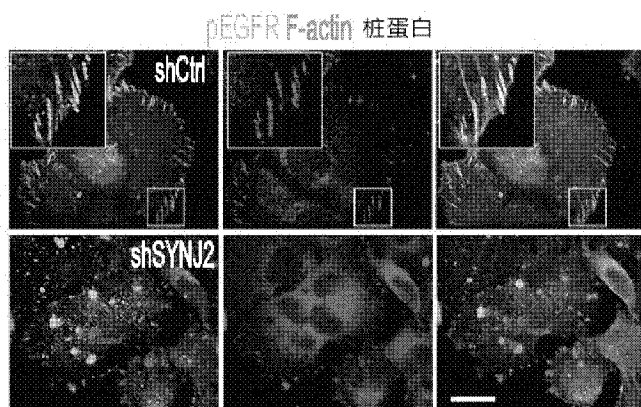
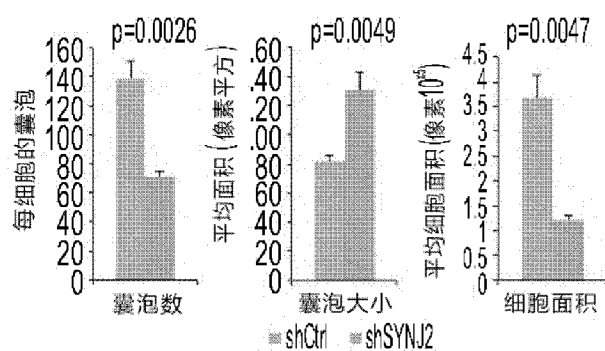


图10D

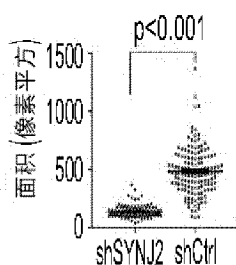
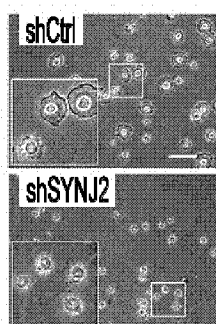


图10E

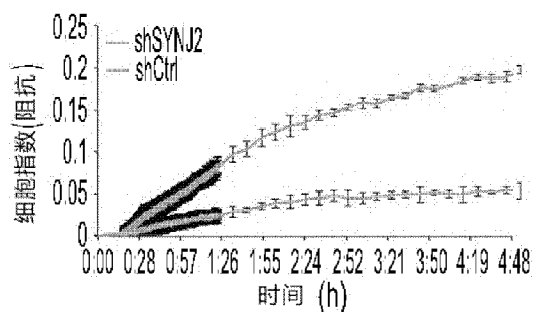


图10F

图11A

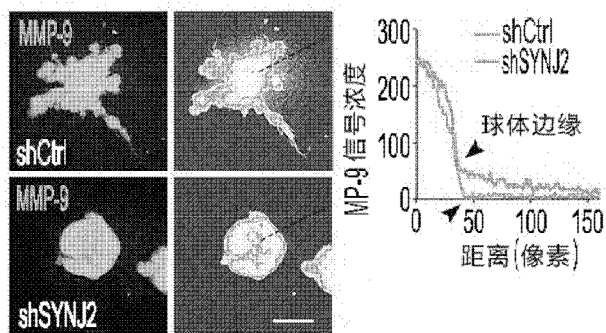


图11B

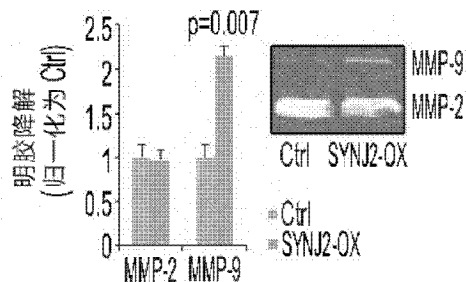


图11C

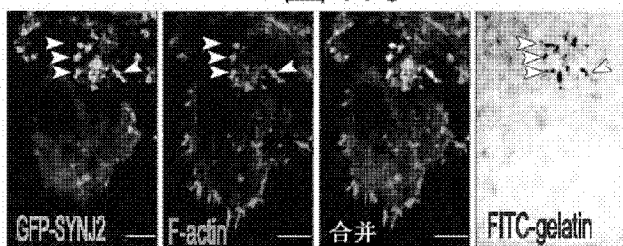


图11D

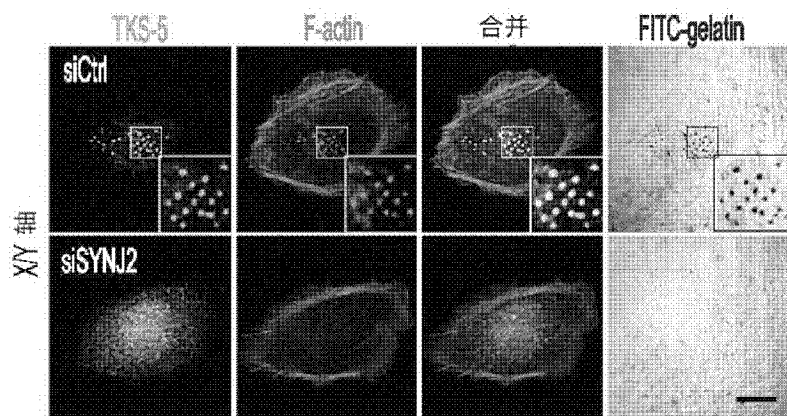
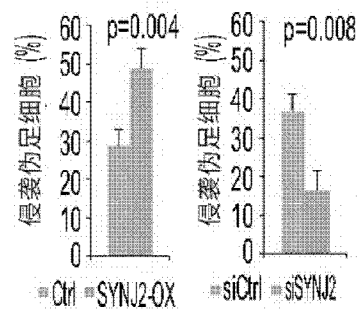


图11E

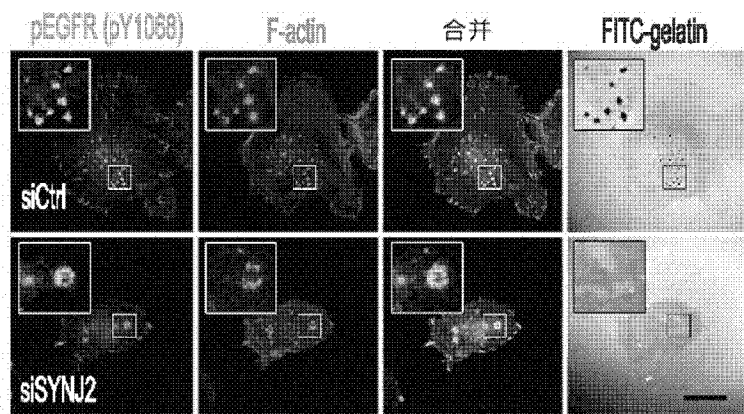
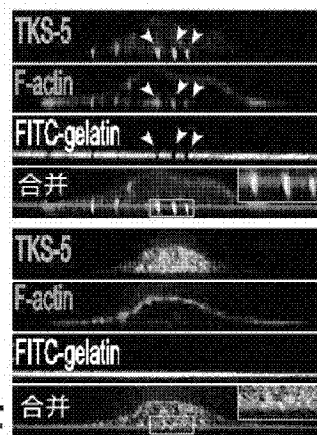


图11F

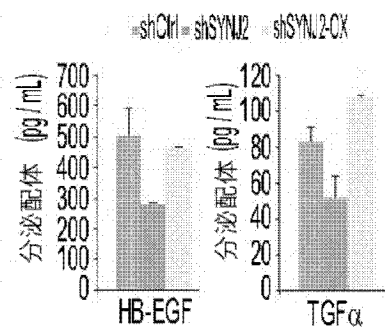
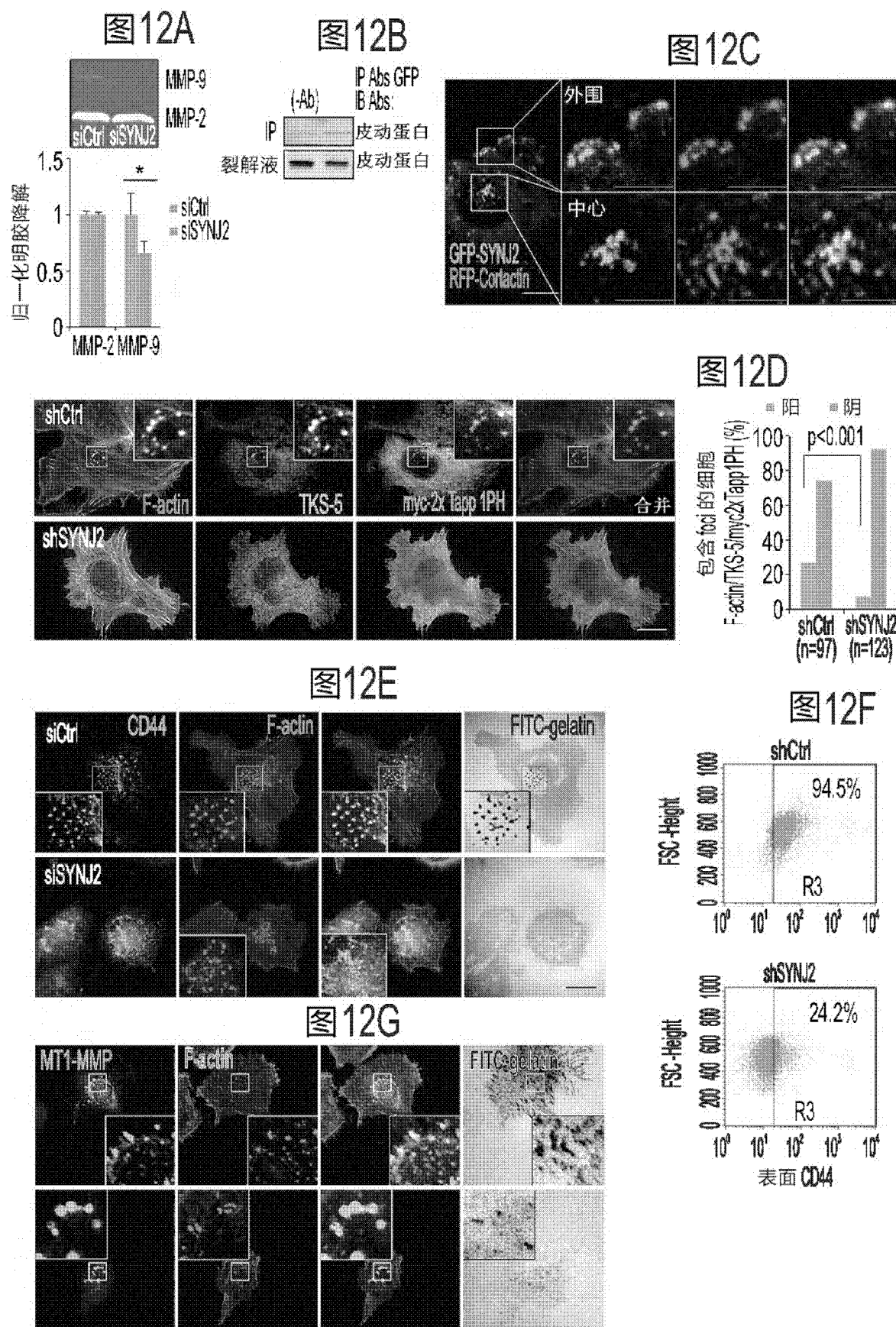


图11G



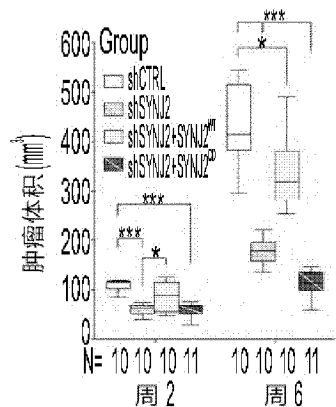


图13A

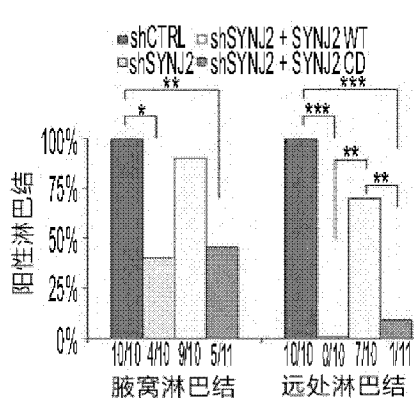


图13B

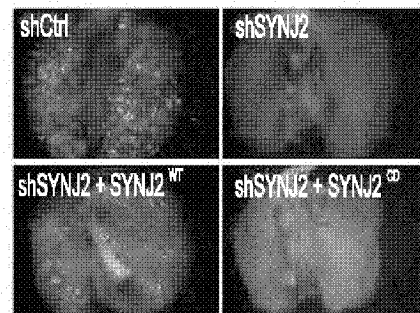


图13C

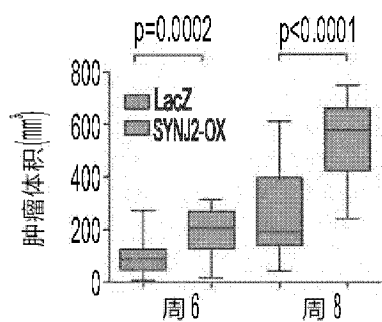


图13D

尾静脉 ► 肺

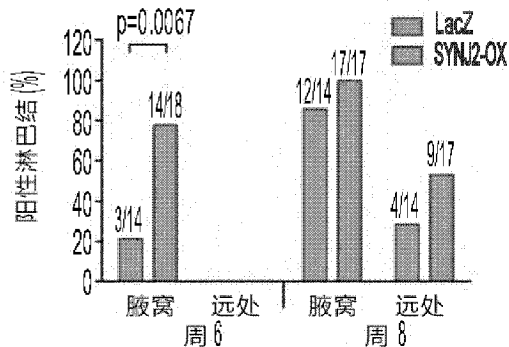
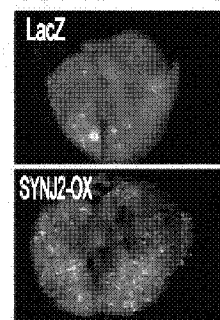


图13E

脂肪垫 ► 血



周8

图13F

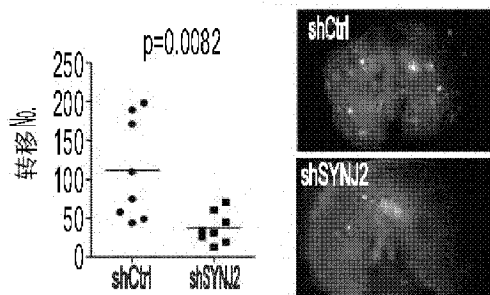
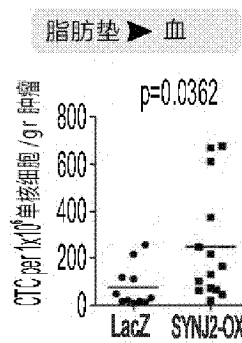
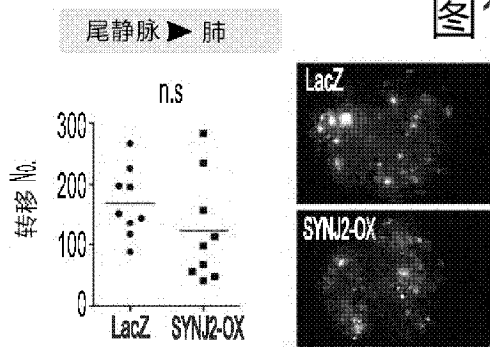
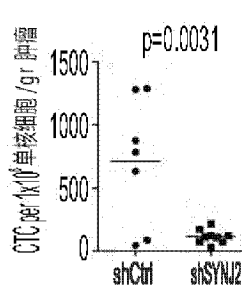


图13H



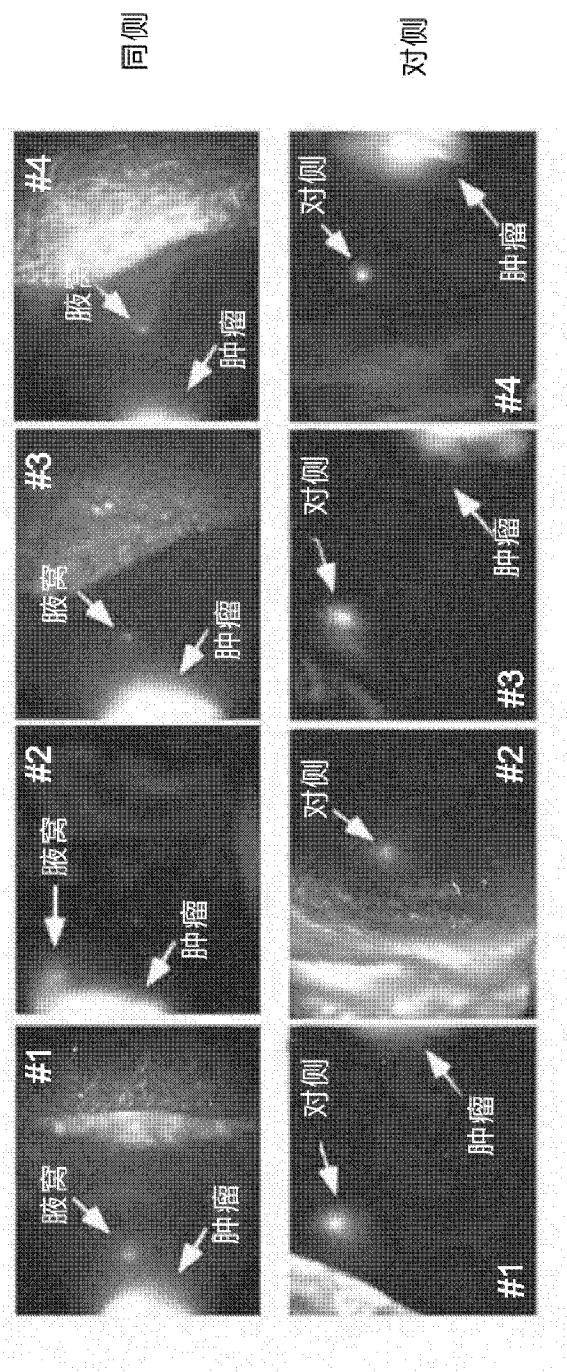


图 14

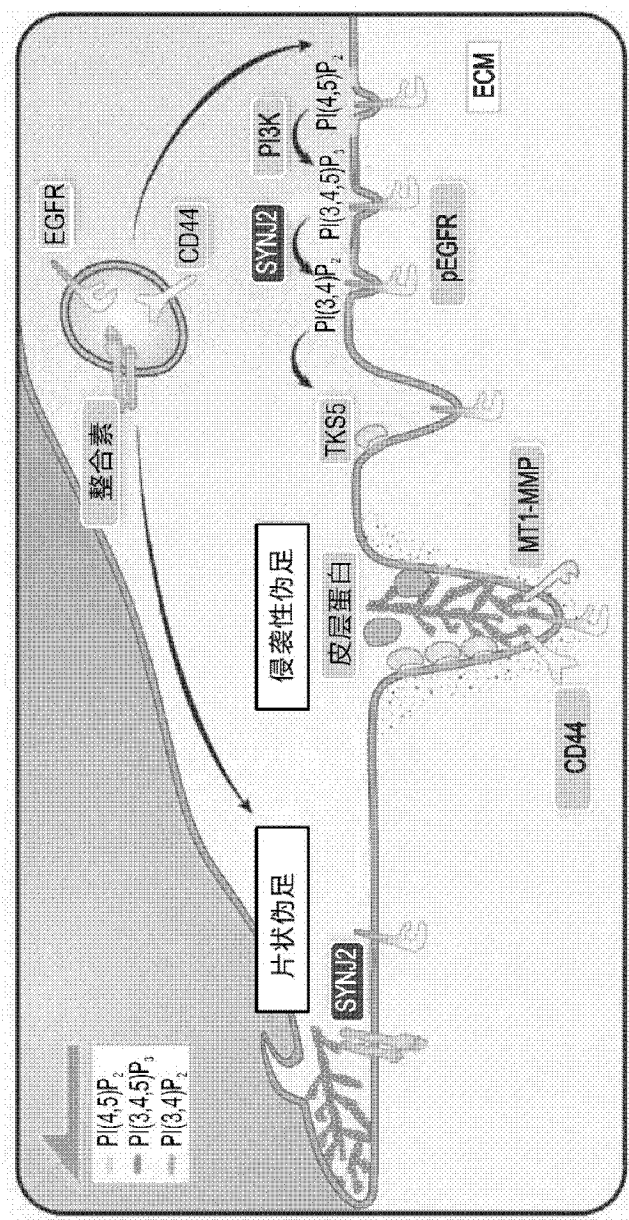


图 15

图16A

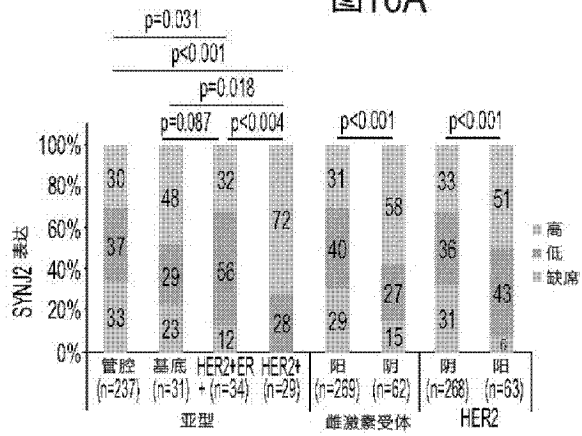


图16B

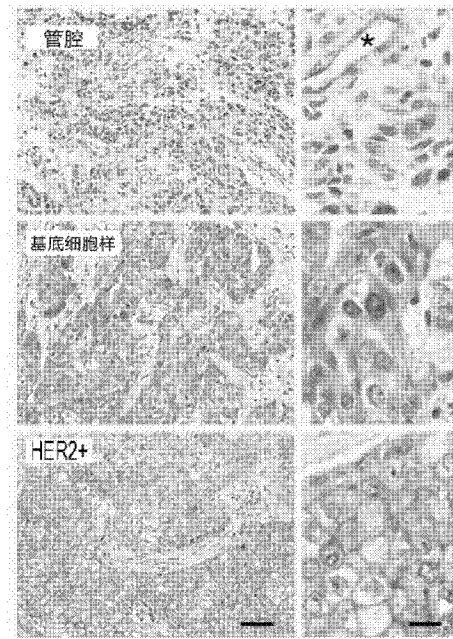
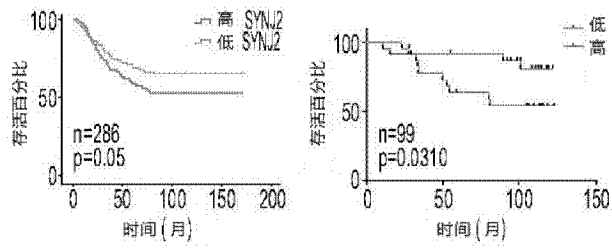
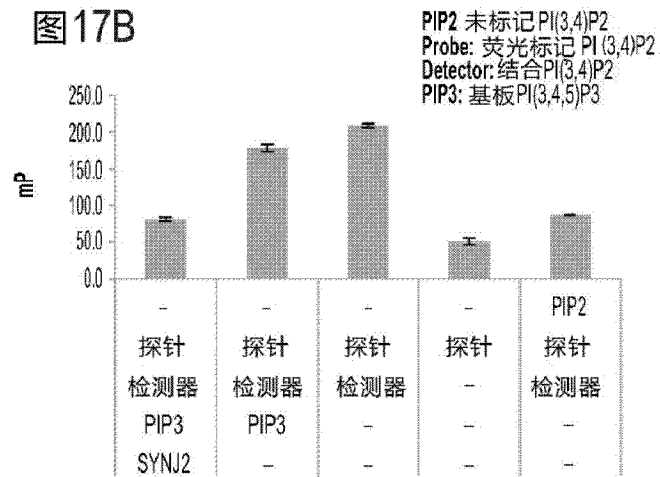
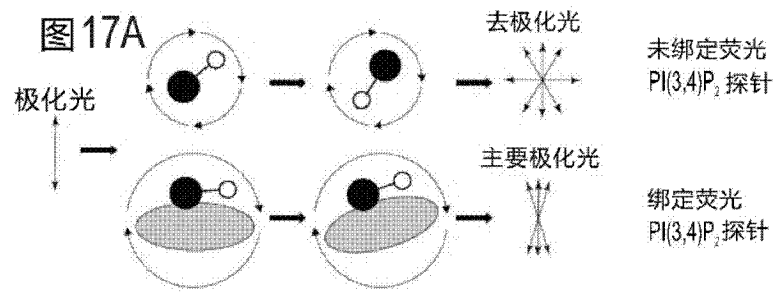


图16C





```

1/1 | 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 gac gat aag ggc gga tcc cct tac ttt act cct aaa cca cct caa gat agt acg gtt atc aaa gct gga tat
91/31 | ggt gla 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
181/61 | gaa aag gaa cct ctt cgc gla ala cca ctt aaa gag gtt cat aaa gtc 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 R D N L
271/91 | ttg gaa att gla aca acg tct cga act ttc tat glg cag gct gat agc cct gaa gag atg cac agt tgg att aaa gca gtc 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
361/121 | att gla gca cag cgg ggt ccc ggc aga tct gcg tct tct gag cat ccc 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 S E H P P P G P S E S K H A F R P T H
451/151 | gca gcc acc gcc acc tca cat tcc aca gcc tct cgc agc aac tct ttg gtc tca acc ttt acc atg 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 G F Y E S
541/181 | ctt gcc aag gtc aag cca ggg aac ttc aag gtc cag act gtc tct cca aga gaa cca gct tcc aaa gtg 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
631/211 | cct caa agt aaa aat ggc cct cag gaa aaa gat tgt gac cta gla gac ttg gac gat gcg agc ctt ccg gtc agt gac gtg ctg 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
721/241 | cac cac cac cac tga
    | H H H H H *

```

图 18