

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-513940**(P2007-513940A)**

(43) 公表日 平成19年5月31日(2007.5.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	2 G O 5 4
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 37/64	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/4375 (2006.01)	A 6 1 K 31/4375	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-543723 (P2006-543723)	(71) 出願人	506198492
(86) (22) 出願日	平成16年12月10日 (2004.12.10)		ゾッロ、マッシモ
(85) 翻訳文提出日	平成18年8月8日 (2006.8.8)		イタリア国、アイ — 8 0 1 4 5 ナボ
(86) 国際出願番号	PCT/IT2004/000689		リ、ヴィア コムナーレ マルゲリータ
(87) 国際公開番号	W02005/056043		4 8 2、バイオテクノロジー アバンザ
(87) 国際公開日	平成17年6月23日 (2005.6.23)		テ スカール、セインジェ気付
(31) 優先権主張番号	RM2003A000572	(74) 代理人	100066692
(32) 優先日	平成15年12月11日 (2003.12.11)		弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	イタリア (IT)	(74) 代理人	100072040
			弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100102897
			弁理士 池田 幸弘
		(74) 代理人	100088926
			弁理士 長沼 暉夫
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 h-PRUNE を過剰発現する腫瘍の転移を予防及び治療するための h-PRUNE の酵素阻害剤の使用

(57) 【要約】

本発明は、h-PRUNE の酵素阻害剤の使用、及び h-PRUNE を過剰発現する腫瘍の転移の予防及び治療のスクリーニング方法、及び前記転移の予後のための診断キットに関する。

【特許請求の範囲】

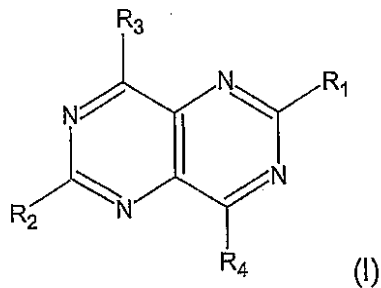
【請求項 1】

h-PRUNE の過剰発現を特徴とする腫瘍転移の予防及び治療用の薬剤を製造するための h-Prune サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤の使用。

【請求項 2】

h-prune サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤は、一般式 (I)

【化 1】



10

[式中、R₁ 及び R₂ は、同じ又は異なり、アミノアルコール、アミノアルキル、コレステロールからなる群から選択することができ、

R₃ 及び R₄ は、同じ又は異なり、複素環式芳香族又は芳香環からなる群から選択することができる] を有する請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記複素環式芳香族環は、ピラゾール、ピロール、イミダゾール、ピリジン、ピリミジン、モルホリンからなる群から選択することができる請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

R₁ 及び／又は R₂ は、ジエタノールアミンである請求項 2 及び 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

R₃ 及び／又は R₄ は、ピリミジンである請求項 2 から 4 までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記阻害剤は、ジピリダモールである請求項 2 から 5 までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項 7】

h-PRUNE サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤は、ビンポセチン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、IC261 及び誘導体、構造類似物、及びその異性体からなる群から選択される請求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

h-PRUNE サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤は、アミノ酸配列

NI IHGSOSVESA EKE (配列番号 9)

を含むペプチドである請求項 1 に記載の使用。

【請求項 9】

h-PRUNE サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤は、アミノ酸配列 NI IHGSOSVESA EKE GGGYGRKKR RORRR (配列番号 10) を含むペプチドであり、浸透性のあることを特徴とする請求項 1 に記載の使用。

【請求項 10】

50

h-PRUNEの過剰発現を特徴とする腫瘍は、乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、前立腺腫瘍、膵臓腫瘍、結腸腫瘍、直腸腫瘍、髄芽細胞腫、上皮腫、肝癌、T細胞又はB細胞リンパ腫、骨髄腫及びメラノーマ、及び肺腫瘍である請求項1から9までのいずれか一項に記載の使用。

【請求項11】

次のアミノ酸配列

N I I H G S O S V E S A E K E (配列番号9)

を含むペプチド。

【請求項12】

浸透性であることを特徴とする、アミノ酸配列

N I I H G S O S V E S A E K E G G G Y G R K K R R Q R R R (配列番号10)を含むペプチド。

10

【請求項13】

h-PRUNE阻害化合物のスクリーニング方法であって、

a) 少なくとも1つのホスホエステラーゼ(PDE)阻害化合物又は誘導体、構造類似物、又はその異性体を選択するフェーズと、

b) 0.05 μ Mから10 μ Mの範囲の濃度の前記少なくとも1つの化合物を、h-PRUNEを過剰発現する細胞系に投与するフェーズと、

c) h-PRUNEのサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の定量分析を行い、及び／又は細胞運動性対前記少なくとも1つの化合物及び化学誘引物質の濃度の分析を行い、前記ホスホジエステラーゼ活性を0.01から1 $\text{pmol} / \text{min}^{-1} / \text{ug}^{-1}$ の間の値に阻害し、及び／又は前記運動を細胞200から1200個の間の値を達成するまで阻害することができる化合物を選択するフェーズと

20

を含むスクリーニング方法。

【請求項14】

前記細胞系は、MDA-C100 435 prune #4である請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記定量分析は、c-AMP及び／又はc-GMP基質の加水分解試験により実施される請求項13及び14のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項16】

前記基質は、0.008 μ Mから1 μ Mの範囲の濃度で使用される請求項15に記載の方法。

【請求項17】

免疫学的アッセイ、FISH分析、リアルタイムPCR、in situハイブリッド形成法によるh-PRUNE過剰発現を特徴とする腫瘍の転移を診断するために生物試料中のh-PRUNEを検出する方法。

【請求項18】

a) 前記生物試料を、少なくとも1つの抗h-PRUNE抗体と接触させるステップと、

40

b) 抗原抗体複合体を検出するステップと、

c) 抗原抗体複合体の定量分析を行うステップとを含む請求項17に記載の方法。

【請求項19】

前記生物試料は、組織切片又は生体液である請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記抗h-PRUNE抗体は、モノクローナル又はポリクローナル抗体である請求項17から19までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項21】

前記抗h-PRUNE抗体は、放射性同位体、蛍光分子、又は酵素で標識されている請

50

求項 17 から 20 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

抗原抗体複合体の前記検出及び定量分析は、免疫組織化学分析、免疫沈降分析、免疫蛍光検査分析、ELISA 分析、免疫ブロット分析により実施される請求項 18 に記載の方法。

【請求項 23】

h-PRUNE に特異的な PCR リアルタイムプライマーは、配列
5'-AGAGATCTTTGGACAGGC AAACT-3' (配列番号 1)、
3'-CCATGTTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号 2)、
又はその相補配列を含む請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 24】

リアルタイム PCR 又は in situ ハイブリッド形成法の標識プローブは、オリゴヌクレオチド配列

CTGCATGGAACCATC (配列番号 3)、
又はその相補配列又は T が U で置き換えられた配列を含む請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

リアルタイム PCR の前記標識プローブは、線形又は円形プローブである請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記プローブは、少なくとも 1 つの放射性同位体及び／又は蛍光色素で標識されている請求項 24 及び 25 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 27】

前記プローブは、5' 及び／又は 3' で少なくとも 1 つの蛍光色素で標識されている請求項 24 から 26 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記蛍光色素は、6-カルボキシフルオレセインである請求項 24 から 25 までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

少なくとも 1 つの抗 h-PRUNE 抗体、又は h-PRUNE に特異的なプライマーの対又は h-PRUNE に特異的な標識オリゴヌクレオチドプローブを含む、h-PRUNE 過剰発現を特徴とする腫瘍の転移の診断のための生物試料中の h-PRUNE を検出するための診断キット。

30

【請求項 30】

h-PRUNE 過剰発現を特徴とする前記腫瘍は、乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、メラノーマである請求項 29 に記載の診断キット。

【請求項 31】

前記抗 h-PRUNE 抗体は、モノクローナル又はポリクローナル抗体である請求項 29 及び 30 のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 32】

前記抗 h-PRUNE 抗体は、放射性同位体、蛍光分子、又は酵素で標識されている請求項 31 に記載の診断キット。

40

【請求項 33】

h-PRUNE に特異的な前記プライマーの対は、配列
5'-AGAGATCTTTGGACAGGC AAACT-3' (配列番号 1)、
3'-CCATGTTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号 2)、
又はその相補配列を含む請求項 29 に記載の診断キット。

【請求項 34】

リアルタイム PCR 又は in situ ハイブリッド形成法の前記標識オリゴヌクレオチドプローブは、オリゴヌクレオチド配列

CTGCATGGAACCATC (配列番号 3)、

50

又はその相補配列又はTがUで置き換えられた配列を含む請求項29に記載の診断キット。

【請求項35】

リアルタイムPCRの前記標識オリゴヌクレオチドプローブは、線形又は円形プローブである請求項34に記載の診断キット。

【請求項36】

前記オリゴヌクレオチドプローブは、少なくとも1つの放射性同位体及び／又は蛍光色素で標識されている請求項34及び35のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項37】

前記プローブは、5'及び／又は3'で少なくとも1つの蛍光色素で標識されている請求項34から36までのいずれか一項に記載の診断キット。 10

【請求項38】

前記蛍光色素は、6-カルボキシフルオレセインである請求項37に記載の診断キット。

【請求項39】

h-PRUNE組換えタンパク質を認識し、選択的に結合することができ、IgM免疫グロブリンクラスに属し、4G3/4クローン(10/12/2004にジェノアのCBAに寄託)により産生されることを特徴とするモノクローナルマウス抗体。

【請求項40】

アミノ酸配列

NH₂-Ala-Leu-Glu-Glu-Ala-Val-Ala-Glu-Val-Leu-Asp-His-Arg-Pro-Ile-Glu-Pro-Lys-COOH (配列番号4)

又はその一部を含む、免疫に使用されるペプチドを認識し、選択的に結合することの特徴とするh-PRUNEのウサギからのポリクローナル抗体。

【請求項41】

オリゴヌクレオチド配列

5'-AGAGATCTTGGACAGGC AAACT-3' (配列番号1)、

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号2)、

又はその相補配列の少なくとも1つを含む、リアルタイムPCRを介したhPRUNE増幅のための特異的プライマー。 30

【請求項42】

配列

CTGCA TGG AACC ATC (配列番号3)、

又はその相補配列又はTがUで置き換えられた配列を含む、リアルタイムPCR又はin situハイブリッド形成法のためのh-PRUNEに特異的なオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項43】

前記プローブは、線形又は円形プローブである請求項42に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。 40

【請求項44】

前記プローブは、少なくとも1つの放射性同位体及び／又は蛍光色素で標識されている請求項42及び43のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項45】

前記プローブは、5'及び／又は3'で少なくとも1つの蛍光色素で標識されている請求項42から44までのいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【請求項46】

前記蛍光色素は、6-カルボキシフルオレセインである請求項45に記載のオリゴヌクレオチドプローブ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、h-PRUNEを過剰発現する腫瘍の転移を予防及び治療するためのh-PRUNEの酵素阻害剤の使用、前記阻害剤のスクリーニング方法、及び転移の検出のための診断キットに関する。

【0002】

より詳細には、本発明は、乳房腫瘍、肉腫、メラノーマ、神経芽細胞腫の転移を予防及び治療するためのh-PRUNEの酵素阻害剤の使用、及び前記阻害剤のスクリーニング方法に関する。さらに、本発明は、前記腫瘍の転移の診断キットに関する。

10

【背景技術】

【0003】

ヒトPRUNE (h-PRUNE) タンパク質は、DHHスーパーファミリーに属し、これは、細菌の核RecJ並びに酵母及び細菌のピロホスファターゼなどのいくつかのホスホエステラーゼを含む (Aravind他、1998年)。

【0004】

DHHスーパーファミリーは、それぞれのグループ内に、但し様々なグループにまたがらずに、非常によく保存されているC末端モチーフに基づき2つの主要なグループに分けることができる。このスーパーファミリーのすべてのメンバーは、イオン結合に関わり、ホスホエステル化に触媒作用を及ぼすことが予測される高く保存されている荷電アミノ酸残基を含む4つの他のモチーフを有する。これらの主要な特性は、第3のモチーフ、つまりDHH (Asp-His-His) であり、このスーパーファミリーはそれにちなんで名付けられている。

20

【0005】

RecJタンパク質は、DNA修復タンパク質であり、他のヌクレアーゼ及びきちんと特徴付けされていない細菌タンパク質と共に、第1のグループに属しているが、PRUNE及びポリホスファターゼは第2のグループに属している。

【0006】

ショウジョウバエの遺伝子PRUNEは、元々、野生型のハエの真っ赤な目とは対照的に、ドロソプテリンの減少による目の茶色がかった紫色を示す突然変異表現型に基づいて特徴付けられたものである (Timmons他、1996年)。同型接合型PRUNE突然変異体は生存可能であり、繁殖可能であるが、羽根を生じさせる成虫原基の正しい形成に干渉する少なくとも1つの単一突然変異コピーの存在下で擬似黒色腫瘍を発症することにより致命的である (awd/Kpn、PRUNEのキラーともいう)。

30

【0007】

ヒトは、awd遺伝子 (nm23) の最大8個までのオーソログをコードし、そのうち少なくとも4つは、ヌクレオシド三リン酸からヌクレオシド二リン酸へのリン酸基転移に触媒作用を及ぼす活性ヌクレオシド二リン酸キナーゼ (NDKP) についてコードする (Lombardi他、2000年)。

【0008】

いくつかの腫瘍及び高増殖性細胞は、nm23-H1 mRNA及びそのタンパク質を過剰発現し、ほとんどの場合、この過剰発現は、癌の初期段階に関連している。乳癌は、その生物学的異質性及び治療に対する反応性が広範であることのため、臨床管理が難しい複雑な疾患である (Keen他、2003年)。腫瘍形成の根底にある分子レベルのメカニズムに関する知識が向上したことで、病変発症の様々な段階における様々な癌予後と相関関係を有するますます増えるバイオマーカーの同定が可能になり、その結果、最も好適な治療上の処置を選べるようになった (Keen他、Domchek他、2002年)。

40

【0009】

原発性乳癌の場合に現在使用されている十分に確立された予後因子には、リンパ節転移、書式的所見、癌の大きさ、エストロゲン及びプロゲステロン受容体の状態、増殖指数

50

、核又は組織学的グレードがある（Kuru他、2003年、Morabito他、2003年）。腫瘍病変発症におけるその後の段階の予後のためのマーカーとして使用されるその後の変換、侵襲性、及び転移プロセスに関わる新しい分子を用意すると有益であろう。

【0010】

乳癌及びメラノーマでは、ヒトnm23-H1の高い発現は、転移能の減少に関連する（Florenes他、1992年）。乳癌の特異ケースについては、転移の広がり、実質的にすべての癌死亡に関与している。

【0011】

侵襲性腫瘍細胞になるには、その接着性を変え、原発腫瘍内の他の細胞との接触を緩め、腫瘍細胞が侵襲する組織の宿主細胞の細胞外マトリックスとの新しい接触を確立する必要がある。この文脈において、腫瘍細胞の周囲のプロテアーゼ活性の調節は、重要な役割を果たす。原発腫瘍から移行し、循環系から出て、二次器官のコロニー形成を行うために、腫瘍細胞は、運動性機能を取得する必要がある。

10

【0012】

今日まで、複数の転移抑制遺伝子が分離され、特徴付けられている（Steeg他、2003年）。このグループ内では、nm23は、腫瘍乳腺細胞内で過剰発現したときに細胞運動性の減少を引き起こし（Freije他、1997年、Hartsough他、2001年、Freije他、1997年）、足場非依存性コロニー形成に影響を及ぼし、分化を引き起こす（Kantor他、1993年、Leone他、1993年、Howlett他、1994年、Hartsough他、1998年、Lombardi他、2000年）ことが知られている。さらに、悪性乳癌細胞系クロンMDA-C100におけるnm23-H1の過剰発現は、その転移性表現型をin vitroとin vivoの両方で減らすことが実証されている（Hartsough他、2000年、Mao他、2001年、Tseng他、2001年）。

20

【0013】

本発明者は、以前の研究で、h-PRUNEとnm23-H1との間の相互作用、及びnm23H1-S120G突然変異によるこの相互作用の阻害を実証した（Reymond他、1999年）。さらに、h-PRUNEの複数のコピーの増幅の結果、細胞増殖が引き起こされ、高レベルのh-PRUNE発現は、中又は低nm23-H1レベルに比べて、肉腫及び乳癌腫瘍の悪性度増大と相関関係があることが開示されている（Forus他、2001年）。

30

【0014】

したがって、腫瘍及びその転移の治療及び予防に都合よく使用されるh-PRUNEの酵素活性を阻害するのに好適な化合物を提供することが必要であることは、h-PRUNEの過剰発現により特徴付けられることは明らかである。

【0015】

そこで、本発明の著者は、特に乳癌の転移に特に相関する、治療酵素作用阻害の影響を受けやすい、h-PRUNEの新しい酵素活性を確認した。実際、著者は、h-PRUNEが、基質としてのcAMPに対する親和性がcGMPよりも優先するサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性を有し、これは何らかのホスホジエステラーゼ阻害剤により効果的に抑制されることを発見した。

40

【0016】

さらに、本発明の著者により実施された研究を通して、h-PRUNE酵素は、複数の組織内の転移性腫瘍のnm-23発現の同時減少を伴って過剰発現することになることが突き止められた。さらに、乳房腫瘍モデルにおけるnm23H1との物理的タンパク質間相互作用による、cAMP-PDE h-PRUNEの活性増大と細胞運動性との間の直接的相関関係も見つかった。この発見は、細胞増殖及び腫瘍転移プロセスの抑制におけるnm23-H1の防御機能の修正をもたらすh-PRUNEとnm23-H1との間の相互作用の重要性を示している。

50

【0017】

本発明の他の態様によれば、乳癌の臨床的発症の予後に対する潜在的独立マーカーとしてのh-PRUNEの考えられる役割は、乳癌患者グループ内でのh-PRUNEタンパク質及びnm23-H1の発現の分布を研究することにより評価された。特に、h-PRUNE過剰発現は、様々な分析された臨床例間で均質的に分布し、例えば、腫瘍型、組織学的サイズ、エストロゲン及びプロゲステロン受容体反応性、リンパ節転移などの他の因子から独立して予後マーカーとしてタンパク質を有利に使用する機会が得られる。新しいマーカーの同定は、採用すべき目標治療の選択に関して、転移能を有する腫瘍を同定し、乳癌に悩む患者をより効果的に管理するために使用することができる。

【0018】

h-PRUNEサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害を評価する好適なスクリーニング法を通じて試験されたいくつかのホスホジエステラーゼ(PDE)のうち、抗凝血性について既に知られている薬剤は、*in vitro*と乳房細胞モデルの両方において、IC₅₀に関してh-PRUNE活性を阻害する最高の能力を示した。また、スクリーニングにおけるビンボセチン及び3-イソブチル-1-メチルキサンチン(IBMx)は、h-PRUNE阻害に対しIC₅₀の有望な値を示しており、この選択からのデータは、上述の3つの成分の構造上類似の誘導体及び異性体に対するスクリーニングの取り扱いを示唆している。

【0019】

最後に、多くの転移性の乳房の腫瘍の*in vivo*分析から、h-PRUNEタンパク質の高いレベルとnm23-H1発現の負の調節との間の直接的相関関係の存在が確認されており、その結果、臨床的追跡研究で報告されているように遠隔転移形成が生じる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

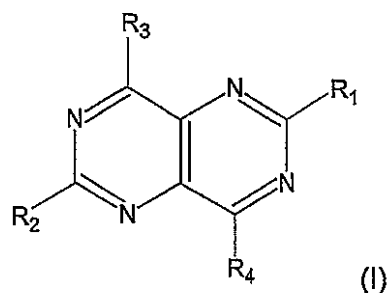
したがって、本発明の目的は、例えば、乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、前立腺腫瘍、膵臓腫瘍、結腸腫瘍、直腸腫瘍、髄芽細胞腫、上皮腫、肝癌(epatocarcinoma)、T細胞又はB細胞リンパ腫、骨髄腫、及びメラノーマなどの、h-PRUNEの過剰発現によって特徴付けられる腫瘍転移の予防及び治療用の薬剤を製造するために、h-PRUNEサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤を使用することである。

【課題を解決するための手段】

【0021】

特に、本発明は、以下の一般式(I)を有するh-PRUNEサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤に関する。

【化1】



式中、R₁及びR₂は、同じ又は異なり、アミノアルコール、アミノアルキル、コレステロールからなる群から選択することができ、

R₃及びR₄は、同じ又は異なり、複素環式芳香族又は芳香環からなる群から選択する

ことができる。好ましくは、複素環式芳香族環は、ピラゾール、ピロール、イミダゾール、ピリジン、ピリミジン、モルホリンからなる群から選択することができる。本発明の好ましい一実施形態では、R 1 及び／又は R 2 は、ジエタノールアミンであり、R 3 及び／又は R 4 は、ピリミジンである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0022】

本発明のより好ましい一実施形態では、R 1 及び R 2 は、ジエタノールアミンであり、R 3 及び R 4 は、ピリミジンであり、阻害剤は、ジピリダモールである。

【0023】

本発明は、さらに、ビンボセチン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン、IC261 及び誘導体、構造類似物、及びその異性体からなる群から選択することができる h-PRUNE サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤の使用に関する。

【0024】

さらに、本発明の目的は、アミノ酸配列 N I I H G S D S V E S A E K E (配列番号 9) を含むペプチドである h-PRUNE サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤の使用である。特に好ましい一実施形態では、前記ペプチドは、さらに、前述のアミノ酸配列の下流に、浸透性に関わり、配列 G G G Y G R K K R R Q R R R を有する他のペプチドを含む。したがって、浸透性があることを特徴とするペプチドは、配列 N I I H G S D S V E S A E K E G G G Y G R K K R R Q R R R (配列番号 10) を含む。

【0025】

本発明の他の目的は、ペプチドが、アミノ酸配列 N I I H G S D S V E S A E K E (配列番号 9) を含み、特定の一実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列 N I I H G S D S V E S A E K E G G G Y G R K K R R O R R R (配列番号 10) を含むことであり、配列 G G G Y G R K K R R O R R R があるため浸透性を有することを特徴とする。

【0026】

本発明の他の目的は、h-PRUNE 阻害化合物のスクリーニング方法であり、これは以下のステップを含む。

a) 少なくとも 1 つのホスホエステラーゼ (PDE) 阻害化合物又は誘導体、構造類似物、又はその異性体を選択するステップ、

b) 0.05 μ M から 10 μ M の範囲の濃度の前記少なくとも 1 つの化合物を、1 つの h-PRUNE 過剰発現細胞系に投与するステップ、

c) h-PRUNE のサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の定量分析を行い、及び／又は細胞運動性対前記少なくとも 1 つの化合物及び化学誘引物質の濃度の分析を行い、及び前記ホスホジエステラーゼ活性を 0.01 から 1 p m o l / m i n ⁻¹ / μ g ⁻¹ の間の値に阻害し、及び／又は前記運動を 200 から 1200 細胞の間の値まで阻害することができる化合物を選択するステップ。

【0027】

前記活性の阻害剤として試験した化合物による h-PRUNE のサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害は、前記の化合物に対する IC₅₀ の評価により確定することができる。

【0028】

h-PRUNE を過剰発現する細胞系は、MDA-C100 435 prune #4 (10/12/2004 にジェノアの CBA に寄託) である。

【0029】

h-PRUNE のサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の定量分析は、c-AMP 及び／又は c-GMP 基質の加水分解試験により実施できる。前記基質は、0.008 μ M から 1 μ M の範囲の濃度で使用される。

【0030】

本発明の他の目的は、少なくとも同定された 1 つの化合物、又はその誘導体、構造類似物、又は異性体を、1 つ又は複数の補助剤及び／又は薬理学的に許容される賦形剤と共に

10

20

30

40

50

、混合する追加のステップd)を含む、上述のような方法を含む薬剤組成物を製造する方法である。

【0031】

さらに、本発明は、h-PRUNEの過剰発現により特徴付けられる腫瘍の転移の予防及び治療用の薬剤を製造するための、前記腫瘍は乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、及びメラノーマである、上で定義されたような方法に従って選択されたh-PRUNE阻害化合物の使用に関する。

【0032】

本発明の他の目的は、免疫学的アッセイ、FISH分析、リアルタイムPCR、in situハイブリッド形成法によりh-PRUNE過剰発現により特徴付けられる腫瘍の転移を診断するため生物試料中のh-PRUNEを検出する方法である。特に、前記方法は、以下のステップを含むことができる。

- a) 例えば、組織切片又は生体液などの前記生物試料を、放射性同位体、蛍光分子、又は酵素で標識付けできる少なくとも1つのモノクローナル若しくはポリクローナル抗h-PRUNE抗体と接触させるステップ、
- b) 抗原抗体複合体を検出するステップ、
- c) 抗原抗体複合体の定量分析を行うステップ。

【0033】

抗原抗体複合体の検出及び定量分析は、免疫組織化学分析、免疫沈降分析、免疫蛍光検査分析、ELISA分析、免疫プロット分析により実施することができる。

【0034】

リアルタイムPCRによりh-PRUNE過剰発現により特徴付けられる腫瘍の転移を診断するため生物試料中のh-PRUNEを検出する方法に関して、特異的プライマーは、5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAACT-3' (配列番号1)、3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号2)、又はその相補配列である。

【0035】

in situハイブリッド形成法を使用して過剰発現により特徴付けられる腫瘍の転移を診断するため生物試料中のh-PRUNEを検出する方法に関して、標識プローブは、オリゴヌクレオチド配列CTGCATGGAACCATC (配列番号3) 又はその相補配列又はTをUで置き換えた配列を含むことができる。

【0036】

リアルタイムPCRの前記標識プローブは、線形又は円形プローブとすることができ (TaqMan、ハイブリッド形成プローブ、分子ビーコン)、標識付けは、少なくとも1つの放射性同位体及び/又は蛍光色素により実施できる。少なくとも1つの蛍光色素 (放射若しくは励起型)、好ましくは6FAM (6-カルボキシフルオレセイン) による標識付けは、プローブオリゴヌクレオチド配列の3' 及び/又は5' 末端で実施できる。

【0037】

本発明の他の目的は、例えば、放射性同位体、蛍光分子、又は酵素で標識付けできる、少なくとも1つのモノクローナル又はポリクローナル抗h-PRUNE抗体を含む、h-PRUNE過剰発現により特徴付けられる腫瘍 (例えば、乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、メラノーマ、前立腺癌、直腸結腸癌など) の転移を診断するため生物試料中のh-PRUNEを検出するための診断キットである。

【0038】

診断キットは、それとは別に、配列5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAACT-3' (配列番号1)、3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号2)、又はその相補配列を含むことができるh-PRUNEの特異的プライマーをいくつか含むことができる。

【0039】

最後に、診断キットは、オリゴヌクレオチド配列CTGCATGGAACCATC (配

10

20

30

40

50

列番号3)又はその相補配列又はTをUで置き換えた配列を含むことができるリアルタイムPCR又は*in situ*ハイブリッド形成用の少なくとも1つの標識オリゴヌクレオチドプローブを備えることができる。

【0040】

リアルタイムPCR用の前記標識オリゴヌクレオチドプローブは、線形及び／又は円形プローブであり、標識付けは、少なくとも1つの放射性同位体及び／又は蛍光色素、好ましくは6-FAM(6カルボキシフルオレセイン)を使用することができ、プローブのオリゴヌクレオチド配列の3'及び／又は5'末端で実施することができる。

【0041】

本発明の他の目的は、IgM免疫グロブリンクラスに属し、4G3/4クローン(10/12/2004にジェノアのCBAに寄託)により産生されることを特徴とする、h-PRUNE組換えタンパク質を認識し、選択的に結合することができるモノクローナルマウス抗体である。このクローンは、NH₂末端でマルトース結合タンパク質(pMAL5構造)を含む融合構造内のh-PRUNE組換えタンパク質全体によるマウスへの免疫付与を通じて得られた。タンパク質は、マルトースアフィニティカラムクロマトグラフィーを通じて精製され、その後、1つのブースターが精製タンパク質100μgを含む5つのブースターと共に、2匹のマウスに注射された。

【0042】

さらに、本発明は、アミノ酸配列NH₂-Ala-Leu-Glu-Glu-Ala-Val-Ala-Glu-Val-Leu-Asp-His-Arg-Pro-Ile-Glu-Pro-Lys-COOH(配列番号4)又はその一部を含むウサギ免疫に使用されるペプチドを認識し、選択的に結合することを特徴とする、h-PRUNE(A59)ウサギポリクローナル抗体に関する。

【0043】

本発明の他の目的は、オリゴヌクレオチド配列5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAACT-3'(配列番号1)、3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5'(配列番号2)、又はその相補配列のうちの少なくとも1つを含むリアルタイムPCRによるh-PRUNE増幅用の特異的プライマーを提供することである。

【0044】

最後に、本発明は、配列CTGCATGGAACCATC(配列番号3)又はその相補配列又はTをUで置き換えた配列を含む、リアルタイムPCR又は*in situ*ハイブリッド形成用のh-PRUNE特異オリゴヌクレオチドプローブに関する。

【0045】

リアルタイムPCR用の前記オリゴヌクレオチドプローブは、線形及び／又は円形プローブであり、少なくとも1つの放射性同位体及び／又は蛍光色素、好ましくは6-FAM(6-カルボキシフルオレセイン)で標識付けすることができ、前記標識付けは、プローブのオリゴヌクレオチド配列の3'及び／又は5'末端で実施することができる。

【0046】

本発明は、好ましいいくつかの実施形態により、付属の図面の図を特に参照しつつ、例示により、但し制限することなく、説明される。

【実施例】

【0047】

(実施例1)

h-PRUNEの構造及び機能分析

材料と方法

タンパク質配列分析

アメリカ国立バイオテクノロジーセンター(NIH、ベテスダ)のタンパク質配列の非冗長データベースは、PSI-BLASTプログラムを使用して繰り返し検索した(Altshul他、1997年)。タンパク質配列の多重整列は、T-coffeeプログラム(Notredame他、1993年)を使用して構築され、PSI-BLASTプ

10

20

30

40

50

プログラムの結果に基づいて補正された。

【0048】

Philip Fitchプログラム及びMolphyパッケージProtMLプログラムを使用して系統樹が構築された。

【0049】

SWISS-PDB-viewerソフトウェアを使用して、タンパク質構造のホモロジーモデリングを実施し、タンパク質バックボーンの衝突が最小になるようにテンプレートとの整列を手作業で調整した。エネルギーの最小化は、シップル様の力場を使用するGROMOSプログラムを使用して実施された。

【0050】

10

MOLESCRIPTプログラムを使用して、リボン構造タンパク質の図を作成した。

【0051】

細胞培養

HEK-293及びMDA-MB-435細胞は、37℃、CO₂ 5%でウシ胎児血清10%、ペニシリン100単位/ml、及びストレプトマイシン100 µg/mlを補ったDulbeccoの改変イーグル培地で培養した。

【0052】

バキュロウイルス (Baculovirus) におけるタンパク質発現及び精製

Baculovirus Expression System (Invitrogen) を使用してタンパク質発現を実施した。要するに、h-PRUNE、nm23-H1、及びnm23-H1 (Mac Donald他、1996年) 及びh-PRUNE突然変異体h-PRUNEΔ、D28A、D106A、D179A、D28A-D106A、D28A-D106A-D126A、D28A-Δ、4DΔ (D28A-D106A-Δ-D179A) をコードするcDNAをEcoRI/XhoI消化pFastBac-Htaベクターにサブクロニングした。

20

【0053】

h-PRUNE突然変異体cDNAを生成するために、h-PRUNE構造の特定部位の突然変異誘発を取扱説明書に従ってQuickChange II Iキット (Stratagene) を使用して実施した (実施例2を参照)。

【0054】

30

ウイルス感染及び精製条件については、Garzia及びcoil (2003年) で説明されている。

【0055】

その後、ヒスチジンタグ付きh-PRUNE及びh-PRUNEΔを、10mM Tris HCl pH 8.0緩衝液を使用してMonoQ HR 5/5カラム (Amersham) 上で精製した。カラム溶離は、0から0.8MのNaClの直線勾配で20分にわたり、流量1ml/分で実施した。画分をさらに10mM Tris HCl、pH 8.0緩衝液に対して透析し、活性について試験した。

【0056】

40

分離されたタンパク質の純度を、SDS Page電気泳動分析により測定した。

【0057】

h-PRUNEホスホジエステラーゼ活性の同定及び特徴付け

PDE活性は、Fisher他、1998年により説明されているcAMP/cGMP検出アッセイにより、シンチレーションアッセイ (Amersham Pharmacia Biotech) により測定した。

【0058】

基質として所望の濃度のcAMP又はcGMPを含む100 µlのアッセイ緩衝液 (50mM Tris HCl、pH 7.4、8.3mM MgCl₂、1.7mM EGTA) を使用し、30℃で試料を希釈、インキュベートした (非標識対³H標識の比=3:1)。

50

【0059】

培地のみを含むブランクを含み、すべての反応を3通り実施し、基質回転率25%未満（経験により決定）となるインキュベーション時間の間進行させた。

【0060】

50 μ l のケイ酸イットリウムSPAビーズ（Amersham）を加えて反応を終結させた。

【0061】

メーカープロトコルに従って検出された放射性標識産物の量について酵素活性を計算した。陰性対照として、モチーフIl1領域（Apotech Corporation、CH）に対するA59ポリクローナル抗体と共にプレインキュベートした、h-PRUNE 及びh-PRUNE Δ 突然変異体を使用した。 10

【0062】

特に、h-PRUNE 及びh-PRUNE 突然変異体のPDE活性については、精製酵素200 ngを、10分間、30℃でインキュベートした。

【0063】

K_m 及び V_{max} 値によるLineweaver-Burkプロットは、5～40分にわたり基質濃度範囲（0.05～10.0 μ M）及び一定量の希釈酵素での加水分解を測定することにより決定された。初期速度を、基質濃度毎に計算し、後者に対してプロットし、それにより、速度パラメータを決定した。

【0064】

h-PRUNE PDE活性に対する異なる緩衝液及びnm23活性の影響を調べ、阻害研究を実施するために、実施例2の「材料と方法」の節で報告されているように、PDEアッセイを改変した。 20

【0065】

in vitro細胞運動性アッセイ

h-PRUNE、h-PRUNE Δ 、h-PRUNE 4D Δ 、及びヒトPDE5Aを過剰発現する安定なMDAクロンを、実施例2の「材料と方法」の節で説明されているように生成し、分析した。

【0066】

in vivoの転移プロセスの阻害を示すnm23-H1過剰発現細胞系（MDA-H1-177）と共に、既に説明されているように（Leo他、1993年）、対照の乳癌細胞系MDA-C100を細胞運動性アッセイで使用した。 30

【0067】

細胞運動性は、化学誘引物質として作用させる最終濃度としてそれぞれ0.25%、0.5% FCS、2.5、及び5.0 ng/mlのフィブロネクチン（Sigma）使用し、6ウェルのトランスウェル技術（Corning-Costar）を用いて決定した（詳細については、実施例2の「材料と方法」の節を参照）。

【0068】

統計分析

PDE活性及び細胞運動性活性を含むすべてのアッセイは、<http://www.graphpad.com/~quickcalcs/index.cfm>に用意されているT検定を使用して妥当性を確認した。 40

【0069】

FISH及びHIC分析、腫瘍の臨床例のコレクション、TNM選択は、実施例2の「材料と方法」の節で報告されている。

【0070】

結果

h-PRUNEの構造及び機能分析

ITERATIVEタンパク質データベース検索（PSI-BLAST）を、h-PRUNEタンパク質について実施し、これにより、統計的に有意な期待値で、PRUNEの 50

真核生物オーソログ、続いて、様々な細菌からの無機ピロホスファターゼ、及び *RecJ* ヌクレアーゼを含む様々な生物からの DHH タンパク質を回収することができる（図 1、パネル C）。

【0071】

BLASTCLUST プログラム及び系統発生分析を使用し、最尤法を使用する DHH タンパク質のクラスタリングから、PRUNE タンパク質（ヒト及びショウジョウバエ）が、無機ピロホスファターゼと共に、第 2 の DHH ファミリーに属していることがわかる（図 1、パネル A）。

【0072】

DHH タンパク質の 2 つのファミリーは、DHH スーパーファミリーに典型的な 4 つの保存モチーフを含む共通の N 末端ドメインを共有するが、これらは、C 末端ドメインにより互いに区別される。共有される N 末端ドメインは、平行なベータシートを伴うアルファ／ベータ折り畳みを有し、DXD（モチーフ—I）、D（モチーフ—I I）、DHH（モチーフ—I I I）、及び D/E（モチーフ—I V）の形態の絶対保存要素を含む（図 1、パネル A 及び B）。

10

【0073】

これらの残基はすべて、このドメインの同じ面にあり、これらが一緒になって、少なくとも 2 つの二価陽イオンをキレートする触媒部位を形成する。PRUNE タンパク質は、形態 DHR をこのファミリーの他のすべてのメンバーで観察される正準 DHH（モチーフ—I I I）の置換として含む（図 1、パネル A）。

20

【0074】

両方の DHH ファミリーにおいて、C 末端ドメインは、5 つのストランドからなるコアシートを含み、そのうちの 4 つは 2 つの β ストランドヘアピンを形成する。しかし、DHH タンパク質の第 1 のファミリーと第 2 のファミリーとの間の C 末端ドメインの違いは、2 つのスーパーファミリーの基質特異性の著しい一因となる可能性がある。さらに、DHH モジュール、哺乳類 PRUNE の C 末端ドメインは、非球状伸展を含み、その中に、リン酸化反応の調整を行う役割を果たしうるいくつかの保存セリンがある。

【0075】

h-PRUNE の構造分析から、*RecJ*（Yama-gata 他、2002 年）及びピロホスファターゼ（Ahn 他、2001 年）との類似性がわかり、そのため、後者に対する潜在的類似活性が示唆される。

30

【0076】

しかし、awd/K-pn 様 NDPK の強い相乗作用は、PRUNE タンパク質がヌクレオチドなどの代替基質を有する可能性があることを示唆した。

【0077】

DHH ファミリーに関する進化論的研究から、ホスホエステラーゼは、様々なホスホエステラーゼ及び加水分解酵素ドメインを含む多数のタンパク質折り畳みから誘導されることがわかっている。これらは、古典的なシグナリング PDE が認識される HD 折り畳み（PDE1-11）（Aravind 他、1998 年）、PdsA 様 PDE が誘導される金属 β ラクタマーゼ折り畳み（Galperin 他、1999 年、Aravind 他、1999 年）、及び Icc 様 PDE が誘導されるカルシニューリン様ホスホエステラーゼ折り畳み（Aravind 他、1998 年）を含む。

40

【0078】

DHH 触媒ドメインは、これらの他のファミリーとは際立って異なる折り畳みを有し、PDE のまったく新しいクラス全体を潜在的に定義する可能性のある複数の類似金属キレート残基（アスパラギン酸及びヒスチジン）を含む。この仮説を検証するために、潜在的 PDE 活性について h-PRUNE が発現され、精製され、分析された。

【0079】

h-PRUNE PDE 活性の同定及び特徴付け

h-PRUNE がサイクリックヌクレオチド（cAMP 及び cGMP）のホスホエステ

50

ル結合を加水分解する能力を調べるために、h-PRUNEのクローンを作成し、バキュロウイルス (Baculovirus) 発現系を使用して発現した。His-tag付きh-PRUNE及びh-PRUNE Δ 、モチーフIII領域内に生成された突然変異 (DHRP126-129AAAA) を、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

【0080】

PDEアッセイを使用して、精製h-PRUNE触媒活性を特徴付けし、特異基質を決定した。

【0081】

図2、パネルAに示されているように、h-PRUNEは、著しいPDE活性を有し、これは、cGMP基質よりもcAMPについて高いが、h-PRUNE Δ は、この活性が40%減少することを示している。陽性対照としてPDE2を使用し、陰性対照は、両方とも、A59特異ポリクローナル抗体及びh-PRUNE Δ と共にプレインキュベートされたh-PRUNEであった。

10

【0082】

PDE検出活性を確認するために、h-PRUNE及びh-PRUNE Δ をヒトHEK-293細胞内で一時的に過剰発現し、次いで、免疫沈降し、PDEアッセイを免疫沈降タンパク質について実施した。

【0083】

これらの結果から、h-PRUNE精製タンパク質は、昆虫由来であろうとヒト細胞由来であろうと、PDE活性を示すことがわかる。

20

【0084】

触媒部位に潜在的に関わるアミノ酸を同定するために、h-PRUNE PDE活性に影響を及ぼす単一及び複数の部位で突然変異分析を実施した。DHH特徴モチーフ (図1、パネルB) のすべてのアスパラギン酸残基を単独と組合せの両方で突然変異させた (図2、パネルB)。突然変異体は、バキュロウイルス (Baculovirus) 発現系を使用して発現され、均質になるように精製された (精製収量80%)。

【0085】

cAMP-PDE活性についてタンパク質を検査したところ、h-PRUNE4D Δ (D28A、D106A、 Δ 、D179A) 突然変異体活性の80%減少が観察された。つまり、D28、D126、H127、R128、P129、及びD179アミノ酸は、h-PRUNE PDE活性について本質的であることがわかり、したがって、それらが触媒部位の一部である可能性は最も高いことを示している。その代わりに、モチーフIIのD106A突然変異は、h-PRUNE PDE活性に影響を及ぼさなかった。

30

【0086】

K_m 値を定義するために、高い精製収量 (90%) のイオン交換クロマトグラフィー (Mono-Qカラム) を使用した別の精製ステップによりHis-tag付きh-PRUNEタンパク質を均質になるように精製した。 K_m 及び V_{max} 値は、基質濃度範囲 (0.05~10.0 μ M) 内で固定量の精製酵素によるヌクレオチド加水分解を測定し、反応の線形的部分のデータ点を考察することにより決定された。cAMPとcGMPは両方とも、h-PRUNEの基質であり、 K_m 値 $0.9 \pm 0.03 \mu$ M及び $2.3 \pm 0.11 \mu$ Mをそれぞれ示す (図2、パネルC及びD)。

40

【0087】

基質回転率の最大値 (V_{max}) は、cAMP及びcGMPに対しそれぞれ $12.8 \pm 0.5 \text{ pmol} \times \text{分}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ 、及び $16.1 \pm 0.8 \text{ pmol} \times \text{分}^{-1} \times \mu\text{g}^{-1}$ の精製酵素であることがわかった。

【0088】

そのため、DHHスーパーファミリーのタンパク質に対するサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の証拠が指摘された。h-PRUNE活性に対する緩衝液の影響を調べるために、同じ塩の存在下でTris HCl及びHEPES緩衝液を試験したところ、Tris HCl緩衝液の存在下でより高いPDE活性が観察された (図2、パ

50

ネル E)。

【0089】

DHHタンパク質のイオン依存性を考察する際に、PDE cAMPアッセイにおける h-PRUNE の Mg^{2+} 及び Mn^{2+} イオン依存性を評価した。Tris HCl 緩衝液中の h-PRUNE の活性が高いことが判明したが、オキシ還元反応を避ける HEPSE 緩衝液の存在下で PDE アッセイを実施し、高い濃度の 2 つの異なる二価イオンを使用した。

【0090】

イオンを含まない緩衝液でいくらかの PDE 活性が測定されたが、 Mg^{2+} は h-PRUNE PDE 活性を刺激し (図 2、パネル E)、対照的に、 $MnCl_2$ の存在下では、この活性は阻害される。さらに、野生型タンパク質と同様、h-PRUNE Δ 突然変異体は Mg^{2+} イオンでは活性化されず (図 2、パネル F)、したがって、ホスホジエステラーゼ活性には、h-PRUNE Δ 突然変異体で修正されるモチーフ IIII が必要であることが示される。結論として、h-PRUNE cAMP-PDE 活性が Mg^{2+} イオン濃度の陽性の影響を受けることが示された。

10

【0091】

安定な乳房 MDA h-PRUNE クローン及び細胞運動性との相関関係

nm23-H1 抗運動性及び転移抑制活性を調整する h-PRUNE 機能を調べるために、乳癌 MDA-C100 及び H1-177 細胞モデルを採用した (Hartsough 他、2000 年、Mao 他、2001 年、Tseng 他、2001 年)。

20

【0092】

MDA435-C100 細胞 (高転移性乳癌細胞、ATCC) に、LTR 含有プラスミド構造 (哺乳類の細胞内にエトロピクレトロウイルスを発生させるために使用される pBabe 構造) 内で h-PRUNE 遺伝子 cDNA のトランスフェクションを行い、トランスフェクションの後、異なるピューロマイシン耐性クローンが得られ (培養 20 日目にクローンを分離する)、プラスミド抗生物質耐性が生じ、LTR プロモーターの下でその h-PRUNE cDNA 過剰発現について選択された。

【0093】

MDA-C100 細胞内の h-PRUNE cDNA (クローン #3 及び #4、これは最後に 10/12/2004 にジェノアの CBA に寄託)、h-PRUNE Δ cDNA (クローン #10 及び #11)、h-PRUNE4D Δ cDNA (クローン #19 及び #20)、及び PDE5A cDNA (クローン #14 及び #16) を過剰発現するいくつかの安定なクローンが生成された。nm23-H1 を過剰発現する MDA-H1-177 (クローン #7 及び #8)、nm23H1-P96S を過剰発現する MDA (クローン #4 及び #5)、及び nm23H1-S120G を過剰発現する MDA (クローン #2 及び #3) における h-PRUNE cDNA を安定化させた。

30

【0094】

これらのクローンのいくつかは、TaqMan 技術によるリアルタイム PCR 分析を使用して h-PRUNE mRNA の発現レベルを決定するように特徴付けられた (図 3、パネル A)。定量分析及びコピー数外挿により、mRNA 発現のそのレベルについて 4 つのクローンを選択し、標的基準遺伝子 (GAPDH) と比較した (図 3、パネル B)。

40

【0095】

さらに、Western blot 分析を実施して、h-PRUNE、nm23、及び PDE5A タンパク質の発現レベルを同定した (図 3、パネル C)。

【0096】

次に、トランスウェル細胞培養チャンバを使用して生成された安定なクローンの細胞運動性について分析した (Freije 他、1997 年、Hartsough 他、2001 年、Freije 他、1997 年)。6 個の独立クローン (MDA-C-100、MDA-PRUNE クローン #3 及び #4、10/12/2004 にジェノアの CBA に寄託、MDA-H1-177-PRUNE クローン #7 及び #8、MDA-11-177) を分

50

析した。MDA-PRUNEクローンは、対照細胞系MDA-C100と比較したときに運動性が2倍に増大する（図3、パネルD）。

【0097】

MDA-H1-177-PRUNEクローンについて観察された値は、nm23-H1だけを過剰発現する細胞系MDA-H1-177と比較して2.2倍増大する（図3、パネルD）。クローンMDA-H1-177観察値は、既に報告されているようにMDA-C100細胞系に比べて少なくとも40%だけ減少し（Hartsough他、2001年）、そこで、細胞運動性の阻害についてnm23-H1の役割が確認される。

【0098】

細胞運動性へのh-PRUNE PDE活性の寄与を調べるために、MDA-C100、MDA-H1-177、MDA-PRUNE（10/12/2004にジェノアのCBAに寄託されたクローン#3及び#4）、MDA-PRUNEΔ（クローン#10及び#11）、及びMDA-PRUNE4DΔ（クローン#19及び#20）に関する運動アッセイを実施した。これらの突然変異体が選択されたのは、h-PRUNE PDE活性に影響を及ぼす異なる能力があるためである。

【0099】

両方ともMDA-PRUNE安定なクローンと比べて、MDA-PRUNEΔ及びMDA-PRUNE4DΔクローン内の細胞運動性の40%及びほぼ完全（90%）の減少がそれぞれ観察された。h-PRUNE PDE活性が乳癌細胞系内の細胞運動性に単独で関与するかどうかを確認するために、MDA-C100（MDA-PDE5Aクローン#14及び#16）のきちんと特徴付けられたPDE（PDE5A）を過剰発現するクローンを試験した。両方のPDE5A過剰発現クローンにおいて細胞運動性の増大は観察されず（図3、パネルE）、したがってh-PRUNE PDE活性のみがこの従来の細胞モデルにおいて細胞運動性を引き起こすことができることを示している。

【0100】

さらに、報告されたのは（Freije他、1997年、Hartsough他、2001年、Freije他、1997年）、nm23H1-S120G（h-PRUNEと相互作用しない突然変異体）（Reymond他、1999年）及びnm23H1-P96S（h-PRUNEを結合する能力を保持している突然変異体）タンパク質が、細胞運動性を引き起こすことができるということであった。

【0101】

h-PRUNEがある場合及びない場合について突然変異体を過剰発現する細胞運動性活性におけるh-PRUNEの役割を調べ、これと細胞運動性との相関関係を求めた。MDA-nm23H1-S120G-PRUNEクローンは、MDA-C100対照細胞系と比較してほぼ60%の運動の増大を示しているが、MDA-nm23H1-P96S-PRUNEクローンは、MDA-C100細胞と比較したときに200%の運動増大を示している（図3、パネルF）。

【0102】

結論として、MDA-C100内のh-PRUNEの過剰発現は細胞運動性を高め、h-PRUNEは、nm32-H1の抗運動性を戻すことができ、それにより、細胞運動性を促進する。この効果は、h-PRUNEがh-PRUNE相互作用障害nm23H1-S120G突然変異体の存在下で過剰発現されたときには観察されず、そのため、細胞運動性の増大に関してnm23-H1-h-PRUNE複合体の役割が推定される。

【0103】

in vitro及びin vivoのh-PRUNE PDE活性

h-PRUNE及びnm23-H1が物理的に相互作用することを（MacDonald他、1996年）考察し、nm23sがh-PRUNEのPDE活性、及びnm23-h-PRUNE相互作用の生化学的な意義に影響を及ぼしうるかどうかを調べた。これは、nm23-H1をh-PRUNE精製タンパク質と共にプレインキュベートし、cAMP-PDE活性をin vitroで測定することにより行った。

10

20

30

40

50

【0104】

h-PRUNE PDE活性は、nm23-H1の存在下で対照に対し最大2倍までの増大を示した。さらに、この増大した活性が物理的相互作用によるものであることを確認するために、別のnm23突然変異体を試験した。非相互作用突然変異体nm23H1-S120G（図4、パネルA）は、h-PRUNE PDE活性を高めることができず、対照的に、それほどではないにせよ、相互作用突然変異体nm23H1-P96Sは、h-PRUNE PDE活性をほとんど野生型nm23-H1として高めた。これは、既に報告されているように、h-PRUNEとの結合アフィニティが低いため可能である（Reymond他、1999年）。

【0105】

他の対照実験として、nm23-H1タンパク質の存在下でh-PRUNE Δ PDE活性を試験したが、それは、これら2つのタンパク質が共免疫沈降アッセイ時に相互作用しないからである。h-PRUNE Δ PDE測定活性には増大は見られない（図4、パネルA）。

【0106】

これらの結果から、h-PRUNEとnm23-H1の直接的物理的相互作用とh-PRUNE PDE活性の増大との間に相関関係のあることが実証される。さらに、免疫沈降タンパク質に関する特異h-PRUNE cAMP-PDE活性について運動アッセイで使用されるそれぞれの安定なクローンを分析した（図4、パネルB）。

【0107】

これらの分析の結果として、MDA-PRUNEクローンでは、MDA-C100と比べて、cAMP-PDE活性の増大は8倍である。その代わりに、MDA-PRUNE Aクローンでは、MDA-PRUNEと比較してcAMP-PDE活性の減少は0.5倍であり、これは、細胞運動性と相関関係を有する（図4、パネルB）。

【0108】

さらに、MDA-h-PRUNEクローンのh-PRUNE PDE活性は、安定二重MDA-H1-177-PRUNEのと比べて、1.4倍の増大であることがわかった（図4、パネルB）。

【0109】

これらの結果から、h-PRUNE PDE活性と細胞運動性との間に直接的な相関関係のあることがわかる。さらに、MDA-nm23H1-S120G-PRUNEクローンでは、h-PRUNE PDE活性の減少はMDA-nm23H1-P96S-PRUNEと比べて3倍であり、したがって、h-PRUNE cAMP-PDE活性、細胞運動性、及びタンパク質間相互作用の間に直接的相関関係のあることが示される。結論として、細胞運動性に著しい影響を及ぼす、h-PRUNE PDE機能とタンパク質間相互作用の間の直接的相関関係が指摘された。

【0110】

h-PRUNEのPDE阻害剤研究及び細胞運動性への影響

細胞内のh-PRUNE cAMP PDE活性の生理学的役割を同定するために、選択的PDE阻害剤のパネルを試験し、h-PRUNEタンパク質活性に影響及ぼすものがあるかどうかを確認した。

【0111】

h-PRUNEがcAMPを加水分解する能力は、ジピリダモール（PDE5、PDE6、PDE9、PDE10、及びPDE11に対し作用することが既に知られている）により選択的に阻害された。h-PRUNE PDE活性のジピリダモール阻害について測定されたIC₅₀は、0.78±0.05 μMであり、この値は、他の選択的PDE阻害値（PDE5、PDE9、PDE10）に比べて低い（高い特異性）。PDE6及びPDE11では、IC₅₀値は、h-PRUNEよりも低い（図5、パネルA）。

【0112】

h-PRUNEは、さらに、IBMX（3-イソブチル-1-メチルキサンチン）（I

10

20

30

40

50

C_{50} $40.2 \pm 0.8 \mu M$)、非選択的特異的 PDE 阻害剤、及びビンポセチン (C_{50} $22.3 \pm 1.1 \mu M$)、PDE1C 特異阻害剤に対し中程度に敏感である。

【0113】

この研究で使用されたいくつかの他の阻害剤は、他の PDE に対する IC_{50} 値の場合よりも 100 倍高い濃度で適用された場合でも、c-AMP h-PRUNE 加水分解活性には影響を及ぼさなかった。阻害研究の結果は、図 5、パネル A にまとめられている。

【0114】

上に示されているデータは、さらに、生理学的阻害を *in vitro* で研究するために MDA-MB-435 乳癌細胞系で検証された。

【0115】

これは、h-PRUNE 過剰発現 MDA クローン、及び、上述のように h-PRUNE PDE 活性の部分的減少 (40%) のため (図 2、パネル A 及び B) 追加の対照として MDA-PRUNE Δ クローンを使用し、ジピリダモールが活性を阻害し、細胞運動性に関連付けることができる程度を確認するように選択された。

【0116】

MDA-PRUNE 及び PRUNE Δ クローンの両方を、ジピリダモール ($8 \mu M$ 、 IC_{50} の場合よりも 10 倍高い濃度) と共に 24 時間の間インキュベートし、完全な酵素不活性を得て、上述のように運動アッセイを繰り返した。

【0117】

ジピリダモールによる処理の後、MDA-PRUNE 及び MDA-PRUNE Δ クローンは、それぞれ、40% 及び 20% の平均運動減少を示したが、これから、阻害剤は、h-PRUNE PDE 活性に対し作用し、そのため、細胞運動性の実質的減少を引き起こすことがわかる (図 5、パネル B)。

【0118】

転移患者における乳癌研究

h-PRUNE の発癌の役割を *in vivo* で確認するために、転移が報告された 59 症例を無作為に選択した (解剖学的な疾患の程度を説明する TNM 分類による T x N x M I (Hejina 他、1999 年))。

【0119】

診断時又は追跡調査中に転移を示した原発腫瘍組織症例を含む組織多重アレイ (TMA) について分析を実施した (少なくとも 5 年分の追跡調査、診断日: 1992~97)。

【0120】

FISH 分析では、h-PRUNE (279-H19) をプローブとして含む PAC を使用して、三染色体又はそれ以上のコピー数を有する 59 例中 22 例 (37%) の腫瘍症例を明らかにし、h-PRUNE ゲノム領域の増幅を示した。nm23-H1 をプローブとして含む PAC を使用して全部で 55 件の分析症例において、1 つの二染色体のみが観察され、増幅は観察されなかった (図 6、パネル A)。

【0121】

さらに、h-PRUNE 及び nm23-H1 をそれぞれ認識する 2 つの抗体 (A59、K73) を使用して、TMA に関する免疫組織化学分析を実施した。正常であるだけでなく、転移性癌組織のないことについての FISH 及び免疫組織化学分析が報告された。

【0122】

免疫組織病理学グレーディングにより、22 例のすべて (37%) において、h-PRUNE 染色体領域の細胞遺伝的増幅の後、nm23-H1 の低又は中発現レベルとは対照的に、高い h-PRUNE タンパク質発現も強調されており、そのため、乳房転移形成の約 1/3 は、機能を抑制する nm23-H1 転移の同時減少レベルを有する h-PRUNE 増幅及び過剰発現の両方によるものと考えられることを示唆している。

【0123】

さらに、7 例 (12%) は、h-PRUNE 増幅を示さず、高い h-PRUNE タンパク質レベルを有するが、nm-23H1 レベルは低い (図 6、パネル D)。これは、遺伝

10

20

30

40

50

子増幅とは無関係の h-PRUNE 過剰発現の代替メカニズムの存在を示唆している。

【0124】

これらのデータは、乳癌の h-PRUNE タンパク質の転移促進役割を示す。

【0125】

(実施例2)

乳房MDAの安定なクローンの遺伝子発現プロファイル

材料と方法

突然変異体作成

以下のオリゴヌクレオチドを使用して、h-PRUNE 突然変異体を生成した。

【化2】

h-PRUNEΔ (DHRP126-129AAAA): 5'-GTA GCA GAG GTG CTA GCC GCT
GCA GCC ATC GAG CCG AAA CAC-3' (配列番号 5);

D28A: 5'-GAA GCC TGT GCT TTG GAC TCC-3' (配列番号 6);

D106A: 5'-ACC CTC ATC CTT GTC GCT CAT CAT ATC TTA TCC-
3' (配列番号 7);

D179a: 5'-GAA CCA TCA TCC TGG CAT GTG TCA ACA TGG-
3' (配列番号 8).

10

20

【0126】

突然変異ヌクレオチドは、太字で示され、変更されたコドンは、下線が引かれている。
すべての突然変異は、DNA塩基配列決定法により確認された。

【0127】

h-PRUNE PDEホスホジエステラーゼ活性の特徴付け

h-PRUNE PDE活性に対する緩衝液の影響を調べるために、Tris HCl
50mM (pH7.4)、又はHEPES緩衝液50mM (pH7.5)を使用し、MgCl₂の濃度を上昇させて(0、1、2、4、8、16、及び32mM)、PDEアッセイを改変した。

【0128】

イオン存在の効果を調べるために、HEPES緩衝液50mM (pH7.5) (オキシ還元反応を避けるため)中で、MgCl₂又はMnCl₂塩の濃度を高くしつつ(1、2、4、8、16、32、及び64mM)、PDEアッセイを実施した。陰性対照として、h-PRUNEΔを、h-PRUNEと同じ条件で使用した。イオンが存在しない場合のh-PRUNE活性は、Tris HCl 50mM (pH7.4)、EGTA 1.7mM、又は50HEPES緩衝液(pH7.5)、EGTA 1.7mMに対しタンパク質の長い透析の後に試験された。

30

【0129】

h-PRUNE PDE活性に対するnm23 (NDPK)活性の影響は、精製h-PRUNEを様々なnm23 (70%精製収量、-H1、-h1-S120G、又は-H1-P96S)と共にプレインキュベートしてアッセイを実施することにより調べた。

40

【0130】

h-PRUNEΔに対するnm23-H1の可能な効果は、精製された突然変異体タンパク質をnm23-H1と共にプレインキュベートし、PDEアッセイを実施することにより試験した。

【0131】

阻害剤研究に関して、8つの異なる潜在的阻害剤、つまり、シロスタマイド、ジピリダモール、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (IBMX)、ミルリノン、ロリプラム、ビンボセチン、スリンダク、及びザプリナスト (シグマ) を試験した。

【0132】

50

低濃度の cAMP (0.01 μ M) を使用して、IC₅₀ を K_i に近似した。すべての阻害研究は、3通りに実施し、3回繰り返した。

【0133】

安定なクローン分析

h-PRUNE、h-PRUNE Δ 、及び h-PRUNE4D Δ cDNA を、N末端の His-tag で修正された EcoRI/XhoI 消化 pBABE ベクターにサブクローニングした。ヒト PDE5A cDNA は、同じ His-tag 付きベクターにクローニングするために、EcoRI 及び XhoI 制限末端を加えることにより PCR 増幅された。

【0134】

MDA-C100、MDA-H1-177、MDA-nm23H1-S120G、及び MDA-nm23H1-P96S クローンは、pBABE-h-PRUNE 発現ベクターによりトランスフェクションが行われた。MDA-C100 クローンは、pBABE-h-PRUNE Δ 、pBABE-h-PRUNE4D Δ 、及び pBABE-h-PDE5A 発現ベクターによりトランスフェクションが行われた。

10

【0135】

取扱説明書に従って Lipofectamine (Invitrogen) を使用することにより、トランスフェクションを実施した。ウシ胎児血清 10%、ペニシリン 100 単位/mI、ストレプトマイシン 100 μ g/ml、及びピューロマイシン 2 μ g/ml (シグマ) を含む Dulbecco の改変イーグル培地 (DMEM) でトランスフェクシ

20

【0136】

大量のトランスフェクションを行った細胞系を作成するために、100個のピューロマイシン耐性コロニーを含むプレートトリプシン処理し、そうして細胞系を設定した。

【0137】

いくつかのピューロマイシン耐性 pBABE-h-PRUNE、pBABE-h-PRUNE Δ 、pBABE-h-PRUNE4D Δ 、及び pBABE-PDE5A クローンを、MDA クローンについて分離し、リアルタイム PCR 及び Western blot 分析の両方によりトランスフェクションを行い、特徴付けを行った。

【0138】

リアルタイム PCR 分析では、個々の細胞クローン (MDA-C100、MDA-H1-177、MDA-H1S120G、MDA-H1P96S 細胞系、複数の h-PRUNE-及び h-PRUNE Δ 安定なクローン) を 75 cm² のフラスコ内で濃度 7-9 $\times$ 10⁶ 細胞で播種した。

30

【0139】

TRIzol (登録商標) (Invitrogen) により mRNA を抽出して精製し、その後、ABI PRISM 7000 計測器 (Applied Biosystems) を使用して TaqMan 定量リアルタイム PCR 検出システムにより分析した。遺伝子プライマー対を合成し (Applied Biosystems: NME1-P/N4331182; GAPDH)、Assay on Design を使用して、h-PRUNE と h-PRUNE Δ 遺伝子の両方について 6FAM プローブ配列 (6-カルボキシフルオレセイン) を構築した。

40

【化3】

6FAM-CTGCATGGAACCATC (配列番号 3);

FOR: AGAGATCTTGGACAGGCAAAC (配列番号 1);

REV: CCATGTTGACACAGTCCAGGAT (配列番号 2).

【0140】

50

複数のクローンを選択し、基準標的と比べて、定量分析及びコピー数外挿によりmRNA発現レベルについて分析した。

【0141】

Western blot分析では、緩衝液中の15 µgのタンパク質溶解物をポリアクリルアミドゲル10% (w/v) 又は12.5% (w/v) についてSDS-PAGEにより分析し、PVDF膜 (イモビロン-P、ミリポア) 上にエレクトロブロットした。h-PRUNEのh-PRUNE特異ポリクローナル (A59、モチーフIII領域に対し発生)、nm23-H1のnm23-H1 (クローンNM301、H1アイソフォームに特異的、サンタクルス)、及びPDE5A抗体のHis-tag (QIAGEN) に対するPent-Hisで溶解物をそれぞれ免疫検出した。

10

【0142】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGでインキュベートした後、視覚化が増強された化学発光 (Amersham) により実施された。11個の細胞系、つまり、MDA-PRUNE (クローン#3及び#4)、MDA-H1-177-PRUNE (クローン#7及び#8)、MDA-nm23H1-S120G-PRUNE (クローン#2及び#3)、MDA-nm23H1-P96S-PRUNE (クローン#4及び#5)、及びMDA-PRUNEΔ (クローン#11)、MDA-PRUNE4DΔ (クローン#19)、MDA-PDE5A (クローン#14) を選択し、タンパク質をWestern blots上で正規化した。

20

【0143】

in vitro細胞運動性アッセイ

トランスウェル技術を使用した (6ウェル-Corning-Costar)。下側ウェルでは、BSA 0.1%、ペニシリン100単位/ml、ストレプトマイシン100 µg/ml、HEPES緩衝液 (運動培地) 5mM、及び希釈化学誘引物を含むDMEM 2.5mlをインキュベートし、上側ウェルでは、CO₂ 5%を使用し、37℃で、細胞を3時間インキュベートした。引き付け手順の後、細胞を固定し、メーカープロトコル (Corning-Costar) に従ってGill[®] 1ヘマトキシリン液で着色し、最終的に顕微鏡を使って細胞をカウントした。

【0144】

FISH分析

ニクトランスレーション法によりdUTP-Cy3 (赤色) で標識されたPAC 279-H19 (PRUNE-染色体1q21.3) 及び厚さ4mmのホルマリン固定パラフィン包埋組織片でニクトランスレーション法によりdUTP-FluorX (緑色) で標識された対照pUC177 (pUC177はDr. M. Rocchiが提供した)。

30

【0145】

細胞核は、4', 6-ジアミジノ-2-フェニル-インドール (DAPI) により対比染色した。それぞれの症例について2つの異なる実験を実施した。COHU Video and Cytovisionソフトウェアを備えるOlympusコンピュータ化落射蛍光顕微鏡を使用してデジタル画像を取り込んだ。損なわれていない、保存状態のよい、重なりのない核上のハイブリッド形成シグナルは、少なくとも2人の独立の研究者により評価された。

40

【0146】

IHC分析

MDA腫瘍は、特異A59 h-PRUNEポリクローナル及びnm23-H1抗体でそれぞれ免疫検出された (クローンK73、H1及びH2アイソフォームに対し特異的、Apotech Corporation、CH)。

【0147】

免疫組織化学染色の強度を使用し、腫瘍試料を、顕微鏡の下で分析された細胞の少なくとも20%に存在する場合に陽性として分類した (h-PRUNE及びnm23-H1タンパク質発現に対し強い+++、中++、広く弱い染色+又は負0 (存在しない、又は集

50

中して弱い染色))。

【0148】

腫瘍症例のコレクション及びTNM選択

最低5年分の追跡調査結果を有する患者を含む腫瘍症例が、SassariのAUSL 1によって収集された。TNMシステム分類は、Sobinによって説明されているようにこの研究に応用され (Hajna他、1999年)、疾患の解剖学的程度を説明するために使用され、また3つの成分、原発腫瘍の程度に対応するT (T0からT4)、所属リンパ節転移の有無及び程度に対応するN (N0からN4)、及び遠隔転移の有無を表すM (M0又はM1)の評価に基づく。59件の腫瘍乳房症例のコレクションは、TxNxM1陽性として分類された。

10

【0149】

乳房細胞クロンでの遺伝子発現

以下の手順によりプローブ作製を実施した。

【0150】

MDA-H1-177-PRUNE (クロン#8) 及びMDA-H1-177クロンからTRIZOL (登録商標) 法によりRNAを抽出した。以下の変更と共にAmersham CyScribe First Strand cDNA Labelling Kitを使用して15から20µgの範囲の全RNAテンプレートに標識した。

【0151】

逆転写時間を3時間に延ばした。その後、37℃で、30分の間、Rnase-Hによりプローブを消化した。

20

【0152】

残留RNAを除去するため、反応混合物をNaOH 0.25Mで20分間インキュベートし、その後、MOPS 2.8Mで中和した。組み込まれているCy染料の量を、Cy5とCy3の両方について計算した。標識されたCy3及びCy5標的は、等量分結合され、スライド上にハイブリッド形成された。

【0153】

組み込まれているCy染料の50pモル未満を含むプローブは、ハイブリッド形成に使用されなかった。

【0154】

標準ハイブリッド形成プロトコルをこのスライドに適用した。独立の2組の実験を実施した。

30

【0155】

走査及び画像解析

それぞれ、Medway Far 2000-I及びMedia Cybernetics社のArray Proソフトウェアにより、走査及び画像解析を実施した。スキャナ感度は、900から1000の範囲に保持され、飽和及び低強度の両方を補正した。16ビット形式の画像を処理した。

【0156】

データマイニング

2つの実験条件の間の遺伝子発現の観察された相違点の統計的有意性を確定するために、それぞれの実験を3通り実施した。

40

【0157】

データ有意性及びばらつきを説明するために、いくつかの反復実験に対しT検定を実施した。Webページ<http://www.igb.uci.edu/servers/cyberb>で入手できるCyber-Tツールを使用して、この検定を適用した。p=0.05でのカットオフ値を使用した。この分析の結果として、異なるデータセットにおいてほぼ5%の疑陽性が期待される。この検定に合格したデータセットのみを使用した (T検定の後のデータ選択)。

【0158】

50

結果

nm23-H1を単独で、及び／又はh-PRUNEと組み合わせて過剰発現する安定なクローンの遺伝子発現プロファイルを検証するために、19,000遺伝子セットを含む出来合のアレイを使用して遺伝子アレイ研究を実施した。このアレイは、ガラススライド上にスポットされたヒトUnigene cDNAデータセットを含む（カナダ、オンタリオ州、Array facility、<http://www.microarrays.ca/>）。

【0159】

MDA-H1-177及びMDA-H1-177-PRUNE（クローン#8）クローンからのRNAを使用して、ハイブリッド形成を実施した。それぞれの乳癌クローンについて独立の2組の実験を実施し、T検定値（ $p=0.05$ ）を外挿した（<http://www.tigem.it/zollo/cancer-cell-supplemental/array.html>）。

10

【0160】

転移プロセスに関わる複数の遺伝子の発現レベルは、表1に示されているように、MDA-H1-177クローンと比べて、MDA-H1-177-PRUNE（クローン#8）において区別される形で調整されることがわかった。表1は、安定細胞乳房クローンについて実施されたアレイ実験をまとめたものであり、左から右への列、ID番号、Unigene基準番号、及びヒト染色体上の位置を含む遺伝子同定、独立の2つの実験が2通りに実施された後のMDA-H1-177/MDA-H1-177-PRUNEクローン#8のアレイデータ間の関係、標準偏差及びp値を含むT検定値、遺伝子の書誌学的参照、対応する転移のプロセスとして報告されている。

20

【0161】

【表 1 - 1】

表 1

遺伝子同定ID	シグナル強度比	シグナル強度比	#obs	遺伝子参照				転移相関プロセス	
	Cy3/Cy5 (H1- 177/クローン8)	Cy5/Cy3 (H1-177/ クローン8)		Mn	SD	t	P		
310622:W31182:310622:Hs.181385 :特徴付けされていない造血幹細胞/ 前駆細胞タンパク質 MDS030:MDS030:9:9p24.1	1.441332	1.442391601	2	1.4418	0.0005	995.8991	0.006	著者Zhao, M., Gu, J., Li, N., Peng, Y., Han, Z. 及びChen, Z. タイトル 骨髄異形成症 候群患者の造血幹細胞/前駆細胞内に発現された 新しい遺伝子 (Novel genes expressed in haematopoietic stem/progenitor cells from myelodysplastic syndromes patient) ジャーナル未刊	血管形成
489392:AA054454:489392:Hs.821 58: プロテアソーム (prosome)、 マクロペイン (macropain)) サブユニット、 アルファ型 1:PSMA1:11:1p15.1	1.42474	1.423157331	2	1.4239	0.0007	635.9779	0.001	Coux O, K. Tanaka, A. Golderberg. 20S及び26Sプロテアソームの構造及び機能 (Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes) Ann. Rev. Biochem. 65: 801-847, 1996年	タンパク質分解
485121 :AA037777:485121:Hs.25300: ホスファチジルイノシトール4-キナーゼ型 II:PI4KI:10:10q24	0.39234	0.394341204	2	0.3933	0.0035	-366.7976	0.0017	J Biol Chem 2001 May 18;276(20): 16635-40 Minogue S, Anderson JS. Waugh MG, dos Santos M, Corless S, Cramer R, Hsuan JJ.	エンドサイトーシス及び 細胞骨格再構成
4692752:BG538790:4692752:Hs.94 881	3.977598	4.013662507	2	3.9955	0.0063	306.9319	0.002	Cancer Lett 1995 May 4;91(1):47-54 Sale- siotis AN, Wang CK, Wang CD, Burger A, Li	転移

10

20

30

40

【表 1 - 2】

										H. Seth A	接着
307259:W21103:307259:Hs.84344: CGI-135 タンパク質 : LOC51024; 7:7q11.22	0.851047	0.857366017	2	0.8542	0.0052	-42.6056	0.0149			Hs. 38738 ホモサピエンス CLDN15 Claudin 15 : Colegio OR, Van Itallie CM, McCrea HJ, Rahner C, Anderson - TM. Claudinは電荷選択チャネルを上皮細胞間の 傍細胞経路内に形成する (Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells) Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Jul; 283 (1) : C142-7. PMID: 120550B2	
4862951:8076631 6:4862951 :Hs.347991:核内受容体サブファミリー2, グループF、メンバー2: NR2F2:15:15q26	0.868882	0.862911048	2	0.8658	0.0048	-41.7638	0.0152			Pereira他 (1999年)	血管形成及び発達
266005:N31521:266005:Hs.1986 89: 水痘性類天疱瘡抗原1, 230/2 40kDa :BPAG1:6: 6p12-p11	0.777256	0.787969285	2	0.7825	0.0096	-35.8148	0.0177			A. Brown, G. Benier, M. Mathieu, J. Rossant, R. Kothary, マウス筋肉ジストニア 遺伝子は水痘性類天疱瘡抗原1の神経アノフィ ムである (The mouse dystonia musculorum gene is a neural isoform of bullous pemphigoid antigen 1). Nature Genet. 10 : 301-306, 1995年	細胞骨格組織
278764:N98784:278764:Hs.148495: プロテアソーム (プロソーム、 マクロペイン) 26Sサブユニット、 非ATPase、4: PSMD4:1:1q21.1	0.695804	0.681432398	2	0.6885	0.0147	-35.7552	0.0178			Q. Deveraux, C. Jensen, M. Rechsteiner: ジロインシン 繰り返しで濃縮された26Sプロテアソ サブユニットの分子クローニング及び発現 (Molecular cloning and expression of a 26S protease subunit enriched in dileucine repeats.) J. Blot. Chem. 270: 23726-23729, 1995年. PubMed ID: 7559544	タンパク質分解

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

54551 17:BM91 1128:54551 17: Hs.111779; 分泌性タンパク質、酸性、 システインリッチ (オステオネクチン): SPARC:5:5q31.3-q32	1.472603	1.515475276	2	1.4938	0.0202	27.9731	0.0227	Biochem Biophys Res Commun 2001 Sep 21, 2B7 (2): 422-6 ヒト血管内皮細胞 内のVEGFによるSPARCOの誘導 (Induction of SPARCO by VEGF in human vascular endothelial cells.) Kato Y, Lewalle JM, Baba Y, Tsukuda M, Sakai N, Baba M, Kobayashi K, Koshika S, Nagashima Y, Frankenne F, Noel A, Foidart JM, Hata RI	血管形成
321313:W321 80:321 313:Hs.387254	0.699574	0.671066627	2	0.6851	0.0294	-18.1757	0.0349	Sfiligoi C, De Luca A, Cascone I, Sorbello V, Fuso L, Panzone R, Biglia N, Audero E, Arisio R, Susolmo F, Sismondi P, De Bortoli M. 関連論文、 リンク 乳癌内のアンジオポエチン-2発現はリンパ 節浸襲及び短命と相関する (Links Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival.) Int J Cancer. 2003 Feb 1; 103 (4): 466-74	血管形成
320701 :W32046: 320701 :Hs.5415	0.772313	0.74904291	2	0.7605	0.0216	-17.8901	0.0355	Sfiligoi C, De Luca A, Cascone t, Sorbello V, Fuso L, Panzone R, Biglia N, Audero E, Arisio R, Bussolino F, Sismondi P, De Bortoli M. 関連論文、 リンク 乳癌内のアンジオポエチン-2発現はリンパ 節浸襲及び短命と相関する (Links Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival.) Int J Cancer. 2003 Feb 1; 103 (4): 466-74	血管形成

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

300555:W07526:300555:Hs.2936: マトリックスメタプロテアーゼ13 (コラゲナーゼ3) MMP13:11: 11q22.3	1.094073	1.105961019	2	1.1	0.0076	17.5383	0.036	Del Casar Lizcano JM, vizoso Pineiro F, Gonzalez Sanchez LO, Marlin Suarez A, Gava R, Cuesta Fernandez E, Diez Senti-steban MC. 関連論文、リンク [胃癌におけるコラゲナーゼ-3 (MMP-3) の発現及び臨床的有意性 (Expression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13) in gastric cancer)] Gastroenterol Hepatol. 2003 Jan; 26 (1): 1-7. Spanish. コラゲナーゼ3前駆体	転移
429533:AA011457:429533:Hs.2376 17:ジペプチジルペプチダーゼ9 :DPP9:19: 19p13.3	1.185238	1.164378856	2	1.1752	0.0131	17.3649	0.0366	IV Olson C, Waghmann N, LiDPP9, ジペプチジルペプチダーゼIVの新しい相同物の同定及び特徴付け (Identification and characterisation of human DPP9, a novel homologue of dipeptidyl peptidases IV.) Gene 2002 Oct. 18: 2991-(1-2): 185-93	腫瘍生物学 (転移)
4747535:BG676028:4747535:Hs.89 626: 副甲状腺ホルモン様ホルモン: PTHrH: 12:12p12.1- p11.2	0.944871	0.951010591	2	0.8479	0.0045	-16.5107	0.0385	Linferth R., Anderson N, Boey R, Nolan T., Downey S, Brady G, Ashcroft L, Bundred N, 早期乳癌における副甲状腺ホルモン関係タンパク質及びその受容体の共発現は、低い患者生存率の予測となる (Coexpression of parathyroid hormone related protein and its receptor in early breast cancer predicts poor patient survival) Clin Cancer Research 2002 Oct(10) 3172-7 PMID: 12374885	転移

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

504278:AA1 49501 :504278:Hs.332405:アルギナーゼ、肝臓: ARG1 :6:6q23	1.391833	1.329405384	2	1.3602	0.0324	13.4093	0.0473	Davel LE, Jasnias MA, de la Torre E, Goloh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sale ME. マクロファージの腫瘍由来血管形成の調節に関わるアルギニン代謝経路 (Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis of macrophages.) FEBS Lett. 2002 Dec 4; 532 (1-2): 216-20	血管形成
127468:R08943:127468:Hs.269181 :ESTs, プラコフィリン2に類似	1.34385	1.378604879	2	1.3611	0.0180	241,491	0.0263	プラコフィリン2a及び2b: 核質及び接着斑板内の二重位置の構成タンパク質 (Flakophilins 2a and 2b: constitutive proteins of dual location in the karyoplasm and the desmosomal plaque.) JOURNAL. Cell Biol. 135 (4), 1009-1025 (1996) PUBMED8922383MEDLINE97081101	接着

10

20

30

40

【0 1 6 2】

腫瘍形成及び転移プロセスに関与し、遺伝子発現分析において著しく変更される、複数

50

の遺伝子を選択し、代替方法によるその発現レベルを確認した。

【0163】

リアルタイムPCR実験を11個の遺伝子について実施した（遺伝子プライマー対は、ジーンバンクID配列から選択された）。これらの選択された遺伝子のうち7及び4は、それぞれ、MDA-H1-177-PRUNEクローン（クローン#8）において上方及び下方制御されることがわかった。発現がチップアレイとPCRリアルタイムの両方により確認された、安定h-PRUNE過剰発現クローンのレベルで区別されるそのような遺伝子発現を表2に報告する。

【0164】

上述の細胞モデルでは、細胞骨格再編成（ホスファチジルイノシトール4-キナーゼ型 i i）、プロテアーゼ活性（プロテアソーム26Sサブユニット、nedd4結合タンパク質）、腫瘍形成（I-プラスチン、rab1b、braca1関連タンパク質（brap2））、タンパク質リン酸化反応、及び核輸送（カゼインキナーゼ i i 1-ckip1相互作用タンパク質）に参与することが知られている遺伝子の上方制御が見つかった。

【0165】

下方制御は、細胞外マトリックス接触又は細胞粘着（プラコフィリン、LIM）、細胞骨格再編成（プラキン）、及び腫瘍抑制活性（EXT1）に参与する4つの遺伝子で見つかり、そのような証拠を表2にまとめた。この表は、安定h-PRUNE過剰発現MDAクローン内の異なる遺伝子発現を報告したもので、左から右へ、ジーンバンクID同定、遺伝子名、独立の2つの実験を2通りに実施した後のクローン#8／クローン#177のアレイ発現値間の関係、アレイ発現のP値、リアルタイムPCRにより値を設定されたクローン#8／クローン#177のアレイ発現値間の関係、リアルタイムPCRのP値、相関関係のある細胞生物学的プロセスの列が報告されている。

【0166】

【表 2 - 1】

表2

上方制御						
ジーンバンクID	遺伝子名	アレイ発現値比 クローン #8/クローン177	P値	リアルタイム発現値比 クローン #8/177	P値	細胞生物学的プロセス
NM_030981.1	RAB 1Bラソファミリー	0.6902	0.0184	0.4005	0.0001	腫瘍形成
BT007330.1	ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ型II	0.3933	0.0017	0.2230	0.0013	細胞骨格再構成
AF035620.1	BRACA1関連タンパク質 (BRAP2)	0.7563	0.0027	0.0670	0.0062	腫瘍形成
M22300.1	プラスチン	0.7491	0.0078	0.0990	0.0001	腫瘍形成
NM_018177.2	NEDD4結合タンパク質2 (NABP2)	0.7567	0.0145	0.2230	0.001	プロテアーゼ活性化
NM_016274.3	CK2相互作用タンパク質1 (CKIP1)	0.7929	0.0161	0.3499	0.0004	増殖
XM_208021.1	26-Sプロテアソーム	0.6886	0.0178	0.4475	0.0044	プロテアーゼ活性化

10

20

30

40

【表 2 - 2】

下方制御		遺伝子名	アレイ発現値比 クローン # 8 / クローン177	P 値	リアルタイム発現値比 クローン # 8 / 177	P 値	細胞生物学的 プロセス
ジーンバンクID							
R08943.1	ブラコフィリンに類似の EST R08943	1.3611	0.0263	2.9180	0.4764	細胞粘着	
AF061258.1	LIM	1.1717	0.0145	3.0525	0.0092	細胞粘着	
BC0011741	EXT1	2.1573	0.0398	2.9588	0.0623	腫瘍抑制剤	
NM_001723.2	プラキン	0.7826	0.0178	0.5625	0.0619	細胞骨格組織	

10

20

30

40

【0167】

要約すると、腫瘍形成に結びつくプロセスに関与する遺伝子が、発現レベルでは著しく変更されて、そのため、h-PRUNEがこの乳癌細胞系のより高い発癌能に寄与する決定要因のあることを示していることが発見されたということである。

【0168】

結論

50

DHHスーパーファミリーに属している2つのタンパク質、つまり、RecJヌクレアーゼ及び無機ピロホスファターゼに基づく構造解析により、h-PRUNEは金属イオン依存性ホスホエステラーゼ活性を有する可能性が示唆される。ホスホエステラーゼのDHHファミリーの構造解析及び進化論的タンパク質量込み込み研究の結果として、哺乳類h-PRUNEはサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性を有することが証明された。

【0169】

h-PRUNEは、ヌクレオチド上で機能することが知られている、NDPK活性を有するnm23-H1アイソフォームと相互作用するので、サイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の特徴付けと細胞シグナリングにおける役割に注目が集中した。DHHファミリーの保存モチーフIII内の置換を含むh-PRUNEΔ突然変異体は、PDE活性の減少を示す(図2、パネルA、B、F)。

10

【0170】

様々な部位の単一又は複数の突然変異分析から、モチーフIIIのイスチジン(127)、アルギニン(128)、及びプロリン(129)、並びにそれぞれモチーフI、III、及びIV内に存在するアスパラギン酸D28、D126、D179の突然変異のみがh-PRUNE PDE活性に実質的な影響を及ぼし、したがって、h-PRUNE PDE触媒部位への関与の可能性が高いことを示すことがわかった。

【0171】

保存モチーフIII領域は、タンパク質モデリングにより予測されるとおり Mg^{2+} イオンの結合に関与しており(図1、パネルB)、さらに、*in vitro*機能アッセイでは、h-PRUNEも、非存在(図2、パネルE)、又は低金属イオン濃度(図2、パネルF)で機能することができることが観察された。

20

【0172】

h-PRUNE及びnm23sタンパク質レベルは、肉腫及び乳癌腫瘍において不平衡であることが実証され、h-PRUNEはnm23-H1抗転移性機能をマイナス方向に調整することができることを示唆している。h-PRUNE発現の増大は、これらの腫瘍及び癌の進行の悪性度に直接関連する(Forus他、2001年)。複数の報告書において、nm23-H1の抗転移活性は、NDPK活性と無関係である(Steege他、1993年、Wagner 1997年)と主張しているため、本発明者らは、原発腫瘍部位から遠くへ移動するために癌細胞が獲得する第1の細胞機能の1つを表す、細胞運動性に対するh-PRUNEの影響を調査した。

30

【0173】

h-PRUNE PDE活性がこれらの現象に直接関与することを確認するため、h-PRUNE、h-PRUNEΔ、及びh-PRUNE4DΔを、乳癌モデルにおいて過剰発現させたところ、野生型タンパク質の過剰発現は、細胞運動性を誘発するが、そのPDE機能(h-PRUNEΔ、h-PRUNE4DΔ)の減少は細胞運動性の減少に対応していることが観察された。

【0174】

逆に、突然変異体h-PRUNE4DΔの80% PDE活性減少及びMDAクローン内のその過剰発現は、細胞運動性の著しい増大を引き起こさないことが観察され、したがって、他の潜在的h-PRUNE活性が運動増大に関与することは除外される。

40

【0175】

他の細胞内の特徴付けされたPDEは細胞移動に関連していなかったとしても、MDAの安定なクローン内のPDE活性の増大が細胞運動性に寄与する可能性があるかどうか調査された。この目的のために、PDE5Aは、同じ細胞モデル内で過剰発現され、細胞運動性に対する影響について試験された。ジピリダモール(IC_{50} 0.9 μM)に対する感度について選択されたPDE5Aは、MDA乳房細胞運動性に影響を及ぼさず、そこで、h-PRUNE PDE機能のみが乳癌細胞の細胞運動性の増大に関与することが示される。

50

【0176】

さらに、高いnm23-H1発現背景におけるh-PRUNE過剰発現は、運動表現型の減少を示し、h-PRUNEだけを過剰発現する細胞と比べてh-PRUNE PDE活性を下げるのが観察された。h-PRUNE PDE活性は、nm23-H1との相互作用の後in vitroで増大されるが(図4、パネルA)、この効果はin vivoでは観察されなかった。これらの減少は、MDA-PRUNEクローンと比較してもMDA-H1-177-PRUNE内に大量のnm23-H1が存在するということにより説明できる(図3、パネルB)。

【0177】

これは、PRUNE-nm23H1複合体形成にマイナスの影響を及ぼす可能性があり、これは異なるオリゴマー及び／又は翻訳後修飾nm23-H1フォーム(例:セリンリン酸化反応)の存在に依存する可能性がある(Steege他、2003年)。

【0178】

nm23抗転移性機能に対するh-PRUNEのマイナスの調整は、タンパク質間相互作用の結果としてのPDE活性の増大によるものであるとの仮説を検証するために、h-PRUNE PDE活性に対する2つのnm23-H1突然変異体の効果を調べた。これらのタンパク質突然変異体は、h-PRUNEと物理的に相互作用できるnm23H1-P96S、及びh-PRUNEと相互作用しないnm23H1-S120Gであり(Rymond他、1999年)、両方の突然変異体は、乳癌細胞内でトランスフェクションが行われ(MDA-435)、それらはnm23-H1野生型タンパク質の内生抗運動効果を抑制することができる(Frijie他、1997年、MacDonald他、1996年)。

【0179】

さらに、nm23-H1-S120Gなどの高nm23発現系内でh-PRUNEを過剰発現する乳癌細胞は、nm23-H1-P96S系内の過剰発現h-PRUNE細胞と比較して細胞運動性が低いことが示された。

【0180】

したがって、これら2つのタンパク質間の物理的相互作用は、運動促進に関与していることが実証された。さらに、h-PRUNE-nm23-H1-S120Gクローンは、h-PRUNEとnm23-H1-P96Sの両方を過剰発現するクローン内で観察されるPDE値と比較してPDE活性がほぼ66%低く(図4、パネルB)、そのため、タンパク質間相互作用、h-PRUNE cAMP-PDE活性、及び細胞運動性効果の間に相関関係があることを決定的に示している。

【0181】

知られているPDE阻害剤がh-PRUNE PDE活性に対抗して選択的に機能することができたかどうかを理解するために、8つのPDE阻害剤一組を試験したところ、ジピリダモールがh-PRUNE PDE活性を阻害することができ、著しいIC₅₀値を有することが発見された。

【0182】

さらに、ジピリダモールを使用すると、安定なh-PRUNE乳房クローンの運動が著しく低下し、またそれほどではないが、h-PRUNEΔ過剰発現クローンの運動も低下した(図5、パネルB)。ジピリダモール及び類似の薬剤などの抗凝血剤は、細胞が毛細血管壁に粘着するのを阻害することを通じて血液凝固伝導路活性に機能干渉を加えるというのが一般的見解である。ここで報告した結果に照らして、ジピリダモールを使用することは、広がっている乳癌転移に対する予防及び治療薬となりうると考えることは論理的である。

【0183】

さらに、細胞運動性活性に関するin vitro観察データは、TxNxM1患者からの有意な数の乳癌組織を使用してin vivoで確認された。遠隔転移を示す症例のうち59件の腫瘍症例では、h-PRUNEは、22の症例(37%)でコピー数が増幅

10

20

30

40

50

され、過剰発現されることがわかったが、nm23-H1は、すべての分析症例において、低いレベルで発現されていることがわかった（図6、パネルB、C、D）。

【0184】

予備データは、h-PRUNEの過剰発現を有する患者間の全生存率の統計的に有意な減少により推論されるように、乳癌のh-PRUNEのマイナスの予後の役割を示している。提示されたデータは、h-PRUNEが転移に関与する遺伝子を上方制御し、その活性は悪性度の高い腫瘍挙動の危険性をin vivoで高めることを示しており、したがって、乳癌患者の臨床転帰に対しマイナスの寄与をする。報告された結果は、h-PRUNE前転移悪性腫瘍機能を阻止するために乳癌の治療の際に使用されるh-PRUNE PDE活性を選択的に阻害することができる薬剤を実現する可能性として、重要な薬理学的帰結を有する。さらに、MDA-H1-177クローンと比較した場合に発現が乳房MDA-H1-177-PRUNE（クローン#8）内で変更された腫瘍形成及び転移プロセスに関与する11個の遺伝子を、アレイ発現により分析し、リアルタイムPCRにより妥当性の検証を行った。提示される結果は、h-PRUNE過剰発現に相関するMDA乳癌細胞系の悪性度及び転移能の追加の証拠となる（実施例2）。

【0185】

全体として、これらの結果は、nm23-H1抗転移性機能にマイナスの影響を及ぼす細胞運動性及び転移の促進に対するh-PRUNEの役割を明確にしている。癌の進行におけるh-PRUNEの役割を研究するために使用されるモデルでは、一般に、腫瘍細胞の増幅を必要とする。

【0186】

この増幅は、細胞質区画のh-PRUNE PDE活性の増大をもたらし、nm23の転移機能の抑制剤にマイナスの影響を及ぼす。h-PRUNE PDE活性の活性化は、nm23-H1タンパク質との物理的相互作用によるものであり、複合体形成の結果、遊離nm23-H1形態レベルの実質的減少が生じ、それにより、細胞増殖、細胞運動性、及び転移プロセスに影響が及ぶ（図7）。

【0187】

（実施例3）

浸潤性乳癌の診断におけるh-PRUNE過剰発現の役割の研究

材料と方法

患者

この研究では、組織学的検査により乳癌と診断された患者を含めた。スイスのバーゼル大学病院の2つのアーカイブから、それぞれ地方倫理委員会とサッサリ大学の病理学協会の承認を得て症例を取り出した。第1のアーカイブは、1,531件の浸潤性腺管癌、310件の浸潤性小葉癌、69件の粘液性癌腫、65件の管状腺癌、48件の髄様癌、及び86件の他の種類の浸潤癌を含んでいた。そこで、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍試料を、バーゼル大学病院の病理学協会、バーゼルの臨床病理学協会、及びチューリッヒのTriemli病院から入手した。第2のアーカイブは、307件の浸潤性腺管癌、69件の浸潤性小葉癌、12件の粘液性癌腫、24件の他の種類の浸潤癌を含んでいた。

【0188】

診断、治療、再発、無病生存率、及び最終対照の時間の疾患段階を含む、それぞれの患者の臨床病理学的特徴はすべて、バーゼル及びサッサリの登録所から取得した。

【0189】

病理病期、腫瘍直径、及びリンパ節の状況は、一次病理学報告書から得られた。臨床データは、2,299例について10年間の追跡調査の後に入手でき（中央値、56カ月、範囲、2～120カ月）、15年間の追跡調査の後の臨床データは、222人の患者について入手できた（中央値、138カ月、範囲、121～176カ月）。この研究のための標本及びデータは、バーゼル大学病院とサッサリ大学の両方の倫理委員会によって承認された。

【0190】

組織多重アレイ (TMA)

TMA構成については、既に説明されている (Simon他、2001年、Simon他、2002年)。要約すると、半自動ロボット高精度計測器を使用して、組織ドナーの代表的な腫瘍領域から直径0.6mmの組織円筒をパンチし、それぞれ342から522の個別試料を含む6つの異なるパラフィンブロック内に配置するということである。その結果得られるTMAブロックの4つのマイクロメータル切片をコーティングされたセクションシステムに移動する (Instrumedics Inc.、ニュージャージー州ハッケンサック)。多重アレイ化試料上の腫瘍組織の存在は、ヘマトキシリンエオシン染色により検証された。組織マイクロアレイは、それぞれの患者の乳癌の異なる領域からの少なくとも2つの切片と共に対照として正常組織を含んでいた。

10

【0191】

免疫組織化学 (IHC)

抗h-PRUNE特異モノクローナル (クローン4G3/4、1から351のアミノ酸の組換え融合タンパク質に対して、Apotech Corporation、CH) 及び抗nm23-H1 (クローンK73、-H1アイソフォーム特異、Apotech Corporation、CH) 抗体を使用して、ホルマリン固定パラフィン包埋組織片を免疫染色した。取付説明書に従い、また知られているプロトコルに従って、Vectastain Elite ABC Kit (Vector Laboratories Inc.) を使用して、免疫組織化学分析を実施した (Forus他、2001年、D'angelo他、2003年)。

20

【0192】

健康な乳房細胞の代表的な対照組織病理学切片を染色することにより最適化されたIHCプロトコルを確立した。正常な乳房組織では、nm23-H1タンパク質は、均質的に発現されるが、h-PRUNEの発現は、存在しないか、又は低強度であった。

【0193】

多重アレイ上に2通りに無作為に配置された54個の正常試料を使用することにより染色を半定量的に評価し、免疫組織化学染色の強度及び分配を使用し、h-PRUNEとnm23発現の両方について腫瘍試料を陽性 (強 [+++] から中 [++] の染色、腫瘍細胞の大半により均一に分配又は与えられる) 又は陰性 (非存在又は弱染色 [+]) として分類した。

30

【0194】

FISH分析

知られているプロトコルに従ってパラフィン包埋TMA切片を処理した (Simon他、2002年; Muresu他、2002年)。

【0195】

染色体1q21.3上に局在するh-PRUNE遺伝子領域にまたがるPAC 279-H19クローン、及び染色体17q21.3上に局在するnm23-H1遺伝子に特異的な、DNA/BACクローンを、dUTP-CY3 (赤色) を使用するニックトランスレーション法で標識し、プローブとして使用した。pUCI77は染色体1q12上のペリセントロメア領域に対応し、pZ17-14は染色体17のセントロメア領域に対応し、クローンは、dCTP-FluorX (緑色) を使用するニックトランスレーション法により標識され、対照として使用された。

40

【0196】

細胞核は、4', 6-ジアミジノー-2-フェニル-インドール (DAPI) により対比染色された。それぞれの症例について2つの異なる実験を実施した。

【0197】

DAPI、Cy3 (オレンジ) 又はFluorX (Vysis) の励起用の適切なフィルタ、及びCOHU Video and Cytovisionソフトウェアを備えるOlympus BX-61落射蛍光顕微鏡を使用してデジタル画像を取り込んだ。少なくとも100個の損なわれていない、保存状態のよい、重なりのない核上のハイブリッド

50

形成シグナルは、少なくとも2人の研究者により評価された。

【0198】

統計的分析

この研究には、変数及びカテゴリとして、病理学的原発腫瘍サイズ（pT）、病理学的リンパ腺状況（pN）、転移の存在（M）、エストロゲン及びプロゲステロン受容体（それぞれER及びPR）の状況、診断時の年齢、組織学的腫瘍種類、及び全生存（外科手術時を開始時点として計算する）を含めた。特に、リンパ腺及び受容体の状況は、多数の症例の中では利用できなかったが、それは、これらの変数は研究対象に患者を含めるうえで必要なかったからである。

【0199】

生存データ解析を統計パッケージEgret（バージョン2.0.3）で実施した。生の死亡及び腫瘍特異的死亡発生率を検閲データとして使用して、Cox回帰モデルを実施した。

【0200】

全生存の時間は、月で表し、独立変数（h-PRUNE、nm23-H1、pT、pN）は、3つの年齢グループ23～44（N=252）、45～64（N=1,146）、及び65～98（N=1123）として階層化した。

【0201】

h-PRUNE及びnm23-H1免疫組織化学データを細分してKaplan Meier推定を実施した。

【0202】

Pearsonの χ^2 乗検定を使用し、病理的パラメータ（組織学的腫瘍種類、pT、pN、M、ER、PR）との関連でh-PRUNE及びnm23-H1発現評価を実施した。試料比率分析の正確な係数を計算し、有意なパラメータ（0.05レベル未満）すべてを決定した。分析はすべて、統計パッケージSPSS/7.5 for Windows（登録商標）を使用して実施した。

【0203】

結果

組織学的に証明されている乳癌診断及び利用可能な追跡調査データのある2,109人の患者の保管されている組織からのTMA切片について、h-PRUNE及びnm23-H1発現レベルと共に、h-PRUNE染色体コピー数の評価を実施した。412人の乳癌患者からの追加のTMA切片（つまり、そのTNM分類が利用できた）をh-prune免疫染色について評価した。患者の大半は、腺管癌を組織学的変異体として有し（1,883人、73%）、年齢は診断時に60歳を超えていた（1,425人、57%）。59カ月の中央値期間（範囲2～176）をカバーするそれぞれの患者の臨床的追跡調査結果のデータが利用可能であり、患者の大半は、まだ生存しており（1,716人、68%）、ごく少数の患者のみがこの研究時点において追跡調査で失われた（12人、0.5%）。2つの特異抗体（それぞれ4G3/4及びK73モノクローナルAbクローン）を使用して免疫組織化学分析により、h-PRUNE及びnm23-H1タンパク質の発現を評価した。図9（パネルA及びB）は、一連の多重組織アレイ内のh-PRUNEタンパク質の染色の代表的実施例を示している。

【0204】

h-PRUNEタンパク質の強陽性細胞質染色（h-PRUNE+と呼ばれる）は、2,463個の試験腫瘍の大半（1,340人、54%）において観察され（58人の患者については評価しなかった）、nm23-H1タンパク質の陽性細胞質免疫染色は、2,061個の試験腫瘍のうち615（30%）個において観察された。h-PRUNE及びnm23-H1発現について評価された2,061個の腫瘍組織では、陽性免疫染色の逆分布が観察された[1,180（57%）の乳癌はh-PRUNE+であったが、615（30%）個はnm23-H1+であった]。表3には、浸潤性乳癌に存在するh-PRUNE及びnm23-H1タンパク質についての免疫組織化学分析（IHC）の結果が報

10

20

30

40

50

告されている。h-PRUNEとnm23-H1発現との間に統計的相関関係は観察されなかった。

【0205】

【表3】

表3

IHC分析	nm23-H1		合計	P
	陽性	陰性		
陽性h-PRUNE	359 (30%)	821 (70%)	1180	0.219
陰性h-PRUNE	256 (29%)	625 (71%)	881	

10

【0206】

異なる病理組織学的パラメータに基づき、患者のサブグループ（2109人の乳癌患者）内のh-PRUNE及びnm23-H1タンパク質発現の分布を評価した。h-PRUNE又はnm23-H1発現と腫瘍の種類（腺管と小葉）、pT、pN、ER、及びPR反応性の間に有意な相関関係は観察されなかった（表4）。

20

【0207】

【表 4 - 1】

表4

腫瘍パラメータ		h-prune			h-prune		合計	P
		陰性	陽性		陰性	陽性		
原発腫瘍サイズ	T ₁	319 (42%)	440 (58%)	T ₁₋₂	765 (44%)	985 (56%)	1750	0,63
	T ₂	446 (45%)	545 (55%)					
	T ₃	54 (45%)	65 (55%)	T ₃₋₄	160 (45%)	196 (55%)	356	
	T ₄	106 (45%)	131 (55%)					
グレーディング	G1	211 (40%)	323 (60%)	G ₁₋₂	584 (41%)	831 (59%)	1415	0,13
	G2	373 (42%)	508 (58%)					
	G3	336 (48%)	357 (52%)	G ₃	336 (48%)	357 (52%)	693	
組織学的種類	腺管	621 (42%)	865 (58%)				1.486	0,42
	小葉	117 (40%)	174 (60%)				291	
	その他	125 (49%)	131 (51%)				256	

10

20

30

40

【表 4 - 2】

ER	+	649 (42%)	882 (58%)				1531	0,37
	-	204 (44%)	259 (56%)				463	
PR	+	279 (43%)	369 (57%)				648	0,34
	-	523 (42%)	714 (58%)				1237	

10

【0208】

乳癌患者の1,016件の腫瘍について蛍光 *in situ* ハイブリッド形成 (FISH) 分析を実施した。染色体1q21.3のところでh-PRUNEゲノム領域に対応するPACクロン(279-H19)及び1q12染色体のところでペリセントロメア領域に対応する対照クロンをプローブとして使用した。分析された核内の20%超の1q21.3のところの複数のFISHシグナルは、173件(17%)の症例にあることがわかった(表5、図9C)。セントロメアに対し少なくとも2つの遺伝子コピーを有する症例及び複数のセントロメアシグナルが存在するため染色体1全体の多染色体性を有する乳癌を考察したところ、染色体1q21.3のところで非常に低いレベルのh-PRUNE増幅が観察された(1,016件のうち68症例、6.7%)。これは、遺伝子増幅メカニズムが少ない数の乳癌症例で発生することを示している。h-pruneゲノム領域でのDNAコピー数の増大は、三染色体性($p=0.027$)又は四染色体性($p=0.033$)を有する腫瘍における陽性h-prune免疫染色の存在に対する有効統計的相関関係に有意に関連する(表5)。しかし、このような細胞遺伝学的変更の頻度の低いことから、関与する代替病原性経路がh-PRUNE活性化及び乳癌のh-prune体性発現の増大を決定することが示唆される。

20

30

【0209】

【表 5】

表5

マーカー	番号	二染色体性	%	三染色体性	%	P	四染色体性	%	P
h-prune 陰性	440	386	88	54	12		21	4.8	
h-prune 陽性	576	457	79	119	21	0.027	47	8.2	0.033
試験合計	1016	843	83	173	17		68	6.7	

*: 染色体1q21. 3のところのh-prune遺伝子に対応するPACクローンとのハイブリッド形成の後分析

された核の20%超の複数のシグナル

**: 染色体1全体の増幅も含む、No: 症例の数、P: χ^2 二乗検定

10

20

【0 2 1 0】

h-prune と臨床病理学的パラメータとの相関関係

乳癌におけるh-PRUNE過剰発現の臨床病理学的役割を評価するために、2, 109件の乳癌症例の系列（病的原発腫瘍情報及び最大15年分の臨床追跡データのすべてを含む、表4）と412件の乳癌症例の系列（完全なTNM分類及び最大10年分の臨床追跡データを含む、表6）の両方を使用して、浸潤性原発乳房腫瘍について、免疫組織化学的分析を実施した。

【0 2 1 1】

【表 6】

表6

TNM		h-prune			h-prune		合計	P
		陰性	陽性		陰性	陽性		
腫瘍サイズ	T ₁	83 (58%)	59 (42%)	T ₁₋₂	170 (58%)	122 (42%)	292	0,099
	T ₂	87 (58%)	63 (42%)					
	T ₃	11 (44%)	14 (56%)	T ₃₋₄	26 (47%)	29 (53%)	55	
	T ₄	15 (50%)	15 (50%)					
リンパ腺 状況	N0	125 (71%)	50 (29%)	N ₀₋₁	230 (68%)	109 (32%)	339	0.017
	N1	105 (64%)	59 (36%)					
	N2	6 (30%)	14 (70%)	N ₂₋₃	6 (27%)	16 (73%)	22	
	N3	-	2 (100%)					
転移	M0	210 (67%)	103 (33%)				313	0.029
	M1	14 (36%)	25 (64%)				39	

P: χ^2 二乗Pearson検定、両側、95%信頼区間

【0212】

さらに、2, 109人の患者の部分集合から取った腫瘍切片も、nm23-H1発現について、免疫組織化学分析により調査した(表7)。

【0213】

10

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表7

腫瘍パラメータ		nm23-H1			nm23-H1		合計	P
		陰性	陽性		陰性	陽性		
サイズ	T ₁	489 (68%)	226 (32%)	T ₁₋₂	1.162 (69%)	517 (31%)	1.679	0.27
	T ₂	673 (70%)	291 (30%)					
	T ₃	86 (45%)	31 (26%)	T ₃₋₄	254 (73%)	94 (27%)	348	
	T ₄	168 (73%)	63 (27%)					
グレイ ディング	G1	360 (69%)	159 (31%)	G ₁₋₂	937 (68%)	434 (32%)	1.371	0.14
	G2	577 (68%)	275 (32%)					
	G3	501 (74%)	179 (26%)	G ₃	501 (74%)	179 (26%)	680	
組織学	腺管	1.031 (69%)	455 (31%)				1.486	0.68
	小葉	201 (69%)	90 (31%)				291	
	その他	167 (65%)	89 (35%)				256	

10

20

30

40

【表 7 - 2】

ER	陽性	1.076 (71%)	447 (29%)				1.523	0.41
	陰性	329 (70%)	142 (30%)				471	
PR	陽性	449 (69%)	203 (31%)				652	0.27
	陰性	871 (71%)	362 (29%)				1,233	

P: χ^2 二乗Pearson検定、両側、95%信頼区間、ER、エストロゲン受容体の状況、PR、プロゲステロン受容体の状況。

10

20

【0 2 1 4】

この後者の部分集合は、遠隔転移の存在についての情報を与えることがなく、リンパ腺の状況に関する情報は、リンパ節転移の存在 (N+) 又は非存在 (N-) に関してそのような乳癌患者について部分的に利用可能であった (陽性 h-p r u n e 免疫染色は、2 1 0 / 4 8 2 [4 4 %] の N+ 症例、及び 1 7 9 / 4 9 6 [3 6 %] の N- 症例、 $P = 0.109$ で観察され、同じように、nm 2 3 - H 1 + 免疫染色についての統計的相関関係は、これら 2 つのグループについては見られなかった)。したがって、それぞれのパラメータの予後値は、生存分析に基づいて決定された。

【0 2 1 5】

2 0 0 2 年 1 2 月に、疾患のため 7 8 2 人 (3 1 %) の患者が死亡したが、全体の生存期間の中央値は、5 9 カ月であり、生存患者の追跡は 7 2 カ月である。Pearson の χ^2 二乗検定を使用し、いくつかの病理的パラメータ、つまり組織学的種類、腫瘍格付け (E l s t o n と E l l i s によって標準化されたとおり)、p T、ER、PR、及び (利用可能な場合) p N、及び M との関連で h-p r u n e 及び nm 2 3 - H 1 免疫染色を評価した。h-p r u n e 又は nm 2 3 - H 1 発現と腫瘍の種類 (腺管と小葉)、組織学的グレード、p T、ER、及び PR 反応性の間に統計的に有意な相関関係は観察されなかった (表 4)。代わりに、4 1 2 人の乳癌患者の系列において陽性 h-p r u n e 免疫染色は進行性リンパ腺状況 ($N_2 \sim N_3$ グループ、 $p = 0.017$) 又は遠隔転移の存在 (M_1 グループ、 $p = 0.029$) との有意な相関関係を有していた (表 6)。この系列の統計分析により、h-p r u n e 過剰発現と原発腫瘍サイズとの間の有意な関連の非存在が確認された (表 6)。

30

40

【0 2 1 6】

疾患段階及び診断時の年齢に応じて調整された Cox モデルを使用した、h-p r u n e 過剰発現 (HR 0. 6 1、9 5 % C I 0. 3 1 ~ 1. 1 8、 $p = 0.144$) 又は nm 2 3 - H 1 (RR 0. 9 8、9 5 % C I 0. 9 0 ~ 1. 0 7、 $p = 0.158$) の予後値は観察されなかった (表 8 及び 9、図 1 0)。

【0 2 1 7】

【表 8】

表8

2, 109人の乳癌患者に関する統計分析			
マーカー*	リスク比	95% CI	P
h-PRUNE (陰性と陽性)	0.93	0.78-1.09	0.369
nm23-H1 (陰性と陽性)	0.98	0.90-1.07	0.158
腫瘍サイズ (pT ₁ と pT ₂₋₄)	0.81	0.68-0.96	0.017
腫瘍グレーディング(G ₁ と G ₂₋₃)	0.70	0.59-0.83	0.001

10

表9

マーカー*	リスク比	95% CI	P
h-prune (陰性と陽性)	0.61	0.31-1.18	0.144
腫瘍サイズ (pT ₁₋₄)	12.49	4.10-38.02	<0.001
リンパ腺状況 (pN ₀₋₃)	2.43	1.34-4.40	0.003

20

【0218】

全体として、腫瘍格付け、原発腫瘍サイズ、及び腋窩リンパ腺状況は、乳癌患者のこの系列における予後に密接に相関するパラメータである（表8及び9）。

【0219】

したがって、結論として、h-prune マーカーは、進行乳癌状況に関連付けられ、N1 から N2 状況に移るときのリンパ節状況の新しいマーカーと考えることができる。

【0220】

30

(実施例4)

NM23 H1 及び H2 リン酸化反応、及び h-prune cAMP-PDE 活性の *in vivo* 阻害を引き起こす h-prune との複合体の形成を阻害する IC261 の使用に関する研究

材料と方法

in vitro 及び *in vivo* の nm23H1 及び H2 タンパク質は、カゼインキナーゼ1δによりリン酸化され、リン酸化反応は複合体の形成に介入することを示す研究（図11）。

【0221】

40

方法-*in vitro*

リン酸化反応 *in vitro*、相互作用アッセイ、及びホスホ-nm23 抗体の生成。100 ng の量の精製された組換え nm23 及びその突然変異体を、Garzia 他（2003 年）で説明されているように、1 時間の間、30 °C で、CKI 標準反応緩衝液内でインキュベートした。その後 nm23 リン酸化タンパク質を、5 % BSA を補った共 IP 標準緩衝液内で h-prune と共にインキュベートした。h-prune タンパク質は、h-prune のモチーフ III 上のペプチドに対してポリクローナル抗体 A59 で免疫沈降した。リン酸化されているか、又は h-prune 結合されていない nm23 の異なる突然変異体の存在は、同時に h-prune 及び nm23 タンパク質を検出する抗 His tail 抗体（Qiagen）で実施される免疫沈降でのその後の Western blot 分析により検出された。

50

【0222】

K73ポリクローナル抗体は、免疫原として、nm23-H1タンパク質からの位置S122でリン酸化されたN115からE127のホスホペプチドを使用して得られ、抗血清は、非選択的抗体における結果として得られるタンパク質Aのカラム上のIgG精製、及び免疫原として使用されるホスホペプチド(NIHGS DSVKSAE)上の他のアフィニティ精製の後に使用された。この第2の手順は、メーカーのプロトコルに従ってAffigel 25樹脂(biorad)でDMSO中に溶解された脱塩リン脂質1mgの架橋結合を通じて実施された。その後、結合樹脂を、リン酸化され、既に精製されたもので免疫されたウサギの血清を使用するアフィニティ精製に使用し、直接Affigel結合ペプチドカラムに塗布された、抗体まで濃縮されたIgGペプチド(K73ポリクローナル抗体)をカラムにより吸着した。カラムは、100mM Tris HCl 10ml (pH8)、500mM NaCl 10ml、10mM Tris HCl 10ml (pH8)、10mM Tris HCl 10ml (pH8)をそれぞれ使用して、カラムml毎に洗浄した。0.1Mのグリシン(pH3)で溶離を実施した。

【0223】

方法-in vivo

In situタンパク質消化及びMALDI分析

トリプシン、ジチオトレイトール、及びヨードアセトアミドをSigmaから入手した。トリフルオロ酢酸(TFA)-HPLC、純度99%は、Carlo Erbaからのものである。最高純度の他のすべての試薬及び溶媒は、Bakerから入手した。

【0224】

SDSゲルから切り取り、milliQ水グラジエントで2回洗浄した、クマシーブルーで染色したタンパク質について分析を行った。摘出した染色物をまずCANで洗浄し、その後、0.1Mの重炭酸アンモニウムで洗浄した。その後、溶液を除去し、洗浄を2回繰り返した。タンパク質試料を、45分間、56℃で、ジチオトレイトール(DTT)内のインキュベートにより還元した。説明されているように、ACN/AMBI Cによる洗浄で還元緩衝液を除去した。暗所で、室温で、39分間、55mMのヨードアセトアミドのインキュベートにより遊離システインをアルキル化した。重炭酸アンモニウムとACNでゲル粒子を洗浄した。10mMの重炭酸アンモニウム(pH8.0)中のトリプシン(12.5ng/μl)を使って酵素消化を行った。ゲル断片を4時間の間、4℃でインキュベートした。その後、トリプシン溶液を除去し、緩衝液の新しいアリコートを加えた。試料を、18時間の間、37℃でインキュベートした。完全ゲル再水和に十分な最低限の反応体積を使用した。その後、室温で50%のACN中の10mMの重炭酸アンモニウム及び0.1%のTFAを使用してゲル粒子を洗浄することによりペプチドを抽出した。

【0225】

Applied Biosystem Voyager DE-PRO計測器及び新しいVoyager MALDI TOF/TOF質量分析計を使用して、MALDI-TOF質量分析結果を記録した。ペプチド及びアルファシアノーヒドロキシ桂皮酸(ACN中10mg/ml/水中0.1% TFA、2:1、v/v)の混合液を金属板に塗布し、室温で乾燥させた。外部標準を使用して、質量較正を実施した。メーカーが用意したソフトウェアを使用して第1のデータを分析し、モノアイソトピック質量として報告した。

【0226】

図3に示されている結果は、リン酸化反応がない場合に、その部位のnm23H1及びnm23H2タンパク質はh-pruneとの複合体を形成しないことを示している。

【0227】

h-prune過剰発現クローンの細胞運動性研究

IC261による阻害に関する研究

MDA-PRUNE #3及びMDA-PRUNE #4細胞クローン及びMDA-435C-100細胞(対照細胞)を、8μMのジピリダモール又は50μMのIC261

(カゼインキナーゼ I δ 及び ϵ 阻害剤、Calbiochem、英国ノッティンガム)でそれぞれ24時間又は8時間かけて処理した。その後、0.5%の胎児血清 FCS 濃度を化学誘引物質として使用して、細胞運動性アッセイを「boiden and chamber」細胞に適用した。その後、顕微鏡を使って細胞の数を数え、得られたデータに統計分析を適用した(図13A)。

【0228】

顕微鏡を使って細胞を数えたところ、細胞運動性値は、すべて2通りに実施した5回の独立アッセイで算術平均 $\pm$ SDである(MDA-クロン prune #3 及び #4 / MDA-クロン prune #3 及び #4、但し IC261 $p < 0.002$)。

【0229】

in vitro 細胞運動性アッセイ

安定 h-prune 過剰発現 MDA クロンは D'Angelio 他、2004 年で説明されているようにして得られた。対照 MDA-C100 乳癌細胞系を、細胞運動性アッセイで使用した(Leone 他、1993a、Leone 他、1993b)。細胞運動性は、0.5% FCS、最終濃度を化学誘引物質として使用するトランスウェル技術(6ウェル、Corning-Costar)を使用して決定された(D'Angelio 他、2004 年を参照)。in vitro h-prune 阻害運動アッセイは以下のように実施された。MDA-prune (クロン #3 及び #4) 及び MDA-C100 を、ジピリダモール(8 μ M、IC₅₀ に関して10倍高い濃度)で24時間の間インキュベートし、完全な酵素不活性をもたらし、同じ細胞系を IC261 により50 μ M の濃度で8時間の間インキュベートしたが、この条件では、細胞死のシグナルなしで nm23 リン酸化反応の最高の減少を観察することができ、その後、運動アッセイを上述のように繰り返した。すべての結果は、すべて2通りに実施された5回の独立の実験の平均である。統計分析は、サイト <http://www.graphpad.com/quickcals/index.cfm> で入手できる低下された T 検定法で実施され、 $P < 0.05$ の値は、統計的に有意であると考えられる。

【0230】

h-prune 過剰発現細胞の、IC261 投与を受ける cAMP-PDE の全含量に関する研究

MDA-Prune #4 細胞は、そのようなものとしてあるか、又は50 μ M IC261 で8時間の間処理された。その後、細胞を溶解し、Amersham「シンチレーション近接アッセイ」法を使用してその cAMP-PDE 全含量について試験した。IC261 の存在下で、組換え h-prune の cAMP ホスホジエステラーゼ活性(図13B、右)の改変は検出されなかったが、prune 過剰発現 MDA prune #4 クロンにおける cAMP-PDE 活性の全含量をきめ細かく下げることができ、h-prune 及び nm23 複合体が細胞 PDE-cAMP 増大(図13B、左)に関与することを示し、またそのような複合体は、in vivo で IC261 により阻害できることが指摘された。

【0231】

A. PDE 活性アッセイと cAMP

PDE 活性は、シンチレーション近接アッセイ(Amersham-Biotech)で測定された。試料、MDA-prune #4 全抽出物の20 μ g、及び対照として使用される MDA-C100 抽出物を、基質として所望の cAMP 濃度を含む(非標識と 3H-標識比 3:1)アッセイ緩衝液(50 mM の Tris HCl [PH 7.4]、8.3 mM MgCl₂、1.7 mM EGTA)100 μ l の中で30℃でインキュベートした。単独の緩衝液を含むブランクを含むすべての反応を、3通り実施し、基質回転率25%未満(経験により決定)となるインキュベーション時間の間進行させた。50 μ l のケイ酸イットリウム SPA パール(Amersham)を加えて反応を急冷した。発見された放射性同位体標識産物量に対する酵素活性を、メーカープロトコルに従って計算した。IC261 による処理は、上述の運動アッセイの場合と同じであった。

10

20

30

40

50

【0232】

結果

得られた結果は、IC261を使用してカゼインキナーゼ1δを阻害することにより、nm23-H1及びH2リン酸化反応を阻害し、したがって、h-pruneタンパク質とのin vivoの結合を阻害する可能性があることを示している。したがって、この薬剤を使用することにより、h-prune-nm23複合体の形成を阻害することが可能であり、これは最後にカゼインキナーゼIによる8120、8122、8125領域（NIIHGSDSVESAEKE）内のリン酸化反応に依存する。この研究では、IC261を使用して、nm23H1及びH2のh-pruneへの結合を阻害し、タンパク質複合体由来の細胞運動性を阻害することができる。

10

【0233】

新しい手順では、細胞内に浸透でき、in vivoでリン酸化されたnm23-H1及びH2の割当量を横取りする、h-pruneの結合に関して競合する新しいペプチドの使用を予測でき、その配列は、8120、8122、及び8125セリンのnm23-H1及びH2範囲のアミノ酸配列から導かれる（実施例H1：NIIHGSDSVESAEKEの後にHIVTATタンパク質の領域の浸透ペプチド配列が続く。GGGYGRKKRRQRRR、純度95%がPRIMMによって合成される）。そのような、又は類似のペプチドは、H1及びH2野生型タンパク質上でカゼインキナーゼIリン酸化反応とin vivoで競合し、h-prune複合体形成及び細胞内のh-prune cAMP-PDE活性の増大及び最終的に細胞運動性の誘発に参与するリン酸化されたnm23の割当量を減らすことができる。また、（H1：SDEIGKVSENI AHSEの後に続く浸透ペプチド配列GGGYGRKKRRQRRR）と呼ばれるカゼインキナーゼIクランプルの認識配列を有する対照ペプチドを合成した。この技術を使用し、in vivoでh-pruneとnm23との間の相互作用の阻害をより特異的に標的にすることが可能である。

20

【0234】

（実施例5）

h-pruneに対するモノクローナル抗体の作成（4G3/4、10/12/2004にジェノアのCBAに寄託）

尾部のN末端で融合され、pMaltoセベクターを通じて大腸菌（E. Coli）内で生成される、h-pruneタンパク質は、精製されたゲルであった。マウスに5週間の間免疫し（1回注射でタンパク質100μg）、何らかのハイブリドーマ培養を用意するために脾臓を取り出した。免疫及び分析のためにタンパク質抗原約2mgが必要であった。Primmは、タンパク質が利用できなかった場合の免疫用に接合合成ペプチドを提供することができる。モノクローナル抗体の開発及び生産は、以下の異なるフェーズで規定される。

30

- － ペプチド合成及びペプチド接合（必要な場合）。
- － ペプチド約10mgの合成、純度>70%
- － ペプチド3～4mgを担体タンパク質に接合（抗原として）
- － ELISAスクリーニング用にペプチド1～2mgを異なる担体タンパク質に接合

40

【0235】

フェーズI（1.5カ月）

3 BALB/cのマウスを抗原で免疫。免疫された動物の血清の特異免疫グロブリンの定量滴定の手順。次の脾臓細胞の融合に対する免疫反応及び動物選択のELISAアッセイ。

【0236】

フェーズII（2カ月）

脾臓摘出及び脾細胞と骨髓症細胞との融合、最も陽性のクローンのELISA凍結を介したハイブリドーマ選択。

【0237】

50

フェーズ I I I (1～1.5 月)

限界希釈法による陽性クローン (1/2 又は 4) のクローニング及びサブクローニング。ハイブリドーマの凍結 (2 アリコート/クローン)。アリコートの解凍後の存続可能性、生産性、及び安定性アッセイ。

【0238】

フェーズ I V (1～1.5 月)

浮遊物 0.5 l からの細胞培養の mAb 0.5～4 mg の生成及び精製。

【0239】

選択されたハイブリドーマは、ハイブリドーマ培養浮遊物から精製されたネズミ IgM を生産する。免疫細胞化学に使用される mAb の量は、1:100 から 300 µg/ml に希釈された mAb 溶液に等しい。抗体は、ヒトとネズミの両方の prune に作用し認識する。内生タンパク質の検出は、ICC、IF、及び Western blot を使用して実施される (図 14)。

【0240】

抗体精製は、以下の IgM 精製プロトコルに従って実施された。溶解細胞の浮遊物を 1 ml/分の流れに曝した。HiTrap IgM を、5 体積の 20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、0.8 M (NH₄)₂SO₄ (緩衝液 A)、5 体積の 20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4) (緩衝液 B)、5 体積の 20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)、30% イソプロパノール (緩衝液 C) で平衡化した (1 ml、Amersham Pharmacia)。ELISA アッセイをペプチド及び精製されたタンパク質全体に対し実施し、生成された抗原及びクローン選択の特異性を決定した。

【0241】

カラム内にハイブリドーマ浮遊物を導入し、3つの緩衝液と共に溶離プロセスを3回繰り返す。そこで、カラムを15体積の緩衝液 A (15 ml) で洗浄し、カラム溶離を12体積の緩衝液 B (12 ml) で行い (1 ml 画分の回収)、280 nm の画分吸収度を読み取り、0.1 O.D. 未満の吸収度の画分を回収し、4℃で一晩、1×PBS 緩衝液に対し12000～14000 の間のカットオフの管で画分透析を行う。カラムを再生するには、7 ml の緩衝液 C を使用する。緩衝液 B + 20% エタノールでカラムを保存する。

(参考文献)

【表 9 - 1】

- Aravind, I. and Koonin, E.V. (1998). Trends in biochemical sciences 23,17-19.
- Timmons, L. and Shearn, A., (1996). Genetics 144, 1589-1600.
- Lombardi, D., Lacombe, M.L. and Paggi, M.G., (2000). J. Cell Physiol 182, 144-149.
- Keen, J.C., Davidson, N.E., (2003). Cancer 97, 825-833.
- Domchek, S.M., Weber, B.L, (2002). Curr Opin Oncol 14, 589-593.
- Kuru, B., Camlibel, M., Ali Gulcelik, M., Alagol, H., (2003). J.Surg. Oncol 83, 167-172.
- Morabito, A., Magnani, E., Gion, M., (2003). Clin Breast Cancer 3, 381-390.
- Florenes, V.A, Aamdal, S., Myklebost, O., Maelandsmo, G.M. Bruland, O.S. and Fodstad, O., (1992). Cancer Res 52, 6088-6091.
- Steeg, P.S., (2003). Nat Rev Cancer 3, 55-63.
- Frejje, J.M., Blay, P., Macdonald, N.J., Manrow, King., and Steeg, P.S., (1997). J Biol Chem 272, 5525-5532.
- Hartsough, M.T., Clare, S.E., Mair, M., Elkaloun, AG., Sgroi, D., Osborne, C.K, Clarke, G. and Steeg, P.S. (2001). Cancer Res 61, 2320-2327.
- Frejje, J.M., Lawrence J.A., Hollingshead M.G., De la Rosa, A., Narayanan, V., Grever, M., Sausville, E.A, Paull, K, and Steeg P.S. (1997). Nat Med 3, 395-401.

10

20

30

【表 9 - 2】

- Kantor, J.O., Mc Cormick, B., Steeg, P.S., and Zetter, B.R., (1993) *Cancer Res* 53, 1971-1973.

- Leone A, Flatow, U., Van Houtte K, and Steeg P.S. (1993). *Oncogene* 8, 2325-2333.

- Howlett, A.R., Petersen, O.W., Steeg, P.S. and Bissell M.J. (1994) *J Natl Cancer Inst* 86, 1838-1844.

- Hartsough, M.T., and Steeg P.S., (1998). *Am J Hum Genet* 63, 6 10.

- Lombardi D., L.M.L., Paggi M.G., (2000) *J. Cell Physiol.* 182, 144-149.

- Hartsough M.T. and Steeg P.S. (2000). *J. Bioenerg Biomembr* 32, 301-308.

- Mao, H., Liu, H., Fu, X., Fang, Z., Abrams, J., and Worsham, M.J. (2001). *Int J Oncol* 18, 587-591.

- Tseng Y. H., Vicent, D., Zhu, J., Niu, Y., Adeyinka, A., Moyers, J.S., Watson, P.H., and Kahn, C.R (2001). *Cancer Res* 61, 2071-2079.

- Raymond A, Valorio, S., Merla, G., Al-Maghteh, M., Zuffardi, O., Bulfone A, Ballabio A, and Zollo, M., (1999). *Oncogene* 18, 7244 7252.

- Forus A, D'Angelo A., Henriksen, J., Merla, G., Maelandsmo, G.M. Florenes, Y.A, Olivieri S., Bjerkehagen, B., Meza-Zepeda, L.A., Del Vecchio Blanco, F., Muller, C., Sanvito F., Kononen, J., Nesland, J.M. Fodstad O., Raymond A, Kallioniemi, O.P., Arrigoni G., Ballabio A, Myklebost, O., and Zollo M., (2001). *Oncogene* 20, 6881-6890.

- Altshul, S.F., Madden, T.L., Schaffer A.A., Zhang Z., Miller W., and Lipman, D.J. (1997). *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.

- Notredame C., Higgins D.G., and Heringa J., (2000). *J Mol Biol* 302 205-217.

- Macdonald, N.J., Freije, J.m.p, Stracke, M.L, Manrow R.E., and Steeg, P.S. (1996). *J. Biol Chem* 271, 25107-25116.

- Garzia, L, Andrè A., Amoresano. A., D'Angelo, A., Martusciello R, Cirulli, C., Turumi, T, Marino G., and Zollo M., (2003). *Biotechniques* vol 35, 384-391.

10

20

30

40

【表 9 - 3】

- Fisher D.A, Smith, J.F., Pillar, J.S., St Denis, S.H. and Cheng, J.B. (1998). J Biol Chem 273, 15559-15564.

- Leone, A., Seeger R.C., Hong C.C.M., Hu, Y.Y., Arboleda M.J. Brodeur G.M., Stram, D., Slamon D.J., and Steeg, P.S. (1993). Oncogene 8, 855-865.

- Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R and Fukuyama, K (2002). Proc Natl Acad Sci Usa 99, 5908-5912. 10

- Ahn, S., Milner, A. J. Futterer, K, Konopka, M., Ilias, M., Young T.W. and White S,A (2001). J. Mol Biol 313, 797, 811.

- Aravind L, and Koonin EV. (1998). Trends Biochem Sci 23, 469 472.

- Aravind L., and Koonin EV. (1998). Nucleic Acids Res 26, 3746 3752.

- Galperin M.Y., Natale D.A, Aravind L, and Koonin E.V. (1999). J. Mol Microbiol Biotechnol 1, 303-305. 20

- Aravind L., (1999). In Silico Biol 1, 69-91.

- Hejna, M., Raderer M., and Zielinsky, C.C. (1999). J Natl Cancer Inst 91, 22-36.

- Stteg, P.S., De la Rosa, A., Flatow, U., Macdonald N.J., Benedicto M., and Leone A., (1993). Breast Cancer Res Treat 25, 175-187. 30

- Wagner, P.D., Steeg, P.S. and Vu, N.D. (1997). Proc Natl Acad Sci USA 94, 9000-9005.

- Simon, R, Nocito, A., Hubscher, T., (2001). J. Natl Cancer Inst, 93, 1141-1146.

- Simon, R, Sauter, G., (2002). Exp Hematol, 30(12), 1365-1372.

- D'Angelo, A., Garzia, L, Andrè, A., (2003). Cancer Cell 2003.

- Muresu, R, Sini, M. C., Cossu, Á., (2002). Eur J Cancer 38, 1802 1809. 40

【図面の簡単な説明】

【0242】

【図1A】 DHHファミリーのホスホエステラーゼ配列の多重整列を示す図であり、4つのジェネリックモチーフ (generic motif) (I-IV) 及び第2のドメインにマッピングする2つの異なるサブファミリーのモチーフ診断を別々に示しており、数字は、それぞれのタンパク質配列内の第1の整列残基の位置及び異なる要素間の距離を示 50

す。

【図1B】PPASE及びRecJタンパク質の結晶構造に基づくh-PRUNEタンパク質の「リボン」構造。矢印は、アスパラギン酸残基(D)を示す。

【図1C】RecJタンパク質の「リボン」構造。矢印は、アスパラギン酸残基(D)を示す。

【図2A】cAMP及びcGMP基質上のh-PRUNE PDE活性の同定を示す図である。

【図2B】単一及び複数の突然変異の分析結果のヒストグラムは、h-PRUNEタンパク質の潜在的触媒部位をマッピングしている。

【図2C】Lineweaver-Burkプロットで、それぞれ基質としてcAMPについて K_m 及び V_{max} を決定している。 10

【図2D】Lineweaver-Burkプロットで、それぞれ基質としてcGMPについて K_m 及び V_{max} を決定している。

【図2E】cAMP-PDE活性は、 Mg^{2+} の高い濃度で2つの異なる緩衝液の存在下で測定された。

【図2F】cAMP-PDE活性は、 Mg^{2+} （黒色点）又は Mn^{2+} （白色点）の高い濃度の存在下で測定された。h-PRUNE（実線）及びh-PRUNE Δ （散在する点の線形）が示されている。

【図3A】安定したクローン分析及びin vitro運動アッセイを示す図である。リアルタイムPCR定量分析によるh-PRUNE及びnm23-H1遺伝子のmRNA発現の試験。関連する ΔC_t 値が示されている。 20

【図3B】リアルタイムによるmRNA発現の検出。m-RNAのコピー数が報告される。

【図3C】h-PRUNE、nm23-H1、及びHis-tag特異抗体をそれぞれ（PDE5Aについて）使用するWestern blot分析は、それぞれの個別細胞クローン内に発現されたタンパク質の量を示している。

【図3D】MDA-C-100（対照）、MDA-H1-177、MDA-PRUNE、及びMDA-H1-177-PRUNE細胞系の細胞運動性は、それぞれh-PRUNE（クローン#3及び#4）単独又はh-PRUNEとnm23-H1（クローン#7及び#8）を過剰発現する。 30

【図3E】MDA-C-100（対照）、MDA-PRUNE（クローン#3及び#4）、MDA-PRUNE Δ （クローン#10及び#11）、MDA-PRUNE4D Δ （クローン#19及び#20）、MDA-PDE5A（クローン#14及び#16）、及びMDA-H1-177細胞系の細胞運動性。

【図3F】MDA-C-100（対照）、MDA-nm23H1-S120G、MDA-nm23H1-S120G-PRUNE（クローン#2及び#3）、MDA-nm23H1-P96S、MDA-nm23H1-P96S-PRUNE（クローン#4及び#5）細胞系の細胞運動性、単独又はh-PRUNEとの過剰発現nm23-H1突然変異体。

【図4】nm23タンパク質の存在下でのin vitro及びin vivoのh-PRUNE PDE活性分析、h-PRUNE及びh-PRUNE Δ cAMP-PDE活性を示す図である（パネルA）。パネルBの表には、タンパク質溶解物全体で細胞 $pmol \times min^{-1} \times \mu g^{-1}$ として測定されたh-PRUNE PDE活性の値が報告されている。 40

【図5】PDEの阻害活性並びにMDA-C-100（対照）、MDA-PRUNE（クローン#3及び#4）、及びMDA-PRUNE Δ （クローン#10及び#11）細胞系の運動の分析結果を表す運動ヒストグラムの図である（パネルA）。パネルBの表には、 IC_{50} の値として表されている、8つの試験阻害剤による異なるPDE上の阻害活性が報告されており、最後の列には、いくつかの最も感度の高い化合物に対するh-PRUNE IC_{50} 値が示されている。

【図6】乳房の腫瘍に関連する転移のin vivo分析、h-PRUNE（左）とnm 50

23-H1 (右) の増幅を示すMTA (多重組織アレイ) のFISH分析を示す図である (パネルA)。中及び低 (0/+) nm23-H1 発現レベル (右) と対比したh-PRUNE 高発現 (+++) 腫瘍 (左) の2つのグループの免疫組織化学的分析 (IHC) の倍率100×及び200× (パネルB、C)。59 TNM₁ 乳癌患者に実施されたFISH分析とIHC分析の結果表 (パネルD)。

【図7】乳癌のh-PRUNE前転移性機能を表すモデルを示す図である。

【図8】正常な乳房組織と腫瘍乳房組織を比較するFISH分析及び免疫組織化学分析を示す図である。パネルAには、正常組織及び腫瘍組織 (左) と腫瘍はあるが転移していない組織 (右) の両方のh-PRUNEコピー数を特徴付けることができるMTAのFISH分析が示されており、パネルBには、低h-PRUNE発現 (+) 腫瘍の2つのグループについて実施される免疫組織化学分析の倍率が報告されている。

10

【図9】乳癌のh-PRUNEの発現及び細胞遺伝分析を示す図である。パネルAでは、TMAセクションで実施されるh-PRUNE発現に対する免疫組織化学分析及び陽性 (a) 及び陰性 (b) のh-PRUNE免疫染色の倍率40×が示されている。パネルBには、h-PRUNE/PAC279-h19をプローブとして、pUCI77を対照として使用する同じ試料に関するFISH分析が報告されている。

【図10】h-PRUNE及びnm23-H1発現に関するKaplan-Meier生存分析を示す図である。乳癌のすべての患者は、nm23-H1 (A) 及びh-PRUNE (B) 免疫染色を受けた。h-PRUNE陽性乳癌は、腋窩リンパ節転移が存在する場合 (C) 又は存在しない場合 (D) のものである。

20

【図11A】バキュロウイルス (baculovirus) 生成h-PRUNEタンパク質のin vitro免疫沈降及びカゼインキナーゼδ in vitroのリン酸化された、及びリン酸化されていない、nm32H1を示す図であり、in vitro免疫沈降を介した複合体形成を示すためにS120-125領域内の複数の単一突然変異が生成された。タンパク質は、バキュロウイルスで合成された組換えタンパク質の末端NH₂に存在する抗HIS抗体を使用してWestern blotにより目に見えるようになっている。レーン1及び2は、組換えタンパク質を対照として示している。免疫沈降は、A-59抗h-pruneポリクローナル抗体を使用して実施され、検出は、抗HISタグ (prune/nm32) ポリクローナル抗体を伴うW. B. により実施された。

【図11B】タンパク質配列及びタンパク質のMALDI-MSを示す図であり、リン酸化陽性セリン (phosphorylation-positive serines) は太字で示されている。

30

【図11C】SDS Pageゲル精製及びトリプシン処理の後、MALDI-MS分子量プロファイル分析に送られる、pcDNA-HA-nm23H2構造及び抗体を認識する抗HAを使用するCOS7発現nm23-H2を示す図であり、ペプチド及びその分子量の同定は、1つ又は2つのリン酸化反応に対応する質量増大がある、Voyager質量分析計を使用して実施された。(80ダルトン、160ダルトン)。

【図12】図12Aは、リン酸化ペプチドに対し数回アフィニティ精製された、ウサギで得られる、nm23H1リン酸化領域に対応するペプチドを認識するK73ポリクローナル抗体を示す図であり、レーン1及びレーン2は、バキュロウイルス生成nm23H1及びH2組換えタンパク質が、カゼインキナーゼδによりin vitroでリン酸化されたときに、IgG濃縮特異K73抗体を認識するリン酸化セリンにより認識されることを示している。これらのデータは、K73特異抗体によるセリン120~125領域内の特異リン酸化反応の存在を示している。図12Cは、MDA H1177が、実施例4で説明されているように、様々な時点において、IC261 50mMolでインキュベートされ、全抽出物30mgが、リン酸化ペプチドに対し精製されたK73ポリクローナル抗体と共にnm32のリン酸化反応について分析されたことを示す図である。レーン6 (0hで与えられた) は、レーン1で使用され、37℃でICP 10Uにより1時間処理された、抽出物30mgを示している。図12Dは、MDA C100が、6時間かけて、IC261により2つの異なる濃度で処理され、h-pruneは、A59ポリクローナ

40

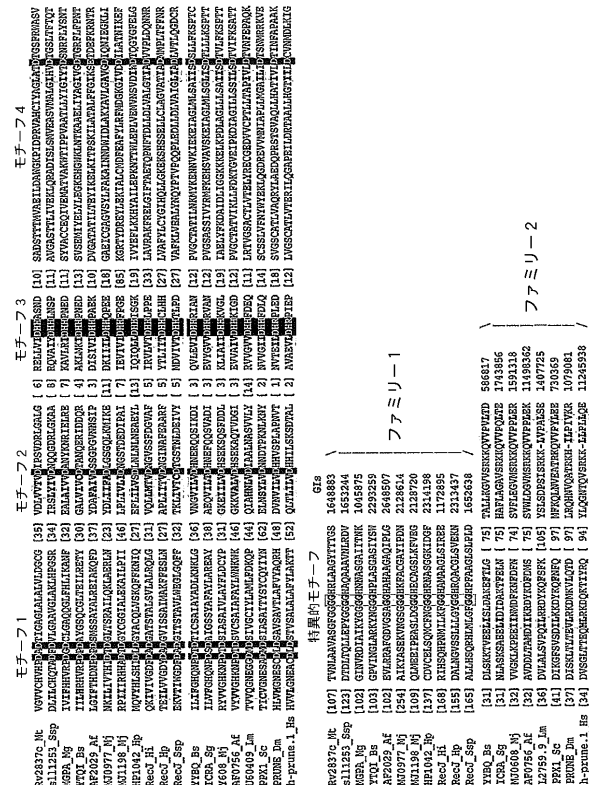
50

ル抗体で免疫沈降され、nm23-H1との相互作用は、moAb抗nm23H1 moAb (NOVOCASTRA) を介して検出されたことを示す図である。レーン1及び5は、組換えh-prune WB陽性対照20ng及びMDAH1177細胞抽出物20ngをそれぞれ示している。

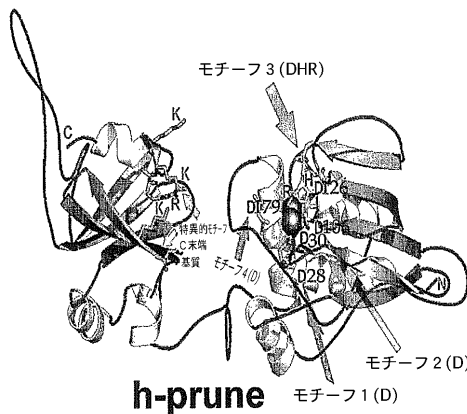
【図13】図13Aは、ジピリダモール、IC261又はジピリダモール及びIC261による処置の後の細胞運動性値(5つの独立複製アッセイについては算術平均±SD)を示す図である。図13B(左下)は、IC261が存在していると、複合体が細胞内のPDE-cAMP増大に関わることを示すMDA prune #4細胞内の直鎖化cAMPの内容(cAMP-PDE活性の全内容)を変えることを示す図である。実際、図13B(右下)は、IC261が存在しているときにin vitroの組換えh-pruneタンパク質は、その生物活性を修正しないことを示しており、比活性度値は未処理タンパク質に類似している。これらのデータから、IC261は、h-prune-nm23複合体を阻害し、後者は、MDA prune #4で明らかなように、ホスホジエステラーゼ活性のin vivo増大に参与することがわかる。

【図14】prune特異モノクローナル抗体(4G3/4)を使用するWestern blotによるh-prune検出を示す図である。

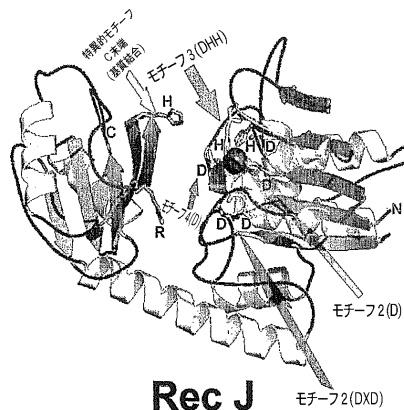
【図1A】



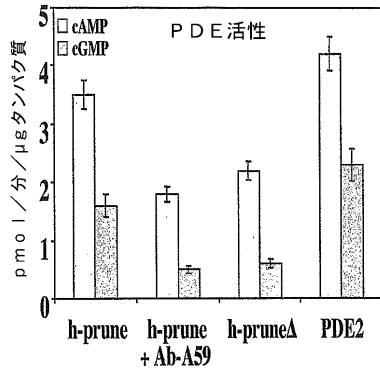
【図1B】



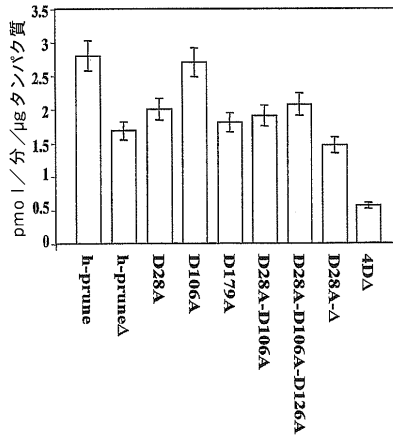
【図1C】



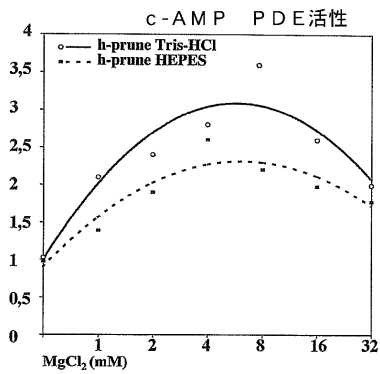
【図 2 A】



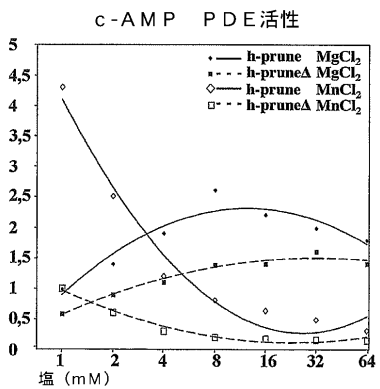
【図 2 B】



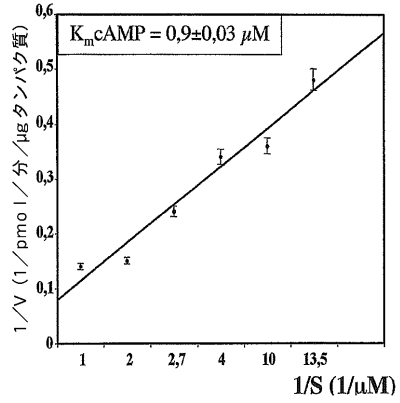
【図 2 E】



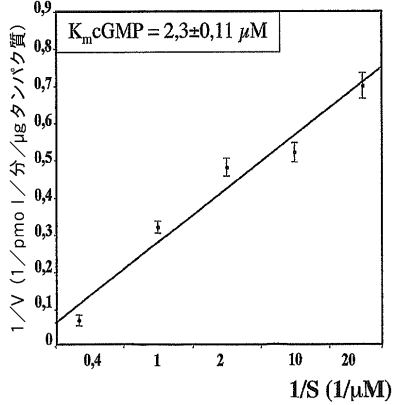
【図 2 F】



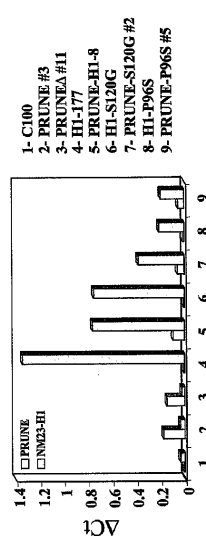
【図 2 C】



【図 2 D】

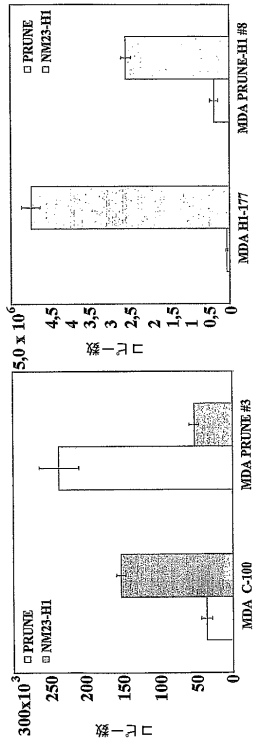


【図 3 A】

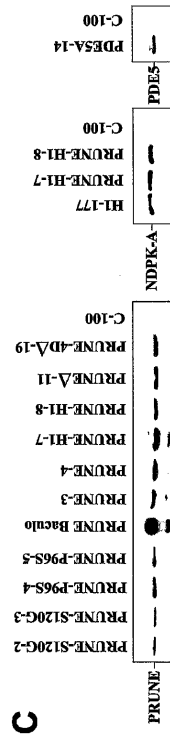


A

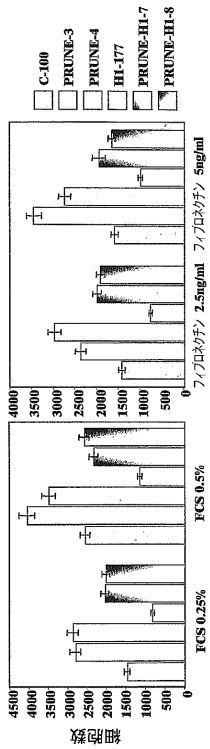
【図 3 B】



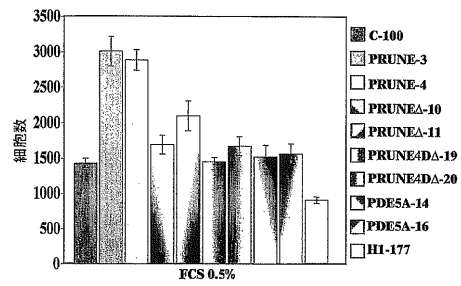
【図 3 C】



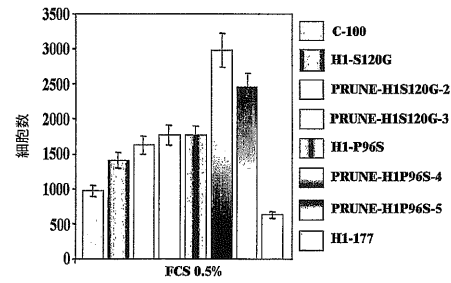
【図 3 D】



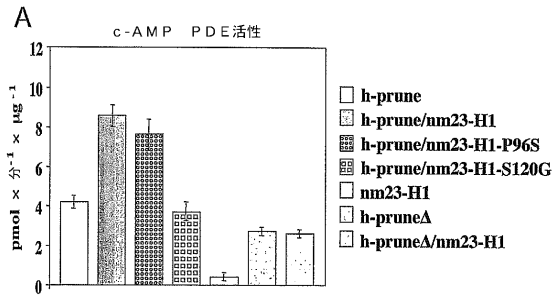
【図 3 E】



【図 3 F】



【図 4】



B

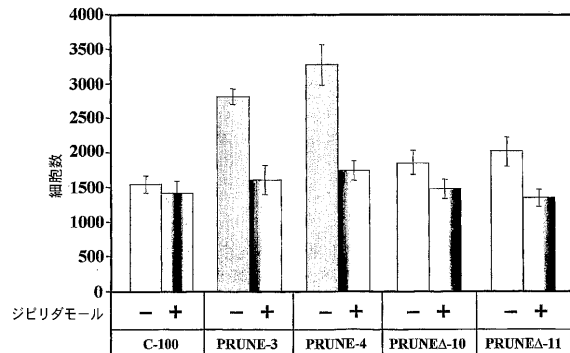
クローン (clone) 名	PDE h-prune 活性 (pmol:分 ⁻¹ ×μg ⁻¹)	運動細胞数
MDA C-100	3.8±0.7	1548±84
MDA H1-177	2.2±0.4	928±73
MDA PRUNE #3	35±5.3	2812±294
MDA PRUNE #4	28.7±2.5	3272±271
MDA PRUNEΔ #10	16.8±1.2	1682±64
MDA PRUNEΔ #11	14.6±0.9	2087±97
MDA PRUNE-H1 #7	18.8±2.6	2048±93
MDA PRUNE-H1 #8	22±4.2	2006±87
MDA H1S120G	2.4±0.8	1328±54
MDA PRUNE-H1S120G #2	4.4±1.6	1624±89
MDA PRUNE-H1S120G #3	5.3±1.4	1767±108
MDA H1P96S	3.0±0.3	1742±38
MDA PRUNE-H1P96S #4	19.2±0.3	2982±184
MDA PRUNE-H1P96S #5	11.6±0.4	2448±143

【図 5】

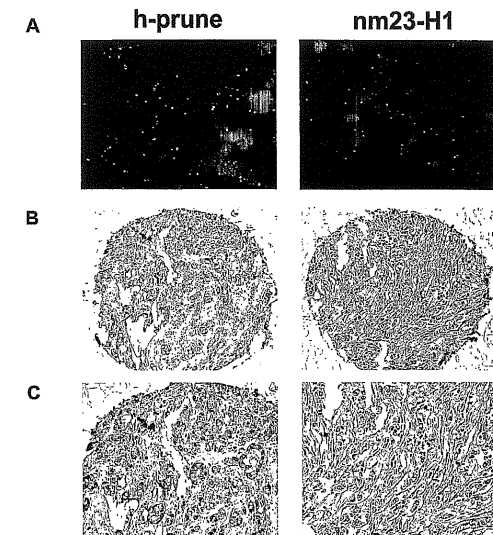
A

阻害剤	PDEの種類について選択的	IC ₅₀ μM	h-prune IC ₅₀ μM
シロスタミド	PDE3	0.05	>100
ジビダモール	PDE5/6/9/10/11	0.9/0.38/4.5/1.1/0.37	0.78±0.05
IBMX	非選択的	2-59	40.2±0.8
ミルリノン	PDE3	1.3	>100
ロリプラム	PDE4	2.0	>100
ビンボセチン	PDE1C	8.1	22.3±1.1
ザブリナスト	PDE1/5/6	6.9/0.76/0.15	>100
スリンダック	cGMP PDEs	—	>100

B



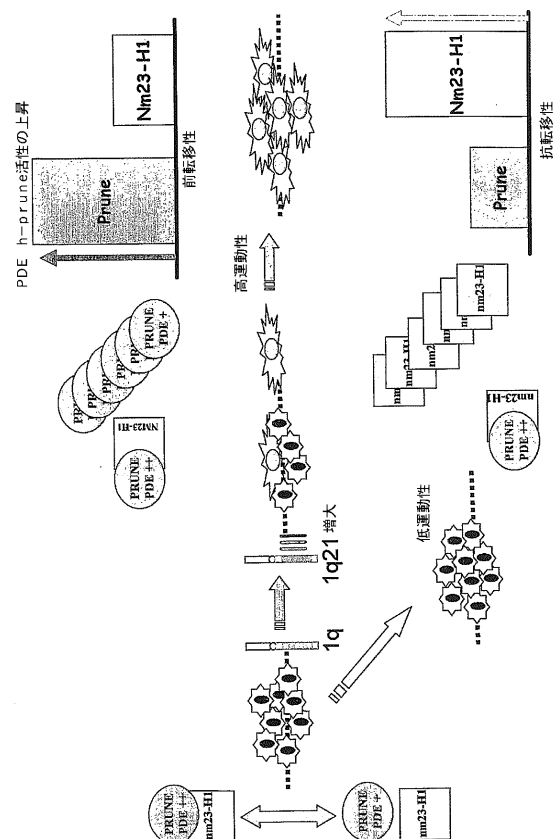
【図 6】



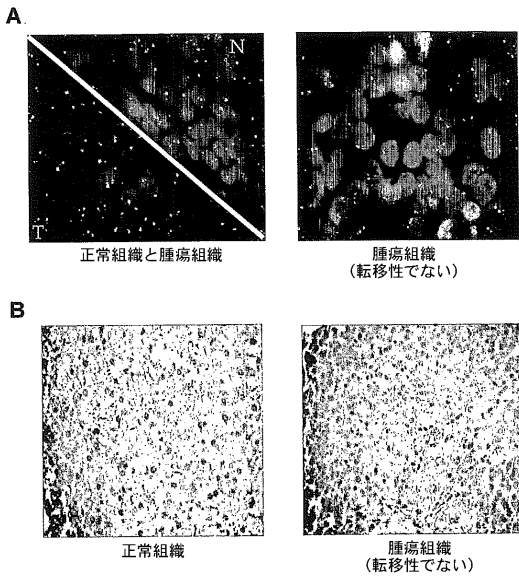
D

免疫組織化学 (IHC)	IHC グレード	FISH 分析	
		PAC h-prune (1q21.3)	PAC nm23-H1 (17q21)
		二染色体 三染色体以上	二染色体 三染色体以上
h-prune	+++ / ++	7 (12%) 22 (37%)	
	+ / 0	30 (51%)	
nm23-h1	+++ / ++		1 (2%) 54 (98%)
	+ / 0		
分析した症例 T NM ₁		59	55

【図 7】



【図 8】



【図 9】

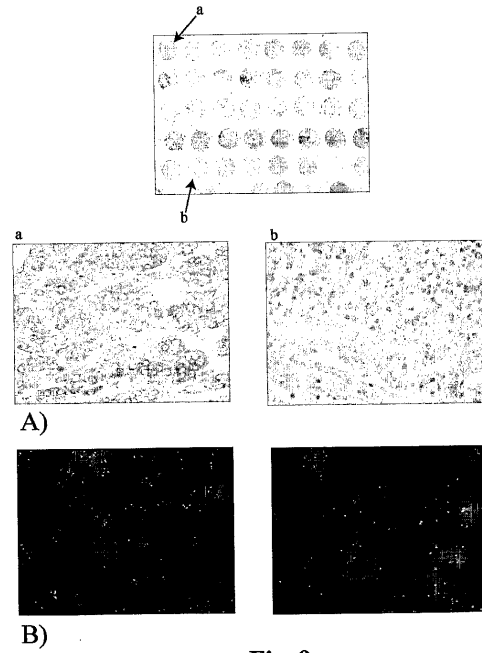
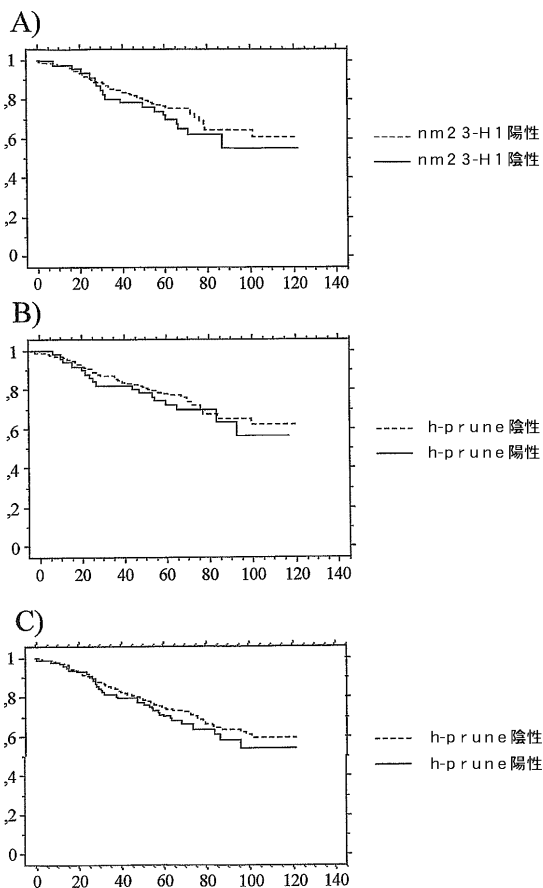
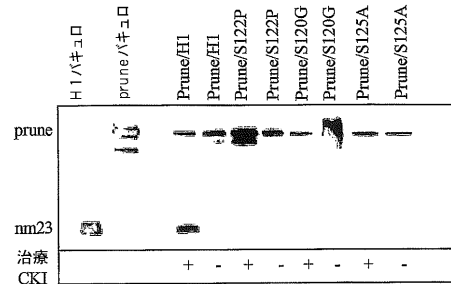


Fig. 9

【図 10】



【図 11 A】

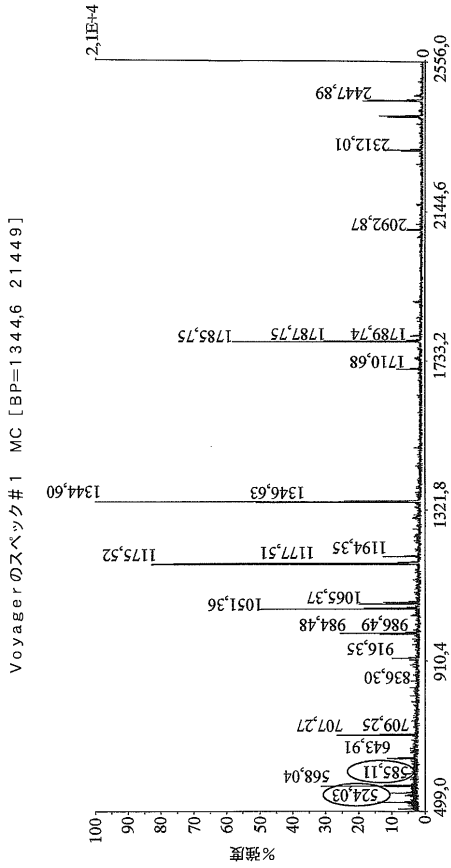


【図 11 B】

B)

MYDVPDYASLGSPVEMA
 NLERTFIAIKPDGVQRGLV
 GEIIRFEQKGFRVLAMK
 FLRASEEHLKQHYIDLKD
 RPFFPGLVKYMNSGPVVA
 MVWEGLNVVKTGRVML
 GETNPADSKPGTIRGDFCI
 QVGRNIHGSDSVKSAAEK
 EISLWFKPEELVDYKSCA
 HDWVYE

【図 1 1 C】



【図 1 2】

A

	1	2	3	4
CK1δ	+	+	-	-
アイソフォームΔNm23	H1	H2	H1	H2

nm23 →

B

IC261	0h	2h	4h	6h	8h	0h
CIP	—	—	—	—	—	+
リン酸化 nm23H1						
全 nm23H1						

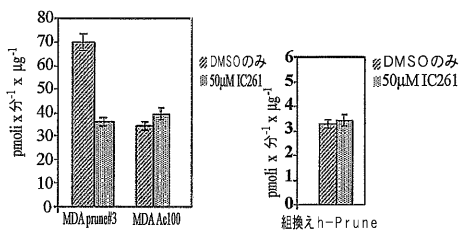
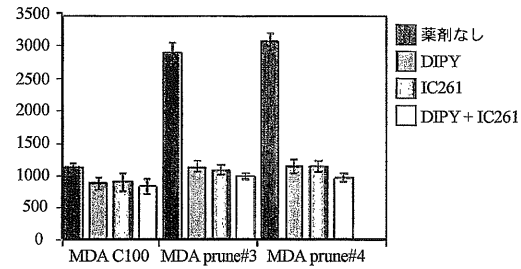
C

	1	2	3	4	5
IC261 μMol		50	200	—	—

h-prune →

nm23H1 →

【図 1 3】



【図 1 4】

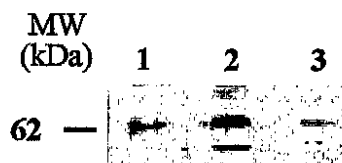


Fig. 14

【配列表】

2007513940000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年10月10日(2005.10.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0025

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0025】

本発明の他の目的は、ペプチドが、アミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E（配列番号9）を含み、特定の一実施形態では、ペプチドは、アミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E G G G Y G R K K R R Q R R R（配列番号10）を含むことであり、配列G G G Y G R K K R R Q R R Rがあるため浸透性を有することを特徴とする。

【手続補正書】

【提出日】平成17年10月18日(2005.10.18)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

h-PRUNEの過剰発現を特徴とする腫瘍転移の予防及び治療用の薬剤を製造するためのh-Pruneサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤の使用であって、前記阻害剤はアミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E（配列番号9）を有するペプチド、アミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E G G G Y G R K K R R Q R R R（配列番号10）を含むペプチド、ピンボセチン、IC261及びそれらの誘導体、構造類似物、及び異性体からなる群から選択される使用。

【請求項2】

h-PRUNEの過剰発現を特徴とする腫瘍は、乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、前立腺腫瘍、膵臓腫瘍、結腸癌腫瘍、直腸腫瘍、髄芽細胞腫、上皮腫、肝癌、T細胞又はB細胞リンパ腫、骨髄腫及びメラノーマ、及び肺腫瘍である請求項1に記載の使用。

【請求項3】

浸透性であることを特徴とする、アミノ酸配列

N I I H G S D S V E S A E K E G G G Y G R K K R R Q R R R（配列番号10）を含むペプチド。

【請求項4】

医療分野で使用する、アミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E G G G Y G R K K R R Q R R R（配列番号10）を含み、浸透性であること、及びh-Pruneサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤であることを特徴とするペプチド。

【請求項5】

アミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E（配列番号9）を有するペプチド。

【請求項6】

医療分野で使用する、アミノ酸配列N I I H G S D S V E S A E K E（配列番号9）を有し、h-Pruneサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の阻害剤であることを特徴とするペプチド。

【請求項7】

h-PRUNE阻害化合物のスクリーニング方法であって、

a) 少なくとも1つのホスホエステラーゼ（PDE）阻害化合物又は誘導体、構造類似

物、又はその異性体を選択するフェーズと、

b) 0.05 μ Mから10 μ Mの範囲の濃度の前記少なくとも1つの化合物を、h-PRUNEを過剰発現する細胞系であって、該細胞系は、MDA-C100 435 pruned #4である細胞系に投与するフェーズと、

c) h-PRUNEのサイクリックヌクレオチドホスホジエステラーゼ活性の定量分析を行い、及び／又は細胞運動性対前記少なくとも1つの化合物及び化学誘引物質の濃度の分析を行い、前記ホスホジエステラーゼ活性を0.01から1 $\text{pmol} / \text{min}^{-1} / \text{ug}^{-1}$ の間の値に阻害し、及び／又は前記運動を細胞200から1200個の間の値を達成するまで阻害することができる化合物を選択するフェーズと

を含むスクリーニング方法。

【請求項8】

ステップC)の前記定量分析は、c-AMP及び／又はc-GMP基質の加水分解試験により実施される請求項7に記載のスクリーニング方法。

【請求項9】

前記基質は、0.008 μ Mから1 μ Mの範囲の濃度で使用される請求項7に記載のスクリーニング方法。

【請求項10】

免疫学的アッセイ、FISH分析、リアルタイムPCR、in situハイブリッド形成法によるh-PRUNE過剰発現を特徴とする腫瘍の転移を診断するために生物試料中のh-PRUNEをin vitroで検出する方法。

【請求項11】

a) 前記生物試料を、少なくとも1つの抗h-PRUNEモノクローナル抗体と接触させるステップと、

b) 抗原抗体複合体を検出するステップと、

c) 抗原抗体複合体の定量分析を行うステップと

を含む請求項10に記載のh-PRUNEをin vitroで検出する方法。

【請求項12】

前記生物試料は、組織切片又は生体液である請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記抗h-PRUNE抗体は、h-PRUNE組換えタンパク質を認識し、選択的に結合することができ、IgM免疫グロブリンクラスに属し、4G3/4クローン(10/12/2004にジェノアのCBAに寄託)により産生されることを特徴とするモノクローナル抗体である請求項10から12までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記抗h-PRUNE抗体は、放射性同位体、蛍光分子、又は酵素で標識されている請求項10から13までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

抗原抗体複合体の前記検出及び定量分析は、免疫組織化学分析、免疫沈降分析、免疫蛍光検査分析、ELISA分析、免疫ブロット分析により実施される請求項11に記載のh-PRUNEをin vitroで検出する方法。

【請求項16】

h-PRUNEに特異的なPCRリアルタイムプライマーは、配列

5'-AGAGATCTTTGGACAGGCAAACT-3' (配列番号1)、

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号2)、

又はその相補配列を含む請求項10に記載の方法。

【請求項17】

リアルタイムPCR又はin situハイブリッド形成法の標識プローブは、オリゴヌクレオチド配列

CTGCATGGAACCATC (配列番号3)、

又はその相補配列又はTがUで置き換えられた配列を含む請求項10に記載の方法。

【請求項 18】

リアルタイムPCRの前記標識プローブは、線形又は円形プローブである請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

前記プローブは、少なくとも1つの放射性同位体及び／又は蛍光色素で標識されている請求項17及び18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記プローブは、5'及び／又は3'で少なくとも1つの蛍光色素で標識されている請求項17から19までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記蛍光色素は、6-カルボキシフルオレセインである請求項17から20までのいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも1つの抗h-PRUNEモノクローナル抗体、又はh-PRUNEに特異的なプライマーの対又はh-PRUNEに特異的な標識オリゴヌクレオチドプローブを含む、h-PRUNE過剰発現を特徴とする腫瘍の転移の診断のための生物試料中のh-PRUNEを検出するための診断キット。

【請求項 23】

h-PRUNE過剰発現を特徴とする前記腫瘍は、乳癌、肉腫、神経芽細胞腫、メラノーマである請求項22に記載の診断キット。

【請求項 24】

前記抗h-PRUNE抗体は、IgM免疫グロブリンクラスに属し、4G3/4クローン(10/12/2004にジェノアのCBAに寄託)により産生されることを特徴とする請求項22及び23のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 25】

前記抗h-PRUNEモノクローナル抗体は、放射性同位体、蛍光分子、又は酵素で標識されている請求項24に記載の診断キット。

【請求項 26】

h-PRUNEに特異的な前記プライマーの対は、配列

5'-AGAGATCTTGGACAGGCAAACT-3' (配列番号1)、

3'-CCATGTTGACACAGTCCAGGAT-5' (配列番号2)、

又はその相補配列を含む請求項22に記載の診断キット。

【請求項 27】

リアルタイムPCR又はin situハイブリッド形成法の前記標識オリゴヌクレオチドプローブは、オリゴヌクレオチド配列

CTGCATGGAACCATC (配列番号3)、

又はその相補配列又はTがUで置き換えられた配列を含む請求項22に記載の診断キット。

【請求項 28】

リアルタイムPCRの前記標識オリゴヌクレオチドプローブは、線形又は円形プローブである請求項27に記載の診断キット。

【請求項 29】

前記オリゴヌクレオチドプローブは、少なくとも1つの放射性同位体及び／又は蛍光色素で標識されている請求項27及び28のいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 30】

前記プローブは、5'及び／又は3'で少なくとも1つの蛍光色素で標識されている請求項27から29までのいずれか一項に記載の診断キット。

【請求項 31】

前記蛍光色素は、6-カルボキシフルオレセインである請求項30に記載の診断キット。

【請求項 32】

h-PRUNE 組換えタンパク質を認識し、選択的に結合することができ、IgM 免疫グロブリンクラスに属し、4G3/4 クローン（10/12/2004 にジェノアの CBA に寄託）により産生されることを特徴とするモノクローナルマウス抗体。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/IT2004/000689												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K31/4985 A61K31/505 A61K31/475 A61K38/12 A61K38/16 G01N33/574 C07K7/00 A61P35/04														
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61K C07K														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX, Sequence Search, CHEM ABS Data														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 6 486 300 B1 (BANDMAN OLGA ET AL) 26 November 2002 (2002-11-26) column 15, line 35 - line 51; figure 2A</td> <td>1,8,10, 11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>COLLIER G R ET AL: "INHIBITION OF LUNG METASTASIS FORMATION BY A RAT OSTEOGENIC SARCOMA SUBCLONE USING PYRIMIDO-PYRIMIDINE DERIVATIVES" AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF MEDICINE, ROYAL AUSTRALASIAN COLLEGE OF PHYSICIANS, SYDNEY, AU, vol. 15, no. 1, SUPPL 1, February 1985 (1985-02), page 127, XP008046052 ISSN: 0004-8291 page 127, column 2</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td colspan="2" style="text-align: center;">----- -/-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6 486 300 B1 (BANDMAN OLGA ET AL) 26 November 2002 (2002-11-26) column 15, line 35 - line 51; figure 2A	1,8,10, 11	X	COLLIER G R ET AL: "INHIBITION OF LUNG METASTASIS FORMATION BY A RAT OSTEOGENIC SARCOMA SUBCLONE USING PYRIMIDO-PYRIMIDINE DERIVATIVES" AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF MEDICINE, ROYAL AUSTRALASIAN COLLEGE OF PHYSICIANS, SYDNEY, AU, vol. 15, no. 1, SUPPL 1, February 1985 (1985-02), page 127, XP008046052 ISSN: 0004-8291 page 127, column 2	1-6	----- -/-		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 6 486 300 B1 (BANDMAN OLGA ET AL) 26 November 2002 (2002-11-26) column 15, line 35 - line 51; figure 2A	1,8,10, 11												
X	COLLIER G R ET AL: "INHIBITION OF LUNG METASTASIS FORMATION BY A RAT OSTEOGENIC SARCOMA SUBCLONE USING PYRIMIDO-PYRIMIDINE DERIVATIVES" AUSTRALIAN AND NEW ZEALAND JOURNAL OF MEDICINE, ROYAL AUSTRALASIAN COLLEGE OF PHYSICIANS, SYDNEY, AU, vol. 15, no. 1, SUPPL 1, February 1985 (1985-02), page 127, XP008046052 ISSN: 0004-8291 page 127, column 2	1-6												
----- -/-														
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.		☒ Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *G* document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 1 June 2005		Date of mailing of the international search report 10/06/2005												
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018		Authorized officer Bochelen, D												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IT2004/000689

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BANDO H ET AL: "EFFECTS OF ANTIPLATELET AGENTS ON PULMONARY METASTASES" GANN, JAPANESE CANCER ASSOCIATION, TOKYO, JP, vol. 75, no. 3, March 1984 (1984-03), pages 284-291, XP009013087 ISSN: 0016-450X page 287, column 1; table 2	1-6
X	BERTRAM J S ET AL: "INHIBITION OF NEOPLASTIC CELL GROWTH BY QUIESCENT CELLS IS MEDIATED BY SERUM CONCENTRATION AND CYCLIC AMP PHOSPHO DI ESTERASE INHIBITORS" JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 18, no. 4, 1982, pages 515-538, XP002329792 ISSN: 0730-2312 page 531; table VII	1,7
X	NI XIAOHUA ET AL: "Isolation and characterization of a novel human NM23-H1B gene, a different transcript of NM23-H1." JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 48, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 96-100, XP002329793 ISSN: 1434-5161 page 96, column 2 - page 97; figure 1	11
X	POSTEL EDITH H ET AL: "Mutational analysis of NM23-H2/NDP kinase identifies the structural domains critical to recognition of a c-myc regulatory element" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 93, no. 14, 1996, pages 6892-6897, XP002329794 ISSN: 0027-8424 page 6892, column 1; figure 1	11
Y	REYMOND ALEXANDRE ET AL: "Evidence for interaction between human PRUNE and nm23-H1 NDPKinase" ONCOGENE, vol. 18, no. 51, 2 December 1999 (1999-12-02), pages 7244-7252, XP002329795 ISSN: 0950-9232 page 7247, column 2 - page 7248, column 1 page 7249, column 2 - page 7250, column 1	1-42
	----- -/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IT2004/000689

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FORUS ANNE ET AL: "Amplification and overexpression of PRUNE in human sarcomas and breast carcinomas: A possible mechanism for altering the nm23-H1 activity" ONCOGENE, vol. 20, no. 47, 18 October 2001 (2001-10-18), pages 6881-6890, XP002329796 ISSN: 0950-9232 page 6887 - page 6888 page 6882, column 2 - page 6883, column 1	17-39
X	ZOLLO M ET AL: "Prune and nm23-H1 and nm-23 H2 (NDP-Kinase) proteins: Involvement in cancer" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 69, no. 4 Supplement, October 2001 (2001-10), page 273, XP009047948 & 51ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS; SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA; OCTOBER 12-16, 2001 ISSN: 0002-9297 page 273, paragraph 524	17-38
Y		1-42
X	DATABASE Geneseq 'Online! 26 June 2001 (2001-06-26), "Human cDNA clone (5'-primer) SEQ ID NO:5290." XP002329797 retrieved from EBI accession no. GSN:AAH08455 Database accession no. AAH08455 abstract & EP 1 074 617 A (RESEARCH ASSOCIATION FORBIOTECHNOLOGY) 7 February 2001 (2001-02-07)	41
X	DATABASE Geneseq 'Online! 6 November 2003 (2003-11-06), "Human intracellular signalling molecule INTSIG-44, SEQ ID NO:44." XP002329798 retrieved from EBI accession no. GSN:ADA13362 Database accession no. ADA13362 abstract & WO 03/031568 A (INCYTE GENOMICS, INC; YUE, HENRY; LU, DYUNG AINA, M; SWARNAKAR, ANITA;) 17 April 2003 (2003-04-17)	40
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/IT2004/000689

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DANGELO A ET AL: "The human cyclic nucleotides phosphodiesterase (PDE) Prune protein: A dual cellular compartment localization and functional properties." AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 71, no. 4 Supplement, October 2002 (2002-10), page 513, XP009047949 & 52ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS; BALTIMORE, MD, USA; OCTOBER 15-19, 2002 ISSN: 0002-9297 page 513, paragraph 2009	13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IT2004/000689

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

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

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 17-28 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/IT2004/000689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6486300	B1	26-11-2002	US 6087125 A 11-07-2000
			US 5874285 A 23-02-1999
			US 2003022306 A1 30-01-2003
			AU 4480697 A 02-04-1998
			WO 9811232 A2 19-03-1998
EP 1074617	A	07-02-2001	AU 6180800 A 19-02-2001
			AU 6180900 A 19-02-2001
			AU 6181000 A 19-02-2001
			AU 6181100 A 19-02-2001
			AU 6181200 A 19-02-2001
			AU 6181300 A 19-02-2001
			AU 6181400 A 19-02-2001
			AU 6181500 A 19-02-2001
			AU 6181600 A 19-02-2001
			AU 6315800 A 19-02-2001
			CA 2380472 A1 08-02-2001
			EP 1074617 A2 07-02-2001
			EP 1205549 A1 15-05-2002
			WO 0109315 A1 08-02-2001
			WO 0109345 A1 08-02-2001
			WO 0109316 A1 08-02-2001
			WO 0109349 A1 08-02-2001
			WO 0109317 A1 08-02-2001
			WO 0109318 A1 08-02-2001
			WO 0109319 A1 08-02-2001
			WO 0109346 A1 08-02-2001
			WO 0109320 A1 08-02-2001
			WO 0109321 A1 08-02-2001
			WO 0109322 A1 08-02-2001
			WO 0109323 A1 08-02-2001
			JP 2002171977 A 18-06-2002
			JP 2002191363 A 09-07-2002
			US 2003157569 A1 21-08-2003
			US 2003082776 A1 01-05-2003
			US 2003017480 A1 23-01-2003
WO 03031568	A	17-04-2003	CA 2458645 A1 17-04-2003
			EP 1423415 A2 02-06-2004
			JP 2005504546 T 17-02-2005
			WO 03031568 A2 17-04-2003
			AU 2003215369 A1 09-09-2003
			WO 03072723 A2 04-09-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08	
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00	
C 1 2 Q 1/44 (2006.01)	C 1 2 Q 1/44	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
C 0 7 K 16/40 (2006.01)	C 0 7 K 16/40	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 21/78	C
C 0 7 D 475/08 (2006.01)	C 0 7 D 475/08	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	

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

(72)発明者 ゾッロ、マッシモ

イタリア国、アイー 8 0 1 4 5 ナポリ、 ヴィア コムナーレ マルゲリータ 4 8 2、
 ビオテクノロジー アバンザテ スカール、セインジェ気付

Fターム(参考) 2G054 AB04 CA23 CE02 EA03 GA04 GB02
 4B024 AA01 AA11 BA53 CA01 CA09 CA11 HA12
 4B063 QA01 QA18 QQ42 QQ52 QR08 QR12 QR32 QR42 QR55 QR62
 QS25 QS34 QS36 QX02
 4B064 AG27 CA20 CC24 DA01 DA13
 4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08 BA18 BA23 CA18 DC32 NA14
 ZB261 ZC202
 4C086 AA01 AA02 CB01 CB10 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC20
 4H045 AA10 AA30 BA17 BA18 DA55 DA76 EA20 EA50 FA20 FA72

专利名称(译)	h-PRUNE酶抑制剂在预防和治疗h-PRUNE过表达肿瘤转移中的应用		
公开(公告)号	JP2007513940A	公开(公告)日	2007-05-31
申请号	JP2006543723	申请日	2004-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	佐罗MASSIMO		
申请(专利权)人(译)	佐罗，马西莫		
[标]发明人	ゾッロマッシモ		
发明人	ゾッロ、マッシモ		
IPC分类号	A61K45/00 A61K38/55 A61K31/4375 A61K31/519 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C12N15/09 C07K7/08 C07K14/00 C12Q1/44 C12Q1/68 C07K16/40 G01N33/53 G01N21/78 C07D475/08 C12P21/08 A61K31/475 A61K31/4985 A61K31/505 A61K38/00 A61K38/10 A61K38/12 A61K38/16 C07K7/00 C12N9/16 G01N33/50 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/5011 A61K31/475 A61K31/4985 A61K31/505 A61K38/10 A61K38/12 A61K38/16 C07K7/08 C07K14/001 C12N9/16 G01N33/5008 G01N33/5029 G01N33/5091 G01N2500/10		
FI分类号	A61K45/00.ZNA A61K37/64 A61K31/4375 A61K31/519 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00.111 C12N15/00.A C07K7/08 C07K14/00 C12Q1/44 C12Q1/68.A C07K16/40 G01N33/53.D G01N21/78.C C07D475/08 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G054/AB04 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR12 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DC32 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB01 4C086/CB10 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/DA55 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA72		
代理人(译)	池田幸		
优先权	102003901169303 2003-12-11 IT		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及h-PRUNE的酶抑制剂的用途和用于预防和治疗过表达h-PRUNE的肿瘤转移的筛选方法，以及用于所述转移的预后的诊断试剂盒。

