

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6445446号
(P6445446)

(45) 発行日 平成30年12月26日 (2018.12.26)

(24) 登録日 平成30年12月7日 (2018.12.7)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A T
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00

請求項の数 11 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-541132 (P2015-541132)	(73) 特許権者 591100596 アンスティチュ ナショナル ドウ ラ サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ ディカル フランス国、エフー75013 パリ、リ ュ・ドゥ・トルビアック 101
(86) (22) 出願日 平成25年11月7日 (2013.11.7)	
(65) 公表番号 特表2016-515092 (P2016-515092A)	(73) 特許権者 596096180 ユニベルシテ・クロード・ベルナル・リ ヨン・ブルミエ フランス, 69100 ヴィユールバンヌ , ブルヴァール ドウ オンズ ノヴァン ブル 1918, 43
(43) 公表日 平成28年5月26日 (2016.5.26)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/073284	(74) 代理人 110001508 特許業務法人 津国
(87) 国際公開番号 W02014/072416	
(87) 国際公開日 平成26年5月15日 (2014.5.15)	
審査請求日 平成28年10月28日 (2016.10.28)	
(31) 優先権主張番号 12306376.0	
(32) 優先日 平成24年11月8日 (2012.11.8)	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	
(31) 優先権主張番号 61/772,999	
(32) 優先日 平成25年3月5日 (2013.3.5)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨転移の治療のための方法及び医薬組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗ROBO4抗体、抗ROBO4アプタマー、ROBO4の細胞外ドメインの全部又は一部を含むROBO4デコイポリペプチド、及びs i R N A、s h R N A、リボザイム及びアンチセンスオリゴヌクレオチドからなる群より選択されるROBO4発現阻害剤からなる群より選択される物質を含む、それを必要とする被験体における骨転移を予防又は治療するための医薬組成物。

【請求項2】

該被験体が、前立腺癌、乳癌、肺癌、黒色腫、膵臓癌、結腸直腸癌、卵巣癌、及び脳癌からなる群より選択される癌を患う、請求項1の医薬組成物。

【請求項3】

該抗体が、キメラ抗体、ヒト化抗体及び完全ヒトモノクローナル抗体からなる群より選択される、請求項1の医薬組成物。

【請求項4】

ROBO4デコイポリペプチドが、免疫グロブリンのFcドメインに融合させたROBO4の細胞外ドメインの全部又は一部を含む、請求項1又は2の医薬組成物。

【請求項5】

ビスホスホネートと組み合わせて被験体に投与するための、請求項1~4のいずれか1項記載の医薬組成物。

【請求項6】

抗 R A N K L 抗体と組み合わせて被験体に投与するための、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の医薬組成物。

【請求項 7】

抗 R A N K L 抗体がデノスマブである、請求項 6 の医薬組成物。

【請求項 8】

i) 患者から得られた試料中の R O B O 4 発現レベルを決定する工程、i i) 工程 i) で決定されたレベルを既定の参照レベルと比較する工程、及び i i i) 工程 i) で決定されたレベルが規定の参照レベルよりも高い場合に、患者が骨転移を有する高いリスクを有すると結論付ける工程を含む、癌患者が骨転移を有するリスクがあるかどうかを試験する方法。

10

【請求項 9】

該試料が、患者の原発性腫瘍から単離されるか、又は被験体から得られた血液試料から単離された循環中の腫瘍細胞の収集物からなる、請求項 8 の方法。

【請求項 10】

被験体が、前立腺癌、乳癌、肺癌、黒色腫、膵臓癌、結腸直腸癌、卵巣癌及び脳癌からなる群より選択される癌を患う、請求項 8 の方法。

【請求項 11】

試料中の R O B O 4 発現レベルが、R O B O 4 を発現している癌細胞の数又は癌細胞表面における R O B O 4 のレベルを決定することによって評価される、請求項 8 の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

発明の分野：

本発明は、骨転移の治療のための方法及び医薬組成物に関する。

【0002】

発明の背景：

癌が骨へと広がること、すなわち骨転移は、世界中の 1 5 0 万人を超える癌患者に起こり、最も一般的には前立腺癌、肺癌及び乳癌に伴う (Weilbaecher et al., Nat Rev Cancer 2011; 11:411-24)。骨髄に存在する転移性癌細胞は、骨吸収細胞 (破骨細胞) 及び骨形成細胞 (骨芽細胞) の機能を変化させ、骨基質から来るシグナルを乗っ取る (Weilbaecher et al., Nat Rev Cancer 2011; 11:411-24)。骨吸収と骨形成との間の生理学的バランスを破壊することによって、転移性細胞は、骨破壊を促進する。骨髄における転移性細胞が破骨細胞と骨芽細胞の機能を変化させるという認識が、破骨細胞を標的化する療法 (ビスホスホネート、デノスマブ) の使用をもたらした。ビスホスホネートは骨吸収破骨細胞の活性を阻害し、かつ、骨転移を有する癌患者において骨破壊を遅延させるための標準的な治療である (Gnant & Clezardin, Cancer Treat Rev 2011; Brown & Coleman, Nat Rev Clin Oncol 2012; 9:110-8)。N F - B 活性化受容体リガンド (R A N K L) に特異的に結合する完全ヒト化モノクローナル抗体であるデノスマブは破骨細胞の形成を阻害し、これにより、骨破壊を減少させる (Brown & Coleman, Nat Rev Clin Oncol 2012; 9:110-8)。しかしながら、これらの処置は対症療法的にすぎず、しばしば有害な副作用を伴う。従って、癌細胞が骨髄に定着して転移が形成される初期に癌細胞を標的化する薬物を開発するために、明らかな骨病変の発症以前に起こる分子機序をより良く理解することが重要である。

30

40

【0003】

発明の要約：

本発明は、骨転移の治療のための方法及び医薬組成物に関する。

【0004】

発明の詳細な説明：

本発明者らは、R O B O 受容体が播種性腫瘍細胞 (D T C) の機能を支援し、これによりこれらの細胞が骨髄で順応しかつ栄えることを可能とすると推測する。骨にのみ転移す

50

るMDA-MB-231細胞株の亜個体群であるヒトBO2乳癌細胞を使用した、遺伝子発現マイクロアレイ分析は、ROBO1及びROBO4が、親細胞で観察されたものと比較して、BO2細胞において有意に過剰発現されていたことを示した。ROBO2及びROBO3はどちらの細胞株においても発現されていなかった。それ故、BO2乳癌転移におけるROBO1/ROBO4の機能的役割を、これらの各受容体に標的化するshRNAを使用して評価した。腫瘍抑制遺伝子としてのその役割と一致して、ROBO1のサイレンシングは、インビトロにおいてshROBO1クローンの遊走特性及び浸潤特性を増強し、また、それは動物におけるshROBO1腫瘍異種移植片の増殖を増加させた。さらに、ROBO1のサイレンシングは、エクスピボにおいて骨髄の微小転移の形成を促進した。著しく対照的には、ROBO4のサイレンシングは、インビトロにおいてshROBO4乳癌細胞の遊走及び浸潤を阻止し、インスピボにおける同所性腫瘍増殖を減少させ、エクスピボにおける骨髄の微小転移の形成を減少させた。従って、データは、骨髄微小転移形成におけるROBO受容体の以前には知られていなかった機能を明らかとし、ROBO1及びROBO4は逆の機能を有することを明らかとした。

10

【0005】

従って、本発明は、必要とする被験体における骨転移を予防又は治療するための方法に使用するための抗ROBO4抗体、抗ROBO4アプタマー、ROBO4デコイポリペプチド、ROBO4発現阻害剤からなる群より選択される物質に関する。

【0006】

本明細書において互換的に使用される「被験体」及び「患者」という用語は、癌、例えば前立腺癌、乳癌、肺癌、黒色腫、膵臓癌、結腸直腸癌、卵巣癌及び乳癌を患う、哺乳動物、特にヒトを指す。

20

【0007】

本明細書において使用される「ROBO4」という用語は、当技術分野におけるその一般的な意味を有し、細胞表面膜貫通タンパク質Roundabout 4を示す。ROBO4は初めて軸索ガイダンス受容体タンパク質として記載され、そのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子配列はGenBankIDに開示されている[アクセッション番号AF361473]。

【0008】

本明細書において使用される「抗体」は、天然及び非天然の抗体の両方を含む。具体的には、「抗体」は、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、並びにその一価及び二価フラグメントを含む。さらに、「抗体」は、キメラ抗体、完全合成抗体、一本鎖抗体、及びそのフラグメントを含む。前記抗体はヒト抗体又は非ヒト抗体であり得る。非ヒト抗体は、ヒトにおけるその免疫原性を低下させるために組換え法によってヒト化されているもよい。

30

【0009】

抗体は、従来の方法に従って調製され得る。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein (Nature, 256:495, 1975)の方法を使用して生成され得る。本発明において有用なモノクローナル抗体を調製するために、マウス又は他の適切な宿主動物を、適切な間隔で(例えば1週間に2回、1週間に1回、1か月に2回、又は1か月に1回)抗原性型のROBO4を用いて免疫する。動物に、屠殺1週間以内に抗原の最終「ブースト」を投与し得る。免疫の際に免疫アジュバントを使用することがしばしば望ましい。適切な免疫アジュバントとしては、フロイント完全アジュバント、フロイント不完全アジュバント、ミョウバン、Rib i アジュバント、Hunter's Titermax、サポニンアジュバント、例えばQS21若しくはクイルA、又はCpG含有免疫刺激オリゴヌクレオチドが挙げられる。他の適切なアジュバントは当技術分野において周知である。動物を、皮下、腹腔内、筋肉内、静脈内、鼻腔内又は他の経路によって免疫し得る。所与の動物を、複数の経路によって複数の形態の抗原を用いて免疫し得る。

40

【0010】

簡潔に言えば、組換え型のROBO4は、任意の以前に記載されている方法を使用して

50

提供され得る。免疫計画後、リンパ球を、動物の脾臓、リンパ節又は他の臓器から単離し、ポリエチレングリコールなどの物質を使用して適切な骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを形成する。融合後、細胞を、記載されているような標準的な方法を使用して、ハイブリドーマの増殖に許容されるが融合対の増殖は許容されない培地に入れる (Coding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice: Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3rd edition, Academic Press, New York, 1996)。ハイブリドーマの培養後、細胞上清を、所望の特異性の抗体、すなわち、抗原に選択的に結合する抗体の存在について分析する。適切な分析技術としては、E L I S A、フローサイトメトリー、免疫沈降法及びウェスタンブロットが挙げられる。他のスクリーニング技術も当技術分野において周知である。好ましい技術は、コンフォメーション的にインタクトな天然に折り畳まれた抗原と抗体との結合を確認する技術、例えば非変性E L I S A、フローサイトメトリー及び免疫沈降法である。

10

【0011】

重要なことには、当技術分野において周知であるように、抗体分子のほんの小さな部分、すなわちパラトープが、抗体とそのエピトープとの結合に関与している。F c ' 及び F c 領域は、例えば、補体カスケードのエフェクターであるが、抗原との結合には関与していない。p F c ' 領域が酵素的に切断された又は p F c ' 領域を含まないように産生された抗体は、F (a b ')₂ フラグメントと称されるが、インタクトな抗体の両方の抗原結合部位を保持する。同様に、F c 領域が酵素的に切断された又は F c 領域を含まないように産生された抗体は、F a b フラグメントと称されるが、インタクトな抗体分子の一方の抗原結合部位を保持する。さらに加工すると、F a b フラグメントは、共有結合した抗体軽鎖及び F d と称される抗体重鎖の一部からなる。F d フラグメントは抗体特異性の主要な決定基であり (単一の F d フラグメントは、抗体の特異性を改変させることなく、10個以下の異なる軽鎖と会合し得る)、F d フラグメントは単独でエピトープ結合能を保持する。

20

【0012】

抗体の抗原結合部位内には、当技術分野において周知であるように、抗原のエピトープと直接相互作用する相補性決定領域 (C D R)、及び、パラトープの3次構造を維持するフレームワーク領域 (F R) が存在する。I g G 免疫グロブリンの重鎖 F d フラグメント及び軽鎖の両方において、それぞれ3つの相補性決定領域 (C D R 1 から C D R 5) によって隔てられた4つのフレームワーク領域 (F R 1 から F R 4) が存在する。C D R、特に C D R 5 領域、より特定すると重鎖 C D R 5 は主に、抗体特異性に関与する。

30

【0013】

哺乳動物の抗体の非 C D R 領域を、元来の抗体のエピトープ特異性を維持しつつ、同種又は異種特異的抗体の類似領域を用いて置換し得ることが当技術分野において現在十分に確立されている。これは、非ヒト C D R をヒト F R 及び / 又は F c / p F c ' 領域に共有結合させて機能的抗体が産生される「ヒト化」抗体の開発及び使用に最も明瞭に顕現している。

【0014】

本発明は、特定の実施態様において、ヒト型の抗体を含む組成物及び方法を提供する。本明細書に使用される「ヒト化」は、C D R 領域外のいくつか、殆ど又は全てのアミノ酸が、ヒト免疫グロブリン分子に由来する対応するアミノ酸で置換された抗体を記載する。ヒト化の方法としては、米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号、第 5, 2 2 5, 5 3 9 号、第 5, 5 8 5, 0 8 9 号、第 5, 6 9 3, 7 6 1 号、第 5, 6 9 3, 7 6 2 号及び第 5, 8 5 9, 2 0 5 号に記載されているものが挙げられるがこれらに限定されず、これらは、参照により本明細書に組み入れられる。上記の米国特許第 5, 5 8 5, 0 8 9 号及び第 5, 6 9 3, 7 6 1 号並びに国際公開公報第 9 0 / 0 7 8 6 1 号もまた、ヒト化抗体の設計に使用され得る4つの見込みある基準を提案する。第1の提案は、アクセプターについて、ヒト化しようとするドナー免疫グロブリンに対して珍しく相同である特定のヒト免疫グロブリン由来のフレームワークを使用すること、又は多くのヒト抗体由来の共通フレームワ

40

50

ークを使用することであった。第2の提案は、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が異常であり、その位置のドナーアミノ酸がヒト配列にとって典型的である場合、アクセプターではなくむしろドナーアミノ酸を選択し得るということであった。第3の提案は、ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRのすぐ隣の位置に、アクセプターアミノ酸ではなくむしろドナーアミノ酸を選択し得るというものであった。第4の提案は、アミノ酸が抗体の3次元モデルにおいてCDRの3以内に側鎖原子を有すると予測され、CDRと相互作用することができると予測されるフレームワーク位置に、ドナーアミノ酸残基を使用することであった。上記の方法は当業者がヒト化抗体を作成するために使用することができるいくつかの方法の単なる例である。当業者は、抗体のヒト化のための他の方法も知っているだろう。

10

【0015】

ヒト型の抗体の1つの実施態様において、CDR領域外のいくつか、殆ど又は全てのアミノ酸が、ヒト免疫グロブリン分子由来のアミノ酸で置換されているが、1つ以上のCDR領域内のいくつか、殆ど又は全てのアミノ酸は不変である。アミノ酸の僅かな付加、欠失、挿入、置換又は修飾は、それらが所与の抗原と抗体が結合する能力を消失しない限り許容可能である。適切なヒト免疫グロブリン分子としては、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及びIgMの分子が挙げられる。「ヒト化」抗体は、元来の抗体と類似した抗原特異性を保持する。しなしながら、特定のヒト化法を使用して、抗体の結合の親和性及び/又は特異性を、Wu et al., / Mol. Biol. 294:151, 1999 (その内容は参照により本明細書に組み入れられる)によって記載されているような「指向的進化」法を使用して増加させ得る。

20

【0016】

完全ヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子座の大部分についてトランスジェニックであるマウスを免疫することによって調製することができる。例えば、米国特許第5,591,669号、第5,598,369号、第5,545,806号、第5,545,807号、第6,150,584号、及びその中に引用されている文献(その内容は参照により本明細書に組み入れられる)を参照されたい。これらの動物は、内因性(例えばマウス)抗体の産生が機能的に欠失するように遺伝子的に改変されている。動物は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子座の全部又は一部を含むようにさらに改変され、よって、これらの動物の免疫により、対象の抗原に対する完全なヒト抗体が産生される。これらのマウス(例えばXenoMouse (Abgenix)、HuMAbマウス (Medarex/GenPharm))の免疫後、モノクローナル抗体を、標準的なハイブリドーマ技術に従って調製することができる。これらのモノクローナル抗体はヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を有し、それ故、ヒトに投与した場合にヒト抗マウス抗体(KAMA)応答を誘起しない。

30

【0017】

ヒト抗体を産生するためのインビトロの方法も存在する。これらは、ファージディスプレイ技術(米国特許第5,565,332号及び第5,573,905号)及びヒトB細胞のインビトロでの刺激(米国特許第5,229,275号及び第5,567,610号)を含む。これらの特許内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【0018】

従って、当業者には明らかであろうように、本発明はまた、 $F(ab')_2$ Fab、Fv及びFdフラグメント;キメラ抗体(Fc及び/又はFR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が相同ヒト又は非ヒト配列によって置換されている);キメラ $F(ab')_2$ フラグメント抗体(FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が相同ヒト又は非ヒト配列によって置換されている);キメラFabフラグメント抗体(FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2及び/又は軽鎖CDR3領域が相同ヒト又は非ヒト配列によって置換されている);及びキメラFdフラグメント抗体(FR及び/又はCDR1及び/又はCDR2領域が相同ヒト又は非ヒト配列によって置換されている)を提供する。本発明また、いわゆる一本鎖抗体も含む。

40

【0019】

50

種々の抗体分子及びフラグメントは、I g A、分泌I g A、I g E、I g G及びI g Mを含むがこれらに限定されない、一般的に知られている免疫グロブリンクラスのいずれかに由来し得る。I g Gサブクラスも当業者に周知であり、ヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4を含むがこれらに限定されない。

【0020】

別の実施態様において、本発明による抗体は、単ドメイン抗体である。「単ドメイン抗体」(s d A b)すなわち「V H H」という用語は、軽鎖を天然的に欠失しているラクダ科哺乳動物に見出すことができる種類の抗体の単一重鎖可変ドメインを指す。このようなV H Hはまた、「ナノボディ(登録商標)」とも呼ばれる。本発明によると、s d A bは特にラマ s d A bであり得る。

10

【0021】

本明細書において使用される「アプタマー」という用語は、分子認識の点で抗体の代替物を表すクラスの分子である。アプタマーは、実質的にあらゆるクラスの標的分子を高い親和性及び特異性で認識する能力を有するオリゴヌクレオチド配列又はオリゴペプチド配列である。従って、「抗R O B O 4アプタマー」という用語は、R O B O 4に対して指向されるアプタマーを指す。アプタマーは、ランダム配列ライブラリーのSystematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)を通して単離され得る。ランダム配列ライブラリーは、D N Aのコンピトナトリアル化学合成によって得ることができる。

【0022】

1つの実施態様において、該物質は、R O B O 4のリガンドを捕捉することができ、従ってその活性化を防ぐことのできるR O B O 4デコイポリペプチドである。典型的には、R O B O 4デコイポリペプチドは、R O B O 4の細胞外ドメインの全部又は一部を含み、それ故、可溶性のR O B O 4を含む。適切な可溶性のR O B O 4は、例えば、膜貫通ドメインが化学的方法、タンパク質分解的方法又は組換え法によって除去された切断短縮形のタンパク質を含み得る。好ましくは、該ポリペプチドは、R O B O 4に対して少なくとも80%相同である。好ましい実施態様において、該ポリペプチドは、例えばPileup配列分析ソフトウェア(Program Manual for the Wisconsin Package, 1996)などの任意の慣用的な分析アルゴリズムによって評価されるように少なくとも90%相同である。

20

【0023】

特定の実施態様において、R O B O 4デコイポリペプチドは、免疫グロブリンのF cドメインに融合させたR O B O 4の細胞外ドメインの全部又は一部を含む。該融合タンパク質のF cドメインは、以下の少なくとも1つの目的を果たす：該融合タンパク質を産生する細胞からの融合タンパク質の分泌、R O B O 4のリガンドを捕捉するように機能する形態(例えば折り畳まれた状態又は凝集状態)でR O B O 4の細胞外ドメインを与えること、該融合タンパク質のアフィニティ精製、抗体による融合タンパク質の認識、医薬品として使用される場合に融合タンパク質に対して好ましい特性を付与すること。適切な免疫グロブリンは、I g G、I g M、I g A、I g D、及びI g Eである。I g G及びI g Aが好ましく、I g G、例えばI g G 1が最も好ましい。該F cドメインは完全F cドメイン又はその機能保存的変異体であり得る。F cの変異体は、それが上記に列挙された機能の少なくとも1つを保持するならば機能保存的である。本発明の融合タンパク質のドメインは、リンカーによって連結されていてもよい。リンカーは約1~100、好ましくは1~10個のアミノ酸残基からなり得る。

30

40

【0024】

本発明のポリペプチドは、当業者には明らかであろうように、任意の適切な手段によって産生され得る。本発明に従って使用するための十分な量のポリペプチドを産生するために、本発明のポリペプチドを含む組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することによって、簡便に発現が達成され得る。好ましくは、該ポリペプチドは、組換え手段によって、コード核酸分子からの発現によって産生される。多種多様な宿主細胞においてポリペプチドをクローニング及び発現するための系は周知である。組換え形で発現される場合、該ポリペプチドは、好ましくは、宿主細胞においてコードされている核酸からの発現によって生

50

成される。特定の系の個々の必要条件に依存して、任意の宿主細胞を使用し得る。適切な宿主細胞としては、細菌、哺乳動物細胞、植物細胞、酵母及びバキュロウイルス系が挙げられる。異種ポリペプチドの発現のために当技術分野において利用できる哺乳動物細胞株としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎細胞、及び多くのその他が挙げられる。細菌を操作及び増殖させ易いために、細菌もまた組換えタンパク質の産生のための好ましい宿主である。一般的で好ましい細菌宿主は大腸菌(E. coli)である。

【0025】

特定の実施態様において、本発明の治療法に使用されるポリペプチドは、その治療効力を改善するために改変され得ると考えられる。このような治療化合物の改変を使用して、毒性を減少させるか、循環時間を増加させるか、又は生体内分布を改変させ得る。例えば、重要である可能性のある治療化合物の毒性を、生体内分布を改変させる多種多様な薬物担体ビヒクルと組み合わせることによってかなり減少させ得る。例えばジペプチドの付加は、内因性輸送体を使用することによる循環剤の血液網膜関門を通した眼内への浸透を改善し得る。

10

【0026】

薬物の存続性を改善させるための戦略は、水溶性ポリマーの使用である。種々の水溶性ポリマーが、生体内分布を改変させ、細胞による取り込みの様式を改善させ、生理学的障壁を通る透過性を変化させ、体内からの消失速度を改変することが示された。標的化効果又は徐放性効果のいずれかを達成するために、末端基として、骨格の一部として、又はポリマー鎖上の吊り下がった基として薬物部分を含む水溶性ポリマーが合成された。

20

【0027】

ポリエチレングリコール(PEG)は、その高い生体適合性及び改変のし易さから、薬物担体として広く使用されている。種々の薬物、タンパク質、及びリボソームへの付着は、滞留時間を改善させ、毒性を低減させることが示された。PEGを、鎖の末端のヒドロキシル基を通して、及び他の化学的方法を介して活性物質に結合させ得るが；しかしながら、PEGそれ自体は、1分子あたり最大で2個の活性物質に制限される。異なるアプローチにおいて、PEGとアミノ酸のコポリマーは、PEGの生体適合特性を保持するが1分子あたり多くの付着点を有し(より多くの薬物が負荷される)、多種多様な適用に適するように合成的に設計することができるというさらなる利点を有する、新規な生体材料として検討された。

30

【0028】

当業者は、薬物の効果的な改変のためのPEG化技術を知っている。例えば、PEGと三機能性モノマー(例えばリジン)の交互ポリマーからなる薬物送達ポリマーがVectraMed(Plainsboro, N.J.)によって使用された。PEG鎖(典型的には2000ダルトン以下)が、安定なウレタン結合を通して、リジンの α -及び ϵ -アミノ基に連結している。このようなコポリマーは、ポリマー鎖に沿って厳密に制御されかつ既定された間隔で反応性の吊り下がった基(リジンのカルボン酸基)を与えつつ、PEGの所望の特性を保持する。反応性の吊り下がった基は、誘導體化、架橋、又は他の分子とのコンジュゲーションのために使用することができる。これらのポリマーは、ポリマーの分子量、PEGセグメントの分子量、及び薬物とポリマーの間の切断可能な連結を変化させることによって、安定で長時間循環するプロドラッグを産生するのに有用である。PEGセグメントの分子量は、薬物/連結基複合体の間隔、及びコンジュゲートの分子量あたりの薬物の量(PEGセグメントが小さければ小さいほど、より多くの薬物が負荷される)に影響を及ぼす。一般的には、ブロックコポリマーコンジュゲートの全分子量の増加は、コンジュゲートの循環半減期を増加させるだろう。それにも関わらず、コンジュゲートは容易に分解可能であるか、又は糸球体ろ過限界閾値未満の分子量(例えば、45kDa未満)を有するかのいずれかでなければならない。

40

【0029】

さらに、ポリマー骨格が循環半減期及び生体内分布を維持するのに重要であるので、特

50

異的トリガー、典型的には標的化組織における酵素活性によって骨格ポリマーから放出されるまで、治療剤をプロドラッグ形で維持するために、リンカーを使用し得る。例えば、この種類の組織活性化薬物送達は、特定の生体内分布部位への送達が必要とされ、治療剤が病態部位に又は病態部位の近くに放出される場合に特に有用である。活性化薬物送達に使用するための連結基ライブラリーは当業者には公知であり、酵素動態、活性酵素の普及、及び選択された疾病特異的酵素の切断特異性に基つき得る。このようなリンカーは、治療薬送達のために本明細書に記載されたタンパク質又はタンパク質フラグメントを改変するのに使用され得る。

【0030】

「ROBO4発現阻害剤」は、ROBO4遺伝子の発現を阻害又は有意に減少させる生物学的効果を有する天然化合物又は合成化合物を指す。

10

【0031】

本発明に使用するための発現阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド構築物に基づき得る。アンチセンスRNA分子及びアンチセンスDNA分子を含むアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ROBO4 mRNAに結合し、よってタンパク質の翻訳を妨げるか、又はmRNAの分解を増加させ、よって細胞中のROBO4のレベル及び従って活性を減少させることによって、ROBO4 mRNAの翻訳を直接遮断するように作用する。例えば、少なくとも約15塩基であり、ROBO4をコードするmRNA転写物配列の独特な領域に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドを、例えば慣用的なホスホジエステル技術によって合成し、例えば静脈内注射又は点滴によって投与することができる。配列が公知である遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するためのアンチセンス技術を使用するための方法は、当技術分野において周知である（例えば、米国特許第6,566,135号；第6,566,131号；第6,365,354号；第6,410,323号；第6,107,091号；第6,046,321号；及び第5,981,732号参照）。

20

【0032】

低分子阻害的RNA (siRNA) はまた、本発明に使用するための発現阻害剤として機能し得る。ROBO4遺伝子発現は、対象又は細胞を、低分子二本鎖RNA (dsRNA) 又は低分子二本鎖RNAの産生を引き起こすベクター若しくは構築物と接触させることによって減少させることができ、よって、ROBO4の遺伝子発現は、特異的に阻害される（すなわちRNA干渉すなわちRNAi）。配列が公知である遺伝子のための、適切なdsRNA又はdsRNAコードベクターを選択するための方法は当技術分野において周知である（例えば、Tuschi, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); 米国特許第6,573,099号及び第6,506,559号；並びに、国際特許公開公報第01/36646号、国際公開公報第99/32619号及び国際公開公報第01/68836号を参照されたい）。本発明のsiRNAのホスホジエステル結合の全部又は一部は、有利には保護されている。この保護は、一般的には、当技術分野において公知の方法を使用して化学的経路を介して行なわれる。ホスホジエステル結合は、例えば、チオール又はアミン保護基によって又はフェニル基によって保護され得る。本発明のsiRNAの5'及び/又は3'末端も有利には、例えば、ホスホジエステル結合を保護するために上記された技術を使用して保護される。siRNA配列は、有利には、少なくとも12個の連続したジヌクレオチド又はその誘導体を含む。

30

40

【0033】

本明細書において使用される、本発明の核酸配列に関する「siRNA誘導体」という用語は、エリスロポエチン又はそのフラグメントに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、一例として少なくとも98%、より好ましくは少なくとも98%の同一率を有する核酸を指す。

【0034】

本明細書において使用される2つの核酸配列間の「同一率」は、比較しようとする2つの配列の最善のアラインメントを用いて得られた、比較しようとする2つの配列間の同一

50

核酸の比率を意味し、この比率は純粹に統計学的であり、これらの2つの配列間の相違は、核酸配列上にランダムに広がっている。本明細書において使用される「最善のアラインメント」又は「最適なアラインメント」は、決定された同一率（以下参照）が最高であるアラインメントを意味する。2つの核酸配列間の配列比較は、通常、最善のアラインメントに従って以前にアラインさせたこれらの配列を比較することによって実現され、この比較は比較セグメント上で実現され、これにより、類似性を有する局所領域が同定及び比較される。比較を実施するための最善の配列アラインメントは、手作業による方法の他に、SMITH及びWATERMAN (Ad. App. Math., vol.2, p:482, 1981)によって開発された全体的相同性アルゴリズムを使用することによって、NEDDLEMAN及びWUNSCH (J. Mol. Biol., vol. 48, p:443, 1970)によって開発された局所相同性アルゴリズムを使用することによって、PEARSON及びLIPMAN (Proc. Natl. Acd. Sci. USA, vol.85, p:2444, 1988)によって開発された類似性の方法を使用することによって、このようなアルゴリズム（ウイスコンシンジェネティックソフトウェアパッケージのGAP、BESTFIT、BLASTP、BLASTN、FASTA、TFASTA、Genetics Computer Group、575 Science Dr.、Madison, WI USA）を使用したコンピューターソフトウェアを使用することによって、MUSCLEマルチプルアラインメントアルゴリズム（Edgar, Robert C., Nucleic Acid s Research, vol. 32, p:1792, 2004）を使用することによって実現され得る。最善の局所アラインメントを得るために、好ましくはBLASTソフトウェアを使用することができる。2つの核酸配列間の同一率は、最適にアラインさせたこれらの2つの配列を比較することによって決定され、核酸配列は、これらの2つの配列間に最適なアラインメントを得るために、参照配列に対して付加又は欠失を含むことができる。同一率は、これらの2つの配列間の同一の位置の数を決定し、この数を比較した位置の総数で割り、得られた結果に100をかけることによって計算され、これにより、これらの2つの配列間の同一率が得られる。

【0035】

s h RNA（低分子ヘアピン型RNA）もまた本発明に使用するための発現阻害剤として機能することができる。

【0036】

リボザイムもまた、本発明に使用するための発現阻害剤として機能することができる。リボザイムは、RNAの特異的切断を触媒することのできる酵素RNA分子である。リボザイムの作用機序は、相補的標的RNAへのリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーション、その後のヌクレオチド鎖切断を含む。それ故、ROB4 mRNA配列のヌクレオチド鎖切断を特異的かつ効率的に触媒する工学操作されたヘアピン型またはハンマーヘッド型モチーフのリボザイム分子は、本発明の範囲内で有用である。あらゆる可能性あるRNA標的内の特異的リボザイム切断部位は最初に、標的分子を、典型的には以下の配列（GUA、GUU及びGUC）を含むリボザイム切断部位について走査することによって同定される。一旦同定されると、切断部位を含む標的遺伝子の領域に対応する約15～20のリボヌクレオチドの短いRNA配列を、オリゴヌクレオチド配列を不適切なものとし得る二次構造などの予測される構造特徴について評価することができる。

【0037】

発現阻害剤として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボザイムの両方が、公知の方法によって調製され得る。これらは、例えば固相ホスホルアマダイト化学合成などによる化学合成技術を含む。あるいは、アンチセンスRNA分子を、RNA分子をコードするDNA配列のインピトロ又はインピボでの転写によって生成し得る。このようなDNA配列を、T7又はSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込んだ多種多様なベクターに組み込むことができる。本発明のオリゴヌクレオチドに対する種々の改変を、細胞内安定性及び半減期を増加させる手段として導入することができる。可能な改変としては、分子の5'及び/又は3'末端へのリボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列の付加、あるいはオリゴヌクレオチド骨格内でのホスホジエステラーゼ結合ではなくむしろ、ホスホロチオエート又は2

10

20

30

40

50

' - O - メチルの使用が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 0 3 8 】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド、*s i R N A*、*s h R N A*及びリボザイムは、インビボにおいて単独で又はベクターと結合させて送達され得る。その最も広い意味において、「ベクター」は、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*s i R N A*、*s h R N A*又はリボザイム核酸の、細胞への、好ましくは*R O B O 4*を発現している細胞への導入を促進することのできる任意のビヒクルである。好ましくは、ベクターは、ベクターの非存在下で得られるであろう分解度と比べて分解度を低減させつつ、核酸を細胞に輸送する。一般的に、本発明に有用なベクターとしては、アンチセンスオリゴヌクレオチド、*s i R N A*、*s h R N A*又はリボザイム核酸配列の挿入又は組み込みによって操作された、プラスミド、ファージミド、ウイルス、ウイルス源又は細菌源に由来する他のビヒクルが挙げられるがこれらに限定されない。ウイルスベクターが好ましい種類のベクターであり、これには、以下のウイルスに由来する核酸配列が含まれるがこれらに限定されない：モロニーマウス白血病ウイルス、ハーベイマウス肉腫ウイルス、マウス乳癌ウイルス、及びラウス肉腫ウイルス等のレトロウイルス；アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス；*S V 4 0*型ウイルス；ポリオーマウイルス；エプスタイン・バーウイルス；パピローマウイルス；ヘルペスウイルス；ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；及びレトロウイルス等の*R N A*ウイルス。命名されていないが当技術分野において公知である他のベクターも容易に使用することができる。

10

【 0 0 3 9 】

好ましいウイルスベクターは、必須ではない遺伝子が対象の遺伝子で置換されている非細胞変性真核生物ウイルスに基づく。非細胞変性ウイルスとしてはレトロウイルス（例えばレンチウイルス）が挙げられ、その生活環は、ゲノムウイルス*R N A*から*D N A*への逆転写、その後の宿主細胞*D N A*へのプロウイルスの組み込みを含む。レトロウイルスは、ヒト遺伝子療法試験のために承認されている。最も有用なのは、複製欠損であるレトロウイルスである（すなわち、所望のタンパク質の合成を指令できるが、感染性粒子は製造できない）。このような遺伝子的に改変されたレトロウイルス発現ベクターは、インビボにおける遺伝子の高効率の形質導入のための一般的な有用性を有する。複製欠損レトロウイルスを産生するための標準的なプロトコール（外来性遺伝子材料をプラスミドに組み込む工程、パッケージング細胞株をプラスミドでトランスフェクションする工程、パッケージング細胞株により組換えレトロウイルスを産生する工程、組織培養培地からウイルス粒子を回収する工程、及び標的細胞をウイルス粒子で感染させる工程を含む）は、Kriegler, 1990及びMurry, 1991に提供される。

20

30

【 0 0 4 0 】

特定の適用のための好ましいウイルスは、アデノウイルス及びアデノ随伴（*A A V*）ウイルスであり、これらは遺伝子療法のヒトへの使用にすでに承認されている二本鎖*D N A*ウイルスである。実際に12個の異なる*A A V*血清型（*A A V 1 ~ 1 2*）が知られており、各々が異なる組織指向性を有する（Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27）。組換え*A A V*は、依存性パルボウイルス*A A V 2*に由来する（Choi, *VW J Virol* 2005; 79:6801-07）。アデノ随伴ウイルス1~12型を、複製欠損となるように工学操作することができ、多種多様な細胞型及び細胞種に感染させることができる（Wu, *Z Mol Ther* 2006; 14:316-27）。それはさらに、熱及び脂質溶媒に対する安定性；造血細胞を含む多様な系統の細胞における高い形質導入頻度；並びに、重複感染阻害がなく、従って、複数回の形質導入が可能となるなどの利点を有する。報告によれば、アデノ随伴ウイルスを、ヒト細胞*D N A*に部位特異的に組み込むことができ、これにより、レトロウイルス感染に特徴的な挿入突然変異及び挿入遺伝子発現のばらつきの可能性が最小限となる。さらに、野生型アデノ随伴ウイルス感染は、選択圧の非存在下で100回を超える継代に及び組織培養中で続けられ、このことは、アデノ随伴ウイルスゲノム組込みが、相対的に安定した事象であることを意味する。アデノ随伴ウイルスはまた、染色体外で機能することができる。

40

【 0 0 4 1 】

50

他のベクターはプラスミドベクターを含む。プラスミドベクターは、当技術分野において十分に記載されており、当業者には公知である。例えば、Sambrook et al., 1989を参照されたい。過去数年間に於いて、プラスミドベクターは、抗原をコードする遺伝子をインピボで細胞に送達するためのDNAワクチンとして使用されてきた。それらは、多くのウイルスベクターと同じ安全性の懸念を有さないために、ワクチンに特に有利である。しかしながら、宿主細胞と適合性であるプロモーターを有するこれらのプラスミドは、プラスミド内に作動可能にコードされた遺伝子からのペプチドを発現することができる。いくつかの一般的に使用されるプラスミドとしては、pBR322、pUC18、pUC19、pRC/CMV、SV40及びpBlueScriptが挙げられる。他のプラスミドは当業者には周知である。さらに、プラスミドは、制限酵素及びライゲーション反応を使用してカスタム設計され、これにより、特定のDNAフラグメントを除去及び付加することができる。プラスミドは、多種多様な経路によって送達され得る。例えば、DNAプラスミドは、筋肉内、皮内、皮下、又は他の経路によって注射され得る。プラスミドは、水溶液中で与えられ得るか、金粒子上に乾燥させ得るか、又は別のDNA送達システム(リポソーム、デンドリマー、コクリエート及びマイクロカプセル封入を含むがこれらに限定されない)と会合させ得る。

10

【0042】

好ましい実施態様において、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、shRNA又はリボザイム核酸配列は、異種調節領域、例えば異種プロモーターの制御下にある。

【0043】

本発明の物質は、以下に定義されているような、医薬組成物の形態で投与され得る。好ましくは前記物質を治療有効量で、「治療有効量」によって、任意の医学的処置に適用可能な妥当なベネフィット/リスク比で疾病を処置するのに十分な量の物質を意味する。前記物質又はそれを含む医薬組成物の全1日量は、妥当な医学的判断の範囲内で担当の医師によって決定されると理解される。任意の特定の被験体のための具体的な治療有効投与量レベルは、処置される疾患及び疾患の重度；使用される具体的な化合物の活性；使用される具体的な組成物；被験体の年齢、体重、全般的な健康状態、性別及び食事；使用される具体的な物質の投与時刻、投与経路、及び排泄速度；処置期間；使用される具体的な物質と組み合わせる又は同時に使用される薬物；並びに、医学分野において周知の同様な因子を含む、多種多様な因子に依存するだろう。例えば、所望の治療効果を達成するのに必要とされるよりも低いレベルで該物質の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで次第に用量を増加させることは十分に当業者の技能範囲内である。しかしながら、該物質の1日量は、1日あたり1人の成人あたり0.01~1,000mgまで幅広い範囲で変化し得る。好ましくは、該組成物は、処置しようとする被験体への投与量の症候による調整のために0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250及び500mgの物質を含む。医薬品は、典型的には、約0.01mg~約500mgの活性成分、好ましくは1mg~約100mgの活性成分を含む。有効量の薬物は、通常、1日あたり0.002mg/kgから約20mg/kg(体重)、特に1日あたり約0.001mg/kgから7mg/kg(体重)の投与量レベルで供給される。

20

30

【0044】

特定の実施態様において、本発明の物質は、ビスホスホネート及び/又は抗RANKL抗体(例えばデノスマブ)と組み合わせ使用され得る。

40

【0045】

従って、本発明の物質は、薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバント、又はビヒクルをさらに含む医薬組成物へと製剤化され得る。1つの実施態様において、本発明は、上記したような本発明の物質、及び薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバント又はビヒクルを含む、医薬組成物に関する。1つの実施態様において、本発明は、有効量の本発明の物質又はその薬学的に許容される塩、及び薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバント又はビヒクルを含む、医薬組成物である。薬学的に許容される担体は、例えば、目的の投与形に関して適切に選択され、かつ従来の薬務に一致する、薬学的な希釈剤、賦

50

形剤又は担体を含む。

【 0 0 4 6 】

薬学的に許容される担体は、前記物質の生物学的活性を過度に阻害しない不活性成分を含み得る。薬学的に許容される担体は、被験体への投与時に、生体適合性、例えば、無毒性、非炎症性、非免疫原性であるべきであるか、又は他の望ましくない反応若しくは副作用を欠くべきである。標準的な医薬製剤技術が使用され得る。

【 0 0 4 7 】

本明細書において使用される薬学的に許容される担体、アジュバント又はビヒクルは、所望の特定の剤形に適した、任意及び全ての溶媒、希釈剤、又は他の液体ビヒクル、分散助剤又は懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤又は乳化剤、保存剤、固体結合剤、潤滑剤などを含む。Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)は、薬学的に許容される組成物の製剤化に使用される様々な担体、及びその調製のための公知の技術を開示する。任意の慣用的な担体媒体が、例えば任意の望ましくない生物学的作用を生じることによって、又はさもなくば薬学的に許容される組成物の任意の他の成分(群)と有害な様式で相互作用することによって、本明細書に記載の化合物と不適合性でない限り、その使用は本発明の範囲内であると考えられる。

【 0 0 4 8 】

薬学的に許容される担体として作用することのできる材料のいくつかの例としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、血清タンパク質(例えばヒト血清アルブミン)、緩衝物質(例えばtwin80、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、又はソルビン酸カリウム)、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、又は電解質(例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム又は亜鉛塩)、コロイド状シリカ、トリケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックコポリマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、羊毛脂、糖、例えば乳糖、ブドウ糖、及びショ糖;デンプン、例えばコーンスターチ及びジャガイモデンプン;セルロース及びその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース、及び酢酸セルロース;トラガカント末;麦芽;ゼラチン;タルク;賦形剤、例えばココアバター及び坐剤ワックス;油、例えばピーナッツ油、綿実油;ペニバナ油;ゴマ油;オリーブ油;コーン油及び大豆油;グリコール;例えばプロピレングリコール又はポリエチレングリコール;エステル、例えばオレイン酸エチル及びラウリン酸エチル;アガー;緩衝剤、例えば水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウム;アルギン酸;発熱物質を含まない水;等張食塩水;リンガー液;エチルアルコール、及びリン酸緩衝溶液、並びに、他の無毒性の適合性の潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムが挙げられるがこれらに限定されず、並びに、着色剤、放出剤、コーティング剤、甘味剤、香味剤及び芳香剤、保存剤及び抗酸化剤も、製剤者の判断に従って組成物中に存在していてもよい。

【 0 0 4 9 】

本明細書に記載の組成物は、経口的に、非経口的に、吸入スプレーによって、局所的に、直腸に、鼻腔内、頬側に、腔内に、又は埋め込まれたレザーバーを介して、処置される疾病の重度に依存して投与され得る。本明細書において使用される「非経口」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液内、胸骨内、くも膜下腔内、肝内、病巣内、及び頭蓋内注射又は注入技術を含むがこれらに限定されない。

【 0 0 5 0 】

本明細書に記載の組成物の無菌注射剤形は、水性又は油性懸濁液であり得る。これらの懸濁液は、適切な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を使用して、当技術分野において公知の技術に従って製剤化され得る。無菌注射調製物はまた、無毒性の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒中の無菌注射溶液又は懸濁液、例えば1,3-ブタンジオール溶液であり得る。使用され得る許容されるビヒクル又は溶媒には、水、リンガー液、及び等張塩化ナト

10

20

30

40

50

リウム溶液がある。さらに、無菌の不揮発性油が、溶媒又は懸濁化媒体として慣用的に使用される。この目的のために、合成モノ又はジグリセリドを含む、任意の無菌の不揮発性油を使用し得る。脂肪酸、例えばオレイン酸及びそのグリセリド誘導体が、天然の薬学的に許容される油、例えばオリーブ油又はヒマシ油、特にそのポリオキシエチル化形の油と同様に注射液の調製に有用である。これらの油溶液又は懸濁液はまた、乳剤及び懸濁剤をはじめとする薬学的に許容される剤形の製剤化に一般的に使用される、長鎖アルコールの希釈剤又は分散剤（例えばカルボキシメチルセルロース）又は類似の分散剤を含み得る。薬学的に許容される固体剤形、液体剤形又は他の剤形の製造に一般的に使用される、他の一般的に使用される界面活性剤、例えば Tween、Span 及び他の乳化剤又はバイオアベイラビリティ増強剤もまた、製剤化のために使用され得る。

10

【0051】

本明細書に記載の医薬組成物は、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤又は液剤を含むがこれらに限定されない、任意の経口的に許容される剤形で経口投与され得る。経口使用のための錠剤の場合、一般的に使用される担体は、乳糖及びコーンスターチを含むがこれらに限定されない。潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムもまた、典型的には添加される。カプセル剤形での経口投与のために有用な希釈剤としては、乳糖及び乾燥トラガカントが挙げられる。水性懸濁液が経口使用のために必要とされる場合、前記物質は、乳化剤及び懸濁化剤と配合される。所望であれば、特定の甘味剤、香味剤又は着色剤も添加され得る。

【0052】

あるいは、本明細書に記載の医薬組成物は、直腸投与のために坐剤の剤形で投与される。これらは、前記物質を適切な非刺激性の賦形剤（これは室温で固体であるが、直腸の温度では液体であり、それ故、直腸内で融解して薬物を放出する）と混合することによって調製され得る。このような材料としては、ココアバター、蜜蝋及びポリエチレングリコールが挙げられるがこれらに限定されない。

20

【0053】

本発明のさらなる態様は、i) 癌患者から得られた試料中の ROBO4 発現レベルを決定する工程、ii) 工程 i) で決定されたレベルを既定の参照レベルと比較する工程、iii) 工程 i) で決定されたレベルが既定の参照レベルよりも高い場合には、該患者は骨転移を有する高いリスクを有すると結論付ける工程を含む、該癌患者が骨転移を有するリスクがあるかどうかを試験する方法に関する。

30

【0054】

本明細書において使用される「試料」という用語は、患者の原発性腫瘍から単離された試料を指し得るか、又は、患者から得られた血液試料から単離された循環中の腫瘍細胞の収集物からなり得る。

【0055】

ROBO4 の発現レベルの決定は、多種多様な周知の方法のいずれかによって評価され得る。

【0056】

例えば、ROBO4 をコードする遺伝子の発現は、該遺伝子の mRNA 転写物又は mRNA 前駆体、例えば新生 RNA の発現を分析することによって評価される。該分析は、患者から得られた試料中の細胞から mRNA / cDNA を調製し、mRNA / cDNA をプローブとハイブリダイズさせることによって評価され得る。調製された mRNA / cDNA は、サザン又はノザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析、例えば定量 PCR (TaqMan)、及びプローブアレイ、例えば Gene Chip (登録商標) DNA アレイ (AFFYMETREX) を含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーション又は増幅アッセイに使用され得る。有利には、ROBO4 をコードする遺伝子から転写された mRNA の発現レベルの分析は、例えば RT-PCR (米国特許第 4,683,202 号に示された実験態様)、リガゼ連鎖反応 (BARANY, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.88, p: 189-193, 1991)、自己維持配列複製 (GUATELLI et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.57, p: 1874-187

40

50

8, 1990)、転写増幅システム(KWOH et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86, p: 1173-1177, 1989)、Q-レプリカーゼ(LIZARDI et al., Biol. Technology, vol.6, p: 1197, 1988)、ローリングサークル複製(米国特許第5,843,033号)、又は任意の他の核酸増幅法によるなどの、核酸増幅プロセス、続いて、当業者に周知の技術を使用した増幅された分子の検出を含む。これらの検出スキームは、このような分子が非常に少数存在する場合には、核酸分子の検出に特に有用である。本明細書において使用される増幅プライマーは、遺伝子(それぞれプラス鎖及びマイナス鎖、又はその逆)の5'又は3'領域にアニーリングすることができ、かつその間の短い領域を含む、一対の核酸分子であると定義される。一般的に、増幅プライマーは、約10から30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域にフランキングする。適切な条件下で適切な試薬を用いて、このようなプライマーは、プライマーによってフランキングされるヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能とする。

【0057】

別の好ましい態様において、試料中のROBO4の発現レベルは、ROBO4を発現する癌細胞の数及び/又は癌細胞の表面におけるROBO4のレベルを決定することによって評価され得る。細胞表面における特異的表面マーカーの発現を検出するための標準的な方法は、当技術分野において周知である。典型的には、癌細胞表面においてROBO4のレベルを測定することからなる工程は、癌細胞の個体群を回収すること、及び、ROBO4に対して指向される少なくとも1つの鑑別的な結合パートナーを使用することからなり得、癌細胞は、結合パートナーによってROBO4に結合している。本明細書において使用される「ROBO4に対して指向される結合パートナー」は、高い親和性でROBO4に結合することのできる任意の分子(天然又は非天然)を指す。該結合パートナーは、抗体、アプタマー及びペプチドを含むがこれらに限定されない。結合パートナーは、ROBO4に対して特異的に指向された、ポリクローナル又はモノクローナル、好ましくはモノクローナルであり得る抗体であり得る。

【0058】

本発明のポリクローナル抗体又はそのフラグメントは、例えばブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ及びマウスからとりわけ選択された宿主動物に、適切な抗原又はエピトープを投与することによって既知の方法に従って産生され得る。当技術分野において公知の様々なアジュバントを使用して抗体産生を増強することができる。本発明を実施するのに有用な抗体は、ポリクローナルであってもよいが、モノクローナル抗体が好ましい。本発明のモノクローナル抗体又はそのフラグメントは、培養液中の継代細胞株による抗体分子の産生を与える任意の技術を使用して調製及び単離され得る。産生及び単離のための技術としては、元来のハイブリドーマ技術; ヒトB細胞ハイブリドーマ技術; 及びEBV-ハイブリドーマ技術が挙げられるがこれらに限定されない。

【0059】

本発明の結合パートナー、例えば抗体又はアプタマーを、検出可能な分子又は物質、例えば優先的には蛍光分子又は放射性分子、又は当技術分野において公知の任意の他の標識で標識し得る。一般的にシグナルを与える(直接的に又は間接的にいずれかで)標識は当技術分野において公知である。本明細書において使用される抗体又はアプタマーに関して「標識された」という用語は、検出可能な物質、例えばフルオロフォア[例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)又はフィコエリトリン(PE)又はヨードシアニン(Cy5)]又は放射性物質を抗体又はアプタマーにカップリング(すなわち物理的に連結)させることによる直接的な抗体又はアプタマーの標識、並びに、検出可能な物質との反応性によるプローブ又は抗体の間接的な標識を包含することを意味する。本発明の抗体又はアプタマーは、当技術分野において公知の任意の方法によって放射性分子で標識され得る。例えば、放射性分子としては、I123、I124、In111、Re186、Re188などのシンチグラフィ研究のための放射性原子が挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、抗体はすでにフルオロフォアにコンジュゲート(例えばFITCにコンジュゲート及び/又はPEにコンジュゲート)している。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 0 】

前記のアッセイは、固相支持体への結合パートナー（すなわち抗体又はアプタマー）の結合を含み得る。固相表面は、結合パートナーでコーティングされたマイクロタイタープレートであり得る。試料をインキュベートした後、ROBO4を発現する癌細胞は、結合パートナーに特異的に結合した。あるいは、固相表面は、ビーズ、例えば活性化ビーズ、磁気応答性ビーズであり得る。ビーズは、ガラス、プラスチック、ポリスチレン、及びアクリルを含むがこれらに限定されない種々の材料から作製され得る。さらに、ビーズは、好ましくは蛍光標識されている。好ましい実施態様において、蛍光ビーズは、Becton Dickinson Biosciences, (San Jose, California)から入手可能なTruCount（登録商標）チューブに含まれるものである。本発明によると、フローサイトメトリー法が、細胞表面におけるROBO4レベルを測定する好ましい方法である。該方法は当技術分野において周知である。例えば、それ故、蛍光活性化細胞選別（FACS）が使用され得る。

10

【 0 0 6 1 】

1つの実施態様において、既定の参照値は、骨転移発生に関する、指標値であり得るか、又は1つ以上のリスク予測アルゴリズムから導かれ得るか、又はコンピューターで算出された指数であり得る。既定の参照値は、個体群の研究から導かれた数又は値に対する相対的なものであり得る。このような既定の参照値は、数学的アルゴリズム及びコンピューターで算出された転移発生指数から得られた、個体群の統計分析及び/又はリスク予測データから導かれ得る。本発明の1つの実施態様において、既定の参照値は、骨転移を発生しなかった1人以上の被験体から得られた対照試料におけるROBO4の発現レベルから導かれる。別の実施態様において、各被験体を、このような試験の後、診断的に関連した期間をかけてモニタリング及び/又は周期的に再検査し（「縦断的研究」）、骨転移の不在が継続されていることを確認する。このような期間は、参照値を決定した最初の試験日から、1年間、2年間、2～5年間、5年間、5～10年間、10年間、又は10年間以上であり得る。さらに、適切に預けられた歴史的な被験体試料におけるROBO4の発現レベルの遡及的な測定が、これらの既定参照値の確立に使用され得、よって必要とされる研究時間が短縮され得る。典型的には、骨転移を有するリスクのある患者におけるROBO4のレベルは、骨転移を決して発生しない患者から得られた参照値よりも高いと見なされる。

20

【 0 0 6 2 】

本発明はまた、i)被験体から得られた試料中のROBO4発現レベルを決定する工程、ii)工程i)で決定されたレベルを既定の参照レベルと比較する工程、iii)工程i)で決定されたレベルが既定の参照レベルよりも高い場合に、被験体が骨転移を有するリスクが高いと結論付ける工程、及びiv)骨転移を有するリスクが高い被験体に、抗ROBO4抗体、抗ROBO4アプタマー、ROBO4デコイポリペプチド、ROBO4発現阻害剤からなる群より選択される物質を投与する工程を含む、被験体が骨転移を有するリスクがあるかどうかを試験することを含む、それを必要とする被験体における骨転移を予防又は治療する方法に関する。

30

【 0 0 6 3 】

本発明は、以下の図面及び実施例によってさらに説明されるだろう。しかしながら、これらの実施例及び図面は、いずれにしても本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきではない。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 4 】

【 図 1 】 原発性乳腺腫瘍におけるROBO4発現は、無再発生存期間の悪い予後に関連している。(A) Kaplan-Meierは、ROBO1状態に従って、254人の乳癌患者における無再発生存率を推定する。(B) (A)と同様であるが、症例はROBO4の状態に従って分類されている。(C) ROBO4の状態による、137人のリンパ節陽性(pN+)乳癌患者における無再発生存率。(D) (C)と同様であるが、無骨転移生存率について。

50

【図2】Sh - 又はSc - Robo4トランスフェクタントを、動物の尾動脈に接種した。腫瘍細胞の接種後の28日目に、骨病変をX線検査、組織学的検査及びTRAP染色によって分析した。各群における骨病変の代表的な画像を、左手側に示す。定量データを右手側に示す。

【図3】MCSF + RANKL、及びROBO1又はROBO4についてサイレンシングされた乳癌細胞からの馴化培地で処置されたマウス骨髄細胞のインビトロにおける破骨細胞の形成。成熟破骨細胞は、多核TRAP陽性細胞として定量された。各群についての成熟破骨細胞の代表的な画像が示されている。

【図4A】(A)細胞遊走アッセイ。ROBO1(左側)又はROBO4(右側)についてサイレンシングされた乳癌細胞を、多孔性の膜を有するインサートにローディングし(上のチャンバー)、化学誘引物質(血清)をコンパニオンプレートのウェル(下のチャンバー)に入れた。37°Cで6時間インキュベートした後、非遊走細胞を除去し、インサートの表面下上の遊走細胞を固定し、染色し、顕微鏡下で計数した。

10

【図4B】(B)細胞浸潤アッセイ。細胞浸潤のために、インサートを基底膜マトリゲルでコーティングした。37°Cで24時間インキュベートした後、非浸潤細胞を除去し、残りの実験を(A)に記載の通りに実施した。

【図4C】(C)骨指向性B02乳癌細胞の浸潤に対する、漸増濃度の抗Robo1(左)又は抗Robo4抗体(右)の効果。挿入図:アイソタイプの一一致した陰性対照抗体と比較した、最高濃度の抗Robo1及び抗Robo4抗体の効果。

【図5A】(A)Sh - Robo1/4トランスフェクタント又は親B02乳癌細胞の動脈内接種から7日後、動物を、図に示されているように、選別し、後肢を回収し、骨髄を洗い流した。骨髄培養細胞を、抗生物質の選択下に置き、抗生物質耐性の腫瘍細胞の選択的増殖を可能とした。腫瘍細胞のコロニーを固定し、染色し、計数した。各群の代表的な画像が示されている。

20

【図5B】(B)は(A)と同様であるが、Sc - 及びSh - Robo4でトランスフェクションされた腫瘍細胞の脛骨内接種について。

【図5C】(C)軟アガーコロニー形成アッセイ。ROBO4のサイレンシングは、コロニーの数及びサイズを減少させる。

【図6】ROBO1及びROBO4の状態による、254人の乳癌患者における無再発生存率についての Kaplan-Meier による推定。ログランク検定により $P = 0.058$ 。各亜群における転移イベントの総数(イベントの数)が、埋め込まれた表に示されている。

30

【図7】腫瘍血管新生と、腫瘍細胞におけるROBO1又はROBO4のサイレンシングとの間の関連。(A)マウス内皮細胞を特異的に認識する抗CD31抗体を使用した、腫瘍細胞接種後の50日目に於けるSc - ROBO1及びSh - ROBO1腫瘍異種移植片の免疫組織化学的分析。腫瘍内のCD31陽性血管の数を定量した。矢印は血管を示す。

** $P < 0.01$ 。(B)(A)と同じであるが、Sc - ROBO4及びSh - ROBO4腫瘍異種移植片について。* $P < 0.05$ 。

【図8】Sh - 又はSc - Robo4によりトランスフェクションされた腫瘍細胞を脛骨内に接種された動物の転移性肢の脛骨の骨幹端を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)により染色した後のインサイトにおける破骨細胞の検出。代表的な画像が左に示されている。破骨細胞が赤色に染色されている(矢印)。破骨細胞(OC)表面、対、骨表面の比を%で表現した。**、Sc - Robo4群と比較して $P < 0.01$ 。

40

【図9】Robo4に対して指向されるポリクローナル抗体を用いてのヒトB02乳癌細胞の処置は、動物における骨髄微小転移の形成を阻害する。

【0065】

実施例1:

材料及び方法

患者

乳癌患者コホートの臨床的及び生物学的特徴が他の場所に(Berthier et al., 2010)記載されている。Hospices Civils de Lyon ($n = 254$)及びRene Huguenin病院 ($n =$

50

456)の患者コホートの経過観察期間中央値はそれぞれ54及び120.5か月であった。

【0066】

リアルタイムPCR

ヒト乳腺腫瘍及びマウス骨髄からの全RNAを、トリゾール試薬(Sigma)を使用して抽出した。あらゆるゲノムDNAの混入を除去するために、全RNAを、リボヌクレアーゼ非含有デオキシリボヌクレアーゼIで処理し、RNeasyマイクロカラム(Qiagen)を使用して精製した。RNAの品質を、Agilent Bioanalyser 2100(Agilent Technologies)を使用して確認した。cDNAを、iScript cDNA合成キット(Biorad)を使用して合成した。PCR反応を、SYBR(登録商標)Green qPCRキット(Life technologies)を使用して、96ウェルプレートにおいてMastercycler EPシステム(Realplex2, Eppendorf, hamburg-Eppendorf, Germany)で製造業者の説明書に従って行なった。リアルタイムRT-PCRは、最初の工程を95で2分間、続いて95で15秒間の40サイクル、T_mで(mL32:58、mSlit2:64、TBP:67、Robo1:63、Robo4:67)15秒間、および72で20秒間行われた。ROBO1及びROBO4発現は、TBPを用いて標準化された。マウスSlit2はmL32を用いて標準化された。

10

【0067】

細胞株、細胞培養及びトランスフェクション

ヒトB02乳癌細胞株は、動物において骨に転移する高い効率のために選択されたMDA-MB-231癌株の亜個体群である(Peyruchaud et al., 2003)。以前に作成された(Buijs et al., 2007)、Flpを発現するサブクローン(MDA-MB-231/B02-Frt11)をここで細胞トランスフェクション実験に使用した。

20

【0068】

ヒトROBO1 mRNAに対して指向される小ヘアピンRNA(shRNA)及び対応するスクランブル配列(ScRNA)を、Si Designer Tool(Promega)を使用して設計した。使用されたオリゴヌクレオチドは以下の通りであった:正方向ShRNA、5'-ACCgCgTACTAAgggAA-CAATAAgTTCCTATTgTTCCCTTAgTACTgCTTTTC-3';逆方向ShRNA、5'-TgCgAAAAAgCg-TACTAAgggAACAAATAgAgAACTTATTgTTCCCTT-AgTACTg-3'。shRNA及び対応するスクランブル二本鎖を、psiSTRIKEピューロマイシンキット(Promega)を用いてU6プロモーター下で合成した。プラスミドを、Transfast試薬(Promega)を使用してB02-Frt細胞中にトランスフェクションした。細胞をピューロマイシン(2 µg/mL、PAA)の存在下で2週間培養し、クローンをクローニングシリンダーを使用して単離した。

30

【0069】

ROBO4 mRNAに標的化するShRNA及びその対応する対照ScRNAを、siRNA設計ツール(Genscript)を用いて設計し、pRNA-U6.1/ゼオシンベクター(Genscript)にクローニングした。使用されたオリゴヌクレオチドは以下の通りであった:正方向のShRNA、5'-GAGCAGAGAAGAGTGACGA-3';逆方向のShRNA、5'-TCTTACACGGCCTTGTTCA-3'。トランスフェクション後、細胞を、ゼオシン(800 µg/mL、Life technologies)の存在下で3週間培養し、その後、クローンをクローニングシリンダーを使用して単離した。ROBO1又はROBO4についてサイレンシングさせたクローン及びそのそれぞれの対照を、その後、ウェスタンブロットによって選択した。

40

【0070】

ウェスタンブロット

タンパク質細胞抽出物を、4~12%勾配のSDS-ポリアクリルアミドゲル(Life technologies)上で電気泳動し、その後、ニトロセルロース膜(Millipore, Billerica, MA)に転写した。Robo1(抗体7279; AbCam; 1:300の希釈度)、Robo4(抗体10547, AbCam; 1:500の希釈度)、-チューブリン(Sigma; 1:2,000の希釈度)、Akt(9272番、Cell Signaling; 1:2,000の希釈度)、ホスホ-Ak

50

t (9271S番、Cell signaling; 1:2, 000の希釈度)、Src (クローンGD11、Millipore; 1:500の希釈度)、ホスホ-Src (クローン9A6、Millipore; 1:500の希釈度)、及びサイクリンD1 (クローンEPR2241、Millipore; 1:10,000の希釈度)を製造業者の説明書に従ってイムノプロットのために使用した。一次抗体と共にインキュベートした後、膜を、セイヨウワサビペルオキシド(HRP)にコンジュゲートさせたロバ抗ウサギ及び抗マウス二次抗体(Amersham; 1:2,000の希釈度)と共にインキュベートし、その後、免疫染色を、増強化学発光(EL)検出システム(Perkin Elmer)を用いて実施した。

【0071】

細胞遊走及び浸潤アッセイ

実験を、以前に記載されているように(Zhang et al., 2007; Fradet et al., 2011)、直径8µmの孔サイズのインサートを有する24ウェル細胞培養プレートで実施した。細胞浸潤アッセイのために、インサートを、100µlの基底膜マトリゲル(0.3mg/ml)でコーティングした。親腫瘍細胞又はトランスフェクタント(1.6×10^5 個の細胞/ml)を、0.1%(w/v)のウシ血清アルブミンを含む培養培地に再懸濁し、300µlのこの細胞懸濁液を、各インサート(上のチャンバー)にローディングした。抗Robo1(クローン1F8、Sigma)及び抗Robo4(抗体10547、Abcam)を用いての実験のために、これらの各抗体を、37で90分間、腫瘍細胞と共にインキュベートして、その後、上のチャンバーに加えた。化学誘引物質[10%(v/v)のウシ胎児血清]を、下のチャンバーに入れた(750µl/ウェル)。細胞遊走及び浸潤実験のために、プレートをそれぞれ6時間及び24時間、37で、5%CO₂インキュベーター中でインキュベートした。インキュベート後、インサートを回収し、非遊走細胞を除去し、インサート表面下上の遊走細胞を固定し、クリスタルバイオレットで染色した。その後、細胞を顕微鏡下で計数した。

【0072】

動物

4週令の雌NMR1及びBalb/c免疫低下マウス及びOF1雄マウスを、Charles River Laboratories (St. Germain sur l'Arbresle, France)から購入した。動物の小屋及び世話をはじめとする動物に關与する全ての手順、動物を選別する方法、並びに実験プロトコールは、リヨン大学の地方倫理委員会によって確立された実施規則に従って実施された。

【0073】

動物の研究

同所性腫瘍異種移植片実験を、以前に記載されている通りに(Fradet et al., 2011)、NMR1免疫不全マウスにおいて実施した。4週令の雌ヌードマウスの、第4乳腺の脂肪パッドに、トランスフェクタントのプール(50µlのPBS中、 10^6 個の細胞)を注射した。プロトコール終了時に、マウスを屠殺し、腫瘍を回収し、秤量し、その後、免疫組織化学的検査のために準備した。

【0074】

骨内腫瘍異種移植実験を、以前に記載されている通りに(Zhang et al., 2007)、雌Balb/cヌードマウスにおいて実施した。簡潔に言えば、30ゲージの滅菌針を用いて、膝を曲げた脛骨プラトーを通して、小さな穴をあけた。50mlの滅菌ハミルトンシリンジに装着させた新しい滅菌針を使用して、単一細胞懸濁液(30µlのPBS中、 10^5 個の細胞)を骨髓腔に注射した。溶骨性病変の進行を、キャビネットX線システムを使用した、麻酔した動物のX線検査によってモニタリングした。

【0075】

骨転移実験を、以前に記載されているように(Fradet et al., 2011; Peyruchaud et al., 2003; Zhang et al., 2007)、雌Balb/cヌードマウスにおいて実施した。トランスフェクタント(100µlのPBS中、 5×10^5 個の細胞)を、麻酔したヌードマウスの尾動脈に注射した。X線写真を上記のように撮影した。溶骨性病変が、骨において

10

20

30

40

50

放射線透過性病変としてX線写真上に同定された。溶骨性病変の領域を、コンピューター画像分析システムを使用して測定し、1つの肢あたりの骨破壊の程度を平方ミリメートルで表現した。

【0076】

骨の組織学的検査、組織形態計測検査、及び免疫組織化学的検査

骨組織切片の骨組織学的及び組織形態計測的分析を、以前に記載の通りに (Fradet et al., 2011; Peyruchaud et al., 2003; Zhang et al., 2007) 実施した。組織形態計測的測定 [骨体積 (BV) / 骨組織体積 (TV) 比、及び腫瘍体積 (TuV) / 軟組織体積 (STV) 比] を、皮質骨及び海綿骨を含む、成長板から 0.5 mm に位置する脛骨骨幹端の標準的な帯域で実施した。BV / TV 比は、骨組織の比率を示す。TuV / STV 比は、腫瘍組織の比率を示す。破骨細胞のインサイトにおける検出は、市販のキット (Sigma) を使用して、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) により染色された縦方向のパラフィンに包埋された脛骨骨幹端の内側切片において実施された。破骨細胞の吸収表面は、腫瘍 - 骨の界面における、TRAP 陽性海綿骨表面積と全海綿骨表面積の比として計算された。血管の免疫検出のために、腫瘍切片を、ウサギポリクローナル抗 CD31 抗体 (AnaSpec) と共にインキュベートし、その後、抗ウサギHRPに連結された二次抗体と共にインキュベートした。腫瘍の微小血管の密度を、以前に記載されている通りに (Fradet et al., 2011; Peyruchaud et al., 2003) 定量した。

10

【0077】

破骨細胞形成アッセイ

実験を、以前に記載されている通りに (Fradet et al., 2011) 実施した。簡潔に言えば、6週令のOF1雄マウスの後肢からの骨髓細胞を、M-CSF (20 ng/ml) 及び RNAK-L (200 ng/ml) の補充された 10% (v/v) ウシ胎児血清を含む MEM 培地中、トランスフェクタント (20 µg/mL) からの馴化培地の存在下で培養した。7日後、成熟破骨細胞を、顕微鏡下で、核の数 (3つを超える核) 及び TRAP 活性に基づいて数えた。結果を、1つのウェルあたりの破骨細胞の数として表現した。

20

【0078】

エクスピボにおける骨髓微小転移アッセイ

Sh / Sc - Robo トランスフェクタント及び親 B02 乳癌細胞を、動物の尾動脈に注射し、動物を腫瘍細胞接種から7日後に選別した。後肢を回収し、脛骨及び大腿骨の両端を切断し、骨髓を、23ゲージの針を使用して培養培地を用いて洗い流した。その後、骨髓細胞を6ウェルプレートに接種し、完全培地中で培養した。1日間培養した後、骨髓細胞を抗生物質の選択下に2週間置き、抗生物質耐性腫瘍細胞の選択的な増殖を可能とした。腫瘍細胞のコロニーを固定し、クリスタルバイオレットで染色し、計数した。

30

【0079】

サイトカインアレイ

79個の増殖因子、サイトカイン及びケモカインを検出するように設計された市販の抗体をベースとしたタンパク質マイクロアレイ (RayBio ヒトサイトカインアレイV, RayBioTech) を使用した。アレイ膜を、2時間、トランスフェクション培養細胞 (150 µg/mL) からの馴化培地と共にインキュベートした。洗浄後、膜を、79個のビオチニル化抗体のカクテルと共にインキュベートし、残りの実験手順を製造業者の説明書に従って実施した。

40

【0080】

統計分析

全てのデータは、StatViewソフトウェア (バージョン5.0; SAS Institute Inc, Cary, NC) を使用して分析された。結果は、図の説明文及び表に示されているように、平均値 ± SD として報告される。前臨床試験に関する対比較は、ノンパラメトリックマンホイットニー-U検定を実施することによって実施された。臨床データに関しては、通常の予後診断パラメーターに関連した Robo1 及び Robo4 発現の分布を、マンホイットニー又はクラスカル・ウォリス検定を使用して実施した。カプランマイヤー曲線間の比較を、口

50

グランク検定を使用して実施した。0.05未満のP値を統計学的に有意と判断した。

【0081】

結果

ROBO1 / ROBO4発現と、臨床上的乳癌の再発との関連

本発明者らは、骨にしか転移しないMDA-MB-231ヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231/B02と称される)の亜個体群を以前に選択した(Peyruchaud et al., 2003)。A及びBU133アフィメトリクスGeneChipを使用して、本発明者らは、MDA-MB-231及びMDA-MB-231/B02細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、MDA-MB-231/B02細胞が、ROBO/SLITファミリーの遺伝子を含む骨転移遺伝子サインを発現することを見出した(Bellahcene et al., Breast Cancer Res Treat., 101:135-148, 2007; Garcia et al., Clin Exp Metastasis, 25:33-42, 2008)。より正確に言えば、骨指向性MDA-MB-231/B02細胞は、親細胞株と比較して、ROBO1及びROBO4を過剰発現した。ROBO2及びROBO3は、MDA-MB-231及びMDA-MB-231/B02細胞によって発現されなかった。RoboリガンドのSLIT2及びより少ない程度でSLIT1(しかしSLIT3ではない)もまた、MDA-MB-231及びMDA-MB-231/B02細胞によって発現された。

10

【0082】

ROBO1及びROBO4の発現と、乳癌の転帰との関連を調べるために、本発明者らは、診断時に遠隔転移のエビデンスが全くなく、以前に治療されたことも全くない、254人の患者コホートを調べた(Berthier et al., 2010)。本発明者らは、乳癌患者において、ROBO1状態と、臨床的及び生物学的特徴との間に全く相関を観察しなかった(表1)。著しく対照的には、ROBO4の発現とリンパ節の状態との間には統計学的に有意な相関があり($P = 0.001$)；原発性腫瘍における高いROBO4レベルが、3つを超えるリンパ節が陽性である患者においてより頻繁に観察された(表1)。乳癌患者におけるROBO1及びROBO4の発現の予後診断値を規定するために、生存曲線を、カプランマイヤー法を使用して推定した。無再発生存率は、高いまたは低いレベルのROBO1を発現している群の間で有意に異ならなかった。逆に、高いROBO4発現レベルを有する群における54か月という経過観察期間の中央値における再発の数は、低いROBO4レベルを有する群の2倍であった(それぞれ32回対15回の再発；ログランク検定により $P = 0.009$)。

20

30

【0083】

さらに、ROBO1及びROBO4の状態による患者コホートの亜群分析は、ROBO1の発現レベルが高い又は低いに関係なく、高いROBO4レベルを有する原発性腫瘍を有する患者において再発がより頻繁に起こったことを示した($P = 0.058$)。リンパ節の状態は、本発明者らが分析したコホートにおいて高い転移リスクと以前に相関し(Berthier et al., 2010)、ROBO4の発現とリンパ節の状態との間の有意な相関がここで観察されたため(表1)、本発明者らは、リンパ節の状態が交絡因子であり得るかどうかを検証した。リンパ節陰性(pN0)患者において、ROBO4の発現は、転移のリスクと関連していなかった(示されていない)。逆に、分析がリンパ節陽性(pN+)患者に限定された場合、高いROBO4レベルは、遠隔再発(ログランク検定により $P = 0.07$)及び骨再発(ログランク検定により $P = 0.018$)と相関していた。従って、高いROBO4の発現は、悪い予後に相関していた。

40

【0084】

ROBO1のサイレンシングは、実験的な原発性腫瘍増殖を増強するが、ROBO4のサイレンシングは減少させる

ROBO1 / ROBO4発現とマウス乳腺内の腫瘍増殖との間に関連があるかどうかを決定するために、本発明者らは、RNA干渉戦略を使用して、ヒトMDA-MB-231/B02乳癌細胞におけるROBO1又はROBO4の内因性レベルを安定に減少させた。shRNAにより媒介されるサイレンシングは、スクランブルでトランスフェクション

50

されたScRobo1及びMDA-MB-231/B02親細胞において観察されたものと比較して、Robo1タンパク質レベルを90%超で減少させた。Robo4レベルは、ShRobo1及びScRobo1乳癌細胞において依然として不変であった。その後、ROBO1についてサイレンシングさせたMDA-MB-231/B02トランスフェクタントのプール(クローンSh1.32及びSh1.33)及び偽トランスフェクタントのプール(クローンSc2.1及びSc2.4)を、免疫不全マウスのマウス乳腺内の同所に埋め込んだ。原発性腫瘍サイズの中央値の分析により、ShRobo1腫瘍が、ScRobo1腫瘍よりも大きいことが実証された。マウス内皮細胞を特異的に認識する抗CD31抗体を用いた腫瘍異種移植片の免疫組織化学的分析は、ROBO1のサイレンシングが、ScRobo1腫瘍と比較して、ShRobo1腫瘍微小血管の密度の実質的な増加をもたらしたことを示した。ShRobo1乳癌細胞によって産生されたVEGFレベルもまた、ScRobo1及び親B02細胞と比較して統計学的に有意に増加していた(データは示していない)。著しく対照的には、ROBO4についてサイレンシングされたB02乳癌細胞のマウス乳腺内の同所への埋め込みは、ScRobo4腫瘍と比較して原発性ShRobo4腫瘍サイズの中央値の3倍の減少をもたらした。より小さなサイズのShRobo4腫瘍は、CD31免疫染色によって判断されたところ、減少した腫瘍血管新生を伴った。しかしながら、ShRobo4及びScRobo4乳癌細胞によって産生されたVEGFレベルは類似していた。総合すると、これらのデータは、腫瘍細胞上に発現されたRobo1及びRobo4は拮抗機能を有し; Robo1及びRobo4はそれぞれ、原発性腫瘍増殖の正及び負の調節因子であることを示唆した。

10

20

【0085】

Robo1及びRobo4は、乳癌の骨での増殖及び溶骨性病変の形成を差次的に調節する

骨転移におけるRobo1及びRobo4の役割を試験するために、ROBO1についてサイレンシングされたMDA-MB-231/B02トランスフェクタントのプール(クローンSh1.32及びSh1.33)、又はROBO4についてサイレンシングされたトランスフェクタントのプール(クローンSh2.6及びSh4.5)、又はROBO1(クローンSc2.1及びSc2.4)及びROBO4(クローンSc1.2及びSc2.2)についてのそれぞれの偽トランスフェクタントのプールを、免疫不全マウスの尾動脈に注射した。この動物モデルを使用した、腫瘍細胞の注射から28日後のX線検査による分析により、ShRobo1腫瘍を有する動物の後肢における骨溶性病変の程度は増加し、偽トランスフェクションされたScRobo1腫瘍を有する動物よりも40%大きいことが判明した。この差は、組織形態計測検査によって決定されたところ、偽トランスフェクションされたScRobo1腫瘍を有するマウスと比較して、BV/TV比の著しい低下(より高度な骨の破壊を示す)及びTB/STV比の3倍増加(骨への腫瘍量の指標)を伴った。ROBO4のサイレンシングは、偽トランスフェクションされたScRobo4腫瘍を有するマウスと比較して、ShRobo4腫瘍を有する動物における骨溶性病変の程度のわずかな増加をもたらした。しかしながら、転移を有する後肢の組織形態計測分析は、BV/TV比及びTB/STV比は2つの動物群間で統計学的に有意に異ならなかったことを示した。興味深いことに、ShRobo4腫瘍を有するマウスの転移性肢の骨組織切片の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)による染色は、腫瘍-骨の界面における活発な破骨細胞吸収表面は、ScRobo4腫瘍と比較して実質的に増加していたことを示した。対照的に、ShRobo1又はScRobo1腫瘍を有するマウスの転移性肢における活発な破骨細胞吸収表面は類似していた。これらの観察は、破骨細胞により媒介される骨破壊を調節する際の腫瘍由来Robo4の特異的な役割を指摘し、一方、腫瘍細胞上で発現されるRobo1は、骨における転移性増殖に関連していた。

30

40

【0086】

腫瘍細胞におけるROBO4(又はROBO1)のサイレンシングが、破骨細胞形成に影響を及ぼし得るかどうかが直接試験するために、本発明者らは、種々のトランスフェクタントの馴化培地と一緒に、RANKL及びマクロファージコロニー刺激因子(これらは

50

破骨細胞形成を誘導するために両方共に必要とされかつ十分である2つの造血因子である)を用いて、一次マウス骨髄細胞培養液を処理した。インビボのデータと一致して、Sh-Robo1及びSc-Robo1 B02乳癌細胞の馴化培地は、TRAP陽性多核破骨細胞の形成を同程度刺激した。逆に、Sh-Robo4 B02細胞の馴化培地は、Sc-Robo4細胞と比較して、破骨細胞形成の2倍の増加を誘導した。その後、本発明者らは、ヒトサイトカイン抗体アレイを使用して、トランスフェクタントからの馴化培地中のサイトカインを測定した。破骨細胞の活性を刺激することが知られているいくつかのサイトカイン及びインターロイキン(MCP-1、GM-CSF、PLGF、VEGF、IL-6、IL-8)が、これらのトランスフェクタントによって産生されていた。サイトカインプロファイルは、Sc-及びSh-Robo1細胞について類似していた。対照的に、サイトカインアレイ及びELISAによって決定したところ、Sc-Robo4細胞よりも、Sh-Robo4細胞によってPLGF、MCP-1及びIL-8のより多くの産生がもたらされた。これらのサイトカインはまた、インビボにおいても検出された。さらに、PLGF及びIL-8(しかしMCP-1ではない)の濃度は、対照群よりもSh-Robo4腫瘍を有する動物の血清中でより高かった。それ故、Sh-Robo4腫瘍を有する動物の転移性肢における増強された活発な破骨細胞吸収表面は、インビボにおける腫瘍細胞によるより多くの骨破壊誘発性サイトカインの産生の結果のようであった。逆に、Robo1欠損腫瘍を有する動物におけるより大きな骨溶性病変は、ROBO1のサイレンシングに直接関連していなかったが、骨髄に存在し、それにより、破骨細胞により媒介される骨破壊を刺激したより多数のSh-Robo1腫瘍細胞の間接的な結果であった。

10

20

【0087】

乳癌細胞の細胞遊走及び浸潤に対する、抗体によるROBO1及びROBO4のサイレンシング又は標的化の効果

これらの結果を鑑みて、本発明者らは、ROBO1のサイレンシングは、Sh-Robo1腫瘍細胞によるより迅速な骨への定着をもたらし得ると推測した。実際に、文献にはSlit-Robo1が癌細胞の遊走を調節するといういくつかのエビデンスが存在する(Mehlen et al., 2011)。それ故、本発明者らは、Robo1及び/又はRobo4が、改変されたボイデンチャンパーアッセイを使用して、乳癌細胞の遊走/浸潤を調節し得るかどうかを調べた。本発明者らはまず、血清への乳癌細胞の走化性応答に対するROBO1又はROBO4のサイレンシングの効果を試験した。スクランブルでトランスフェクションされたSc-Robo1細胞(クローンSc2.1及びSc2.4のプール)と比較して、Sh-Robo1でトランスフェクションされた細胞(クローンSh1.32及びSh1.33のプール)の遊走は1.5倍から2倍増加した。同様に、Sc-Robo1細胞と比較してSh-Robo1細胞の浸潤は実質的に増加した。対照的に、ROBO4のサイレンシングは、対照細胞(クローンSc1.2及びSc2.2のプール)と比較して、Sh-Robo4細胞(クローンSh2.6及びSh4.5のプール)の遊走の統計学的に有意な減少をもたらした。さらに、Sc-Robo4細胞と比較して、Sh-Robo4細胞の浸潤は4倍減少した。次に、本発明者らは、親B02乳癌細胞の浸潤に対する、抗体を用いてのRobo1又はRobo4の標的化の利点を評価した。アイソタイプの一一致した対照抗体と比較して、モノクローナル抗Robo1抗体を用いてのB02乳癌細胞の処置は浸潤性を促進し、一方、B02細胞の浸潤は、漸増濃度のポリクローナル抗Robo4抗体の存在下で用量依存的に阻害された。総合すると、本発明者らは、腫瘍細胞におけるRobo1及びRobo4は、それぞれ、抗浸潤特性及び浸潤誘発特性を有すると結論付けた。

30

40

【0088】

それ故、これらの結果は、Robo1のサイレンシングは、静脈内に注射されると、乳癌細胞がより迅速に骨に定着するように導き得、これにより、Robo1欠損腫瘍を有する動物の肢におけるより多い骨への腫瘍量が説明されることを示唆した。この仮定は、実際に、Sc-Robo1及びSh-Robo1でトランスフェクションされた細胞が、脛

50

骨髄腔に直接接種されると、対照又はRobo1の欠失した腫瘍を有するマウスが、X線検査及び組織形態計測検査によって決定されたところ、同程度の骨破壊及び骨への腫瘍量を有していたという観察によって支持された。従って、ROBO1のサイレンシングは、腫瘍細胞にインビボにおけるより高い浸潤性を賦与した。骨転移におけるRobo4の機能に関して、Sh-Robo4腫瘍細胞によって形成される骨溶性病変は、Sc-Robo4腫瘍を有する動物の転移性肢に観察されたものと同等であった。これは、ROBO4のサイレンシングが、Sc-Robo4腫瘍と比較して、転移性動物においての骨への腫瘍量を減少させたことを考えると意外であった。しかしながら、また、Sc-Robo4腫瘍と比較してSh-Robo4腫瘍を有する動物の腫瘍-骨の界面においてTRAP陽性破骨細胞が著しく増加し、及び、Sc-Robo4腫瘍と比較してSh-Robo4腫瘍を有する動物の血清中に高レベルの骨破壊促進性サイトカインIL-8が存在していた。従って、Sh-Robo4腫瘍細胞の高い内因性破骨細胞刺激活性は、なぜSh-Robo4腫瘍を有する動物が、骨への腫瘍量の減少にも関わらず、骨溶性病変を示したのかを説明するようであった。

10

【0089】

ROBO4のサイレンシングは、骨髄における乳癌細胞の生存及び増殖を減少させる
腫瘍細胞の浸潤は、骨転移形成中の非常に早期の段階で起こり、これにより腫瘍細胞が骨髄において播種及び栄えることを可能とする(Weilbaecher et al., 2011)。Robo1及びRobo4はインビトロにおいて乳癌細胞の浸潤を、及びインビボにおいて骨への転移の形成を調節していたので、本発明者らは、これらの受容体が、骨髄微小環境における腫瘍細胞の生着を促進し得ると仮定した。この問題に対処するために、Sh-Robotoランスフェクタント及び親B02乳癌細胞を、動物の尾動脈に注射し、その後、これらの動物を、腫瘍細胞の接種後の7日目に選別し、この時にはX線検査、生物発光イメージング及び組織学的検査によって判断したところ転移のエビデンスは全くない(Garcia et al., 2008)。その後、これらの動物の後肢から骨髄を洗い流し、抗生物質の選択下の培養液に入れ、抗生物質耐性腫瘍細胞の選択的増殖を可能とした。親B02細胞又はSh-Robo1細胞の接種されたマウスと比較して、Sh-Robo4細胞の接種されたマウスの骨髄における腫瘍細胞コロニー数は、75から80%減少した。さらに、脛骨の骨髄腔に直接接種し、腫瘍増殖について追跡した場合に、骨髄におけるSh-Robo4コロニーの数は、Sc-Robo4細胞について観察されたのと比較して78%減少した。腫瘍細胞を足場とは独立して軟アガー中で増殖させた場合に同じような効果が観察された。Sc-Robo4及び親B02細胞と比較して、Sh-Robo4細胞によって形成されたコロニーの数及びサイズは統計学的に有意に減少した。従って、Robo4は、骨髄における乳癌細胞の生存にとって必要とされた。

20

30

【0090】

実施例2:

抗Robo4抗体で前処理されたB02細胞を、免疫不全マウスの尾動脈に注射した。腫瘍細胞の接種から1週間後、これらの動物の後肢から骨髄を洗い流し、抗生物質の選択下の培養液に入れ、抗生物質に耐性な腫瘍細胞の選択的な増殖を可能とした。2週間培養した後、腫瘍細胞のコロニーを固定し、染色し、計数した。各シリーズの3つのウェルは、1匹の動物の骨髄からの腫瘍細胞コロニーの増殖を示す。1群あたり4匹のマウスが含まれていた。図9は、Robo4に対して指向されるポリクローナル抗体を用いてのヒトB02乳癌細胞の処置が、動物における骨髄微小転移の形成を阻害することを示す。PCR分析は、大半の乳癌細胞株がRobo1を発現したが、骨指向性を有するものだけが(B02及びMC-M1)Robo4を発現したことを示す。さらに、Hs578T及びT47D細胞がRobo2を強力に発現したことが判明した。

40

【0091】

【表 1】

特徴		n	Robo1 の発現			Robo4 の発現			
			低い ^(a)	高い ^(a)	P	低い ^(a)	高い ^(a)	P	
閉経期の状態	閉経前	147	77	70	.45	82	65	.08	10
	閉経後	107	50	57		47	60		
腫瘍サイズ	< 20 mm	103	60	43	.05	52	51	.99	
	> 20 mm	143	64	79		73	70		
組織学的等級	1	27	15	12	.74	15	12	.12	
	2	110	52	58		52	58		
	3	58	28	30		37	21		
リンパ節の状態	陰性	117	66	51	.13	74	43	.001	20
	1-3	83	35	48		39	44		
	> 3	54	26	28		16	38		
ERの状態	陰性	42	15	27	.06	22	20	.95	
	陽性	212	112	110		107	105		
PRの状態	陰性	55	26	29	.76	30	25	.63	
	陽性	199	101	98		99	100		

^(a) 低い: < 50%四分位値; 高い: > 50%四分位値

P値は、カイ二乗検定を使用した高い群と低い群との間の比較である。

表 1

【 0 0 9 2 】

【表 2】

参考文献:

Alajez, N.M., Lenarduzzi M, Ito E, Hui AB, Shi W, Bruce J, Yue S, Huang SH, Xu W, Waldron J, et al. (2011) MiR-218 suppresses nasopharyngeal cancer progression through downregulation of survivin and the SLIT2-ROBO1 pathway. *Cancer Res* 71, 2381-2391.

Bellahcène, A., Bachelier, R., Detry, C., Lidereau, R., Clézardin, P., and Castronovo, V. (2007) Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101, 135-148. 10

Berthier, A., Seguin, S., Sasco, A.J., Bobin, J.Y., De Laroche, G., Datchary, J., Saez, S., Rodriguez-Lafrasse, C., Tolle, F., Fraichard, A., et al. (2010) High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 102, 1024-1031.

Buijs, J.T., Henriquez, N.V., van Overveld, P.G., van der Horst, G., Que, I., Schwaninger, R., Rentsch, C., Ten Dijke, P., Cleton-Jansen, A.M., Driouch, K., Lidereau, R., et al. (2007) Bone morphogenetic protein 7 in the development and treatment of bone metastases from breast cancer. *Cancer Res* 67, 8742-8751. 20

Chang, P-H., Hwang-Verslues, W.W., Chang, Y-C., Chen, C-C., Hsiao, M., Jeng, Y-M., Chang, K-J., Lee, E. Y., Shew, J-Y., and Lee, W-H. (2012) Activation of Robo1 signaling of breast cancer cells by Slit2 from stromal fibroblast restrains tumorigenesis via blocking PI3K/Akt/b-catenin pathway. *Cancer Res* (in press).

Coleman, R., Gnant, M., Morgan, G., and Clézardin, P. (2012) Effects of bone-targeted agents on cancer progression and mortality. *J Natl Cancer Inst* 104, 1059-1067. 30

Dickinson, R.E., and Duncan, W.C. (2010) The SLIT-ROBO pathway: a regulator of cell function with implications for the reproductive system. *Reproduction* 139, 697-704.

Fradet, A., Sorel, H., Bouazza, L., Goehrig, D., Dépalle, B., Bellahcène, A., Castronovo, V., Follet, H., Descotes, F., Aubin, J.E., et al. (2011) Dual function of ERR α in breast cancer and bone metastasis formation: implication of VEGF and osteoprotegerin. *Cancer Res* 71, 5728-5738.

Garcia, T., Jackson, A., Bachelier, R., Clément-Lacroix, P., Baron, R., Clézardin, P., and Pujuguet, P. (2008). A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25,33-42. 40

Jones CA, Nishiya N, London NR, Zhu W, Sorensen LK, Chan AC, Lim CJ, Chen H, Zhang Q, Schultz PG, et al. (2009) Slit2-Robo4 signalling promotes vascular stability by blocking Arf6 activity. *Nat Cell Biol* 11, 1325-1331.

Marlow, R., Strickland P, Lee JS, Wu X, Pebenito M, Binnewies M, Le EK, Moran A, Macias H, Cardiff RD, et al. (2008) SLITs suppress tumor growth in vivo by silencing Sdf1/Cxcr4 within breast epithelium. *Cancer Res* 68, 7819-7827.

Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat Rev Cancer* 11, 188-197.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.

Peyruchaud, O., Serre, C. M., NicAmhlaoibh, R., Fournier, P., and Clézardin, P. (2003). Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J Biol Chem* 278, 45826-45832.

Prasad, A., Paruchuri, V., Preet, A., Latif, F., Ganju, R.K. (2008) Slit-2 induces a tumor-suppressive effect by regulating beta-catenin in breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 26624-26633.

Sin, S., Bonin, F., Petit, V., Meseure, D., Lallemand, F., Bièche, I., Bellahcène, A., Castronovo, V., de Wever, O., Gespach, C., et al. (2011) Role of the focal adhesion protein kindlin-1 in breast cancer growth and lung metastasis. *J Natl Cancer Inst* 103, 1323-1337.

Sun, H., Dai, K., Tang, T. and Zhang, X. (2009) Regulation of osteoblast differentiation by Slit2 in osteoblastic cells. *Cells Tissues Organs* 190, 69-80.

Weilbaecher, K.N., Guise, T.A., and McCauley, L.K. (2011) Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* 11, 411-424.

Ypsilanti, A.R., Zagar, Y., Chédotal, A. (2010) Moving away from the midline: new developments for Slit and Robo. *Development* 137, 1939-1952.

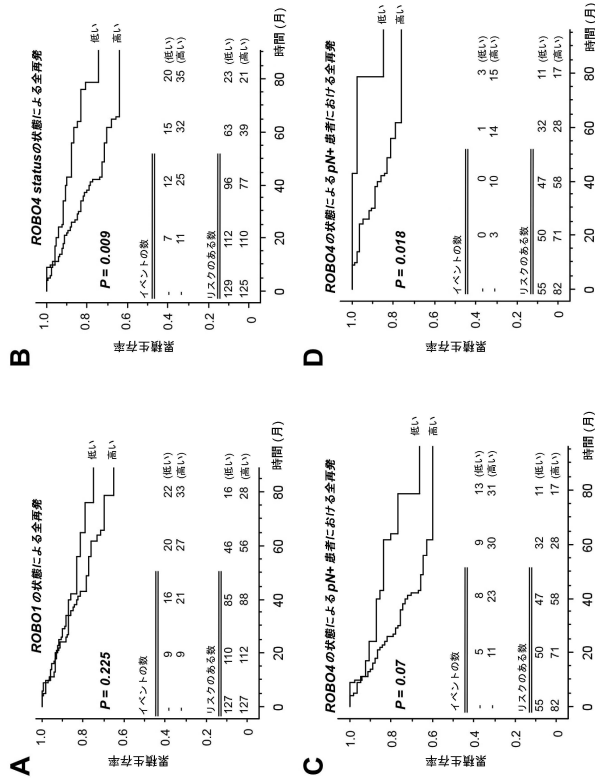
Yu, J., Cao, Q., Yu, J., Wu, L., Dallol, A., Li, J., Chen, G., Grasso, C., Cao, X., Lonigro, R.J., et al. (2010) The neuronal repellent SLIT2 is a target for repression by EZH2 in prostate cancer. *Oncogene* 29, 5370-5380.

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

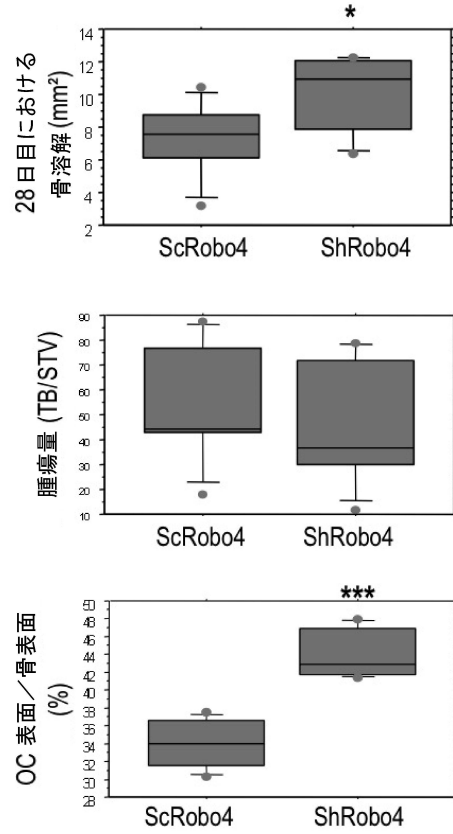
【 0 0 9 3 】

本出願全体を通して、様々な参考文献が、本発明が属する技術分野の最新技術を記載する。これらの参考文献の開示は、本開示への参照により本明細書に組み入れられる。

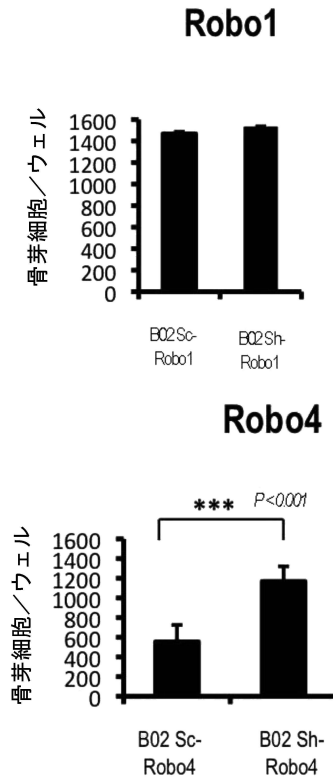
【 図 1 】



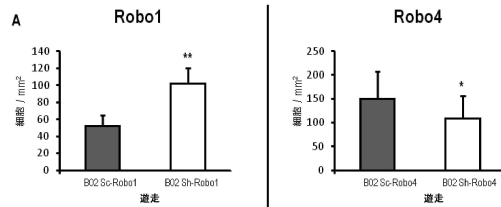
【 図 2 】



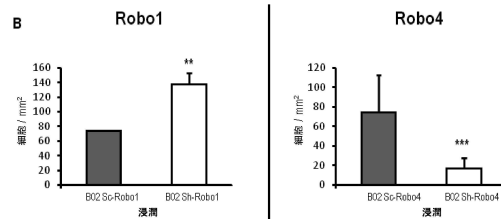
【 図 3 】



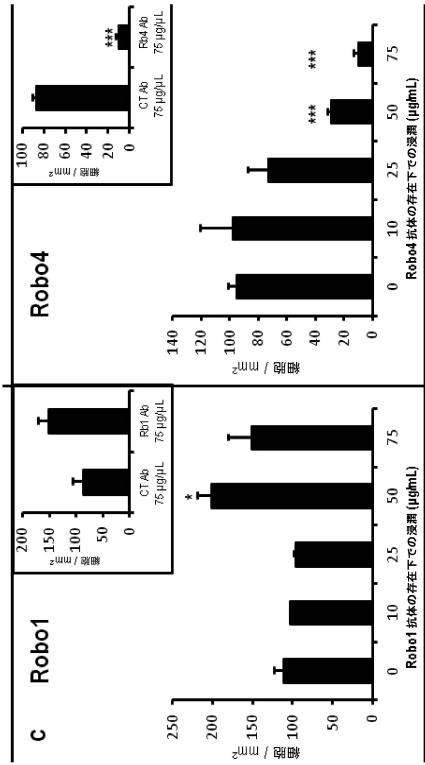
【 図 4 A 】



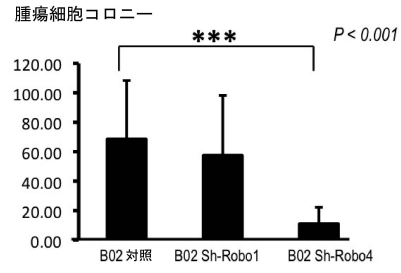
【 図 4 B 】



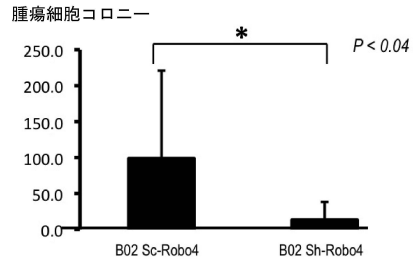
【 図 4 C 】



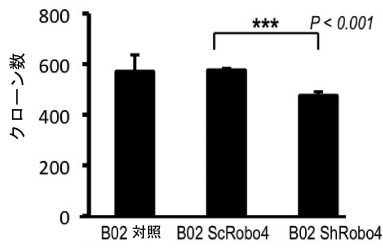
【 図 5 A 】



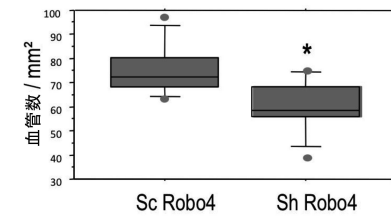
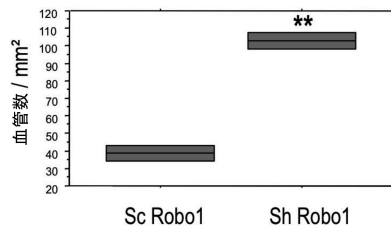
【 図 5 B 】



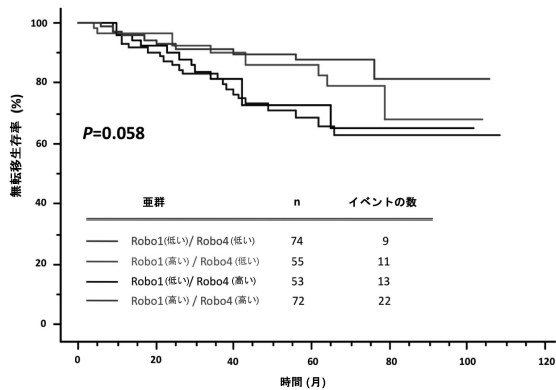
【 図 5 C 】



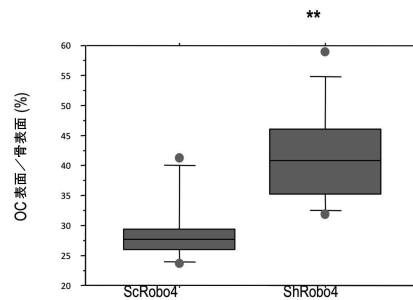
【 図 7 】



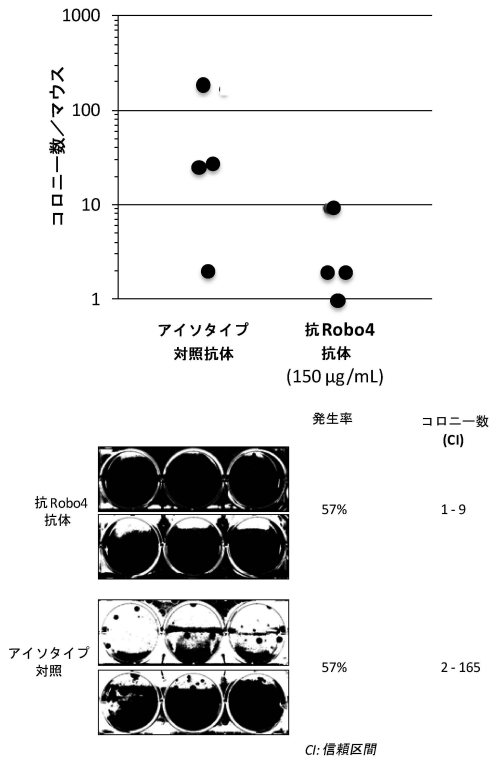
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

0006445446000001.app

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I			
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04		
C 1 2 Q 1/686	(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	Y	

- (31)優先権主張番号 61/777,518
(32)優先日 平成25年3月12日(2013.3.12)
(33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 クレジャルダン, フィリップ
フランス国、エフ - 6 9 3 7 2 リヨン・セデックス・0 8、リュ・ギョーム・パラダン、ユエフ
エール・ドゥ・メドスイーヌ・リヨン - エスト(ドメーヌ・ラエンネック)、アンセルム・ユエム
エール・1 0 3 3
- (72)発明者 エッケル, ベネディクト
フランス国、エフ - 6 9 3 7 2 リヨン・セデックス・0 8、リュ・ギョーム・パラダン、ユエフ
エール・ドゥ・メドスイーヌ・リヨン - エスト(ドメーヌ・ラエンネック)、アンセルム・ユエム
エール・1 0 3 3
- (72)発明者 ディアツ - ラトゥー, シャンタル
フランス国、エフ - 6 9 3 7 2 リヨン・セデックス・0 8、リュ・ギョーム・パラダン、ユエフ
エール・ドゥ・メドスイーヌ・リヨン - エスト(ドメーヌ・ラエンネック)、アンセルム・ユエム
エール・1 0 3 3
- (72)発明者 クレマン - ドゥマンジュ, リーズ
フランス国、エフ - 6 9 3 7 2 リヨン・セデックス・0 8、リュ・ギョーム・パラダン、ユエフ
エール・ドゥ・メドスイーヌ・リヨン - エスト(ドメーヌ・ラエンネック)、アンセルム・ユエム
エール・1 0 3 3

審査官 小堀 麻子

- (56)参考文献 特表2010-518115(JP, A)
Angiogenesis, 2008年, Vol.11, p.13-21
Cancer Control, 2012年 4月, Vol.19, No.2, p.92-101

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 K 3 1 / 0 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 0 0
G 0 1 N 3 3 / 5 3
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

专利名称(译)	治疗骨转录的方法		
公开(公告)号	JP6445446B2	公开(公告)日	2018-12-26
申请号	JP2015541132	申请日	2013-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Yuniberushite克劳德·伯纳德·里昂总理		
当前申请(专利权)人(译)	Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 Yuniberushite克劳德·伯纳德·里昂总理		
[标]发明人	クレジャルダンフィリップ エッケルベネディクト ディアツラトウーシャンタル クレマンドウマンジュリーズ		
发明人	クレジャルダン,フィリップ エッケル,ベネディクト ディアツ-ラトウー,シャンタル クレマン-ドウマンジュ,リーズ		
IPC分类号	A61K39/395 A61K38/17 A61K31/713 A61K31/7088 A61P19/00 A61P35/04 C12Q1/686 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/713 A61K38/177 A61K2039/505 A61P19/00 A61P35/04 C07K16/2803 C07K16/30 C07K16/3015 C07K2317/76 C12N15/1138 C12N15/1135 G01N33/57484 G01N33/574 C12N2310/14 C12N2310/531 A61K39/3955 C07K16/2875 C07K2317/24 C12N2310/11 C12N2310/12 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N33/57492 G01N2333/705		
FI分类号	A61K39/395.ZNA.T A61K38/17 A61K31/713 A61K31/7088 A61P19/00 A61P35/04 C12Q1/686.Z G01N33/53.Y		
优先权	2012306376 2012-11-08 EP 61/772999 2013-03-05 US 61/777518 2013-03-12 US		
其他公开文献	JP2016515092A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于治疗骨转移的方法和药物组合物。特别地，本公开内容提供了预防或治疗有需要的受试者的骨转移的方法，包括向受试者施用治疗有效量的抗-R0BO4抗体，抗-R0BO4适体，ROBO4诱饵多肽，ROBO4表达抑制剂。选择的物质。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6445446号 (P6445446)
(45) 発行日 平成30年12月26日 (2018.12.26)	(24) 登録日 平成30年12月7日 (2018.12.7)	
(51) Int. Cl. F I A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 Z N A T A 6 1 K 38/17 (2006.01) A 6 1 K 38/17 A 6 1 K 31/713 (2006.01) A 6 1 K 31/713 A 6 1 K 31/7088 (2006.01) A 6 1 K 31/7088 A 6 1 P 19/00 (2006.01) A 6 1 P 19/00		
請求項の数 11 (全 30 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-541132 (P2015-541132)	(73) 特許権者 591100596	
(86) (22) 出願日 平成25年11月7日 (2013.11.7)	アンステイチュ ナショナル ドウ ラ	
(65) 公表番号 特表2016-515092 (P2016-515092A)	サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メ	
(43) 公表日 平成28年5月26日 (2016.5.26)	ディカル	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2013/073284	フランス国、エフ-75013 バリ、リ	
(87) 国際公開番号 W02014/072416	ュ・ドゥ・トルビアク IOI	
(87) 国際公開日 平成26年5月15日 (2014.5.15)	(73) 特許権者 596096180	
審査請求日 平成28年10月28日 (2016.10.28)	ユニベルシテ・クロード・ベルナル・リ	
(31) 優先権主張番号 12306376.0	ヨン・ブルミエ	
(32) 優先日 平成24年11月8日 (2012.11.8)	フランス、69100 ヴィユールバンヌ	
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)	、ブルヴァール ドウ オンズ ノヴァン	
(31) 優先権主張番号 61/772,999	ブル 1918, 43	
(32) 優先日 平成25年3月5日 (2013.3.5)	(74) 代理人 110001508	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	特許業務法人 津国	
	最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 骨転移の治療のための方法及び医薬組成物		