

(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2015-509489

(P2015-509489A)

(43) 公表日 平成27年3月30日(2015.3.30)

(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	2 G 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/145 (2006.01)	A 6 1 K 31/145	4 C 2 0 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 131 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-556787 (P2014-556787)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月11日 (2013.2.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月2日 (2014.10.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/025601
 (87) 国際公開番号 W02013/120086
 (87) 国際公開日 平成25年8月15日 (2013.8.15)
 (31) 優先権主張番号 61/597,550
 (32) 優先日 平成24年2月10日 (2012.2.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

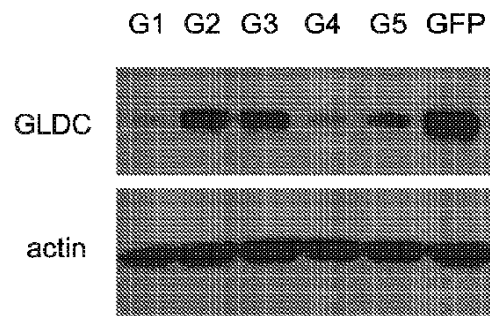
(71) 出願人 500482810
 ホワイトヘッド・インスティテュート・フ
 ォー・バイオメディカル・リサーチ
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ州 O
 2 1 4 2 ケンブリッジ、ナイン・ケンブ
 リッジ・センター (番地なし)
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんの処置のためのグリシン開裂系の阻害

(57) 【要約】

一部の態様において、腫瘍細胞の生存または増殖を阻害する方法であって、腫瘍細胞のグリシン開裂系 (GCS) を阻害するステップを含む方法が提供される。一部の態様において、腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、腫瘍におけるGCSを阻害するステップを含む方法。一部の実施形態において、方法は、腫瘍細胞または腫瘍をGCS阻害剤と接触させるステップを含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍は、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ2 (SHMT2) の発現が上昇している。一部の態様において、GCSの阻害に対し感受性である腫瘍細胞または腫瘍を同定する方法であって、腫瘍細胞または腫瘍が、SHMT2を過剰発現するかどうかを決定するステップを含む方法が提供される。一部の態様において、候補抗がん剤を同定する方法であって、GCS阻害剤を同定または修飾するステップを含む方法が提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、前記細胞をグリシン開裂系（GCS）の阻害剤と接触させるステップを含む方法。

【請求項 2】

前記腫瘍細胞が、対照細胞と比較してセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ 2（S H M T 2）を過剰発現する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記腫瘍細胞が、脳腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、頸部腫瘍細胞、結腸直腸腫瘍細胞、胚性腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、生殖細胞腫瘍細胞、頭頸部腫瘍細胞、血液系腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、メラノーマ細胞、中皮腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、卵黄嚢腫瘍細胞または肉腫細胞である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記腫瘍細胞が、多形神経膠芽腫（G B M）細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記腫瘍細胞が、腫瘍幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記腫瘍細胞が、ヒト腫瘍細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 GCS 阻害剤が、低分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 8】

前記 GCS 阻害剤が、RNAi 剤を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 GCS 阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、アナログもしくはプロドラッグを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 GCS 阻害剤が、グリシン脱水素酵素（G L D C）阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 GCS 阻害剤が、グリシン開裂系タンパク質 H（G C S H）阻害剤である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記腫瘍細胞が、対象中に存在する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

S H M T 2 を過剰発現する細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、前記細胞を GCS の阻害剤と接触させるステップを含む方法。

【請求項 14】

前記細胞が、腫瘍細胞である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

候補抗腫瘍剤を同定する方法であって、被験薬剤が、GCS 構成成分に結合するかもしれない GCS 構成成分を阻害するかまたは GCS を阻害するかどうかを決定するステップを含み、前記被験薬剤が GCS 構成成分に結合するもしくは GCS 構成成分を阻害するまたは GCS を阻害する場合、前記被験薬剤が候補抗腫瘍剤として同定される方法。

40

【請求項 16】

(a) 1 種または複数の GCS 構成成分を用意するステップと、(b) 被験薬剤を用意するステップと、(c) 前記被験薬剤が、前記 GCS 構成成分の 1 種または複数に結合するかまたは前記 GCS 構成成分の 1 種または複数に阻害するかどうかを決定するステップとを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 GCS 構成成分が、組換えにより産生されたポリペプチドである、請求項 16 に記

50

載の方法。

【請求項 18】

前記被験薬剤が、低分子である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

ハイスループットスクリーニングを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも 1,000 種の被験薬剤を検査するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 21】

前記被験薬剤が、GCS 構成成分の酵素活性を阻害するかどうかを決定するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。 10

【請求項 22】

前記被験薬剤が、GLDC に結合するかまたは GLDC を阻害するかどうかを決定するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 23】

前記被験薬剤が、GCSH に結合するかまたは GCSH を阻害するかどうかを決定するステップを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 24】

前記被験薬剤が、腫瘍細胞の増殖もしくは生存を阻害するかまたは腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。 20

【請求項 25】

前記被験薬剤が、SHMT2 を過剰発現する腫瘍細胞の増殖もしくは生存を阻害するかまたは SHMT2 を過剰発現する腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 26】

前記被験薬剤が、非腫瘍細胞に対するその効果と比較して、腫瘍細胞の増殖または生存を選択的に阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 27】

前記被験薬剤が、非腫瘍細胞に対するその効果と比較して、SHMT2 を過剰発現する腫瘍細胞の増殖または生存を選択的に阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。 30

【請求項 28】

前記被験薬剤を、腫瘍を患っている対象に投与するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 29】

変更された被験薬剤を産生するステップと、前記変更された被験薬剤が、GCS 構成成分を阻害するか、GCS を阻害するか、腫瘍細胞の生存もしくは増殖を阻害するか、または腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害する能力を評価するステップとをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。 40

【請求項 30】

変更された被験薬剤を産生するステップと、前記変更された被験薬剤が、GCS 構成成分を阻害するか、GCS を阻害するか、SHMT2 を過剰発現する腫瘍細胞の生存もしくは増殖を阻害するか、または SHMT2 を過剰発現する腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害する能力を評価するステップとをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 31】

抗腫瘍剤を同定する方法であって、(a) 腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を GCS 阻害剤と接触させるステップと、(b) 前記腫瘍細胞または腫瘍の生存、増殖、成長または転移が阻害されたかどうかを決定するステップとを含み、前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株また 50

は腫瘍の生存、増殖、成長または転移が阻害された場合、前記 G C S 阻害剤が抗腫瘍剤である方法。

【請求項 3 2】

ステップ (b) が、 (a) の前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の生存、増殖、成長または転移を対照値と比較することを含み、 (a) の前記腫瘍細胞または腫瘍の生存、増殖、成長または転移が対照値と比較して低下している場合、前記 G C S 阻害剤が抗腫瘍剤として同定される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記腫瘍細胞または腫瘍が、 S H M T 2 を過剰発現する、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記対照値が、前記 G C S 阻害剤と接触されなかった場合の前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の生存、増殖、成長または転移を表す、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 5】

腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 G C S 阻害に対し感受性である見込みを予測する方法であって、 (a) 前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 S H M T 2 を過剰発現するかまたは S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型に属するかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 S H M T 2 を過剰発現する場合または S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型に属する場合、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 S H M T 2 を過剰発現しない場合または S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型に属しない場合よりも、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加している方法。

【請求項 3 6】

腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 S H M T 2 を過剰発現する場合、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 S H M T 2 を過剰発現しない場合よりも、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、 G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加している、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

腫瘍または腫瘍細胞株が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップが、 (a) 前記腫瘍または腫瘍細胞株から得られた試料における S H M T 2 遺伝子産物のレベルを決定することと、 (b) 前記レベルを S H M T 2 遺伝子産物の対照レベルと比較することとを含み、 (a) において決定された前記レベルが前記対照レベルを超える場合、 (a) において決定された前記レベルが前記対照レベルを超えない場合よりも、前記腫瘍または腫瘍細胞株が、 G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加している、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

S H M T 2 遺伝子産物の前記対照レベルが、非腫瘍組織または非腫瘍細胞における前記遺伝子産物のレベルである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 S H M T 2 遺伝子産物が、 S H M T 2 R N A または S H M T 2 ポリペプチドである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 4 0】

腫瘍が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップが、 S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して、前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うことを含む、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 4 1】

腫瘍が S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップが、前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫であるかどうかを決定することを含む、請求項 3 5

10

20

30

40

50

に記載の方法。

【請求項 4 2】

G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加した腫瘍細胞または腫瘍を同定する方法であって、前記腫瘍細胞または腫瘍における S H M T 2 の発現を評価するステップを含み、前記腫瘍細胞または腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する場合、S H M T 2 が過剰発現されていない場合よりも、前記腫瘍細胞または腫瘍が、G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加している方法。

【請求項 4 3】

前記腫瘍細胞または腫瘍における S H M T 2 遺伝子産物のレベルを評価するステップを含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うステップを含み、I H C が、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して行われる、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

腫瘍のための処置を必要とする対象が、G C S 阻害剤による処置に適した候補であるかどうかを決定する方法であって、前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現するかまたは S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する場合または S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである場合、前記対象が、G C S 阻害剤による処置に適した候補である方法。

【請求項 4 6】

前記腫瘍が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップが、(a) 前記腫瘍から得られた試料における S H M T 2 遺伝子産物のレベルを決定することを含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記レベルを S H M T 2 遺伝子産物の対照レベルと比較するステップをさらに含み、(a) において決定された前記レベルが、前記対照レベルを超える場合、前記対象が、G C S 阻害剤による処置に適した候補である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

S H M T 2 遺伝子産物の前記対照レベルが、非腫瘍組織または非腫瘍細胞における前記遺伝子産物のレベルである、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記 S H M T 2 遺伝子産物が、S H M T 2 R N A または S H M T 2 ポリペプチドである、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うステップを含み、I H C が、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して行われる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記腫瘍が、S H M T 2 の過剰発現を起こし易い腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップが、前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫であるかどうかを決定することを含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 5 2】

腫瘍のための処置を必要とする対象のための治療剤を選択する方法であって、(a) 前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現するかまたは S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップと、(b) 前記対象のための治療剤を、ステップ (a) の結果の少なくとも一部に基づき選択するステップとを含む方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する場合または S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである場合、ステップ (b) が、治療剤として G C S 阻害剤を選択することを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

ステップ (a) が、前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うことを含み、I H C が、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して行われる、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、前記対象に G C S 阻害剤を投与するステップを含む方法。 10

【請求項 5 6】

前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現することを決定するステップを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記腫瘍から得られた試料において I H C を行うことにより、前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現することを決定するステップを含む、請求項 5 5 に記載の方法。 20

【請求項 6 0】

前記腫瘍が、前記 G C S の阻害に対し感受性であることを決定するステップを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記対象が、前記腫瘍を処置するための G C S 阻害剤による処置に適した候補であることを決定するステップを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記 G C S 阻害剤が、R N A i 剤を含む、請求項 5 5 に記載の方法。 30

【請求項 6 3】

前記 G C S 阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、アナログもしくはプロドラッグを含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 G C S 阻害剤が、G L D C 阻害剤である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 G C S 阻害剤が、G C S H 阻害剤である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である、請求項 5 5 に記載の方法。 40

【請求項 6 7】

前記腫瘍が、G B M である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 8】

放射線療法を前記対象に施すステップをさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 9】

第 2 の抗腫瘍剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 7 0】

腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、(a) 対象が、S H M T 50

2を過剰発現する腫瘍を有することを決定するステップと、(b)前記対象をGCS阻害剤により処置するステップとを含む方法。

【請求項71】

前記腫瘍がSHMT2を過剰発現することを決定するステップが、前記腫瘍から得られた試料においてIHCを行うことを含む、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記GCS阻害剤が、RNAi剤を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項73】

前記GCS阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、プロドラッグもしくはアナログを含む、請求項70に記載の方法。

【請求項74】

前記GCS阻害剤が、GLDC阻害剤である、請求項70に記載の方法。

【請求項75】

前記GCS阻害剤が、GCSH阻害剤である、請求項70に記載の方法。

【請求項76】

前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である、請求項70に記載の方法。

【請求項77】

前記腫瘍が、GBMである、請求項70に記載の方法。

【請求項78】

放射線療法を使用して前記対象を処置するステップをさらに含む、請求項70に記載の方法。

【請求項79】

第2の抗腫瘍剤により前記対象を処置するステップをさらに含む、請求項70に記載の方法。

【請求項80】

腫瘍のための処置を必要とする対象をモニターする方法であって、(a)前記対象にGCS阻害剤を投与するステップと、(b)投与後の1または複数の時点において前記対象をモニターするステップとを含む方法。

【請求項81】

前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現する、請求項80に記載の方法。

【請求項82】

前記GCS阻害剤が、RNAi剤を含む、請求項80に記載の方法。

【請求項83】

前記GCS阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、プロドラッグもしくはアナログを含む、請求項80に記載の方法。

【請求項84】

前記GCS阻害剤が、GLDC阻害剤である、請求項80に記載の方法。

【請求項85】

前記GCS阻害剤が、GCSH阻害剤である、請求項80に記載の方法。

【請求項86】

前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である、請求項80に記載の方法。

【請求項87】

前記腫瘍が、GBMである、請求項80に記載の方法。

【請求項88】

放射線療法を使用して前記対象を処置するステップをさらに含む、請求項80に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 89】

第2の抗腫瘍剤により前記対象を処置するステップをさらに含む、請求項80に記載の方法。

【請求項 90】

(a)有効量のGCS阻害剤と、(b)薬学的に許容される担体とを含む、抗腫瘍療法のための医薬組成物。

【請求項 91】

腫瘍の処置のための対象への投与に適切な量でGCS阻害剤を含む単位剤形。

【請求項 92】

(a)GCS阻害剤と、(b)第2の抗腫瘍剤とを含む組成物。

10

【請求項 93】

(a)SHMT2遺伝子産物に結合する試薬と、(b)(i)腫瘍がSHMT2を過剰発現するかどうかを決定するために前記試薬を使用するための説明書、(ii)検出試薬および(iii)対照試薬からなる群から選択される少なくとも1種の物品とを含むキット。

【請求項 94】

(a)の前記試薬が、SHMT2ポリペプチドに結合する抗体を含む、請求項93に記載のキット。

【請求項 95】

(a)の前記試薬が、SHMT2ポリペプチドをコードするmRNAに結合するプローブまたはプライマーを含む、請求項93に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の引用

本願は、2012年2月10日に提出された米国仮出願第61/597,550号の利益を主張する。上記出願の教示全体は、本明細書に参考として援用される。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

がんは、主な死亡原因であり、世界保健機関(World Health Organization)によると、2008年における世界中のおよそ760万名の死亡の原因であった(全死亡の13%前後)。いくつかの腫瘍型の薬理療法において注目すべき成功が達成されてきたが、多くの腫瘍は、依然として処置が困難である。例えば、成人に最もよく見られる原発性脳腫瘍である多形神経膠芽腫(GBM)患者の平均余命は、現在最先端の治療法で処置した場合であっても、診断後約12~18ヶ月である。がんの処置のための新たな標的および治療アプローチの必要がある。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

概要

一部の態様において、本開示は、腫瘍細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、前記細胞のグリシン開裂系(GCS)を阻害するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、方法は、腫瘍細胞をGCS阻害剤と接触させるステップを含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ2(SHMT2)を過剰発現する。

40

【0004】

一部の態様において、本開示は、腫瘍の維持、成長または転移を阻害する方法であって、腫瘍をGCS阻害剤と接触させるステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、腫瘍は、SHMT2を過剰発現する。一部の実施形態において、方法は、腫瘍がS

50

H M T 2 を過剰発現することを決定するステップを含む。

【 0 0 0 5 】

一部の態様において、本開示は、腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、前記対象を G C S 阻害剤で処置するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、対象を処置する方法は、(a) 腫瘍のための処置を必要とする対象を用意するステップと、(b) 前記対象に G C S 阻害剤を投与するステップとを含む。一部の実施形態において、腫瘍は、S H M T 2 を過剰発現する。一部の実施形態において、方法は、(a) 対象が腫瘍を有すると診断するステップと、(b) 前記対象を G C S 阻害剤で処置するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(a) 対象が腫瘍を有すると診断するステップと、(b) 前記対象に G C S 阻害剤を投与するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、対象が、S H M T 2 を過剰発現する腫瘍を有すると決定するステップを含む。

10

【 0 0 0 6 】

一部の態様において、本開示は、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を分類する方法であって、前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍における S H M T 2 発現を評価するステップと、(b) ステップ (a) の結果に基づき前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を分類するステップとを含む方法を提供する。一部の実施形態において、ステップ (b) は、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍が S H M T 2 を過剰発現する場合、G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加したと前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を分類することを含む。

【 0 0 0 7 】

一部の態様において、本開示は、G C S 阻害剤による処置に適した候補である対象を同定する方法であって、前記対象から得られた腫瘍試料における S H M T 2 発現を評価するステップを含む方法を提供する。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 0 8 】

【 図 1 A 】 図 1 A ~ 1 C は、G L D C をノックダウンする s h R N A は、G B M S C に毒性であることを示す。B T 1 4 5 細胞は、G L D C (G 1 から G 5) を標的化するヘアピンを発現しているレンチウイルスまたは G F P を標的化する対照ヘアピンのいずれかを感染させた。(A) G L D C についてのウエスタンブロッティングは、ヘアピン G 1、G 4 および G 5 について G L D C 発現の強い抑制を実証する。(B) 細胞生存率が A T P アッセイを使用して測定された際に、本発明者らは、G F P 対照ヘアピンと比較して s h R N A G 1、G 4 および G 5 が細胞生存率を顕著に減らしたが、G 2 または G 3 s h R N A はしなかったことを見出した。G F P 対照に対する G 1、G 4 および G 5 の差異は、5 日目および 7 . 5 日目でそれぞれ統計的に有意であった ($p < 0 . 0 5$) (エラーバーは明確さのために示さない)。(C) G L D C ノックダウン後の B T 1 4 5 ニューロスフェアの形態は毒性を示す。示す通り G 2、G 3 および G F P で感染させたニューロスフェアは、大きく、円形で正常なスフェアを形成し、生存を示す。一方 G 1、G 4 または G 5 で感染させたスフェアは、小さく、不規則であって、崩壊の過程にあり、細胞死および増殖障害を示す。

30

【 図 1 B 】 図 1 A ~ 1 C は、G L D C をノックダウンする s h R N A は、G B M S C に毒性であることを示す。B T 1 4 5 細胞は、G L D C (G 1 から G 5) を標的化するヘアピンを発現しているレンチウイルスまたは G F P を標的化する対照ヘアピンのいずれかを感染させた。(A) G L D C についてのウエスタンブロッティングは、ヘアピン G 1、G 4 および G 5 について G L D C 発現の強い抑制を実証する。(B) 細胞生存率が A T P アッセイを使用して測定された際に、本発明者らは、G F P 対照ヘアピンと比較して s h R N A G 1、G 4 および G 5 が細胞生存率を顕著に減らしたが、G 2 または G 3 s h R N A はしなかったことを見出した。G F P 対照に対する G 1、G 4 および G 5 の差異は、5 日目および 7 . 5 日目でそれぞれ統計的に有意であった ($p < 0 . 0 5$) (エラーバーは明確さのために示さない)。(C) G L D C ノックダウン後の B T 1 4 5 ニューロスフェアの形態は毒性を示す。示す通り G 2、G 3 および G F P で感染させたニューロスフェア

40

50

は、大きく、円形で正常なスフェアを形成し、生存を示す。一方G 1、G 4またはG 5で感染させたスフェアは、小さく、不規則であって、崩壊の過程にあり、細胞死および増殖障害を示す。

【図1C】図1A～1Cは、GLDCをノックダウンするshRNAは、GBMSCに毒性であることを示す。BT145細胞は、GLDC(G 1からG 5)を標的化するヘアピンを発現しているレンチウイルスまたはGFPを標的化する対照ヘアピンのいずれかを感染させた。(A)GLDCについてのウエスタンブロッティングは、ヘアピンG 1、G 4およびG 5についてGLDC発現の強い抑制を実証する。(B)細胞生存率がATPアッセイを使用して測定された際に、本発明者らは、GFP対照ヘアピンと比較してshRNA G 1、G 4およびG 5が細胞生存率を顕著に減らしたが、G 2またはG 3 shRNAはしなかったことを見出した。GFP対照に対するG 1、G 4およびG 5の差異は、5日目および7.5日目でそれぞれ統計的に有意であった($p < 0.05$) (エラーバーは明確さのために示さない)。(C)GLDCノックダウン後のBT145ニューロスフェアの形態は毒性を示す。示す通りG 2、G 3およびGFPで感染させたニューロスフェアは、大きく、円形で正常なスフェアを形成し、生存を示す。一方G 1、G 4またはG 5で感染させたスフェアは、小さく、不規則であって、崩壊の過程にあり、細胞死および増殖障害を示す。

【0009】

【図2】図2は、様々な細胞株がGLDCのshRNA媒介ノックダウンについて感受性または非感受性のいずれかであることを示す。左表に赤字で示す通り、種々の起源の細胞株がGLDCノックダウンに対して感受性である。「感受性%」は、G 1またはG 5 shRNA発現に続く生存率における平均%降下を示し、100%は生存率の完全な消失を示す。右に、BT145生存率についてのプロットが(図1から)「感受性」群細胞の例として示されている。一方青字で示すのは、他の細胞が、5.3%感受性から-14.3%感受性の範囲でGLDCノックダウンに高度に非感受性である(負の値は、G 1またはG 5 shRNAで感染された場合、GFP shRNAと比較して細胞が14.3%高い生存率を有することを示す)。右に種々のshRNAで感染させたMCF7細胞の生存率についてのプロットが非感受性細胞株の例として示されている。BT145DIFおよび308DIFは、shRNA感染の前に血清処置によって分化されたBT145および0308GBMSC株を示す。

【0010】

【図3A】図3A～3Cは、GLDC shRNA感受性株はGCSの薬理的阻害および別のGCS構成成分(GCSH)のshRNAノックダウンにも感受性であるが、非感受性株はそうではないことを示す。(A)種々の細胞株は、1mMシステアミンで4日間処置された。相対光単位として表される細胞生存率を測定し、複数の実験からのデータを±S.Dとして示す。(B)GCSHについてのウエスタンブロッティングは、LN229細胞において、GCSHに対して方向付けられたGS 1、GS 2、GS 3およびGS 4レンチウイルスshRNAによるGCSH発現の強い抑制を実証する。(C)種々の細胞株をGS 1、GS 2、GS 3またはGS 4 shRNAで6日間で感染させた。細胞生存率を測定し、複数の実験からのデータを±S.Dとして示す。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。(A)および(C)についてアスタリスクは、未処置と比較したシステアミン処置後の細胞生存率における統計的に有意な減少($p < 0.05$)を示す。赤字はGLDC shRNA感受性株を示し、青字は非感受性株を示す。

【図3B】図3A～3Cは、GLDC shRNA感受性株はGCSの薬理的阻害および別のGCS構成成分(GCSH)のshRNAノックダウンにも感受性であるが、非感受性株はそうではないことを示す。(A)種々の細胞株は、1mMシステアミンで4日間処置された。相対光単位として表される細胞生存率を測定し、複数の実験からのデータを±S.Dとして示す。(B)GCSHについてのウエスタンブロッティングは、LN22

10

20

30

40

50

9細胞において、GCSHに対して方向付けられたGS1、GS2、GS3およびGS4レンチウイルスshRNAによるGCSH発現の強い抑制を実証する。(C)種々の細胞株をGS1、GS2、GS3またはGS4 shRNAで6日間で感染させた。細胞生存率を測定し、複数の実験からのデータを±S.Dとして示す。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。(A)および(C)についてアスタリスクは、未処置と比較したシステアミン処置後の細胞生存率における統計的に有意な減少($p < 0.05$)を示す。赤字はGLDC shRNA感受性株を示し、青字は非感受性株を示す。

【図3C】図3A~3Cは、GLDC shRNA感受性株はGCSの薬理的阻害および別のGCS構成成分(GCSH)のshRNAノックダウンにも感受性であるが、非感受性株はそうではないことを示す。(A)種々の細胞株は、1mMシステアミンで4日間処置された。相対光単位として表される細胞生存率を測定し、複数の実験からのデータを±S.Dとして示す。(B)GCSHについてのウエスタンブロットリングは、LN229細胞において、GCSHに対して方向付けられたGS1、GS2、GS3およびGS4レンチウイルスshRNAによるGCSH発現の強い抑制を実証する。(C)種々の細胞株をGS1、GS2、GS3またはGS4 shRNAで6日間で感染させた。細胞生存率を測定し、複数の実験からのデータを±S.Dとして示す。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。(A)および(C)についてアスタリスクは、未処置と比較したシステアミン処置後の細胞生存率における統計的に有意な減少($p < 0.05$)を示す。赤字はGLDC shRNA感受性株を示し、青字は非感受性株を示す。

【0011】

【図4】図4は、ミトコンドリアセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ発現は、GLDCノックダウン/GCS阻害への感受性と密接に相関することを示す。多数の細胞株は、細胞を回収し、グリシン開裂複合体または近位代謝酵素(proximal metabolic enzyme)に関与する種々の遺伝子についてのウエスタンブロットを行う2日前に同一の培地(EGFおよびFGFを補充したニューロベーサル培地(neurobasal media))で増殖された。赤字は図2に示す通り、本発明者らがGLDCノックダウンに感受性であると以前決定した細胞株を示し；青字は非感受性細胞株を示す。「BT145 Dif」および「0308 Dif」は、10%不活性化ウシ胎児血清を含有する培地で増殖させることによって分化を誘導されたBT145および0308GBM-SC株を示す。

【0012】

【図5A】図5A~5Eは、SHMT2のノックダウンがGLDCノックダウンの毒性作用に対してレスキューすることを示す。(A)SHMT2に対して方向付けられたshRNA S1~S5は、SHMT2を効果的にノックダウンする。示されるのは、S1~S5または対照(GFP)shRNAで5日間感染させたBT145細胞由来のウエスタンブロット分析である。同様の結果が種々の細胞株について観察された(未記載)。(B)種々の細胞株をS1~S5または対照(GFP)shRNAで6日間感染させ、次いで細胞生存率を測定した。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。データは、複数の実験からの平均±S.D.として示される。示される通り、SHMT2ノックダウンは、検査した全ての細胞株において細胞生存率に有意な影響を与えなかった。(C)SHMT2の消失がGLDCノックダウンへの細胞感受性に影響を与えるかを検討するための計画。細胞株は、SHMT2に対して方向付けられたshRNAで最初に感染され、次いでshRNAの安定な組込みおよび安定な発現を有する細胞を得るために5日間ピューロマイシン中で選択された。次にこれらの細胞をGLDCに対して方向付けられたshR

10

20

30

40

50

NAでの2回目の感染に供し、細胞生存率が5~7日目に測定された。(D)SHMT2またはGFP shRNA(X軸に標示)で安定に感染させ、次いでG1 shRNAで二次的に感染させた細胞の細胞生存率。点線は、最初にGFP shRNAを発現しており、次いでG1で7日間感染させた細胞の細胞生存率のレベルを示す。生存率は、各安定株を二次的にGFP shRNAで感染させた場合の生存率(100%として設定した)の%として表す。(E)GFPまたはS3 shRNAのいずれかを最初に発現しており、次いでG1、G4またはG5 shRNAで二次的に感染させたニューロスフェアの代表的な光学顕微鏡像。示される通り、shGFP発現細胞のG1、G4またはG5感染が細胞死を示唆する小さな、崩壊しているニューロスフェアを生じる一方で、S3を発現している細胞は保護される。

【図5B】図5A~5Eは、SHMT2のノックダウンがGLDCノックダウンの毒性作用に対してレスキューすることを示す。(A)SHMT2に対して方向付けられたshRNA S1~S5は、SHMT2を効果的にノックダウンする。示されるのは、S1~S5または対照(GFP)shRNAで5日間感染させたBT145細胞由来のウエスタンブロット分析である。同様の結果が種々の細胞株について観察された(未記載)。(B)種々の細胞株をS1~S5または対照(GFP)shRNAで6日間感染させ、次いで細胞生存率を測定した。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。データは、複数の実験からの平均±S.D.として示される。示される通り、SHMT2ノックダウンは、検査した全ての細胞株において細胞生存率に有意な影響を与えなかった。(C)SHMT2の消失がGLDCノックダウンへの細胞感受性に影響を与えるかを検討するための計画。細胞株は、SHMT2に対して方向付けられたshRNAで最初に感染され、次いでshRNAの安定な組み込みおよび安定な発現を有する細胞を得るために5日間ピュロマイシン中で選択された。次にこれらの細胞をGLDCに対して方向付けられたshRNAでの2回目の感染に供し、細胞生存率が5~7日目に測定された。(D)SHMT2またはGFP shRNA(X軸に標示)で安定に感染させ、次いでG1 shRNAで二次的に感染させた細胞の細胞生存率。点線は、最初にGFP shRNAを発現しており、次いでG1で7日間感染させた細胞の細胞生存率のレベルを示す。生存率は、各安定株を二次的にGFP shRNAで感染させた場合の生存率(100%として設定した)の%として表す。(E)GFPまたはS3 shRNAのいずれかを最初に発現しており、次いでG1、G4またはG5 shRNAで二次的に感染させたニューロスフェアの代表的な光学顕微鏡像。示される通り、shGFP発現細胞のG1、G4またはG5感染が細胞死を示唆する小さな、崩壊しているニューロスフェアを生じる一方で、S3を発現している細胞は保護される。

【図5C】図5A~5Eは、SHMT2のノックダウンがGLDCノックダウンの毒性作用に対してレスキューすることを示す。(A)SHMT2に対して方向付けられたshRNA S1~S5は、SHMT2を効果的にノックダウンする。示されるのは、S1~S5または対照(GFP)shRNAで5日間感染させたBT145細胞由来のウエスタンブロット分析である。同様の結果が種々の細胞株について観察された(未記載)。(B)種々の細胞株をS1~S5または対照(GFP)shRNAで6日間感染させ、次いで細胞生存率を測定した。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。データは、複数の実験からの平均±S.D.として示される。示される通り、SHMT2ノックダウンは、検査した全ての細胞株において細胞生存率に有意な影響を与えなかった。(C)SHMT2の消失がGLDCノックダウンへの細胞感受性に影響を与えるかを検討するための計画。細胞株は、SHMT2に対して方向付けられたshRNAで最初に感染され、次いでshRNAの安定な組み込みおよび安定な発現を有する細胞を得るために5日間ピュロマイシン中で選択された。次にこれらの細胞をGLDCに対して方向付けられたshR

10

20

30

40

50

NAでの2回目の感染に供し、細胞生存率が5~7日目に測定された。(D)SHMT2またはGFP shRNA(X軸に標示)で安定に感染させ、次いでG1 shRNAで二次的に感染させた細胞の細胞生存率。点線は、最初にGFP shRNAを発現しており、次いでG1で7日間感染させた細胞の細胞生存率のレベルを示す。生存率は、各安定株を二次的にGFP shRNAで感染させた場合の生存率(100%として設定した)の%として表す。(E)GFPまたはS3 shRNAのいずれかを最初に発現しており、次いでG1、G4またはG5 shRNAで二次的に感染させたニューロスフェアの代表的な光学顕微鏡像。示される通り、shGFP発現細胞のG1、G4またはG5感染が細胞死を示唆する小さな、崩壊しているニューロスフェアを生じる一方で、S3を発現している細胞は保護される。

【図5D】図5A~5Eは、SHMT2のノックダウンがGLDCノックダウンの毒性作用に対してレスキューすることを示す。(A)SHMT2に対して方向付けられたshRNA S1~S5は、SHMT2を効果的にノックダウンする。示されるのは、S1~S5または対照(GFP)shRNAで5日間感染させたBT145細胞由来のウエスタンブロット分析である。同様の結果が種々の細胞株について観察された(未記載)。(B)種々の細胞株をS1~S5または対照(GFP)shRNAで6日間感染させ、次いで細胞生存率を測定した。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。データは、複数の実験からの平均±S.D.として示される。示される通り、SHMT2ノックダウンは、検査した全ての細胞株において細胞生存率に有意な影響を与えなかった。(C)SHMT2の消失がGLDCノックダウンへの細胞感受性に影響を与えるかを検討するための計画。細胞株は、SHMT2に対して方向付けられたshRNAで最初に感染され、次いでshRNAの安定な組み込みおよび安定な発現を有する細胞を得るために5日間ピュロマイシン中で選択された。次にこれらの細胞をGLDCに対して方向付けられたshRNAでの2回目の感染に供し、細胞生存率が5~7日目に測定された。(D)SHMT2またはGFP shRNA(X軸に標示)で安定に感染させ、次いでG1 shRNAで二次的に感染させた細胞の細胞生存率。点線は、最初にGFP shRNAを発現しており、次いでG1で7日間感染させた細胞の細胞生存率のレベルを示す。生存率は、各安定株を二次的にGFP shRNAで感染させた場合の生存率(100%として設定した)の%として表す。(E)GFPまたはS3 shRNAのいずれかを最初に発現しており、次いでG1、G4またはG5 shRNAで二次的に感染させたニューロスフェアの代表的な光学顕微鏡像。示される通り、shGFP発現細胞のG1、G4またはG5感染が細胞死を示唆する小さな、崩壊しているニューロスフェアを生じる一方で、S3を発現している細胞は保護される。

【図5E】図5A~5Eは、SHMT2のノックダウンがGLDCノックダウンの毒性作用に対してレスキューすることを示す。(A)SHMT2に対して方向付けられたshRNA S1~S5は、SHMT2を効果的にノックダウンする。示されるのは、S1~S5または対照(GFP)shRNAで5日間感染させたBT145細胞由来のウエスタンブロット分析である。同様の結果が種々の細胞株について観察された(未記載)。(B)種々の細胞株をS1~S5または対照(GFP)shRNAで6日間感染させ、次いで細胞生存率を測定した。青線は(100%として設定した)対照(GFP)shRNAで感染させた場合の各細胞株についての細胞生存率を示す。したがって各細胞株についてのデータは、shGFPで感染させた場合の生存率と比較した%として示される。データは、複数の実験からの平均±S.D.として示される。示される通り、SHMT2ノックダウンは、検査した全ての細胞株において細胞生存率に有意な影響を与えなかった。(C)SHMT2の消失がGLDCノックダウンへの細胞感受性に影響を与えるかを検討するための計画。細胞株は、SHMT2に対して方向付けられたshRNAで最初に感染され、次いでshRNAの安定な組み込みおよび安定な発現を有する細胞を得るために5日間ピュロマイシン中で選択された。次にこれらの細胞をGLDCに対して方向付けられたshR

10

20

30

40

50

NAでの2回目の感染に供し、細胞生存率が5～7日目に測定された。(D)SHMT2またはGFP-shRNA(X軸に標示)で安定に感染させ、次いでG1-shRNAで二次的に感染させた細胞の細胞生存率。点線は、最初にGFP-shRNAを発現しており、次いでG1で7日間感染させた細胞の細胞生存率のレベルを示す。生存率は、各安定株を二次的にGFP-shRNAで感染させた場合の生存率(100%として設定した)の%として表す。(E)GFPまたはS3-shRNAのいずれかを最初に発現しており、次いでG1、G4またはG5-shRNAで二次的に感染させたニューロスフェアの代表的な光学顕微鏡像。示される通り、shGFP発現細胞のG1、G4またはG5感染が細胞死を示唆する小さな、崩壊しているニューロスフェアを生じる一方で、S3を発現している細胞は保護される。

10

【0013】

【図6A】図6A～6Bは、SHMT2タンパク質発現がGBMにおいて上昇していることを示す。(A)代表的な正常脳(白質領域)および3つの代表的なGBM腫瘍のIHC顕微鏡像。3つの画像は、7GBMについて観察されるシグナルの範囲を表す。視野は拡大率100Xである。(B)正常な脳およびGBM腫瘍におけるSHMT2の細胞質内点状染色パターンを示す高拡大率顕微鏡像。GBMのいくつかの細胞ではシグナルは、個々の粒状点が容易には識別されないほど強い。DABインキュベーション時間は全ての試料について同一であった。視野は拡大率600Xである。

【図6B】図6A～6Bは、SHMT2タンパク質発現がGBMにおいて上昇していることを示す。(A)代表的な正常脳(白質領域)および3つの代表的なGBM腫瘍のIHC顕微鏡像。3つの画像は、7GBMについて観察されるシグナルの範囲を表す。視野は拡大率100Xである。(B)正常な脳およびGBM腫瘍におけるSHMT2の細胞質内点状染色パターンを示す高拡大率顕微鏡像。GBMのいくつかの細胞ではシグナルは、個々の粒状点が容易には識別されないほど強い。DABインキュベーション時間は全ての試料について同一であった。視野は拡大率600Xである。

20

【発明を実施するための形態】

【0014】

I.用語集

【0015】

本開示において使用されている特定の用語に関する説明および情報を便宜上ここに集める。

30

【0016】

「薬剤」は、本明細書において、いずれかの物質、化合物(例えば、分子)、超分子複合体、材料またはこれらの組合せもしくは混合物を指すよう使用されている。化合物は、化学式、化学構造または配列により表すことのできるいずれかの薬剤となり得る。例示的な薬剤として、例えば、低分子、ポリペプチド、核酸(例えば、RNAi剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アプタマー)、脂質、多糖等が挙げられる。一般に、薬剤は、当技術分野において公知のいずれかの適した方法の使用により得ることができる。当業者であれば、例えば、薬剤の性質に基づき適切な方法を選択することができよう。薬剤は、少なくとも部分的に精製されていてよい。一部の実施形態において、薬剤は、様々な実施形態において、該薬剤に加えて、例えば、対イオン、水性もしくは非水性希釈剤もしくは担体、バッファー、保存料または他の成分を含有し得る組成物の一部として提供することができる。一部の実施形態において、薬剤は、塩、エステル、水和物または溶媒和物として提供することができる。一部の実施形態において、薬剤は、細胞透過性、例えば、細胞に取り込まれて、細胞内で、例えば、哺乳動物細胞内で作用して、生物学的効果を生じる典型的な薬剤の範囲内にある。特定の化合物は、特定の幾何的または立体異性的形態で存在し得る。様々な実施形態において、他に断りがなければ、シス-およびトランス-異性体、E-およびZ-異性体、R-およびS-エナンチオマー、ジアステレオマー、(D)-異性体、(L)-異性体、(-)-および(+)-異性体ならびにこれらのラセミ混合物およびこれらの他の混合物を含む係る化合物が、本開示に包含されている。特定の化合物

40

50

は、種々のプロトン化状態で存在し得る、種々の立体配置を有し得る、溶媒和物（例えば、水（即ち、水和物）または共通溶媒との）として存在し得る、および/または異なる結晶形（例えば、多形）もしくは異なる互変異性形態を有し得る。係る代替的プロトン化状態、立体配置、溶媒和物および形態を呈する実施形態は、適用できる場合、本開示に含まれている。

【0017】

第1の薬剤の「アナログ」は、第1の薬剤と構造的におよび/または機能的に同様の第2の薬剤を指す。第1の薬剤の「構造的アナログ」は、第1の薬剤と構造的に同様のアナログである。薬剤の構造的アナログは、該薬剤と実質的に同様の物理学的、化学的、生物学的および/または薬理学的特性（複数可）を有してよい、あるいは少なくとも1種の物理学的、化学的、生物学的または薬理学的特性において異なっていてよい。一部の実施形態において、少なくとも1種の係る特性は、該アナログを対象の目的に対しより適したものにすべく変更されていてよい。一部の実施形態において、薬剤の構造的アナログは、該薬剤の少なくとも1個の原子、官能基または下部構造が、該アナログにおいて異なる原子、官能基または下部構造に置き換えられているという点において該薬剤と異なる。一部の実施形態において、薬剤の構造的アナログは、該薬剤に存在する少なくとも1個の水素または置換基が、該アナログにおいて異なる部分（例えば、異なる置換基）に置き換えられているという点において、該薬剤と異なる。「基質アナログ」は、酵素反応の基質と構造的に似ている薬剤を指す。基質アナログの構造は、該基質アナログが、酵素との物理学的相互作用（例えば、結合）において正常な基質の代わりになることができるように、正常な基質の構造と十分に同様となり得る。一部の実施形態において、基質アナログの構造は、該基質アナログが、正常な基質と同様に化学反応を行うことができないように（例えば、反応は、検出可能に起こることができないまたはよりゆっくりと起こり得る）、正常な基質の構造と十分に異なる。「遷移状態アナログ」は、酵素反応における基質の遷移状態と構造的に似ている薬剤を指す。遷移状態アナログの構造は、該遷移状態アナログが、酵素と物理学的に相互作用（例えば、結合）することができるように、正常な遷移状態の構造と十分に同様となり得る。一部の実施形態において、遷移状態アナログの構造は、該遷移状態アナログが、正常な遷移状態と同様に化学反応を行うことができないように、正常な遷移状態の構造と十分に異なる。基質アナログまたは遷移状態アナログは、例えば、酵素活性部位を遮断することにより、酵素阻害剤として作用し得る。一部の実施形態において、基質アナログまたは遷移状態アナログは、酵素と反応して共有結合を形成する部分を含むことができる。

【0018】

用語「抗体」は、天然のものであれ、全面的にまたは部分的に合成により産生されたものであれ、免疫グロブリンを指す。抗体は、様々な実施形態において、哺乳動物、例えば、ヒトの、クラス：IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEまたはこれらのサブクラスのいずれかを含むいずれかの免疫グロブリンクラスのメンバーとなることができ、抗体断片となることができる。抗体は、種々の脊椎動物（例えば、哺乳類または鳥類）の生物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ヤギ、ニワトリ、ヒト、ラクダ科動物（camelid）、サメ等のいずれかから生じ得る、あるいは少なくとも一部は、前述の生物のいずれかに由来する免疫グロブリン遺伝子配列にコードされ得る。一部の実施形態において、抗体は、ナノボディである。本明細書において使用される場合、用語「抗体断片」は、完全抗体構造に満たない（例えば、2本の重鎖および2本の軽鎖で構成される従来の抗体の完全構造に満たない）ものを含有する、抗体の様々な部分のいずれかを指す。一般に、抗体断片は、完全抗体の特異的結合能力の少なくとも重要な意味を持つ部分を保持する。抗体断片の例として、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv、ディアボディ（diabody）、ミニボディ（minibody）、Fd断片およびシングルドメイン抗体が挙げられるがこれらに限定されない。当技術分野において公知の抗体同定および産生の標準方法は、対象のポリペプチドに結合する抗体の産生に使用することができる。一部の実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。モノクローナル抗体

10

20

30

40

50

は、様々な実施形態において、例えば、ハイブリドーマ技術または組換え核酸技術を使用して同定および/または産生することができる。一部の実施形態において、抗体は、ライブラリー、例えば、ファージまたは酵母ディスプレイライブラリーから選択される。一部の実施形態において、抗体は、キメラ、ヒト化または完全ヒト抗体である。一部の実施形態において、抗体は、ポリクローナル抗体である。一部の実施形態において、抗体は、別個のエピトープに結合する少なくとも2個の別個の抗原結合部位を含む。一部の実施形態において、抗体は、自身に標識（例えば、標識は、放射性同位体、蛍光薬剤、酵素、ハプテンを含むことができる）が付着している（例えば、共有結合により付着）。一部の実施形態において、単鎖抗体（s c F v）は、重鎖（V H）および軽鎖（V L）の抗原結合可変領域を連結ドメインにより接続することにより作製することができる。連結ドメインは、例えば、約10～約25アミノ酸のペプチドを含むことができる。

10

【0019】

用語「アプタマー」は、対象の標的、例えば、ポリペプチドに特異的にかつ高親和性で結合するオリゴヌクレオチドを指す（用語「アプタマー」は、対象の標的がオリゴヌクレオチドに相補的な核酸ではない場合に典型的に用いられることが理解されよう）。アプタマーは、例えば、試験管内進化法（systematic evolution of ligands by exponential enrichment）（S E L E X）または様々な定方向性進化技法を使用する選択過程により同定することができる。例えば、Turek, C. and Gold, L., Science, 249巻：505～10頁、1990年；Brody EN and Gold LJ, Biotechnol. J, 74巻（1号）：5～13頁、2000年；L. Cerchia and V. de Franciscis, Trends Biotechnol., 28巻：517～525頁、2010年；Keefe, A. Nat. Rev. Drug Discov. 9巻：537～550頁、2010年を参照されたい。アプタマーは、典型的には、一本鎖である（但し、これは分子内相補性により二本鎖二次構造の領域を形成し得る）。

20

【0020】

「アッセイ」は、任意のものの同定または評価に使用することのできるいずれかの手順もしくは過程または一連の手順もしくは過程を包含することができる。本明細書において使用される場合、「評価」、「評価する」および同様の用語は、特徴付け、検出、決定、測定、評定、見積もり、解析、検査等を包含する。様々な実施形態において、同定または評価されているものは、例えば、遺伝子、遺伝子産物、反応物または反応の産物、経路、薬剤、組成物、細胞、細胞株、腫瘍、対象や、組成物または方法において使用するための試薬となり得る。一部の実施形態において、アッセイは、定性的であっても、あるいは少なくとも一部には定量的であってもよく、例えば、数値的に表すことのできる測定値をもたらすことができる。測定値は、様々な実施形態において、相対的であっても絶対的であってもよい。一部の実施形態において、アッセイは、規模、濃度、レベル、量、強度、モジュレーションの程度（例えば、低下または増強）、活性または前述のいずれかの変化の測定値をもたらす。スクリーニングは、1種もしくは複数の対象の特性または1種もしくは複数の対象の目的もしくは用途へのその適合性に関する実体の評価を含むことができる、あるいは1種もしくは複数の対象の特性を有するまたは1種もしくは複数の対象の目的もしくは用途に適合したもしくは適合し得る実体の同定を含むことができる。スクリーニングは、例えば、1種または複数のアッセイ、コンピュータ支援手順または過程等を含むことができる。様々な実施形態において、同定もしくは評価されているまたは同定もしくは評価しようとするものは、例えば、遺伝子、遺伝子産物、反応物または反応の産物、経路、薬剤、組成物、細胞、細胞株、腫瘍、対象や、組成物または方法において使用するための試薬等となり得る、あるいはコンピュータを使用して操作、解析、加工または表示することのできる配列、構造または他の情報もしくは表現となり得る。一部の実施形態において、スクリーニングは、協調的な様式における、例えば、共通の指示または制御下における複数の実体（例えば、複数の薬剤、例えば、複数の被験薬剤）の評価を含む。スクリーニングは、例えば、複数の異なる被験薬剤を使用した、同一または基本的に同一アッセイの複数回の実行を含むことができる。アッセイは、同一アッセイ系を使用して（例えば

30

40

50

、同一装置 / 計測手段を使用して) 行うことができる。アッセイは、被験薬剤の同一性が異なる、基本的に同一アッセイ組成物を使用して行うことができる。アッセイは、所定のセットの被験薬剤、例えば、薬剤のライブラリーを使用して行うことができる。

【0021】

「細胞マーカー」は、細胞内または細胞上(例えば、細胞表面に少なくとも部分的に露出した)におけるそのレベルが、1種もしくは複数の細胞型(複数可)、細胞系列(複数可)もしくは組織型(複数可)を特徴付ける、指示するもしくは同定する、または特定の状態(例えば、がん性または正常等の疾患または生理的状态、分化状態、幹細胞状態)を特徴付ける、指示するもしくは同定する、分子(例えば、タンパク質、RNA、DNA、脂質、炭水化物)またはその部分を指す。レベルは、例えば、高/低; + / - ; 数値表示等、種々の異なる仕方で報告することができる。特定の細胞マーカー(複数可)の存在、非存在またはレベルは、患者、臓器、組織または細胞の特定の生理的または疾患状態を指示することができる。複数の細胞マーカーを評価して、例えば、対象の細胞型を同定または単離し、疾患を診断すること等ができることを理解されよう。一部の実施形態において、2 ~ 10 種の間細胞マーカーを評価することができる。細胞の表面にまたは表面上に存在する細胞マーカーは、「細胞表面マーカー」と称され得る。一部の実施形態において、細胞表面マーカーは、受容体である。例えば、標的化部分は、受容体の細胞外ドメインに結合することができる。一部の実施形態において、受容体は、増殖因子受容体、ホルモン受容体、インテグリン受容体、葉酸受容体またはトランスフェリン受容体である。細胞マーカーは、細胞型特異的となり得る。細胞型特異的マーカーは一般に、多くのまたは大部分の他の細胞型(例えば、身体または人工環境における他の細胞型)の中または上よりも特定の細胞型(単数または複数)の中または上に(その表面上に)高レベルで発現されるまたは存在する。場合によっては、細胞型特異的マーカーは、対象の特定の細胞型の中または上においてのみ検出可能レベルで存在する。しかし、有用な細胞型特異的マーカーは、対象の細胞型に絶対的に特異的となることはできず、多くの場合、絶対的に特異的ではない。細胞マーカー、例えば、細胞型特異的マーカーは、特定の細胞型中またはその表面上に、例えば、複数(例えば、5 ~ 10 ; 10 ~ 20 種以上)の異なる組織または臓器由来の細胞をおよそ等量で含有する混合物からなっていてよい細胞の参照集団よりも、少なくとも2倍または少なくとも3倍大きいレベルで存在することができる。一部の実施形態において、細胞マーカー、例えば、細胞型特異的マーカーは、参照集団におけるその平均発現よりも少なくとも4 ~ 5倍、5 ~ 10倍の間または10倍超大きいレベルで存在することができる。一部の実施形態において、細胞マーカー、例えば、細胞表面マーカーは、正常細胞、例えば、同一臓器および/または細胞型に由来する正常細胞による発現と比較して、腫瘍細胞により選択的に発現される、例えば、腫瘍細胞により過剰発現される。係る細胞マーカーは、「腫瘍細胞マーカー」と称され得る。腫瘍細胞の表面にまたは表面上に存在する腫瘍マーカーは、「腫瘍細胞表面マーカー」と称され得る。一部の実施形態において、腫瘍細胞表面マーカーは、非腫瘍細胞と比較して、少なくとも一部の腫瘍細胞により差次的に発現される分子(またはその部分)である。有用な腫瘍細胞表面マーカーは、1種もしくは複数の腫瘍型または1種もしくは複数の腫瘍型の腫瘍サブセットにより発現または過剰発現され得る。一部の実施形態において、腫瘍細胞表面マーカーは、適したアッセイを使用して測定された場合、正常細胞、例えば、同一臓器および/または細胞型に由来する正常細胞による発現と比べて、腫瘍の少なくとも一部の細胞において少なくとも1.5倍過剰発現される。腫瘍細胞表面マーカーは、例えば、正常には非常に少量産生され、腫瘍細胞においてより大量に発現されるタンパク質、正常には発生の特定のステージ(例えば、出生前)においてのみ産生されるタンパク質、その構造(例えば、配列または翻訳後修飾(複数可))が、腫瘍細胞における突然変異により修飾されるタンパク質または(正常な条件下では)免疫系から隔離される正常なタンパク質を含むことができる。一部の実施形態において、腫瘍細胞表面マーカーは、突然変異した遺伝子、例えば、癌遺伝子または突然変異した腫瘍抑制因子遺伝子の発現産物、過剰発現もしくは異常に発現された細胞タンパク質または癌胎児性抗原である。一般に、細胞マーカーのレベルは、ノ

10

20

30

40

50

ーザンプロットティング、*in situ*ハイブリダイゼーション、RT-PCR、配列決定、イムノプロットティングや免疫組織化学等の免疫学的方法、蛍光標識された抗体による染色後の蛍光検出（例えば、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡）、マーカーに特異的に結合する非抗体リガンドを使用する同様の方法、オリゴヌクレオチドまたはcDNAマイクロアレイまたは膜アレイ、タンパク質マイクロアレイ解析、質量分析等、標準技法を使用して決定することができる。細胞表面マーカー、例えば、細胞型特異的細胞表面マーカーまたは腫瘍細胞表面マーカーは、細胞の検出または単離に使用、あるいは薬剤を細胞へと送達するための標的として使用することができる。例えば、薬剤は、細胞表面マーカーに結合する部分に連結させることができる。適した結合部分は、例えば、抗体またはリガンド、例えば、低分子、アプタマー、ポリペプチドを含む。

10

【0022】

本明細書において使用される場合、「コンピュータ支援」は、情報（例えば、データ、結果、構造、配列等）を集める、加工する、操作する、表示する、可視化する、受け取る、伝達する、記憶するまたは他の仕方を取り扱うために、コンピュータシステムが使用される方法を包含する。方法は、コンピュータのプロセッサに、データまたは他の情報を集める、加工する、操作する、表示する、受け取る、伝達するまたは記憶するための命令を実行させるステップを含むことができる。命令は、コンピュータ可読媒体を含むコンピュータプログラム製品において具体化させることができる。一部の実施形態において、方法は、通信ネットワークを通してデータまたは他の情報を伝達または受け取るステップを含む。通信ネットワークは、例えば、1種もしくは複数のイントラネット、またはインター

20

【0023】

薬剤（または係る薬剤を含有する組成物）の「有効量」または「有効用量」は、例えば、選択された投与形態、経路および/またはスケジュールに従って細胞または生物に送達される場合に、所望の生物学および/または薬理学的効果を達成するのに十分な量を指す。当業者であれば認められようが、有効な特定の薬剤または組成物の絶対量は、所望の生物学または薬理学的エンドポイント、送達される薬剤、標的組織等の要因に応じて変動し得る。当業者であれば、「有効量」が、様々な実施形態において、単一用量で、あるいは複数用量の使用により細胞と接触され得るまたは投与され得ることをさらに理解するであろう。生物学的效果は、例えば、1種または複数の遺伝子産物の発現または活性の低下、代謝経路または反応の活性の低下、細胞の細胞増殖または生存（例えば、腫瘍細胞増殖または生存）の低下、腫瘍の維持、サイズ、成長または進行の低下となり得る。

30

【0024】

用語「発現」は、ポリ核酸（例えば、DNA）が転写されてRNAを産生し、（適用できる場合は）RNA転写物がポリペプチドへと翻訳される過程を包含する。

【0025】

用語「遺伝子産物」（本明細書において、「遺伝子発現産物」または「発現産物」とも称される）は、遺伝子から転写されたRNAおよび係るRNAの翻訳から生じたポリペプチド等、遺伝子の発現に起因する産物を包含する。特定の遺伝子産物が、例えば細胞においてプロセッシングまたは修飾され得ることを認められよう。例えば、RNA転写物は、mRNA翻訳前にスプライシング、ポリアデニル化等され得る、および/またはポリペプチドは、分泌シグナル配列の除去、オルガネラ標的化配列の除去またはリン酸化や脂肪酸アシル化等の修飾等、翻訳時または翻訳後プロセッシングされ得る。用語「遺伝子産物」は、係るプロセッシングまたは修飾形態を包含する。ヒトを含む種々の生物種由来のゲノム、mRNA、ポリペプチド配列は、当技術分野において公知のものであり、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）（www.ncbi.nlm.nih.gov）またはユニバーサル・プロテイン・リソース（Universal Protein Resource）（www.uniprot.org）において利用できるもの等、公開されたデータベースにおいて利用できる。例示的なデータベースとして、例えば、GenBank、RefSeq、Gene、UniProtKB/SwissProt、UniProtKB/Tremblそ

40

50

の他が挙げられる。一般に、NCBI参照配列データベースにおける配列、例えば、mRNAおよびポリペプチド配列は、対象の遺伝子の遺伝子産物配列として使用することができる。同一種の個体間に遺伝子の複数のアレルが存在し得ることが認められよう。例えば、所定の種の個体間には、特定のタンパク質をコードする核酸の1個または複数のヌクレオチド（例えば、ヌクレオチドの最大約1%、2%、3~5%）における差が存在し得る。コードされるタンパク質の配列の変化をもたらすDNA多型も存在し得るが、遺伝暗号の縮重により、係る変種は、コードされるアミノ酸配列を変更しないことが多い。多型バリエーションの例は、例えば、NCBIウェブサイト、www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/において利用できる一塩基多型データベース（Single Nucleotide Polymorphism Database）（dbSNP）に見出すことができる（Sherry STら（2001年）「dbSNP: the NCBI database of genetic variation」、Nucleic Acids Res. 29巻（1号）：308~311頁；Kitts A, and Sherry S（2009年）。The NCBI Handbook [インターネット]、McEntyre J、Ostell J、編集、ベセスダ（メリーランド州）：国立バイオテクノロジー情報センター（米国）；2002年（www.ncbi.nlm.nih.gov/books/br.fcgi?book=handbook&part=ch5）におけるヌクレオチド配列変種の一塩基多型データベース（dbSNP）。例えば、選択的RNAスプライシングまたは編集の結果、特定のタンパク質の複数のアイソフォームが存在し得る。一般に、本開示の態様が、遺伝子または遺伝子産物に属する場合、他に指示がなければ、アレルバリエーションまたはアイソフォームに属する実施形態が包含される。特定の実施形態は、特定の配列（複数可）、例えば、特定のアレル（複数可）またはアイソフォーム（複数可）に方向付けることができる。

10

20

【0026】

「同一性」または「パーセント同一性」は、2種以上の核酸またはポリペプチドの配列が同じである度合いの尺度である。対象の配列Aと、第2の配列Bとの間のパーセント同一性は、配列を整列し、同一性を最大化するためにギャップ導入し、同一残基の反対側の残基（ヌクレオチドまたはアミノ酸）数を決定し、最小限の TG_A および TG_B （この場合、 TG_A および TG_B は、アライメントの配列AおよびBにおける残基および内部ギャップポジションの数の合計である）で割り、100を掛けることにより算出することができる。特定のパーセント同一性を得るために必要とされる同一残基の数を算出する場合、端数は、最も近い整数となるよう四捨五入するべきである。配列は、当技術分野において公知の種々のコンピュータプログラムの使用により整列することができる。例えば、BLAST2、BLASTN、BLASTP、Gapped BLAST等、コンピュータプログラムを使用して、アライメントを作成するおよび/またはパーセント同一性を得ることができる。KarlinおよびAltschulのアルゴリズム（Karlin and Altschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻：22264~2268頁、1990年）は、Karlin and Altschul、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻：5873~5877頁、1993年のアルゴリズムとして修正され、Altschulら（Altschulら、J. Mol. Biol. 215巻：403~410頁、1990年）のNBLASTおよびXBLASTプログラムに取り込まれている。一部の実施形態において、比較目的のためにギャップ付きアライメントを得るため、Altschulら（Altschulら、Nucleic Acids Res. 25巻：3389~3402頁、1997年）に記載されている通り、Gapped BLASTが利用される。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合、個々のプログラムのデフォルトパラメータを使用することができる。URL、www.ncbi.nlm.nih.govのウェブサイトおよび/またはMcGinnis, S. and Madden, TL、W20~W25 Nucleic Acids Research、2004年、32巻、Web server issueを参照されたい。他の適したプログラムは、CLUSTALW（Thompson JD、Higgins DG、Gibson TJ、Nuc Ac Res、22巻：4673~4680頁、1994年）およびGAP（GCGバージョン9.1；これはNeedleman & Wunsch、1970年のアルゴリズム（Needleman SB、Wunsch CD、J Mol Biol、48巻：443~453頁、1970年）を実行する）を含む。パーセント同一性は、評価ウィンドウにわたり

30

40

50

評価することができる。一部の実施形態において、評価ウィンドウは、比較されている配列の最短の長さの少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上、例えば、100%の長さを有することができる。一部の実施形態において、評価ウィンドウは、少なくとも100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1,000; 1,200; 1,500; 2,000; 2,500; 3,000; 3,500; 4,000; 4,500; または5,000アミノ酸である。一部の実施形態において、評価ウィンドウにわたるいずれかの配列または両方の配列におけるポジションの20%、10%、5%または1%以下は、ギャップで占められている。一部の実施形態において、いずれかの配列または両方の配列におけるポジションの20%、10%、5%または1%以下は、ギャップで占められている。

10

【0027】

「阻害」は、文脈における必要に応じて、「抑制」、「減少」、「低下」等の用語と互換的に使用することができる。阻害の度合いは変動し得ることを理解されたい。例えば、阻害は、関連性のあるレベルの少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%低下を指すことができる。一部の実施形態において、阻害は、100%の減少、例えば、バックグラウンドレベルまたは検出不能レベルまでの減少を指す。一部の実施形態において、阻害は、統計的に有意である。

20

【0028】

「単離される」は、1)通常天然においては関連している構成成分の少なくとも一部から分離されること、2)人の手が関与する過程により調製または精製されること、および/または3)天然に発生しないこと、例えば、人工環境において存在することを意味する。

【0029】

「核酸」は、「ポリヌクレオチド」と互換的に使用され、ヌクレオチドのポリマーを包含する。「オリゴヌクレオチド」は、相対的に短い核酸、例えば、典型的には、約4~約100ヌクレオチド(nt)長の間、例えば、8~60nt長の間または10~40nt長の間を指す。ヌクレオチドは、例えば、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、核酸は、DNAまたはRNAを含むまたはこれからなる。一部の実施形態において、核酸は、標準核酸塩基(多くの場合、「塩基」と称される)のみを含む。標準塩基は、シトシン、グアニン、アデニン(DNAおよびRNAに存在する)、チミン(DNAに存在する)およびウラシル(RNAに存在する)であり、これらはそれぞれC、G、A、TおよびUと省略される。一部の実施形態において、核酸は、様々な実施形態において、天然起源であっても非天然起源(即ち、人工的;天然には存在しない)であってもよい1種または複数の非標準核酸塩基を含むことができる。一部の実施形態において、核酸は、化学的または生物学的に修飾された塩基(例えば、アルキル化(例えば、メチル化)塩基)、修飾糖(例えば、2'-O-アルキルリボース(alkyl ribose)(例えば、2'-Oメチルリボース(methylribose))、2'-フルオロリボース(fluororibose)、アラビノースまたはヘキソース)、修飾リン酸基(例えば、ホスホロチオエートまたは5'-N-ホスホラミダイト結合)を含むことができる。一部の実施形態において、核酸は、ホスホジエステル結合により連結されたサブユニット(残基)、例えば、ヌクレオチドを含む。一部の実施形態において、核酸の少なくとも一部のサブユニットは、非ホスホジエステル結合または他の骨格構造により連結される。一部の実施形態において、核酸は、ロックド核酸、モルホリノまたはペプチド核酸を含む。核酸は、様々な実施形態において、直鎖状であっても環状であってもよい。核酸は、様々な実施形態において、一本鎖であっても、二本鎖であっても、部分的に二本鎖であってもよい。少なくとも部分的に二本鎖の核酸は、平滑断端であっても、1個または複数のオーバーハング

30

40

50

、例えば、5' および/または3' オーバーハング(複数可)を有していてもよい。研究または治療目的のRNA干渉(RNAi)、アプタマーまたはアンチセンスに基づく分子の文脈において有用な、当技術分野において公知のもの等、核酸修飾(例えば、塩基、糖および/または骨格修飾)、非標準ヌクレオチドまたはヌクレオシド等を、様々な実施形態において取り込むことができる。係る修飾は、例えば、安定性を増加させ(例えば、ヌクレアーゼによる開裂に対する感受性を低下させることによる)、*in vivo*におけるクリアランスを減少させ、細胞取込みを増加させ、あるいは効力、有効性、特異性を改善する他の特性を付与し、あるいは他の仕方で核酸を使用目的により適したものとすることができる。核酸修飾の様々な非限定的な例は、例えば、Deleavey GFら、Chemical modification of siRNA. Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem. 2009年; 39巻: 16.3.1~16.3.22; Crooke, ST(編) Antisense drug technology: principles, strategies, and applications, Boca Raton: CRC Press, 2008年; Kurreck, J.(編) Therapeutic oligonucleotides, RSC biomolecular sciences, Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2008年; 米国特許第4,469,863号; 同第5,536,821号; 同第5,541,306号; 同第5,637,683号; 同第5,637,684号; 同第5,700,922号; 同第5,717,083号; 同第5,719,262号; 同第5,739,308号; 同第5,773,601号; 同第5,886,165号; 同第5,929,226号; 同第5,977,296号; 同第6,140,482号; 同第6,455,308号明細書、および/またはPCT出願公開、国際公開第00/56746号パンフレットおよび国際公開第01/14398号パンフレットに記載されている。二本鎖核酸の2本の鎖において異なる修飾を使用することができる。核酸は、均一にまたはそのほんの一部が修飾されていてよい、および/または複数の異なる修飾を含有することができる。

【0030】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合により連結されたアミノ酸のポリマーを指す。タンパク質は、1種または複数のポリペプチドを含む分子である。ペプチドは、典型的には、約2~100アミノ酸(aa)の間の長さ、例えば、4~60aaの間、8~40aaの間、10~30aaの間の、相対的に短いポリペプチドである。用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、互換的に使用することができる。一般に、ポリペプチドは、標準アミノ酸のみを含有することができる、あるいは様々な実施形態において、1種または複数の非標準アミノ酸(天然起源または非天然起源のアミノ酸となり得る)および/またはアミノ酸アナログを含むことができる。「標準アミノ酸」は、哺乳動物によるタンパク質の合成において一般に利用され、遺伝暗号によりコードされる20種のL-アミノ酸のいずれかである。「非標準アミノ酸」は、哺乳動物によるタンパク質の合成において一般に利用されないアミノ酸である。非標準アミノ酸は、天然起源のアミノ酸(20種の標準アミノ酸以外)および非天然起源のアミノ酸を含む。一部の実施形態において、非標準の天然起源のアミノ酸は、哺乳動物に存在する。例えば、オルニチン、シトルリンおよびホモシステインは、哺乳動物代謝において重要な役割を有する天然起源の非標準アミノ酸である。例示的な非標準アミノ酸として、例えば、単独でまたは複数でハロゲン化された(例えば、フッ素化された)アミノ酸、D-アミノ酸、ホモ-アミノ酸、N-アルキルアミノ酸(プロリン以外)、デヒドロアミノ酸、芳香族アミノ酸(ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン以外)および、二置換されたアミノ酸が挙げられる。アミノ酸、例えば、ポリペプチドにおけるアミノ酸のうち1個または複数は、例えば、アルキル基、アルカノイル基、炭水化物基、リン酸基、脂質、多糖、ハロゲン、コンジュゲーションのためのリンカー、保護基等の部分の付加、例えば共有結合により修飾されていてよい。ポリペプチドのいかなる箇所においても、例えば、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシル末端において修飾は生じ得る。所定のポリペプチドは、多くの種類の修飾を含有し得る。ポリペプチドは、分枝していてよい、あるいは分枝したまたは分枝していない環式であってもよい。ポリペプチドは、ポリマーまたはポリマーマトリックス、 dendrimer、ナノ粒子、マイクロ粒子、リボソームそ

の他とコンジュゲートしていても、これによりカプセル封入されていても、あるいはこの中に包埋されていてもよい。修飾は、様々な実施形態において、アミノ酸がポリペプチドに取り込まれる前または後に生じ得る。ポリペプチドは、例えば、天然の供給源から精製しても、組換えDNA技術（例えば、組換え宿主細胞によりまたはトランスジェニック動物もしくは植物における）を使用して適した発現系において *in vitro* または *in vivo* で産生しても、従来の固相ペプチド合成および/または合成ペプチドの化学的ライゲーションに關与する方法（例えば、Kent, S., *J Pept Sci.*, 9巻(9号): 574~93頁、2003年または米国特許出願公開第20040115774号明細書を参照）等、化学的手段により合成しても、前述のいずれかの組合せによってもよい。

【0031】

本明細書において使用される場合、用語「精製された」は、天然においてまたは本来生成されたときにこれが關連していた構成成分の大部分から分離された薬剤を指す。一般に、係る精製は、人の手による作用に關与する。精製された薬剤は、部分的に精製されていても、実質的に精製されていても、純粋であってもよい。係る薬剤は、例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、あるいは99%を超えて純粋であってもよい。一部の実施形態において、核酸、ポリペプチドまたは低分子は、調製物に存在するそれぞれ総核酸、ポリペプチドまたは低分子材料の少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上を構成するよう精製される。一部の実施形態において、有機物質、例えば、核酸、ポリペプチドまたは低分子は、調製物に存在する総有機材料の少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上を構成するよう精製される。純度は、例えば、乾燥重量、クロマトグラフィートレーシング（GC、HPLC等）におけるピークのサイズ、分子存在量、電気泳動方法、ゲルにおけるバンドの強度、分光学的データ（例えば、NMR）、元素分析、ハイスループット配列決定、質量分析またはいずれかの技術的に許容される定量化方法に基づくことができる。一部の実施形態において、水、緩衝物質、イオンおよび/または低分子（例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸等、合成前駆体）は、精製された調製物において任意選択で存在してよい。精製された薬剤は、他の物質（例えば、他の細胞材料）から分離することにより、あるいは所望の程度の純度を達成できるような様式で産生させることにより調製することができる。一部の実施形態において、細胞により産生された分子に關する「部分的に精製された」は、細胞により産生された分子が、もはや細胞内に存在しないこと、例えば、細胞が溶解され、任意選択で、細胞材料の少なくとも一部（例えば、細胞壁、細胞膜（複数可）、細胞オルガネラ（複数可））が除去されたこと、および/またはライセートに存在していた同じ種類の少なくとも一部の分子（タンパク質、RNA、DNA等）から分子が分離または隔離されたことを意味する。

【0032】

用語「RNA干渉」（RNAi）は、例えば、真核生物細胞、例えば、脊椎動物細胞においてまたは適切な *in vitro* 系において、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）として公知の分子複合体が、配列特異的様式で遺伝子発現をサイレンスまたは「ノックダウン」する過程を包含する。RISCは、短い核酸鎖（例えば、約16~約30ヌクレオチド（nt）の長さ）を取り込むことができ、この核酸鎖は、この鎖と相補性を有するRNA（例えば、mRNA）と対形成し、その配列特異的分解または翻訳抑圧を方向付けるまたは「ガイド」する。短い核酸鎖は、「ガイド鎖」または「アンチセンス鎖」と称され得る。ガイド鎖と相補性を有するRNA鎖は、「標的RNA」と称され得る。ガイド鎖は、初めに、短い二本鎖RNA（dsRNA）の一部、例えば、低分子干渉RNA（siRNA）としてRISC構成成分（RISCローディング複合体と呼ばれることもある複合体において）と会合するようになる。短いdsRNAの他方の鎖は、「パッセンジャー鎖」または「センス鎖」と称され得る。標的RNAおよびガイド鎖のハイブリダイゼーションにより形成される構造の相補性は、鎖が、（i）RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）において標的RNAの開裂をガイドする、および/または（ii）標的

10

20

30

40

50

RNAの翻訳抑圧を引き起こすことができるようなものとなり得る。RNAiによる発現の低下は、様々な実施形態において、基本的に完全なものであっても（例えば、遺伝子産物の量がバックグラウンドレベルまで低下する）、完全に満たないものであってもよい。例えば、mRNAおよび/またはタンパク質レベルは、様々な実施形態において、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上低下し得る。当技術分野において公知の通り、ガイド鎖と標的RNAとの間の相補性は、完璧（100%）である必要はないが、遺伝子発現の阻害を生じるのに十分となることのみを必要とする。例えば、一部の実施形態において、ガイド鎖の1、2、3、4、5個以上のヌクレオチドは、標的RNAにマッチしなくてよい。「マッチしない」または「アンマッチ」は、ミスマッチである（二重鎖においてこれと向かい合って位置するヌクレオチドと相補的ではない、即ち、ワトソン・クリック塩基対形成が起こらない）またはバルジの少なくとも一部を形成するヌクレオチドを指す。ミスマッチの例として、限定することなく、GまたはAと向かい合うA、AまたはCと向かい合うC、CまたはUと向かい合うU、Gと向かい合うGが挙げられる。バルジは、他方の鎖におけるヌクレオチド（複数可）と向かい合って位置しない、全般的に二重鎖の領域内の鎖における1個または複数のヌクレオチドの配列を指す。「部分的に相補的」は、完璧に満たない相補性を指す。一部の実施形態において、ガイド鎖は、標的RNAに対し、標的RNAの一続きの少なくとも約15nt、例えば、15nt~30ntの間、17nt~29ntの間、18nt~25ntの間、19nt~23ntの間にわたり、少なくとも約80%、85%または90%、例えば、少なくとも約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列相補性を有する。一部の実施形態において、ガイド鎖の少なくともシード領域（ガイド鎖のポジション2~7または2~8におけるヌクレオチド）は、標的RNAに対し完璧に相補的である。一部の実施形態において、ガイド鎖および標的RNA配列は、一続きの少なくとも10nt、例えば、10~30ntの間にわたり、1、2、3または4個以下のミスマッチまたはバルジしたヌクレオチドを含有する二重鎖を形成することができる。一部の実施形態において、ガイド鎖と標的RNA配列は、一続きの少なくとも12nt、例えば、10~30ntの間にわたり、1、2、3、4、5または6個以下のミスマッチまたはバルジしたヌクレオチドを含有する二重鎖を形成することができる。一部の実施形態において、ガイド鎖と標的RNA配列は、一続きの少なくとも15nt、例えば、10~30ntの間にわたり、1、2、3、4、5、6、7または8個以下のミスマッチまたはバルジしたntを含有する二重鎖を形成することができる。一部の実施形態において、ガイド鎖と標的RNA配列は、一続きの少なくとも10nt、例えば、10~30ntの間にわたり、ミスマッチまたはバルジしたヌクレオチドを含有しない二重鎖を形成することができる。一部の実施形態において、10~30ntの間は、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ntである。

【0033】

本明細書において使用される場合、用語「RNAi剤」は、真核生物の細胞におけるRNAiの達成に使用することのできる核酸を包含する。低分子干渉RNA（siRNA）、低分子ヘアピン型RNA（shRNA）およびマイクロRNA（miRNA）は、RNAi剤の例である。siRNAは、典型的には、互いにハイブリダイズして、少なくとも15ntの長さ、例えば、約15~約30nt長、例えば、17~27nt長の間、例えば、18~25nt長の間、例えば、19~23nt長の間、例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30ヌクレオチドの二本鎖（二重鎖）部分を含有する構造を形成する2本の別々の核酸鎖を含む。一部の実施形態において、siRNAの鎖は、二重鎖部分内において、互いに完璧に相補的である。一部の実施形態において、二重鎖部分は、1個または複数のアンマッチしたヌクレオチド、例えば、1個または複数のミスマッチした（非相補的）ヌクレオチド対またはバルジしたヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態において、siRNAのいずれか一方または両方の鎖は、二重鎖部分内において、最大約1、2、3または4個の

10

20

30

40

50

アンマッチしたヌクレオチドを含有し得る。一部の実施形態において、鎖は、15～35 ntの間、例えば、17～29 ntの間、例えば、19～25 nt、例えば、21～23 ntの長さを有し得る。鎖は、様々な実施形態において、長さが等しくなり得る、あるいは異なる長さを有し得る。一部の実施形態において、鎖は、長さが1～10 nt異なっていてよい。鎖は、5'リン酸基および/または3'ヒドロキシル(-OH)基を有し得る。siRNAのいずれか一方または両方の鎖は、例えば、約1～10 nt(例えば、1～5 nt、例えば、2 nt)の3'オーバーハングを含むことができる。オーバーハングは、様々な実施形態において、同じ長さまたは異なる長さとなり得る。一部の実施形態において、オーバーハングは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドまたは2'-O-メチル化ヌクレオチドもしくは2'-O-メチル-ウリジン等の修飾ヌクレオチドもしくは修飾リボヌクレオチドを含むまたはこれからなることができる。オーバーハングは、様々な実施形態において、ガイド鎖および標的RNAにより形成されたハイブリッドにおける標的RNAに対し完璧に相補的、部分的に相補的または非相補的となり得る。

10

20

30

40

50

【0034】

shRNAは、ステムループ構造を含む、典型的には、約40～150 ntの間、例えば、約50～100 nt、例えば、60～80 ntの長さの核酸分子である。「ステムループ構造」(「ヘアピン」構造とも称される)は、二本鎖(ステム部分;二重鎖)を形成することが公知のまたは予測されるヌクレオチドの領域を含み、この二本鎖の片側に、(通常)主に一本鎖のヌクレオチドの領域(ループ部分)が連結した二次構造を有する核酸を指す。係る構造は、当技術分野において周知のものであり、この用語は、当技術分野におけるその意義と一貫して使用される。ガイド鎖配列は、ステムのいずれかの腕に、即ち、様々な実施形態において、ループに対して5'またはループに対して3'に配置され得る。当技術分野において公知の通り、ステム構造は、正確な塩基対形成(完璧な相補性)を要求しない。よって、ステムは、1個または複数のアンマッチした残基を含んでもよく、あるいは塩基対形成が正確であってもよい、即ち、いかなるミスマッチまたはバルジを含まなくてもよい。一部の実施形態において、ステムは、15～30 ntの間、例えば、17～29 ntの間、例えば、19～25 ntである。一部の実施形態において、ステムは、15～19 ntの間である。一部の実施形態において、ステムは、19～30 ntの間である。ループ内の一次配列およびヌクレオチド数は、変動し得る。ループ配列の例として、例えば、UGGU;ACUCGAGA;UUC A A G A G Aが挙げられる。一部の実施形態において、天然起源のmiRNA前駆体分子(例えば、premiRNA)に存在するループ配列を使用することができる。一部の実施形態において、ループ配列は存在しなくてもよい(この場合、二重鎖部分の末端は直接的に連結してよい)。一部の実施形態において、ループ配列は、少なくとも部分的に自己相補的となり得る。一部の実施形態において、ループは、1～20 ntの間の長さ、例えば、1～15 nt、例えば、4～9 ntである。shRNA構造は、5'または3'オーバーハングを含むことができる。当技術分野において公知の通り、shRNAは、例えば、ダイサー(Dicer)として公知のリボヌクレアーゼ(RNase)IIIファミリー酵素により細胞内プロセシングされ、ループを除去して、siRNAを生成することができる。

【0035】

成熟内在性miRNAは、miRNA前駆体と呼ばれるより大型の内在的にコードされた前駆体RNA分子から細胞内プロセシングにより生成された、短い(典型的には、18～24 nt、例えば、約22 nt)一本鎖RNAである(例えば、Bartel, D., MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116巻(2号): 281～97頁(2004年); Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 136巻(2号): 215～33頁(2009年); Winter, J.ら、Nature Cell Biology, 11巻: 228～234頁(2009年)を参照)。人工的miRNAは、対象の標的RNAをサイレンスするため、内在性RNA経路を活用するために設計され得る。

【0036】

RNAiを媒介することのできる細胞または*in vitro*系において、対象のRNAの発現低下をもたらすことができるよう(例えば、RNAの分解または翻訳抑圧の結果)対象のRNAと十分に相補的な鎖を含有する、および/または対象のRNAの少なくとも10、12、15、17または19個の連続的ヌクレオチドを含む配列と少なくとも80%、90%、95%以上(例えば、100%)相補的な配列を含むRNAi剤は、対象のRNA「に標的化された」と称され得る。RNA転写物に標的化されたRNAi剤は、該転写物の転写元の遺伝子に標的化されたと考慮することもできる。

【0037】

一部の実施形態において、RNAi剤は、細胞においてsiRNA、shRNAまたはmiRNAを生じる1種または複数の転写物の細胞内発現を引き起こすのに適したベクター(例えば、発現ベクター)である。係るベクターは、「RNAiベクター」と称され得る。RNAiベクターは、転写されるとsiRNA(例えば、互いにハイブリダイズする2本の別々の鎖として)、shRNAまたはmiRNA前駆体(例えば、primiRNAまたはpremiRNA)を形成し得る転写物を生じる鑄型を含むことができる。

10

【0038】

RNAi剤は、様々な実施形態において、種々の仕方のいずれかにおいて產生することができる。例えば、核酸鎖は、化学的に合成しても(例えば、標準核酸合成技法を使用)、細胞においてまたは*in vitro*転写系を使用して產生してもよい。鎖は、適切な液体組成物(「アニーリングバッファー」と呼ばれることもある)においてハイブリダイズ(アニール)させることができる。RNAiベクターは、標準組換え核酸技法を使用して產生することができる。

20

【0039】

「試料」は、細胞、組織または細胞材料(例えば、細胞ライセートまたはその画分等、細胞に由来する材料)を含有するいかなる生物学的検体であってもよい。試料は、対象から得ることができる(即ち、対象に由来する、対象から最初に取り出されたものである)。試料を得る方法は、当技術分野において公知のものであり、例えば、切除生検、切開生検もしくはコア生検等、組織生検;穿刺吸引生検;擦過ブラシ(brushing);洗浄液(lavage);または血液、痰、リンパ液、粘液、唾液もしくは尿等、細胞を含有し得る体液の収集を含む。一部の実施形態において、試料は、対象から取り出された時点において、少なくともいくつかの無傷細胞を含有する。一部の実施形態において、試料は、取り出された元の組織の微小構造の少なくとも一部を保持する。試料は、対象から得た後に1種または複数の加工ステップに付すことができる、および/または1種または複数の部分に分割することができる。用語「試料」は、加工された試料、試料の部分等を包含し、係る試料は、最初の試料が取り出された元の対象から得たと考慮される。一部の実施形態において、試料は、腫瘍、例えば、脳腫瘍を有すると診断されたまたはそうであると疑われる個体から得ることができる。腫瘍試料は、腫瘍細胞または腫瘍から得られたまたはこれを含む試料である。腫瘍試料は、対象から腫瘍を取り出す前または後に腫瘍から得られたものでもよい。試料、例えば、本明細書に開示されている方法または組成物において使用される試料は、対象から直接的に、あるいは間接的に、例えば、例えば対象において生検、外科手術または他の手順を行うことにより、対象から直接的に試料を獲得した1名または複数の人物から試料を受け取ることにより獲得されていてよい。

30

40

【0040】

本明細書において使用される場合「低分子」は、質量が約2キログルトン(kDa)未満の有機分子である。一部の実施形態において、低分子は、約1.5kDa未満または約1kDa未満である。一部の実施形態において、低分子は、約800ダルトン(Da)、600Da、500Da、400Da、300Da、200Daまたは100Da未満である。多くの場合、低分子は、少なくとも50Daの質量を有する。一部の実施形態において、低分子は、非ポリマーである。一部の実施形態において、低分子は、アミノ酸ではない。一部の実施形態において、低分子は、ヌクレオチドではない。一部の実施形態において、低分子は、糖類ではない。一部の実施形態において、低分子は、複数の炭素-炭素

50

結合を含有し、タンパク質との構造的相互作用（例えば、水素結合）に重要な1個または複数のヘテロ原子および/または1個または複数の官能基、例えば、アミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基を含むことができ、一部の実施形態において、少なくとも2個の官能基を含むことができる。低分子は、多くの場合、上述の官能基の1個または複数に任意選択で置換された、1個もしくは複数の環式炭素もしくは複素環式構造および/または芳香族もしくは多環芳香族構造を含む。

【0041】

「対象」は、様々な実施形態において、いかなる脊椎動物生物であってもよい。対象は、例えば、実験、診断および/または治療目的で薬剤が投与される、あるいは試料が得られる、あるいは手順が為される個体となり得る。一部の実施形態において、対象は、哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類（例えば、マウス、ラット、ウサギ）、有蹄動物（例えば、ヒツジ、ウシ、ウマ、ヤギ種）、イヌまたはネコである。一部の実施形態において、対象は、成体である。本明細書の目的のため、少なくとも18歳のヒトが、成体と考慮される。

10

【0042】

「処置」、「処置する」および同様の用語は、対象の医学的および/または外科的管理の提供を指す。処置として、対象への薬剤または組成物（例えば、医薬組成物）の投与を挙げることができるがこれに限定されない。処置は、典型的には、対象に有益な様式で、疾患（この用語は、治療法を是認するいずれかの疾患、障害または望ましくない状態を指示するよう使用される）経過を変更する努力において試みられる。処置の効果は、疾患または疾患の1もしくは複数の症状もしくは徴候の逆行、軽減、重症度低下、発病遅延、治癒、進行の阻害および/またはその発生もしくは再発の見込みの低下を含むことができる。治療剤は、罹患したまたは一般集団のメンバーと比べて疾患発症リスクが増加した対象に投与することができる。一部の実施形態において、治療剤は、かつて疾患であったが、もはや疾患エビデンスを示さない対象に投与することができる。薬剤は、例えば、明らかな疾患の再発の見込みを低下させるために投与することができる。治療剤は、予防的に、即ち、疾患のいずれかの症状または徴候の発症前に投与することができる。「予防的処置」は、例えば、疾患が発生する見込みを低下させるための、あるいは疾患の重症度が生じる見込みを低下させるための、疾患を発症したことがないまたは疾患エビデンスを示さない対象への医学的および/または外科的管理の提供を指す。対象は、疾患発症リスクがある（例えば、一般集団と比べてリスクが増加したまたは疾患を発症する見込みを増加するリスク因子を有する）と同定されていてよい。

20

30

【0043】

特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「バリエーション」は、それぞれ「本来のポリペプチド」または「本来のポリヌクレオチド」と称され得るポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対して、1個または複数の変更（例えば、「突然変異」と総称される付加、置換および/または欠失）を有する。付加は、挿入であっても、いずれかの末端に為されてもよい。バリエーションは、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドよりも短くまたは長くなり得る。用語「バリエーション」は、「断片」を包含する。「断片」は、本来のポリペプチドよりも短いポリペプチドまたはポリヌクレオチドの連続的部分である。一部の実施形態において、バリエーションは、断片を含むまたはこれからなる。一部の実施形態において、断片またはバリエーションは、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の長さである。断片は、N末端、C末端または内部断片となり得る。一部の実施形態において、バリエーションポリペプチドは、本来のポリペプチドの少なくとも1個のドメインを含むまたはこれからなる。一部の実施形態において、バリエーションポリヌクレオチドは、ストリンジェントな条件、例えば、高ストリンジェンシー条件下で、本来のポリペプチドの長さの配列に対し、本来のポリヌクレオチドにハイブリダイズする。一部の実施形態において、バリエーションポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも20%、30%、40%、50%、

40

50

60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%にわたって、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対し、配列が少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含むまたはこれからなる。一部の実施形態において、バリエーションポリペプチドは、本来のポリペプチドの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%にわたって、本来のポリペプチドに対し、配列が少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一のポリペプチドを含むまたはこれからなり、但し、パーセント同一性を算出する目的において、保存的アミノ酸置換は、置き換えたアミノ酸と同一であると考慮される。一部の実施形態において、バリエーションポリペプチドは、本来のポリペプチドの少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%または100%にわたって、本来のポリペプチドに対し、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上同一のポリペプチドを含むまたはこれからなり、但し、1個または複数のアミノ酸置換（最大で係る置換の総数）は、保存的置換に制限され得る。一部の実施形態において、パーセント同一性は、少なくとも100；200；300；400；500；600；700；800；900；1,000；1,200；1,500；2,000；2,500；3,000；3,500；4,000；4,500；または5,000アミノ酸にわたって測定される。一部の実施形態において、バリエーションポリペプチドの配列は、本来の配列に対してN個のアミノ酸の差を有する配列を含むまたはこれからなり、Nは、1～10の間もしくは1～20の間の任意の整数または本来のポリペプチドにおけるアミノ酸数の最大1%、2%、5%もしくは10%の任意の整数であり、「アミノ酸の差」は、アミノ酸の置換、挿入または欠失を指す。一部の実施形態において、差は、保存的置換である。保存的置換は、例えば、関与する残基の側鎖サイズ、極性、電荷、溶解度、疎水性、親水性および/または両親媒性性質における類似性に基づいて為すことができる。一部の実施形態において、保存的置換は、表Aに従って為すことができ、表中、2番目の縦列の同じブロックにおけるアミノ酸および3番目の縦列の同じ横列におけるアミノ酸は、保存的置換において他のアミノ酸と互いに置換することができる。特定の保存的置換とは、2番目の縦列におけるあるブロックに対応する3番目の縦列における行の一方におけるアミノ酸の、2番目の縦列における同じブロック内に存在する3番目の縦列におけるもう一方の行のアミノ酸との置換である。

10

20

30

40

50

【表A】

表A

脂肪族	非極性	GAP
		ILV
	極性—無荷電	CSTM
		NQ
	極性—荷電	DE
		KR
芳香族		HFYW

【0044】

一部の実施形態において、プロリン（P）は、独自の群にあると考慮される。一部の実

施形態において、システイン(C)は、独自の群にあると考慮される。一部の実施形態において、プロリン(P)およびシステイン(C)はそれぞれ、独自の群にあると考慮される。

【0045】

一部の実施形態において、バリエーションは、機能的バリエーション、即ち、少なくとも一部には、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも1種の活性を保持するバリエーションである。一部の実施形態において、バリエーションは、少なくとも一部には、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの2種以上のまたは実質的に全ての公知の生物学的に有意な活性を保持する。活性は、例えば、生物学的機能または過程等を行うまたはこれに関与する触媒活性、結合活性、能力となり得る。一部の実施形態において、バリエーションの活性は、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上となり得、様々な実施形態において、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性の最大およそ100%、およそ125%またはおよそ150%となり得る。一部の実施形態において、バリエーション、例えば、機能的バリエーションは、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%または100%にわたって、本来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対し、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一のポリペプチドを含むまたはこれからなる。一部の実施形態において、例えば機能的バリエーションにおける変更、例えば、置換または欠失は、活性に重要であることが公知のまたは予測されるアミノ酸またはヌクレオチド、例えば、公知のまたは予測される触媒残基、または基質もしくは補因子の結合に関与する残基を変更または欠失しない。一部の実施形態において、他のアミノ酸または領域と比較して種間でより低い程度の保存を呈するヌクレオチド(複数可)、アミノ酸(複数可)または領域(複数可)を、変更のために選択することができる。理解できる通り、1個または複数のアミノ酸変更、例えば、置換(複数可)、付加(複数可)および/または欠失(複数可)がコードポリペプチドに導入されるように、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に1個または複数のヌクレオチド変更、例えば、1個または複数の置換(複数可)、付加(複数可)および/または欠失(複数可)を導入することにより、バリエーションを作製することができる。変更は、部位特異的突然変異誘発、PCR媒介性突然変異誘発等、標準技法により導入することができる。バリエーションは、活性を評価するための1種または複数の適したアッセイにおいて検査することができる。

【0046】

「ベクター」は、異なる遺伝的環境間または細胞への対象の核酸の侵入を媒介することができる、例えば、これを伝達、輸送等することができる、いくつもの核酸分子またはウイルスもしくはその部分のいずれかとなり得る。対象の核酸は、例えば、制限酵素およびライゲーションを使用してベクターに連結、例えば、これに挿入することができる。ベクターは、例えば、DNAまたはRNAプラスミド、コスミド、天然起源のまたは修飾されたウイルスゲノムまたはその部分、ウイルスカプシド内にパッケージングされ得る核酸、ミニ染色体、人工的染色体等を含む。プラスミドベクターは、典型的には、複製起点(例えば、原核生物の細胞における複製のための)を含む。プラスミドは、ウイルスゲノムの一部または全体(例えば、ウイルスプロモーター、エンハンサー、プロセッシングもしくはパッケージングシグナル、および/または宿主細胞ゲノムに組み込むことのできる核酸を生じるおよび/または感染性ウイルスを生じるのに十分な配列)を含むことができる。細胞への核酸の導入に使用することのできるウイルスまたはその部分は、ウイルスベクターと称され得る。ウイルスベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス)、ワクシニアウイルスおよび他のボックスウイルス、ヘルペスウイルス(例えば、単純ヘルペスウイルス)その他を含む。ウイルスベクターは、宿主細胞に導入される場合、感染性ウイルスの産生に十分なウイルス遺伝情報を含んでも含有しなくてもよい、即ち、ウイルスベクターは、複製能を有していても複製

10

20

30

40

50

欠損であってもよい。一部の実施形態において、例えば、ウイルスの産生が望ましいのであれば、例えば、感染性ウイルスの産生に十分な情報を欠く場合、情報は、宿主細胞または細胞に導入された別のベクターにより供給され得る。一部の実施形態において、例えば、ウイルスの産生が望ましくなければ、係る情報は供給されない。伝達すべき核酸は、天然起源のまたは修飾されたウイルスゲノムまたはその部分に取り込まれ得る、あるいは別々の核酸分子としてウイルスカプシド内に存在し得る。ベクターは、ベクターを取り込んだ細胞の同定および/または選択に適したマーカーをコードする1種または複数の核酸を含有することができる。マーカーは、例えば、抗生物質または他の薬剤に対する抵抗性または感受性のいずれかを増加または減少させる様々なタンパク質（例えば、ピューロマイシン、ハイグロマイシンまたはブラストサイジン等、抗生物質に対する抵抗性を付与するタンパク質）、その活性を当技術分野において公知のアッセイにより検出することができる酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）、およびこれを発現する細胞の表現型に検出可能な影響を与えるタンパク質またはRNA（例えば、蛍光タンパク質）を含む。ベクターは、多くの場合、核酸、例えば発現させようとする核酸の、ベクターへの挿入を容易にするために使用することのできる、1個または複数の適切に配置された制限酵素部位を含む。発現ベクターは、核酸が調節エレメント（「調節配列」、「発現制御エレメント」または「発現制御配列」とも呼ばれる）に作動可能に連結し、RNA転写物（例えば、タンパク質へと翻訳され得るmRNAまたはshRNAもしくはmiRNA前駆体等の非コードRNA）として発現され得るように、所望の核酸が挿入された、あるいはこれを挿入することのできるベクターである。発現ベクターは、少なくともある条件下で、作動可能に連結された核酸の転写を方向付けるのに十分な調節配列（複数可）、例えば、発現制御配列を含む。発現に要求されるまたは役立つ他のエレメントは、例えば、宿主細胞または*in vitro*発現系により供給され得る。係る調節配列は、典型的には、プロモーターを含み、エンハンサー配列または上流アクチベーター配列を含むことができる。一部の実施形態において、ベクターは、開裂および/またはポリ阿德ニル化シグナルを含み得る5'非翻訳領域および/または3'非翻訳領域をコードする配列を含むことができる。一般に、調節エレメントは、その発現が望まれる核酸の挿入前にベクターに含有されていてもよく、あるいは挿入される核酸に含有されていてもよく、あるいはその発現が望まれる核酸の挿入後にベクターに挿入されてもよい。本明細書において使用される場合、核酸および調節エレメント（複数可）は、調節エレメント（複数可）の影響または制御下で核酸の発現または転写が行われるように、共有結合により連結されている場合、「作動可能に連結される」と呼ばれる。例えば、プロモーター領域が、核酸の転写をもたらすことができる場合、プロモーター領域は、該核酸に作動可能に連結している。当業者であれば、遺伝子発現に有用な調節配列の厳密な性質は、種間または細胞型間で変動し得るが、一般に、必要に応じて、転写開始、RNAプロセッシングまたは翻訳開始に関与する配列を含み得ることに気づくであろう。適切なベクターおよび調節エレメント（複数可）の選択および設計は、当業者の能力および裁量の範囲内である。例えば、当業者は、所望の種（例えば、哺乳動物種）または細胞型における発現のための適切なプロモーター（または他の発現制御配列）を選択するであろう。ベクターは、例えば、サイトメガロウイルス（CMV）、レトロウイルス、サルウイルス（例えば、SV40）、パピローマウイルス、ヘルペスウイルスもしくは哺乳動物細胞に感染する他のウイルス由来の適したウイルスプロモーター、または例えば、EF1アルファ、ユビキチン（例えば、ユビキチンBまたはC）、グロビン、アクチン、ホスホグリセリン酸キナーゼ（PGK）等の遺伝子由来の哺乳動物プロモーター、またはCAGプロモーター（CMV初期エンハンサーエレメントおよびニワトリベータ-アクチンプロモーターの組合せ）等の複合（composite）プロモーター等、哺乳動物細胞における発現を方向付けることのできるプロモーターを含有し得る。一部の実施形態において、ヒトプロモーターを使用することができる。一部の実施形態において、通常、真核生物RNAポリメラーゼIによる転写を方向付けるプロモーター（「pol Iプロモーター」）、例えば、（U6、H1、7SKもしくはtRNAプロモーターまたはこれらの機能的バリエーション）を使用することができる。

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、通常、真核生物RNAポリメラーゼIIによる転写を方向付けるプロモーター(「pol IIプロモーター」)またはその機能的バリエーションが使用される。一部の実施形態において、通常、真核生物RNAポリメラーゼIIIによる転写を方向付けるプロモーター(「pol IIIプロモーター」)、例えば、リボソームRNA(5S rRNA以外)の転写のためのプロモーターまたはその機能的バリエーションが使用される。当業者は、対象の配列の転写を方向付けるための適切なプロモーターを選択するであろう。哺乳動物細胞において使用することのできる発現ベクターの例として、例えば、pcDNAベクターシリーズ、pSV2ベクターシリーズ、pCMVベクターシリーズ、pRSVベクターシリーズ、pEF1ベクターシリーズ、Gateway(登録商標)ベクター等が挙げられる。哺乳動物細胞において使用することのできるウイルスベクターの例として、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ワクシニアウイルスおよび弱毒化ポックスウイルス等のポックスウイルス、レトロウイルス(例えば、レンチウイルス)、セムリキ森林ウイルス、シンドビスウイルス等が挙げられる。一部の実施形態において、調節性(例えば、誘導性または抑圧性)発現制御エレメント(複数可)、例えば、調節性プロモーターは、発現を調節、例えば、オンにするもしくは増加させるまたはオフにするもしくは減少させることができるように使用される。例えば、テトラサイクリン調節性遺伝子発現系(Gossen & Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. 89巻: 5547~5551頁、1992年)またはそのバリエーション(例えば、Allen, N5(2000年) Mouse Genetics and Transgenics: 259~263頁; Urlinger, S5(2000年) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97巻(14号): 7963~8頁; Zhou, X. 20(2006年) Gene Ther. 13巻(19号): 1382~1390頁を例えば参照)は、誘導性または抑圧性発現をもたらすために用いることができる。様々な実施形態において、他の誘導性/抑圧性の系を使用することができる。例えば、人工または天然起源のホルモン受容体リガンド(例えば、天然起源または合成のエストロゲン受容体またはグルココルチコイド受容体リガンド等、ステロイド受容体リガンド)、テトラサイクリンまたはこれらのアナログ等の低分子により調節され得る発現制御エレメントや金属調節系(例えば、メタロチオネインプロモーター)を、特定の実施形態において使用することができる。一部の実施形態において、例えば、1種または複数の選択された組織または細胞型における発現を方向付けるために、組織特異的または細胞型特異的調節エレメント(複数可)を使用することができる。一部の実施形態において、ベクターは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むことができ、このポリヌクレオチド配列は、NまたはC末端融合体が作製されるように、ベクターに挿入された核酸と共にインフレームに配置される。一部の実施形態において、ポリヌクレオチド配列にコードされたポリペプチドは、標的化ペプチドとなり得る。標的化ペプチドは、シグナル配列(タンパク質の分泌を方向付ける)または発現されたタンパク質を核もしくはミトコンドリア等の細胞内の特異的オルガネラもしくは位置に方向付ける配列を含むことができる。一部の実施形態において、ポリペプチドは、タグを含む。タグは、これを含むタンパク質の検出および/または精製を容易にするために有用となり得る。タグの例として、ポリヒスチジンタグ(例えば、6xHisタグ)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、マルトース結合タンパク質、NUSタグ、SNUTタグ、StreptタグまたはV5、HA、MycもしくはFLAG等のエピトープタグが挙げられる。一部の実施形態において、挿入された核酸にコードされるタンパク質とポリペプチドとの間の領域にプロテアーゼ開裂部位が位置し、プロテアーゼに曝露することによるポリペプチドの除去を可能にする。

【0047】

本開示の目的のため、化学元素は、元素周期表(Periodic Table of the Elements)、CASバージョン、Handbook of Chemistry and Physics、第75版、表紙裏に従って同定されており、特異的官能基は、そこに記載されている通りに一般に定義されている。有機化学の一般原理ならびに特異的官能性部分および反応性は、例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、Organic Chemistry、Thomas Sorrell、University Science Books、Sausalito: 1999年、「March's Advanced 50

Organic Chemistry」、第5版、Smith, M. B. and March, J., John Wiley & Sons, New York: 2001年または前述のいずれかのより最新版に記載されている。様々な特異的官能基および化学用語の定義は、後述および/または国際出願PCT/US 2009/005656号明細書(国際公開第2010/044885号パンフレット)に記載されている。様々な用語の定義は、IUPAC Compendium of Chemical Terminology(1997年)、Alan D. McNaught and Andrew Wilkinson(Royal Society of Chemistry、英国ケンブリッジ)により編纂またはIUPACウェブサイト(<http://old.iupac.org/publications/compendium/index.html>)において利用できるそのアップデートされたオンラインバージョンに見出すことができる。本明細書に記載されている特定の態様の実施は、分子生物学、細胞培養、組換え核酸(例えば、DNA)技術、免疫学、核酸およびポリペプチドの合成、検出、操作および定量化ならびにRNA干渉の従来技法を当業者の技能範囲内で用いることができる。例えば、Ausubel, F.ら(編)、Current Protocols in Molecular Biology、Current Protocols in Immunology、Current Protocols in Protein ScienceおよびCurrent Protocols in Cell Biology、これら全てJohn Wiley & Sons, N.Y., 2008年12月時点の版; Sambrook, Russell, and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001年; Harlow, E. and Lane, D., Antibodies - A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988年を参照されたい。がんおよびがん処置に関するさらなる情報は、例えば、Cancer: Principles and Practice of Oncology(V.T. DeVitaら編、J.B. Lippincott Company、第8版、2008年または第9版、2011年)および/またはBrunton, L.ら(編)Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics、第12版、McGraw Hill、2010年に見出される。本明細書に引用されているあらゆる特許、特許出願、書籍、学術論文、文書、データベース、ウェブサイト、記事、刊行物、参考文献等は、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその全内容を援用する。本明細書との間に矛盾または不一致が生じる場合、本明細書が優先される。本出願人は、例えば、援用された材料のいずれかに基づき本明細書を修正するおよび/または明確な誤りを訂正する権利を留保する。援用された材料のいかなる内容も、本発明を限定することはない。

10

20

30

【0048】

II. 抗腫瘍標的としてのグリシン開裂系およびその構成成分

【0049】

抗腫瘍標的としてのグリシン開裂系(GSC)の同定が、本明細書に開示されている。一部の態様において、腫瘍細胞生存または増殖を阻害する方法であって、腫瘍細胞のGCSを阻害するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態において、腫瘍細胞生存または増殖を阻害する方法は、腫瘍細胞をGCSの阻害剤と接触させるステップを含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞を殺傷する方法であって、腫瘍細胞をGCS阻害剤と接触させるステップを含む方法が提供される。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ2(SHMT2)を過剰発現する。本明細書において使用される用語「腫瘍」は、異常に増殖する細胞を含む異常成長物を包含する。腫瘍は、典型的には、適切に調節されていない(例えば、通常であれば増殖を制約する生理的影響およびシグナルに正常に応答しない)過剰な細胞増殖により特徴付けられ、次の特性のうち1種または複数を呈することができる: 異形成(例えば、未成熟細胞の数または割合の増加をもたらす正常細胞分化の欠如); 退形成(例えば、より大きな分化損失、構造的組織化のさらなる損失、細胞多形性、大型のクロマチン増加性(hyperchromatic)核、高い核:細胞質比、非定型有糸分裂等の異常性等); 隣接組織の浸潤(例えば、基底膜の破損); および/または転移。特定の実施形態において、腫瘍は、本明細書において「がん」とも称される悪性腫瘍である。悪性腫瘍は、持続的な成長の傾向ならびに拡散する、例えば、局所的に浸潤する、および/または局所的におよび/または遠位の位置に転移する能力を有し、一方、良性腫瘍は、多くの場合、起源部位に局在化したままであり、多

40

50

くの場合、成長の観点から自己限定性である。用語「腫瘍」は、悪性固形腫瘍（例えば、癌腫、肉腫）および検出可能な固形腫瘍塊が存在しない悪性成長物（例えば、特定の血液系悪性病変）を含む。用語「がん」は一般に、本明細書において「腫瘍」と互換的に使用される、および/または1種または複数の腫瘍、例えば、1種または複数の悪性または潜在的な悪性腫瘍により特徴付けられる疾患を指すように使用される。がんとして、乳がん；胆道がん；膀胱がん；脳がん（例えば、神経膠芽腫、髄芽腫）；子宮頸がん；絨毛癌；結腸がん；子宮内膜がん；食道がん；胃がん；急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病を含む血液系新生物（neoplasm）；T細胞急性リンパ芽球性白血病/リンパ腫；ヘアリー細胞白血病；慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫；成人T細胞白血病/リンパ腫；ボーエン病およびパジェット病を含む上皮内新生物；肝臓がん；肺がん；ホジキン病およびリンパ球性リンパ腫を含むリンパ腫；神経芽細胞腫；メラノーマ、扁平上皮癌を含む口腔がん；上皮細胞、間質細胞、生殖細胞および間葉系細胞に起因する卵巣がんを含む卵巣がん；神経芽細胞腫、膵臓がん；前立腺がん；直腸がん；血管肉腫、胃腸管間質性腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫、線維肉腫および骨肉腫を含む肉腫；腎細胞癌およびウィルムス腫瘍を含む腎臓がん；基底細胞癌および扁平上皮がんを含む皮膚がん；セミノーマ、非セミノーマ（テラトーマ、絨毛癌）、間質性腫瘍および生殖細胞腫瘍等、胚腫瘍を含む精巣がん；甲状腺腺癌および髄様癌を含む甲状腺がんが挙げられるがこれらに限定されない。一部の実施形態において、腫瘍は、浸潤または転移の見込みが相対的に低い種類のものとなり得る。例えば、一部の実施形態において、腫瘍は、神経線維腫症（例えば、1、2、3、4または5型）、結節性硬化症、スタージ・ウェーバー症候群またはフォンヒッペル・リンドウ病に関連し得る。一部の実施形態において、腫瘍は、検出可能に浸潤性ではない、例えば、上皮内癌。種々の異なる腫瘍型が、特定の臓器において生じ得ること、これらが、臨床および/または病理学的特色、および/または分子マーカーに関して異なっていてよいことが認められよう。種々の異なる臓器において生じる腫瘍は、例えば、DeVita、上記参照またはその全巻をここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、WHO Classification of Tumoursシリーズ、第4版または第3版（Pathology and Genetics of Tumoursシリーズ）、International Agency for Research on Cancer（IARC）、WHO Press、スイス、ジュネーブに記述されている。

10

20

30

40

50

【0050】

一部の実施形態において、腫瘍細胞は、脳腫瘍細胞、例えば、神経膠芽腫細胞である。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、膀胱腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、頸部腫瘍細胞、結腸直腸腫瘍細胞、胚性腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、生殖細胞腫瘍細胞、頭頸部腫瘍細胞、血液系腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、メラノーマ細胞、中皮腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、卵黄嚢腫瘍細胞または肉腫細胞である。一部の実施形態において、乳房腫瘍細胞は、トリプルネガティブ乳房腫瘍細胞である。当技術分野において公知の通り、「トリプルネガティブ」乳房腫瘍は、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）またはHer2/neuを発現しない乳房腫瘍である。一般に、トリプルネガティブ乳房腫瘍は、典型的には、トリプルネガティブではない乳房腫瘍よりも悪い予後を有する。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、腫瘍形成細胞（tumor initiating cell）である。一部の実施形態において、腫瘍形成細胞は、神経膠芽腫幹細胞（GBM-SC）である。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、肺腫瘍細胞ではない。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、非小細胞肺癌細胞ではない。一部の実施形態において、腫瘍は、結腸がんではない。一部の実施形態において、腫瘍は、肺腫瘍ではない。一部の実施形態において、がんは、非小細胞肺癌ではない。一部の実施形態において、腫瘍は、結腸がんではない。

【0051】

一部の態様において、腫瘍を阻害する方法であって、腫瘍の少なくとも一部の腫瘍細胞においてGCSを阻害するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態において、腫瘍を阻害する方法は、腫瘍をGCSの阻害剤と接触させるステップを含む。一部の実施形態において、腫瘍を阻害する方法は、腫瘍をGCS構成成分の阻害剤と接触させるステ

ップを含む。一部の実施形態において、腫瘍の阻害は、腫瘍の少なくとも一部の腫瘍細胞の生存または増殖の阻害を含む。一部の実施形態において、腫瘍の阻害は、腫瘍の少なくとも一部の細胞の死滅を含む。一部の実施形態において、腫瘍の阻害は、少なくとも一部の腫瘍形成細胞の生存または増殖の阻害を含む。一部の実施形態において、腫瘍の阻害は、腫瘍進行の阻害、例えば、局所的浸潤または転移の阻害を含む。一部の実施形態において、腫瘍は、S H M T 2 を過剰発現する腫瘍細胞を含む。一部の実施形態において、腫瘍は、S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する種類のものである。一部の実施形態において、腫瘍は、脳腫瘍、例えば、神経膠芽腫である。一部の実施形態において、腫瘍は、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である。一部の実施形態において、乳房腫瘍は、トリプルネガティブ乳房腫瘍である。

10

【0052】

用語「G C S 阻害剤」または「G C S の阻害剤」は、G C S 構成成分の発現を阻害する、G C S 構成成分の1種または複数の活性（複数可）を阻害する、あるいはG C S により触媒されるグリシン異化反応経路（または逆反応）を阻害する薬剤を指す。様々な実施形態において、種々の異なる薬剤のいずれをG C S 阻害剤として使用してもよい。特定のG C S 阻害剤およびG C S 阻害剤を同定する方法をさらに後述する。

【0053】

一部の実施形態において、方法は、(a) 1個または複数の細胞をG C S 阻害剤と接触させるステップと、(b) 前記1個または複数の細胞の生存および/または増殖を評価するステップとを含む。一部の実施形態において、1個または複数の細胞は、腫瘍細胞を含む。一部の実施形態において、1個または複数の細胞は、腫瘍形成細胞を含む。一部の実施形態において、1個または複数の細胞は、S H M T 2 を過剰発現する腫瘍細胞を含む。例えば、一部の実施形態において、少なくとも、腫瘍細胞の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上、例えば、全てまたは基本的に全てが、S H M T 2 を過剰発現する。一部の実施形態において、1個または複数の腫瘍細胞の生存および/または増殖の阻害のレベルの検出は、1個または複数の腫瘍細胞が懸濁培養においてコロニーを形成する能力の決定を含む。一部の実施形態において、1個または複数の腫瘍細胞の生存または増殖の阻害のレベルの検出は、1個または複数の腫瘍細胞が半固体培地においてコロニーを形成する能力の決定を含む。一部の実施形態において、1個または複数の腫瘍細胞の生存および/または増殖の阻害のレベルの検出は、1個または複数の腫瘍細胞が培養において腫瘍球(tumor sphere)を形成する能力の決定を含む。一部の実施形態において、1個または複数の腫瘍細胞の生存および/または増殖の阻害のレベルの検出は、1個または複数の腫瘍細胞が*in vivo*で腫瘍を形成する能力の決定を含む。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、第2の抗腫瘍剤と組み合わせて、細胞、例えば、腫瘍細胞と接触される。一部の実施形態において、方法は、*ex vivo*または*in vivo*腫瘍モデルにおいて、第2の薬剤と組み合わせたG C S 阻害剤の効果を、単一薬剤として使用した場合のG C S 阻害剤の効果と比較するステップを含む。

20

30

【0054】

一部の実施形態において、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍は、1種または複数の癌遺伝子を含む、あるいは例えば、腫瘍抑制因子遺伝子(T S G)における突然変異の結果、1種もしくは複数の腫瘍抑制因子遺伝子(T S G)の発現が低下したもしくは発現がない、または1種もしくは複数のT S G 遺伝子産物の活性が低下したもしくは活性がない。用語「癌遺伝子」は、発現されると、がん開始または進行の見込みを増加させるまたはこれに寄与することのできる核酸を包含する。正常細胞の配列(「癌原遺伝子」)は、突然変異および/または異常発現により、癌遺伝子(「活性化された癌遺伝子」と呼ばれることもある)となるよう活性化され得る。様々な実施形態において、癌遺伝子は、遺伝子産物の完全なコード配列、または少なくとも一部には完全配列の発癌能を維持する部分、または融合タンパク質をコードする配列を含むことができる。発癌性突然変異は、例えば、変

40

50

更された（例えば、増加された）タンパク質活性、適正な調節の損失またはRNAもしくはタンパク質レベルの変更（例えば、増加）をもたらす得る。異常発現は、例えば、エンハンサー等の調節エレメントとの並置をもたらす染色体再編成により、エピジェネティック機序により、あるいは増幅により発生することができ、不適切な細胞型における増加した量の癌原遺伝子産物または産生をもたらすことができる。当技術分野において公知の通り、癌原遺伝子は多くの場合、細胞増殖、分化および/またはアポトーシスを制御するまたはこれに関与するタンパク質をコードする。このようなタンパク質は、例えば、様々な転写因子、クロマチンリモデリング因子（remodeler）、増殖因子、増殖因子受容体、シグナルトランスデューサーおよびアポトーシス調節因子を含む。癌遺伝子はまた、種々のウイルスタンパク質、例えば、ポリオーマウイルス（例えば、SV40ラージT抗原）およびパピローマウイルス（例えば、ヒトパピローマウイルスE6およびE7）等のウイルス由来のタンパク質を含む。TSGは、その発現産物の機能の損失または低下が、がん開始または進行の見込みを増加するまたはこれに寄与し得る、いずれかの遺伝子となり得る。機能の損失または低下は、例えば、突然変異またはエピジェネティック機序により発生し得る。多くのTSGは、細胞増殖を抑えるもしくは負に調節するおよび/またはアポトーシスを促進するように、正常であれば機能するタンパク質をコードする。一部の実施形態において、癌遺伝子またはTSGは、miRNAをコードする。例示的な癌遺伝子として、例えば、MYC、SRC、FOS、JUN、MYB、RAS、RAF、ABL、ALK、AKT、TRK、BCL2、WNT、HER2/NEU、EGFR、MAPK、ERK、MDM2、CDK4、GLI1、GLI2、IGF2、TP53等が挙げられる。例示的なTSGとして、例えば、RB、TP53、APC、NF1、BRCA1、BRCA2、PTEN、CDK阻害タンパク質（例えば、p16、p21）、PTCH、WT1等が挙げられる。いくつものこのような癌遺伝子およびTSGの名称が、複数のファミリーメンバーを包含すること、多くの他のTSGが公知であることを理解されよう。

【0055】

一部の実施形態において、腫瘍形成（initiating）細胞（TIC）を阻害する方法であって、腫瘍形成細胞をGCS阻害剤と接触させるステップを含む方法が提供される。用語「腫瘍形成細胞」は、本明細書において、用語「がん幹細胞」（CSC）と互換的に使用される。CSCは、広範な自己再生の特性、多系列分化の能力または多分化能、および例えば、適切な培養条件下における継続的な増殖の能力を呈する腫瘍内のまたはこれから生じる細胞である。CSCは、播種し二次腫瘍を生じる能力を有する腫瘍塊内の細胞として機能的に定義することができる。一部の態様において、CSCは、動物モデル（例えば、免疫無防備状態のマウス）において高い希釈度で（即ち、ごく少数の細胞を使用して）腫瘍を播種するその能力により定義することができる。CSCにより発生した腫瘍は、例えば、形態学および免疫組織化学的表現型の観点から、CSCを生じた腫瘍に似ていることがある。CSCは、（i）腫瘍を開始する、（ii）懸濁培養において成長する、（iii）軟寒天においてコロニーを形成する、（iv）腫瘍球を形成する、および/または（v）様々な一般に使用される化学療法薬物および/または放射線照射に対する抵抗性を呈する見込みの増加を呈することができる。CSCは、転移性散在等の現象、多くの腫瘍型におけるがん死亡率の主因および/または例えば、外科手術、放射線照射、化学療法もしくは高周波アブレーションによる大部分の腫瘍の除去またはアブレーション後の腫瘍再発の原因となり得る。CSCは、脳腫瘍、乳房腫瘍、結腸直腸腫瘍その他を含む多種多様な腫瘍型から同定された（例えば、Singh, Cら、Nature、432巻（2004年）：396～401頁）、Al-Hajj Mら、Proc Natl Acad Sci U S A、2003年；100巻（7号）：3983～8頁；Li Cら、Cancer Res、2007年；67巻（3号）：1030～7頁；O'Brien CAら、Nature、2007年；445巻（7123号）：106～10頁；Ricci-Vitiani Lら、Nature、2007年；445巻（7123号）：111～5頁を参照）。神経膠芽腫幹細胞（GBM-SC）とも呼ばれる例示的な神経膠芽腫腫瘍形成細胞株は、実施例に記載されている。GBM-SCは、GBMから得られる細胞またはその子孫（例えば、GBMに由来する細胞株のメンバー）となり得る。一部の実施

10

20

30

40

50

形態において、GBM-SCは、*in vitro*で繁殖させることができ、適した培地において培養されると、正常な神経幹細胞により形成されたものに似たニューロスフェアを形成することができる。一部の実施形態において、適した培地は、上皮増殖因子および塩基性線維芽細胞増殖因子等、適切な増殖因子を補充したneurobasal培地である。一部の実施形態において、GBM-SCは、アストロサイト、オリゴデンドロサイトおよびニューロンの細胞マーカープロファイルおよび形態学的特徴を呈する細胞等、複数の異なる神経またはグリア細胞型へと*in vitro*で分化するよう誘導され得る。一部の実施形態において、係る分化は、血清の添加および/またはニューロスフェア繁殖に適した培養条件の撤回により誘導され得る。

【0056】

CSCは、必要に応じて、種々の仕方で同定または単離することができる。様々な腫瘍型から単離されたCSCは、同じ組織型の正常細胞と比較して、あるいは同じ腫瘍由来の他の細胞と比較して、様々な細胞マーカー、例えば、細胞表面マーカーの発現の変更（例えば、発現の増加または減少）を呈することが報告されている。一部の実施形態において、CSCは、その発現パターンをCSCの同定または単離に使用することができる、1種または複数の細胞マーカー（複数可）の発現が増加または減少している。例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、国際出願PCT/US2009/002254号明細書およびその参考文献を参照されたい。特定の実施形態において、1種または複数の細胞マーカーは、CD15、CD20、CD24、CD34、CD38、CD44、CD45、CD105、CD133、CD166、CD171（L1CAM）、EpCAM、ESA、SCA1、Pecam、Stro1およびアルファ6インテグリンから選択される。一部の実施形態において、CSCは、CD44⁺、CD24⁻（CD44^高、CD24^低）である。一部の実施形態において、CSC、例えば、GBM-SCは、CD133、CD15、アルファ6インテグリンおよびL1CAMから選択される少なくとも1種の細胞表面マーカーを発現する。一部の実施形態において、GBM-SCは、A2B5⁺である。A2B5は、GT3ガングリオシドを認識するモノクローナル抗体である。一部の実施形態において、CSC、例えば、GBM-SCは、アルデヒド脱水素酵素（ALDH）、例えば、アルデヒド脱水素酵素1を発現する。ALDH⁺細胞は、例えば、試薬ALDEFLUOR（STEMCELL Technologies Inc、カナダ、ブリティッシュコロンビア州バンクーバー）を使用する機能的アッセイを使用して同定することができる。ALDEFLUOR基質、BODIPYアミノアセトアルデヒド（BAAA）は、細胞におけるALDHによって、流出阻害剤の存在下で細胞に蓄積する蛍光分子へと変換されて、高いALDH活性を有する細胞の同定を可能にする。一部の実施形態において、CSC、例えば、GBM-SCは、細胞内区画からヘキスト（Hoescht）33342蛍光色素を排除する能力を有する細胞の「サイド（side）集団」を含む。一部の実施形態において、CSC、例えば、GBM-SCは、OCT4、SOX2、NANOG、c-MYCおよびNOTCHから選択される少なくとも1種の転写因子を発現する。一部の実施形態において、CSC、例えば、GBM-SCは、特定の細胞マーカーの発現とは無関係に、その同定または単離に使用することができる特徴的な物理学的特徴を呈することができる。例えば、一部の実施形態において、CSC、例えば、GBM-SCは、非CSCと比較して増加した自発蛍光を呈することができる、および/または特有の形態（例えば、非常に高い核：細胞質比を有する大型の無顆粒細胞）を有することができる。

【0057】

一部の実施形態において、腫瘍におけるTICの数を低下させる方法は、腫瘍をGCS阻害剤と接触させるステップを含み、これにより、腫瘍におけるTICの数が低下する。一部の実施形態において、腫瘍における処置抵抗性を阻害するまたは処置抵抗性の出現を阻害する方法は、腫瘍をGCS阻害剤と接触させるステップを含み、これにより、抵抗性または処置抵抗性の出現が阻害される。一部の実施形態において、腫瘍転移を阻害する方法は、腫瘍をGCS阻害剤と接触させるステップを含み、これにより、腫瘍転移が阻害さ

10

20

30

40

50

れる。一部の実施形態において、腫瘍再発を阻害する方法は、それを必要とする対象をGCS阻害剤により処置するステップを含み、これにより、腫瘍再発の見込みが阻害される。

【0058】

一部の態様において、腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、対象における少なくとも一部の腫瘍細胞におけるGCSを阻害するステップを含む方法が提供される。一部の実施形態において、腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法は、対象にGCSの阻害剤を投与するステップを含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞の少なくとも一部は、SHMT2を過剰発現する。一部の実施形態において、腫瘍は、SHMT2を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである。一部の実施形態において、腫瘍は、脳腫瘍、例えば、神経膠芽腫である。一部の実施形態において、腫瘍は、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である。

10

【0059】

一部の実施形態において、方法は、GCS阻害剤の投与に対する腫瘍の応答を評価するステップをさらに含む。一部の実施形態において、応答を評価するステップは、腫瘍のサイズ、成長速度、局所的進行または転移を評価することを含む。一部の実施形態において、方法は、腫瘍の1種または複数の症状または兆候の存在または重症度に関して対象を評価するステップをさらに含む。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、第2の抗腫瘍剤、例えば、少なくとも1種の腫瘍型の処置における使用に認可された薬剤の使用と組み合わせて投与される。

20

【0060】

一部の態様において、腫瘍細胞もしくは腫瘍の阻害または腫瘍のための処置を必要とする対象の処置に有用な組成物であって、GCSの阻害剤を含む組成物が提供される。一部の実施形態において、組成物は、追加的な抗腫瘍剤をさらに含む。

【0061】

GCSは、幅広い生物に存在する多酵素系を含み、ヒトにおけるグリシンの異化反応の主要経路である(7)。GCS構成成分は、グリシン脱水素酵素(GLDC;グリシン脱炭酸酵素とも呼ばれる)、グリシン開裂系タンパク質H(GCSH)、アミノメチルトランスフェラーゼ(AMT)およびジヒドロリポアミド脱水素酵素(DLD)を含む。動物において、GCSのタンパク質(GCSタンパク質)は、ミトコンドリアに位置し、ミトコンドリア内膜に緩く結合している。GLDCをコードする遺伝子における突然変異、あるいは一般的ではないが、AMTまたはGCSHをコードする遺伝子における突然変異は、遺伝性代謝障害非ケトーシス型高グリシン血症(NKH)[MIM ID#605899]の根底をなす。グリシン脳症としても公知のNKHは、組織および体液(例えば、血漿および脳脊髄液)におけるグリシンの蓄積により特徴付けられ、様々な神経発生的欠損症をもたらす。これは常染色体劣性形質として遺伝する。NKHは、Hamosh Aら、「Glycine Encephalopathy」、Pagon RAら(編)Gene Reviews[インターネット]シアトル(ワシントン州):ワシントン大学、シアトル;1993~2002年[2009年11月24日にアップデート]US National Library of Medicine Bookshelf ID:NBK1357 PMID:20301531、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1357>において利用可、およびApplegarth, D.A. and Toone, J.R. Nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy): laboratory diagnosis. Mol. Genet. Metab. 74巻(1~2号):139~146頁(2001年)において記述されている。

30

40

【0062】

実施例においてさらに記載する通り、本出願人らは、アミノ酸異化反応に関与する遺伝子のセットを調査して、神経膠芽腫(GBM)細胞の生存および/または増殖におけるこれら遺伝子の発現のための潜在的な要件を評価した。少なくとも一部には、次の判断基準に基づき遺伝子を選択した:(1)遺伝子における機能喪失型突然変異が、ヒトにおける

50

遺伝性代謝障害の公知の原因である；および（２）遺伝子の発現が、GBM、GBM腫瘍形成細胞および幹細胞性と正に関連すると決定されている。低分子ヘアピン型RNA（shRNA）媒介性ノックダウンを使用して、選択された遺伝子の発現阻害の効果を検査した。GCS構成成分グリシン脱水素酵素（GLDC）をコードする遺伝子のノックダウンが、gGBM由来腫瘍形成細胞株（本明細書において、GBM幹細胞（GBM-SC）株とも称される）の生存率を有意に低下させることが発見された。GLDCノックダウンはまた、GBMに由来するまたは種々の他のがん型に由来するいくつかの他の腫瘍細胞株の生存率を著しく低下させた。GLDCノックダウンが生存率の低下をもたらした度合いに基づき、GLDCノックダウン感受性または非感受性として細胞株を分類した。これらの実験に関して、著しく低下した生存率を呈した（例えば、生存率の少なくとも10%、20%、25%以上の低下）細胞株は、「GLDCノックダウン感受性」と考慮したが、一方、著しく低下した生存率を呈さなかった（例えば、生存率の6%未満の低下）細胞株は、「GLDCノックダウン非感受性」と考慮した。異なるGCS構成成分、グリシン開裂系タンパク質H（GCSH）のshRNA媒介性の阻害またはGCSの公知の阻害剤の低分子であるシステアミンによる処置（9）は、GLDCノックダウン感受性群における細胞株の生存率を著しく損なった。よって、複数の証拠が、GCSの阻害が種々の異なる腫瘍型の腫瘍細胞の生存率を低下させることを示す。さらに後述する通り、SHMT2の過剰発現が、GCS阻害に対する腫瘍細胞感受性の見込みの増加と相関することも発見された。一部の態様において、SHMT2の発現の評価は、GCS阻害剤の投与に対し感受性である（「応答する」）見込みが増加した腫瘍細胞および/または腫瘍の同定に役立つ。一部の態様において、SHMT2の発現の評価は、GCS阻害剤の投与の恩恵を受ける見込みが増加した、がんの処置を必要とする対象の同定に役立つ。

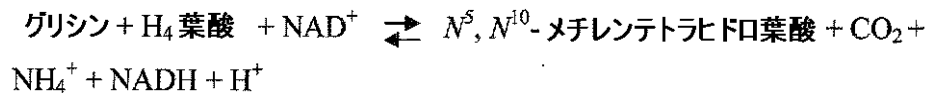
10

20

【0063】

次の全体的な反応スキームによると、GCSは、グリシンの可逆的酸化を触媒し、二酸化炭素、アンモニア、N5，N10-メチレンテトラヒドロ葉酸（5，10-CH2-H4葉酸）および還元型ピリジヌクレオチド（NADH）を生じる。

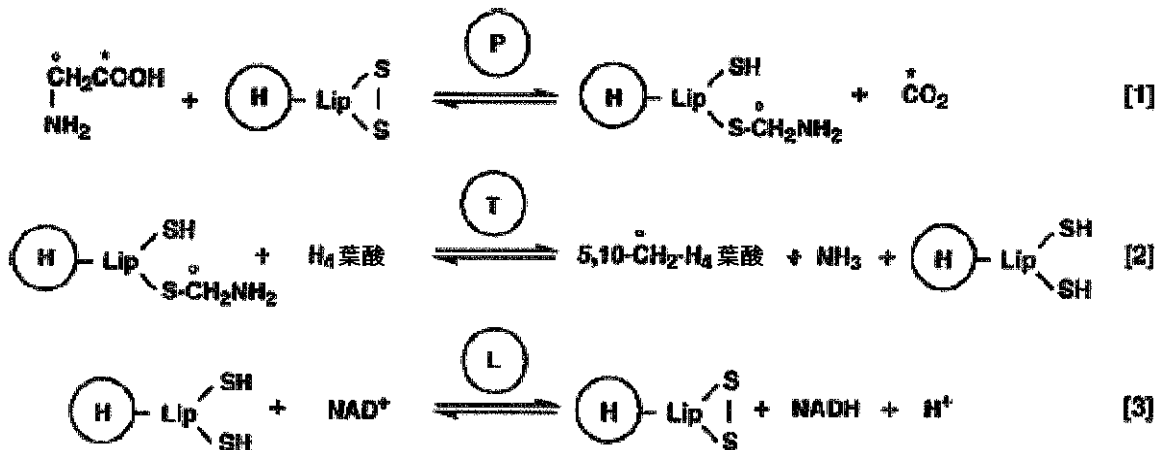
【化1】



30

Pタンパク質とも呼ばれるGLDCは、ピリドキサルリン酸依存性グリシン脱炭酸酵素（EC1.4.4.2）である。Hタンパク質とも呼ばれるGCSHは、担体タンパク質として働くリポ酸含有タンパク質である。Tタンパク質とも呼ばれるAMTは、テトラヒドロ葉酸要求酵素（EC2.1.2.10）である。Lタンパク質またはE3とも呼ばれるDLDCは、リポアミド脱水素酵素（EC1.8.1.4）である。いかなる理論に制約されることも望まないが、GCSにより触媒されるグリシン異化反応は、次の3つの反応（部分反応と呼ばれることもある）において起こると考えられる。

【化2】



40

50

上述の反応において、Lip、H₄葉酸および5,10-CH₂-H₄葉酸は、それぞれリポイル部分、テトラヒドロ葉酸およびN₅,N₁₀-メチレン-H₄葉酸を表す(7)。第1の反応において、Pタンパク質は、酸化型Hタンパク質のリポイル基における硫黄原子への残基アミノメチル基の移動と同時に、グリシンの脱炭酸を触媒し、アミノメチル化Hタンパク質を生成する。第2の反応において、Tタンパク質は、アミノメチル化Hタンパク質からテトラヒドロ葉酸(THF)へのメチレン基の移動を触媒し、NH₃の放出および還元型Hタンパク質の生成をもたらす。第3の反応において、還元型Hタンパク質のジヒドロリポイル基は、Lタンパク質により再度酸化される(7)。適切な条件下、例えば、嫌気細菌に存する条件等、嫌気条件下において、これらの反応は、逆に機能してグリシンの合成をもたらすことができる。

10

【0064】

いくつもの異なる真核生物および原核生物由来のGCS構成成分が、精製および特徴付けされてきた(例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する(7)に引用されている参考文献を参照)。例えば、GCS構成成分は、ヒト、ラット、ニワトリおよびウシを含む数種の脊椎動物の組織、植物(例えば、エンドウマメ)ならびに様々な細菌種から精製された。グリシン開裂活性は、様々な脊椎動物(vertebrate)種における肝臓、腎臓および脳において検出された。ヒト、他の脊椎動物ならびに様々な細菌および植物を含むいくつもの種のGLDC、GCSH、AMTおよびDLTをコードするcDNAがクローニングされており、配列は、当技術分野において公知である。配列は、例えば、国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)データベース等、様々な公表されているデータベースにおいて利用できる。いくつかの生物種由来のGCS構成成分の構造(例えば、結晶構造)が得られている。構造情報は、例えば、タンパク質構造データベース(Protein Data Bank)(PDB)データベース(www.pdb.org)に見出すことができる。表Bは、ヒトGCS構成成分の遺伝子ID(NCBI遺伝子データベース由来)ならびにNCBI参照配列(RefSeq)データベース由来のmRNAおよびタンパク質受託番号を収載する。例えば哺乳動物細胞において、GLDC、GCSH、AMTおよびDLTタンパク質は、そのN末端にミトコンドリア標的化配列(MTS)を含む「前タンパク質」として天然に産生され、この配列は、典型的には、前タンパク質が成熟型へとプロセッシングされる際に除去される。表Bにおける受託番号により収載されている配列は、例示的な正常配列であり、MTS配列を含む。他の正常配列が集団において存在し得ることが理解されよう。正常なDNA、RNAまたはポリペプチド配列は、少なくとも一部の健常個体に存在する配列であり、疾患に寄与するまたはこれをもたらすことは公知ではない。正常なDNA、RNAまたはポリペプチド配列は、例えば、(i)集団に存在する最もよく見られる配列；(ii)参照配列(例えば、NCBI RefSeq配列またはUniProt参照配列)；(iii)配列の各ポジションに存在するヌクレオチドが、集団において該ポジションに存在する最もよく見られるヌクレオチドである配列；または(iv)前述の配列の少なくとも1種と比べたあらゆる差(複数可)が、集団において少なくとも約1%の頻度を有する配列となり得る。

20

30

【0065】

【表 B】

表 B: GCS 構成成分(とヒト遺伝子 ID および受託番号)

名称	公式遺伝子記号	遺伝子 ID	RefSeq mRNA およびタンパク質受託番号
グリシン開裂系タンパク質 P(グリシン脱水素酵素)	GLDC	2731	NM_000170.2; NP_000161.2
グリシン開裂系タンパク質 H	GCSH	2653	NM_004483.4; NP_004474.2
グリシン開裂系タンパク質 L(ジヒドロリポアミド脱水素酵素)	DLD	1738	NM_000108.3; NP_000099.2
グリシン開裂系タンパク質 T(アミノメチルトランスフェラーゼ)	AMT	275	NM_000481.3; NP_000472.2 (アイソフォーム 1) NM_001164710.1; NP_001158182.1 (アイソフォーム 2) NM_001164711.1; NP_001158183.1 (アイソフォーム 3) NM_001164712.1; NP_001158184.1 (アイソフォーム 4)

10

【0066】

GCS 構成成分は、組換え DNA 技術を使用して様々な宿主細胞において発現され、活性（または活性化可能）型で精製された。例えば、タグ付きヒト H タンパク質が、産生および精製された (Zay, A.ら、Glycine cleavage enzyme complex: Molecular cloning and expression of the H-protein cDNA from cultured human skin fibroblasts *Biochem. Cell Biol.* 89 巻 (3号): 299~307 頁 (2011年))。E. coli リポ酸塩タンパク質リガーゼ (LPL) は、発現および精製されて、アポ-Hタンパク質をリポイル化し（これにリポ酸塩補欠分子族を付着し）、これを機能的ホロ-Hタンパク質に変換することを示した。タグ付きヒト T タンパク質が、産生および精製された (Okamura-Ikeda, K.ら、Crystal Structure of Human T-protein of Glycine Cleavage System at 2.0 Å Resolution and its Implication for Understanding Non-ketotic Hyperglycinemia. *J. Mol. Biol.* 351、1146~1159 頁 (2005年))。ヒト L タンパク質（タグ付きまたはタグなし）が、産生および精製された (Kim, H.ら、Expression of cDNA sequences encoding mature and precursor forms of human dihydrolipoamide dehydrogenase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266 巻、9367~9373 頁 (1991年); Liu, T.ら、Spectroscopic studies of the characterization of recombinant human dihydrolipoamide dehydrogenase and its site-directed mutants. *J. Biol. Chem.* 270 巻、15545~15550 頁 (1995年); Brautigamら、Crystal structure of human dihydrolipoamide dehydrogenase: NAD⁺/NADH binding and the structural basis of disease-causing mutations. *J. Mol. Biol.* 350 巻: 543~552 頁 (2005年); およびこれらの参考文献)。突然変異体 GCS 構成成分が、様々な種から単離され、あるいは組換え DNA 技法を使用して生成され、活性を評価された。例えば、天然起源の GCS タンパク質（例えば、NHKにおいて発生する突然変異体タンパク質）またはアミノ酸変更を含有する組換えにより産生された GCS タンパク質の配列保存、構造的情報および/または活性のアッセイを使用して、活性に重要な様々なアミノ酸残基が同定された（例えば、Brautigamら、2005年; Liuら、1995年; Nakai, T.ら、Structure of P-protein of the glycine cleavage system: implications for nonketotic hyperglycinemia. *EMBO J.* 24 巻 (8号): 1523~1526 頁 (2005年) を参照)。

20

30

40

【0067】

P タンパク質のサブユニット組成は、2種の型に分類された：真核生物および特定の原

50

核生物（例えば、*E. coli*）由来の型は、ホモ二量体であるが、一方、様々な他の原核生物（例えば、*Thermus thermophilus* (Tth)）由来の型は、ヘテロ四量体である。Tth Pタンパク質の結晶構造は、アポ酵素、ホロ酵素および阻害剤（（アミノオキシ）アセテート）と複合体形成したホロ酵素に対して決定され、ヒトPタンパク質の構造モデルの作成に使用された（Nakaiら、2005年）。配列保存および構造情報を使用して、ヒトPタンパク質の活性部位および特定の機能的に重要な残基を同定した。

【0068】

Hタンパク質は、グリシン開裂において中心的な役割を果たす分子量ほぼ14kDaの単量体タンパク質である。Hタンパク質の特異的リシン残基に共有結合しているリポ酸補欠分子族は、P、TおよびLタンパク質の部位と相互作用する。還元型リポ酸、酸化型リポ酸およびアミノメチルリポ酸を有するエンドウマメ葉由来のHタンパク質の構造が決定された（Paresら、1994年；Paresら、1995年）。ウシHタンパク質の結晶構造が報告されている（Higashiura Aら、High-resolution X-ray crystal structure of bovine H-protein at 0.88 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66巻 (Pt 6号) : 698~708頁 (2010年)）。

【0069】

遊離型および競合的阻害剤5-メチルテトラヒドロ葉酸（5-CH₃-H₄葉酸）との結合型の成熟ヒトTタンパク質の結晶構造が決定された（Okamura-Ikeda、K.ら、2005年）。構造の解析は、ヒトTタンパク質単量体が、中心に空洞を有するクローバー葉様構造に配置された3個のドメインからなり、該空洞が、広範な水素結合および疎水性接触により葉酸基質のアナログである5-CH₃-H₄葉酸に占有されることを指示した。疾患関連残基の大部分は、空洞の周りにクラスター形成し、広範な水素結合ネットワークを形成する。構造および突然変異解析に基づき、Arg292が、水分子を介して葉酸ポリグルタミン酸（folate polyglutamate）テイルと相互作用すること、また、5-CH₃-H₄葉酸のN10基近傍に位置するインバリアントAsp101が、触媒作用の開始における役割を果たし得ることが提案された。

【0070】

Lタンパク質は、上に示すグリシン開裂反応スキームの最後のステップを触媒し、このステップは、リポアミド（Lip-S₂）を生成するジヒドロリポアミド（Lip-(SH)₂）の酸化に關与する。FAD補因子は、Lip-(SH)₂からNAD⁺への電子伝達における中間物である。Lタンパク質は、FAD補因子近位のシステイン残基間に2個の分子内ジスルフィド架橋を有するホモ二量体として機能する。NAD⁺またはNADH存在下におけるヒトLタンパク質の結晶構造が決定された（Brautigam、2005年、上記参照）。NKHを引き起こす突然変異は、二量体界面、活性部位またはFADおよびNAD(+)結合部位に生じることが判明した。

【0071】

一部の態様において、GCS阻害に対し感受性を有する腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の同定に有用な方法が、本明細書に提供されている。一部の態様において、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍が感受性を有する薬剤の同定に有用な方法が、本明細書に提供されている。一部の実施形態において、薬剤への曝露または介入が、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株において少なくとも1種の抗腫瘍効果を有する場合、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株は、薬剤（例えば、GCS阻害剤）または介入に対し「感受性を有する」と考慮される。一部の実施形態において、「抗腫瘍効果」は、例えば、腫瘍細胞生存（生存率）、増殖、腫瘍形成能力および/または転移の阻害、あるいは腫瘍サイズ、成長速度または進行もしくは再発の見込みの減少である。例えば、一部の実施形態において、GCS阻害剤が、腫瘍細胞生存率または増殖を阻害する場合、例えば、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、適した参照値と比較して、GCS阻害剤への曝露後に細胞生存率および/または細胞増殖の減少を呈する場合、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株は、GCS阻害剤に対し感受性を有すると考慮される。適した参照値は、例えば、GCS阻害剤への曝露前に存在し

10

20

30

40

50

た生存率または増殖のレベル、あるいはGCS阻害剤の非存在下で予想される生存率および/または増殖のレベルとなり得る。一部の実施形態において、GCS阻害剤への曝露が、腫瘍サイズ、成長速度または転移もしくは再発の見込みの低下をもたらす場合、例えば、腫瘍が、適した参照値と比較して、GCS阻害剤への曝露後にサイズ、成長速度または転移もしくは再発の見込みの減少を呈する場合、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性を有すると考慮される。適した参照値は、例えば、GCS阻害剤への曝露前に存在したまたはGCS阻害剤の非存在下で予想される、サイズ、成長速度または転移もしくは再発の見込みとなり得る。一部の実施形態において、GCS阻害剤の非存在下で予想されるレベルは、匹敵する腫瘍または腫瘍細胞（複数可）、例えば、同じ腫瘍細胞株の腫瘍細胞または同じ腫瘍細胞株に由来する腫瘍がGCS阻害剤に曝露されない対照アッセイを行って決定される。一部の実施形態において、GCS阻害剤の非存在下で予想されるレベルは、病歴データに基づき決定される。一部の実施形態において、GCS阻害剤の非存在下で予想されるレベルは、GCS阻害剤で処置されていない対象の対照群を使用して決定される。

10

【0072】

一部の実施形態において、GCS阻害に対する腫瘍細胞、腫瘍細胞株もしくは腫瘍の感受性または薬剤、例えばGCS阻害剤もしくは薬剤の組合せに対する感受性は、培養中の腫瘍細胞を使用して評価される。数多くの腫瘍細胞株および非腫瘍原性細胞株は、当技術分野において公知のものである。細胞株は、例えば、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(American Type Culture Collection)(ATCC)、コリエル細胞リポジトリ(Coriell Cell Repositories)、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen(ドイツ微生物細胞培養コレクション(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures); DSMZ)、欧州細胞培養コレクション(European Collection of Cell Cultures)(ECCACC)、日本研究生物資源コレクション(Japanese Collection of Research Bioresources)(JCRB)、RIKEN、細胞バンクオーストラリア(Cell Bank Australia)等、寄託機関または細胞バンクから得ることができる。上述の寄託機関および細胞バンクの書面およびオンラインのカタログは、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する。例示的な腫瘍細胞株および腫瘍は、実施例に記載されている。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍細胞株は、SHMT2を過剰発現する。一部の実施形態において、腫瘍細胞、例えば、腫瘍細胞株は、ヒト腫瘍から生じる。一部の実施形態において、腫瘍細胞、例えば、腫瘍細胞株は、非ヒト動物の腫瘍、例えば、非ヒト動物への腫瘍細胞の導入によって産生されていない腫瘍から生じる。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、天然に発生する腫瘍(即ち、例えば、実験目的のために意図的に誘導または作製されていない腫瘍)から生じる。

20

30

【0073】

一部の実施形態において、実験的に産生された腫瘍細胞が使用される。腫瘍細胞は、非腫瘍細胞、例えば、非腫瘍体細胞を遺伝子改変することにより、例えば、非腫瘍細胞において癌遺伝子を発現もしくは活性化することにより、および/または1種または複数の腫瘍抑制因子遺伝子(TSG)の発現を不活性化もしくは阻害することにより、またはTSGの遺伝子産物の活性を阻害することにより産生することができる。特定の実験的に産生された腫瘍細胞および腫瘍細胞を産生する例示的な方法は、国際出願PCT/US2000/015008号明細書(国際公開第2000/073420号パンフレット)および/またはUS5,101,767, 018に記載されている。特定の実施形態において、非腫瘍細胞は、細胞にテロメラーゼ触媒サブユニット(例えば、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット; hTERT)を発現させることにより不死化されている。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、癌遺伝子を含む1種または複数の発現構築物(複数可)または発現ベクター(複数可)を細胞に導入することにより、あるいは遺伝子内もしくはその近傍への標的化された挿入によりまたは遺伝子の部分の欠失もしくは置き換えにより内在性遺伝子(癌原遺伝子)を修飾することにより、非腫瘍細胞から産生される。一部の実施形態において、TSGは、遺伝子標的化を使用してノックアウトまたは機能的に不

40

50

活性化される。例えば、TSGの部分は、欠失されてよい、あるいはTSGは、挿入により破壊されてもよい。一部の実施形態において、TSGは、TSGの発現産物の発現または活性を阻害することのできる、阻害分子をコードする1種または複数の発現構築物（複数可）または発現ベクター（複数可）（例えば、shRNAまたはドミナントネガティブもしくは負の調節因子等、RNAi剤）を細胞に導入することにより阻害される。癌遺伝子および/またはTSG阻害分子は、構成的であっても調節性（例えば、誘導性）であってもよい適した調節エレメントの制御下で発現させることができる。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、複数の癌遺伝子を発現もしくは活性化することにより、および/または複数のTSG、例えば、1、2、3、4種以上の癌遺伝子および/または1、2、3、4種以上のTSGを阻害もしくは不活性化することにより産生することができる。それぞれその発現/活性化または阻害/不活性化を使用して腫瘍を誘導することができる癌遺伝子および/またはTSGの多くの組合せは、当技術分野において公知のものである。

10

【0074】

腫瘍細胞は、薬剤（例えば、GCS阻害剤）が添加されるまたは添加された培養培地を含む培養系において維持することができる。腫瘍細胞生存率、増殖、腫瘍形成能力または他のいずれかの腫瘍細胞特性における薬剤の効果を評価することができる。一般に、当技術分野において公知のいずれかの適した方法は、様々な実施形態において、腫瘍細胞生存率もしくは増殖または腫瘍形成能力の評価に使用することができる。特定の実施形態において、例えば、細胞培養物における細胞または細胞集団の生存および/または増殖は、細胞計数アッセイ（例えば、目視検査、自動画像解析、フローサイトメーター等を使用）、複製アッセイ、細胞膜統合性アッセイ、細胞ATPベースのアッセイ、ミトコンドリア還元酵素活性アッセイ、BrdU、EdUもしくはH3-チミジン取り込みアッセイ、ヘキスト色素、DAPI、アクチノマイシンD、7-アミノアクチノマイシンDもしくはヨウ化プロピジウム等の核酸色素を使用するDNA含量アッセイ、レザズリン（AlamarBlueまたは様々な他の名称としても公知であることがある）、MTT、XTTおよびCell Titre Glo等の細胞代謝アッセイ、SRB（スルホローダミンB）アッセイ等のタンパク質含量アッセイ；核断片化アッセイ；細胞質ヒストン会合DNA断片化アッセイ；PARP開裂アッセイ；TUNEL染色；またはアネキシン染色により決定することができる。

20

【0075】

GCS阻害剤による細胞増殖または生存の阻害は、完全であっても完全でなくてもよいことが理解されよう。例えば、細胞増殖は、細胞増殖の阻害または低下の1種と考慮される効果のために完全抑止状態へと減少しても減少しなくてもよい。一部の実施形態において、「阻害」は、非増殖状態における細胞（例えば、G0状態における細胞、「静止状態」とも称される）の増殖の阻害および/または増殖細胞（例えば、静止状態ではない細胞）の増殖の阻害を含むことができる。同様に、細胞生存の阻害は、壊死もしくはアポトーシスおよび/または細胞を死亡させ易くする過程をもたらすまたはこれに寄与することによる等、細胞（単数または複数）の殺傷を指すことができる。阻害は、参照レベル（例えば、対照レベル）の少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%となり得る。例えば、一部の実施形態において、GCS阻害剤は、選択された量、例えば、参照レベル（例えば、対照レベル）の少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%だけ腫瘍細胞増殖または生存を阻害する量（例えば、濃度）で使用される、例えば、腫瘍細胞、例えばSHMT2を過剰発現する腫瘍細胞と接触される。

30

40

【0076】

一部の実施形態において、抗腫瘍効果は、腫瘍細胞が懸濁培養においてコロニーを形成する能力の阻害である。一部の実施形態において、抗腫瘍効果は、1個または複数の腫瘍細胞が、軟寒天またはメチルセルロース等、半固体培地においてコロニーを形成する能力

50

の阻害である。一部の実施形態において、抗腫瘍効果は、1個または複数の腫瘍細胞が培養において腫瘍球を形成する能力の阻害である。一部の実施形態において、抗腫瘍効果は、1個または複数の腫瘍細胞が *in vivo* で腫瘍を形成する能力の阻害である。

【0077】

一部の実施形態において、GCS阻害に対する腫瘍細胞、腫瘍細胞株もしくは腫瘍の感受性または薬剤、例えば、GCS阻害剤もしくは薬剤の組合せに対する感受性は、*in vivo* 腫瘍モデルを使用して評価される。「*in vivo*」腫瘍モデルは、1体または複数の生きた非ヒト動物（「被験動物」）の使用に關与する。例えば、*in vivo* 腫瘍モデルは、1体または複数の被験動物への薬剤（例えば、GCS阻害剤）の投与および/または腫瘍細胞の導入に關与し得る。一部の実施形態において、被験動物は、マウス、ラットまたはイヌである。数多くの *in vivo* 腫瘍モデルは、当技術分野において公知のものである。例として、特定の *in vivo* 腫瘍モデルは、米国特許第4,736,866号明細書；US SN 10/990993；国際出願 PCT/US 2004/028098号明細書（国際公開第2005/020683号パンフレット）；および/または国際出願 PCT/US 2008/085040号明細書（国際公開第2009/070767号パンフレット）に記載されている。対象への1個または複数の細胞の導入（例えば、注射または植え込みによる）は、「グラフティング (grafting)」と称することができ、導入された細胞（複数可）は、「グラフト」と称することができる。一般に、様々な実施形態において、*in vivo* 腫瘍モデルにおいていかなる腫瘍細胞を使用してもよい。腫瘍細胞は、腫瘍細胞株または腫瘍試料に由来し得る。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、天然に発生する腫瘍（即ち、例えば、実験目的のために意図的に誘導または作製されていない腫瘍）から生じる。一部の実施形態において、実験的に産生された腫瘍細胞を使用してもよい。導入された腫瘍細胞の数は、例えば、1個から約10、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹個以上に及び得る。一部の実施形態において、腫瘍細胞の少なくとも一部は、SHMT2を過剰発現する、例えば、腫瘍細胞は、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞株または腫瘍に由来する。例えば、腫瘍細胞の少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上、例えば、全てまたは基本的に全ては、SHMT2を過剰発現することができる。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、被験動物と同じ種または近交系統のものである。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、被験動物から生じ得る。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、被験動物とは異なる種のものである。例えば、腫瘍細胞は、ヒト細胞となり得る。一部の実施形態において、例えば、腫瘍細胞が被験動物と異なる種に由来するまたは被験動物と同じ種の免疫不適合系統から生じる特定の実施形態において、被験動物は、免疫無防備状態である。例えば、被験動物は、機能的欠損の免疫系を有するよう選択または遺伝子操作することができる、あるいは免疫系機能を低下させるように処置（例えば、放射線照射または免疫抑制剤または胸腺除去等の外科手術により）することができる。一部の実施形態において、被験動物は、SCIDマウス、NODマウス、NOD/SCIDマウス、ヌードマウス、および/またはRag1および/またはRag2ノックアウトマウス、または同様の免疫系機能不全を有するラットである。腫瘍細胞は、同所性または非同所性位置に導入することができる。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、皮下に、腎被膜下に、または血流に導入される。非腫瘍細胞（例えば、線維芽細胞、骨髄由来細胞）、細胞外マトリックス構成成分またはハイドロゲル（例えば、コラーゲンまたはMatrigel（登録商標））または腫瘍発達もしくは成長を促進する薬剤は、腫瘍細胞の前に、これと共に、またはこれとは別々に被験動物に投与することができる。腫瘍細胞は、グラフティングの前および/またはグラフティングの後に薬剤（例えば、GCS阻害剤）と接触させることができる（被験動物に薬剤を投与することにより）。数、サイズ、成長速度、転移または他の特性は、グラフティング後の1または複数の時点において評価することができる。一部の実施形態において、*in vivo* 腫瘍モデルにおける腫瘍は、例えば、少なくとも一部には、*in vivo* の細胞に存在するまたは発生する1種または複数の突然変異の結果、*in vivo* で発生する腫瘍性形質転換によ

10

20

30

40

50

り生じる。一部の実施形態において、被験動物は、腫瘍易発性動物である。動物は、例えば、腫瘍を発症する素因を天然に有する種または系統のものとなり得る、および/または遺伝子操作された動物となり得る。例えば、一部の実施形態において、動物は、その細胞の少なくとも一部が、遺伝子改変の結果、少なくとも1種の活性化された癌遺伝子を含む、および/または少なくとも1種のTSGが機能的に不活性化された、遺伝子操作された動物である。外来性遺伝子を含む遺伝子改変動物、例えば、トランスジェニック動物または内在性遺伝子に変更、例えば、挿入もしくは少なくとも部分的な欠失もしくは置き換えを有する動物（「ノックアウト」または「ノックイン」動物と称されることもある）を複製する標準方法を使用することができる。

【0078】

腫瘍数、サイズ、成長速度または転移は、例えば、様々なイメージング様式、例えば、X線、磁気共鳴画像法、例えば、代謝の（例えば、PETスキャンを使用する）機能イメージング等を使用して評価することができる。一部の実施形態において、腫瘍（複数可）は、身体から取り出して（例えば、剖検において）、評価することができる（例えば、腫瘍は、計数、秤量および/またはサイズ（例えば、寸法）測定することができる）。一部の実施形態において、腫瘍のサイズおよび/または数は、非侵襲的に決定することができる。例えば、特定の腫瘍モデルにおいて、蛍光標識された（例えば、GFP等、蛍光タンパク質を発現させることにより）腫瘍細胞は、様々な腫瘍イメージング技法または機器、例えば、二光子顕微鏡等、非侵襲的蛍光方法によりモニターすることができる。皮下に植え込まれた腫瘍のサイズは、皮膚の下でモニターおよび測定することができる。

【0079】

一部の実施形態において、ヒト対象における腫瘍の処置効果または感受性は、少なくとも一部には、当技術分野において公知の客観的判断基準を使用して評定することができる。例えば、本来のまたは改訂された（例えば、バージョン1.1）固形腫瘍における応答評定判断基準（Response Evaluation Criteria In Solid Tumors）（RECIST）を使用して、解剖学的腫瘍量に基づき、がん患者が改善（「応答」）するか、殆ど同じままであるか（「安定的疾患」）、悪化するか（「進行性疾患」）決定することができる（Therasse Pら、J Natl Cancer Inst（2000年）92巻：205～16頁；Eisenhauer, E.ら、Eur J Cancer.（2009年）45巻（2号）：228～47頁）。脳腫瘍（例えば、神経膠芽腫等、高度神経膠腫における）の応答評価は、Macdonald判断基準（Macdonald Dら（1990年）Response criteria for phase II studies of supratentorial malignant glioma. J Clin Oncol 8巻：1277～1280頁）、例えば、磁気共鳴画像法（Rees J（2003年）Advances in magnetic resonance imaging of brain tumours. Curr Opin Neurol 16巻：643～650頁）に外挿された、あるいはMacdonald判断基準のアップデートバージョン（Wen, PYら、J Clin Oncol.（2010年）28巻（11号）：1963～72頁）を使用することができる。例示的なリンパ腫応答評価は、Cheson BDら、J Clin Oncol 2007年；10巻：579～86頁に記載されている。

【0080】

一部の実施形態において、対象が、少なくともある期間、例えば、臨床に意義があると考慮される期間、応答（完全または部分応答）または安定的疾患または腫瘍進行の遅れを経験する場合、腫瘍は、「感受性」と考慮することができる。腫瘍進行は、例えば、より前進したステージまたはグレード；局所的、局部的または遠位拡散（例えば、転移）への進行を含むことができる。一部の実施形態において、生存率、増殖、サイズ、成長速度または進行もしくは再発の見込みの減少は、統計的に有意である。一部の実施形態において、期間は、少なくとも4、6、8、12週間以上となり得る。ヒト対象における腫瘍感受性を評価するための、本明細書において言及されている判断基準は、単なる例示である。修正バージョンまたは他の合理的な判断基準を使用してもよい。一般に、解剖的腫瘍量に基づく判断基準は、1種または複数の症状の低下等、生存の増加（例えば、無進行生存の増加、がん特異的生存の増加または全生存の増加）または少なくとも改善されたクオリテ

10

20

30

40

50

イ・オブ・ライフ等、臨床的に意義がある利益と合理的に相関するべきである。

【0081】

一部の実施形態において、例えば、ヒト対象における腫瘍の処置効果または感受性は、成績を評定することにより評価することができる。一部の実施形態において、全生存を評価することができる。一部の実施形態において、疾患特異的生存（即ち、がんによる死亡率のみを考慮する生存）が評価される。一部の実施形態において、無進行生存が評価される。成績は、所定の期間、例えば、診断の日付または処置開始の日付から、例えば、1、2、5、10、15または20年間にわたって評価することができる。進行、処置に対する応答、転移の存在および他の成績を評定するための方法および判断基準は、当技術分野において公知のものであり、客観的測定値（例えば、解剖学的腫瘍量）および判断基準、症状の臨床評定またはこれらの組合せを含むことができる。例えば、イメージング（例えば、X線、CTスキャンまたはMRIスキャン等を使用）および/または機能イメージングを使用して、病変（局所的または転移性）を検出または評価することができる、例えば、解剖学的腫瘍量を測定、新たな病変を検出すること等ができる。

10

【0082】

III. 腫瘍におけるSHMT2発現およびこれに関する使用

【0083】

実施例においてさらに記載する通り、本出願人は、(i)ミトコンドリアセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ2 (SHMT2)の発現が、多数の腫瘍型において上昇することおよび(ii)SHMT2発現のレベルが、GCS阻害に対し感受性である腫瘍細胞と相関することを発見した。腫瘍型の多様なセットから生じる腫瘍細胞株のパネルの中でも、グリシン代謝に関与する複数の遺伝子の発現レベルの解析は、ミトコンドリアにおけるセリンからグリシンへの変換に関与する酵素であるミトコンドリアSHMT2の発現が、GLDCノックダウンに対する感受性と密接に相関することを明らかにした。GLDCノックダウンに対し感受性である腫瘍細胞株（即ち、その生存または増殖がGLDCノックダウンにより阻害された腫瘍細胞株）は、非感受性細胞と比較して、SHMT2の著しくより高い発現を有していた。例えば、正常組織対照と比べてSHMT2を過剰発現した腫瘍細胞株は、低分子（システアミン）によるGCS阻害に対し感受性であったが、一方、SHMT2の低発現または発現なしを表示した腫瘍細胞株は、GCS阻害に対し非感受性であった。よって、SHMT2の発現レベルは、GCS阻害に対する腫瘍細胞感受性と相関する。GCS阻害に対し感受性であった腫瘍細胞におけるSHMT2のshRNA媒介性ノックダウンが、GLDC shRNAからこれらの細胞を保護したことも観察された。いかなる理論に制約されることも望まないが、この結果は、SHMT2レベルとGCS阻害に対する感受性との間の関係性が、単純な相関性ではなく、機能的に関連性ともなり得ることを示唆する。

20

30

【0084】

ヒトSHMT2は、遺伝子ID6472を割り当てられた。SHMT2遺伝子（ヒト遺伝子のホモログ）は、幅広い他の種（例えば、他の脊椎動物、昆虫、真菌）において同定された。ヒトSHMT2ポリペプチドの複数のアイソフォームが同定され、複数の転写物バリエーションが公知である。表Cは、ヒトSHMT2タンパク質アイソフォームおよびmRNA転写物バリエーションの例示的な配列のRefSeq受託番号を収載する。

40

【0085】

【表 C】

表 C: ヒト SHMT2 ならびにアイソフォームおよび転写物の RefSeq 受託番号

タンパク質名	RefSeq mRNA およびタンパク質受託番号
セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、ミトコンドリアアイソフォーム 1 前駆体	NM_005412.5; NP_005403.2 (転写物バリエーション 1)
セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、ミトコンドリアアイソフォーム 2 前駆体	NM_001166356.1; NP_001159828.1 (転写物バリエーション 2)
セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ、ミトコンドリアアイソフォーム 3	NM_001166357.1; NP_001159829.1 (転写物バリエーション 3) NM_001166358.1; NP_001159830.1 (転写物バリエーション 4) NM_001166359.1; NP_001159831.1 (転写物バリエーション 5)

10

【0086】

本出願人は、SHMT2 mRNA レベルが、正常組織対照と比べて、多数のがんにおいて有意に上昇することを発見した。例えば、マイクロアレイに基づくメタ解析は、SHMT2 発現が、種々の脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍および肉腫を含むいくつものがんにおいて増加することを明らかにした。多くの場合、SHMT2 は、係る特定のがんにおいて過剰発現される遺伝子の上位 1% 内に入る（実施例における表 1 を参照）。よって、SHMT2 発現レベルは、広範囲のヒト腫瘍にわたる分類に使用することができる。

20

【0087】

一部の態様において、腫瘍細胞、腫瘍細胞株、腫瘍または対象を分類する方法が、本明細書に提供される。一部の実施形態において、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を分類する方法は、(a) 腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍における SHMT2 発現を評価するステップと、(b) ステップ (a) の結果に基づき前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を分類するステップとを含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍は、SHMT2 の発現に基づき、少なくとも 2 群のうち 1 群に分類される。例えば、一部の実施形態において、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍は、SHMT2 の過剰発現を呈するまたは SHMT2 の過剰発現を呈しないと分類される。一部の実施形態において、SHMT2 の発現レベルは、GCS 阻害に対し感受性である可能性が高いまたは感受性である可能性が低い腫瘍細胞の間の区別に役立つ。例えば、一部の実施形態において、SHMT2 発現のレベルは、GCS 阻害に対する腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の感受性の予測に使用される。一部の実施形態において、SHMT2 を過剰発現する腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍は、GCS の阻害に対し感受性である見込みが増加したと分類される。一部の実施形態において、SHMT2 を過剰発現する腫瘍のための処置を必要とする対象は、GCS の阻害剤による処置に適した候補である見込みが増加したと分類される、例えば、対象は、GCS 阻害剤による処置の恩恵を受ける見込みが増加したと分類される。

30

40

【0088】

一部の実施形態において、腫瘍を分類する方法は、(a) 腫瘍が、SHMT2 を過剰発現する傾向を有する種類のものであるかどうかを決定するステップと、(b) ステップ (a) の結果に基づき前記腫瘍を分類するステップとを含む。一部の実施形態において、SHMT2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型は、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である。一部の実施形態において、乳房腫瘍は、トリプルネガティブ乳房腫瘍である。一部の実施形態において、方法は、腫瘍における SHMT2 発現を評価するステップをさらに含む。

50

【 0 0 8 9 】

一般に、適した試料を入手できるいずれかの細胞、細胞株または腫瘍は、S H M T 2 発現または活性に関して評価することができる（および/または本明細書に記載されている1または複数の目的に使用することができる）。数多くの腫瘍細胞株および非腫瘍原性細胞株は、当技術分野において公知のものである。細胞株は、例えば、上に収載されている機関または細胞バンク等、寄託機関または細胞バンクから得ることができる。S H M T 2 を過剰発現するまたはS H M T 2 を過剰発現しない例示的な腫瘍細胞株および腫瘍は、実施例に記載されている。

【 0 0 9 0 】

本明細書において使用される場合、「過剰発現」または「過剰発現される」は、参照レベルまたは対照レベルよりも大きい、例えば、それよりも少なくとも約1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上高い発現のレベル（例えば、産生されたまたは存在するmRNAまたはタンパク質等、遺伝子産物の量）を指すよう互換的に使用される。しかし、一部の実施形態において、過剰発現は、参照または対照レベルよりも1.1~1.5倍の間高いレベルを指すことができる。一部の実施形態において、対照レベルは、正常な（非腫瘍）細胞または非腫瘍組織におけるレベルである。一部の実施形態において、非腫瘍組織は、腫瘍に隣接する組織である。一部の実施形態において、非腫瘍組織は、腫瘍が生じた組織と同じ組織型の組織である。一部の実施形態において、非腫瘍細胞は、非腫瘍組織、例えば、腫瘍に隣接する非腫瘍組織に存在する細胞である。一部の実施形態において、発現が、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍においてバックグラウンドよりも検出可能に大きく、対照細胞においてバックグラウンドよりも検出可能に大きくない場合、遺伝子は、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍において過剰発現される。一部の実施形態において、S H M T 2 の過剰発現は、U - 2 5 1、B T 1 4 5、0 3 0 8、A 2 0 5 8、A C H N またはL N 2 2 9 細胞株の細胞に存在する発現レベル（またはこれらの細胞株の平均発現レベル）の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%または100%の高さの発現レベルを指し、この場合、特定の条件下で培養することにより分化するよう誘導することのできる細胞株に関して、S H M T 2 の発現は、非分化誘導条件下で培養された細胞において測定される。一部の実施形態において、S H M T 2 の過剰発現は、表1に収載されているがんのいずれか1種または複数に存在する発現レベルの少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%または100%の高さの発現レベルを指す。一部の実施形態において、M C F 7、H M C - 1 - 8、U 8 7、P C 3、D o T c 2 - 4 5 1 0 により呈されるまたは分化するよう誘導された場合のB T 1 4 5 もしくは0 3 0 8 により呈される発現のレベルと同じまたはこれを下回るS H M T 2 発現のレベルは、S H M T 2 の過剰発現の欠如を表す。

【 0 0 9 1 】

一部の実施形態において、S H M T 2 発現のレベルの評価は、少なくとも一部の腫瘍細胞が、S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップまたはS H M T 2 を過剰発現する腫瘍細胞のパーセンテージを評価するステップを含む。一部の実施形態において、解析された腫瘍細胞の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%以上が、S H M T 2 を過剰発現する場合、腫瘍は、S H M T 2 を過剰発現すると考慮することができる。一部の実施形態において、腫瘍細胞の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%以上が、S H M T 2 を過剰発現する。一部の実施形態において、腫瘍細胞の少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%以上が、S H M T 2 の強い染色を呈する。図6は、S H M T 2 の過剰発現を呈する脳腫瘍（G B M）切片の代表例および正常な脳組織（S H M T 2 を過剰発現しない組織の代表）を示す。一部の実施形態において、S H M T 2 を発現する非がん対照細胞において粒状点が容易に区別される条件を使用して行われたI H C により、個々の粒状点が簡単に区別されないよう、細胞は、十分に強くS H M T 2 を過剰発現する。

【 0 0 9 2 】

一部の実施形態において、方法は、試料、例えば、腫瘍試料におけるS H M T 2 遺伝子

産物のレベルを決定することにより、S H M T 2 発現のレベルを評価するステップを含む。よって、一部の実施形態において、試料における S H M T 2 遺伝子産物のレベルに従って腫瘍試料を分類するための方法が提供される。一部の実施形態において、腫瘍試料を分類する方法は、(a) 腫瘍試料を用意するステップと、(b) 前記腫瘍試料における S H M T 2 発現を評価するステップとを含み、S H M T 2 発現のレベルは G C S 阻害剤に対する感受性と相関するため、G C S 阻害剤に対する感受性に関して腫瘍試料を分類する。一部の態様において、腫瘍を分類する方法は、(a) 腫瘍から得られた試料における S H M T 2 発現のレベルを決定するステップと、(b) S H M T 2 発現のレベルを S H M T 2 発現の対照レベルと比較するステップと、(c) ステップ (b) の結果に基づき、腫瘍が G C S 阻害剤に対し感受性である見込みに関して腫瘍を分類するステップとを含み、S H M T 2 発現の対照レベルと比較して試料における S H M T 2 遺伝子発現のより大きい (増加した) レベルは、腫瘍が G C S 阻害剤に対し感受性である見込みの増加を示す。

10

【 0 0 9 3 】

一部の態様において、腫瘍診断、予後、予測または処置選択のための方法は、腫瘍における S H M T 2 発現のレベルを評価するステップを含む。一部の態様において、腫瘍診断、予後、予測または処置選択のための方法は、(a) 腫瘍における S H M T 2 発現のレベルを評価するステップと、(b) 少なくとも一部にはステップ (a) に基づき、診断、予後、予測または処置選択情報を提供するステップとを含む。一部の態様において、腫瘍診断、予後、予測または処置選択のための方法は、(a) 対象から得られた腫瘍試料を用意するステップと、(b) 前記試料における S H M T 2 発現のレベルを評価するステップと、(c) 少なくとも一部にはステップ (a) に基づき、診断、予後、予測または処置選択情報を提供するステップとを含む。方法は、S H M T 2 発現のレベルに基づき、試料または腫瘍をスコア化するステップをさらに含むことができる。スコアは、診断、予後、予測または処置選択情報を提供するために使用することができる。一部の実施形態において、診断情報は、腫瘍の存在の診断を含む。例えば、正常には (腫瘍の非存在では) S H M T 2 を発現または過剰発現する細胞を含有することが予想されない位置または試料における係る細胞の存在は、腫瘍を示すことができる、あるいは正常に (腫瘍の非存在で) 予想される S H M T 2 を過剰発現する細胞の数と比較した、係る細胞の数の増加の存在は、腫瘍を示すことができる。

20

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態において、S H M T 2 発現の存在またはレベルが、特定の処置とは無関係に、予後、例えば、成績と相関し得ることが想定される。例えば、S H M T 2 を過剰発現する腫瘍は、一般に、S H M T 2 を過剰発現しない腫瘍よりも、より高悪性度となり得る、標準治療法を使用して処置された場合に成績不良をもたらす可能性がより高くなり得る、および / または標準治療法を使用した処置後に再発する可能性がより高くなり得る。成績は、例えば、無病生存、全生存 (例えば、診断後 1、2、5 または 10 年間の生存) により評価することができる。係る相関は、成績データが利用できる患者コホート由来の腫瘍試料における S H M T 2 発現の解析により確立することができる。対象は、対象由来の腫瘍試料における S H M T 2 発現に基づき、群に分類することができ、適切な解析、例えば、適切な統計解析を行って、群間の差を検出することができる。例えば、カプラン・マイヤー (Kaplan-Meier) 解析を使用することができる。

30

40

【 0 0 9 5 】

一部の実施形態において、予測情報は、腫瘍が G C S 阻害剤に対し感受性となる (G C S 阻害剤に応答するようになる) 見込みの予測を含み、S H M T 2 発現の増加は、腫瘍が G C S 阻害剤に対し感受性となる見込みの増加を示す。一部の態様において、腫瘍細胞または腫瘍が G C S 阻害剤に対し感受性である見込みを予測する方法であって、前記腫瘍細胞または腫瘍が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍細胞または腫瘍が S H M T 2 を過剰発現する場合、前記腫瘍細胞または腫瘍が S H M T 2 を過剰発現しない場合よりも、前記腫瘍細胞または腫瘍が、G C S 阻害剤に対し感受性である見込みが増加している方法が提供される。

50

【 0 0 9 6 】

一部の態様において、GCS阻害剤による治療法に適した候補である対象を同定するための使用方法であって、がんを有する対象から得られた腫瘍試料におけるSHMT2発現のレベルを評価するステップを含み、SHMT2発現のレベルの増加が、対象がGCS阻害剤による処置に適した候補であることを指示する方法が提供される。一部の実施形態において、がんのための処置を必要とする対象のための処置を選択する方法は、(a)がんを有する対象から得られた腫瘍試料におけるSHMT2発現のレベルを評価するステップと、(b)少なくとも一部にはステップ(a)の結果に基づき、対象のための治療剤を選択するステップとを含む。一部の実施形態において、がんのための処置を必要とする対象のための処置を選択する方法は、(a)対象から得られた腫瘍試料におけるSHMT2発現のレベルを評価するステップと、(b)前記腫瘍がSHMT2を過剰発現する場合、対象のための治療剤としてGCS阻害剤を選択するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、前記対象をGCS阻害剤で処置するステップをさらに含む。一部の実施形態において、対象を処置する方法は、(a)SHMT2を過剰発現することが決定された腫瘍のための処置を必要とする対象を用意するステップと、(b)前記対象をGCS阻害剤で処置するステップとを含む。

10

【 0 0 9 7 】

一部の実施形態において、方法は、(a)対象が、SHMT2を過剰発現する腫瘍のための処置を必要としていることを決定するステップと、(b)前記対象をGCS阻害剤で処置するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(a)がんを有する対象がGCS阻害剤による処置に適した候補であることを、少なくとも一部には前記がんにおけるSHMT2発現のレベルに基づき決定するステップと、(b)前記対象をGCS阻害剤で処置するステップとを含む。

20

【 0 0 9 8 】

一部の態様において、がんの処置の有効性を評価する方法であって、(a)がんを処置した対象から得られた試料におけるSHMT2発現またはSHMT2活性のレベルを評価するステップを含み、前記試料におけるSHMT2発現増加の非存在またはSHMT2活性増加の非存在が、有効な処置を指示する方法が提供される。一部の実施形態において、ステップ(a)は、対象のがんを処置した後の1または複数の時点において反復され、経時的なSHMT2発現増加またはSHMT2活性増加の継続的な非存在は、有効な処置を指示する。試料は、例えば、処置された腫瘍の部位またはその近くから(例えば、腫瘍が除去された部位またはその近傍から)得ることができる。腫瘍は、本来、SHMT2を過剰発現することが決定されていてよい。

30

【 0 0 9 9 】

一部の態様において、がんの処置の有効性を評価する方法であって、(a)がんを有する対象から得られた試料におけるSHMT2発現またはSHMT2活性のレベルを評価するステップと、(b)前記対象の処置における1または複数の時点において、ステップ(a)を反復するステップとを含み、経時的なSHMT2発現の減少もしくはSHMT2活性の減少または経時的なSHMT2発現もしくは活性の低下の維持が、有効な処置を指示する方法が提供される。試料は、例えば、処置されているがんの部位またはその近くから得ることができる。腫瘍は、本来、SHMT2を過剰発現する少なくとも一部の細胞を含むことが決定されていてよい。

40

【 0 1 0 0 】

一部の態様において、腫瘍再発に関して対象をモニターする方法であって、(a)腫瘍を処置した対象から得られた試料におけるSHMT2発現またはSHMT2活性のレベルを評価するステップを含み、前記試料におけるSHMT2発現の増加またはSHMT2活性の増加の存在が、腫瘍再発を指示する方法が提供される。一部の実施形態において、ステップ(a)は、処置後の1または複数の時点において反復される。試料は、例えば、腫瘍の部位またはその近傍から(例えば、腫瘍が除去された部位またはその近傍から)得ることができる。

50

【0101】

一部の実施形態において、SHMT2発現のレベルは、SHMT2遺伝子産物、例えば、RNAまたはタンパク質のレベルを評価することにより評価することができる。様々な実施形態において、遺伝子産物、例えば、RNAまたはタンパク質の評価に有用な、当技術分野において公知のいかなる適した方法を使用してもよい。一部の実施形態において、RNAは、少なくとも一部には、ハイブリダイゼーション、増幅および/または配列決定に基づき測定される。RNA、例えば、mRNAを検出するための例示的な使用方法として、*in situ*ハイブリダイゼーション、ノーザンブロット、マイクロアレイハイブリダイゼーション（例えば、cDNAまたはオリゴヌクレオチドマイクロアレイを使用）、逆転写PCR（例えば、リアルタイム逆転写PCR；定量的RT-PCR）、逆転写に続く配列決定、ナノストリング（nanostrip）技術（Geiss, G.ら、Nature Biotechnology（2008年）、26巻、317～325頁）、フローサイトメトリー等が挙げられる。TaqMan（登録商標）アッセイおよびSYBR（登録商標）Green PCRアッセイは、一般に使用されているリアルタイムPCR技法である。他のアッセイとして、標準化（Sta）RT-PCR（商標）（Gene Express, Inc.、オハイオ州トレド）およびQuantigene（登録商標）（Panomics, Inc.、カリフォルニア州フリーモント）が挙げられる。いくつものこのような方法は、そのレベルを測定しようとする標的RNAと実質的にまたは完璧に相補的な配列（例えば、少なくとも10ヌクレオチドの長さ、例えば、少なくとも12、15、20または25ヌクレオチドの長さ）を含む1種または複数の核酸プローブ（複数可）またはプライマー（複数可）と試料を接触させるステップを含む。プローブまたはプライマーは、例えば、蛍光色素で標識することができる。多くの実施形態において、プローブまたはプライマーは、プローブまたはプライマーが、アッセイ条件下において、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞における係るmRNAと、他の遺伝子に由来する大部分のまたは基本的に全（例えば、少なくとも99%以上の）転写物との間を区別できるよう、対象のmRNAと十分に相補的な配列を含む。プライマーは、当技術分野において公知の方法およびソフトウェアプログラムを使用して設計することができる。例えば、アルゴリズムPrimer3（Rozen, S and Skaletsky, HJ（2000年）Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S（編）Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press、ニュージャージー州トトワ））を利用する、NCBIウェブサイトにおいて利用できるプログラムであるPrimer Blastを使用することができる。プローブまたはプライマーは、様々な実施形態において、支持体に付着することができる、あるいは溶液中に存在することができる。支持体は、実質的に平面状の支持体、例えば、スライドもしくはチップまたは粒子状の支持体、例えば、マイクロ粒子（「ビーズ」とも称される）等のほぼ球状の支持体となり得る。一部の実施形態において、遺伝子発現の連続解析（serial analysis of gene expression）（SAGE）（そのパリアントを含む）またはRNA-Seq等、配列決定に基づくアプローチを使用することができる。RNA-Seqは、RNA転写物を定量化するための、種々のハイスループット配列決定技法のいずれかの使用を指す（例えば、Wang, Z.ら、Nature Reviews Genetics（2009年）、10巻、57～63頁を参照）。RNAを検出するための他の使用法は、例えば、電気化学的検出または蛍光相関分光法を含む。mRNAを検出する特定の方法が、場合によっては、少なくとも一部のプレmRNA転写物（複数可）、転写物プロセッシング中間体、非コード転写物パリアントおよび/または分解産物を検出することもできることを理解できよう。

【0102】

一部の実施形態において、SHMT2遺伝子の少なくとも一部分を含有する染色体領域のコピー数の増加は、過剰発現の指標として使用することができる。一部の実施形態において、腫瘍または腫瘍細胞株における腫瘍細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%以上において細胞当たり2コピー超の領域が存在する場合、領域のコピー数が増加したと考慮される。一部の実施形態に

10

20

30

40

50

において、コピー数は、少なくとも3、4、5、8、10または15個であってもよい。一部の実施形態において、腫瘍または腫瘍細胞株における腫瘍細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%以上において細胞当たり2コピー未満の領域が存在する場合、領域のコピー数は減少したと考慮される。コピー数の評価に有用な方法として、例えば、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH)、マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅、短い蛍光断片の定量的マルチプレックスPCR (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragment) (QMPSF)、比較ゲノムハイブリダイゼーション、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション、SNPアレイ技術、DNA配列決定等が挙げられる。

【0103】

一般に、タンパク質の検出および/または測定に適したいずれかの方法は、様々な実施形態におけるSHMT2ポリペプチドのレベルの評価に使用することができる。例えば、免疫学的方法または他の親和性に基づく方法を使用することができる。免疫学的検出方法は一般に、例えば、試料における特異的抗体-抗原相互作用の検出に關与する。抗体は、モノクローナルであってもポリクローナルであってもよい。抗体調製物は、免疫原または結合標的として対象のポリペプチドの同じまたは異なる部分を使用して作製されていてよい複数のモノクローナル抗体を含むことができる。一部の実施形態において、抗体は、抗ペプチド抗体である。一部の実施形態において、抗体、例えば、抗原に結合する抗体(一次抗体)または一次抗体に結合する二次抗体は、標識にタグ付けまたはコンジュゲートされている。一般に、標識(「検出可能標識」とも称される)は、標識を含むまたは標識が付着している実体の検出と、任意選択でその定量化を容易にするいずれかの部分となり得る。様々な実施形態において使用することのできる標識として、例えば、有機材料(低分子色素フルオロフォア、クエンチャー、ポリマー、蛍光タンパク質を含む); 金属キレート、コロイド金属、金属および半導体ナノ結晶(例えば、量子ドット)等、無機材料; 天然起源または合成のルシフェリン(例えば、ホタルまたはRenillaルシフェリン、セレンテラジン)等、酵素触媒作用によりルミネセンス(luminescence)を呈する化合物、ハプテン、放射性原子、同位元素または酵素が挙げられる。蛍光色素として、例えば、アクリジン色素; Alexa色素; BODIPY、クマリン(coumain)、シアニン色素; フルオレセイン色素、ローダミン色素、キサンテン色素および前述のいずれかの誘導体が挙げられる。例えば、数多くの蛍光およびそれ以外の検出可能分子ならびにそれらの使用および修飾のための方法について記載する、The Handbook - A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies、第10版(Invitrogen Corp.)を参照されたい。酵素として、例えば、ルシフェラーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼが挙げられる。標識は、様々な実施形態において、直接的に検出可能であっても間接的に検出可能であってもよい。例えば、蛍光色素は、直接的に検出可能となるが、一方、酵素は、間接的に検出可能となり得る、例えば、酵素は、基質と反応して、直接的に検出可能なシグナルを生じる。一部の実施形態において、標識フリー検出方法を使用することができる。

【0104】

例示的な免疫学的検出方法として、例えば、免疫組織化学(IHC)(この用語は一般に、組織または細胞試料における組織または細胞構成物の免疫学に基づく検出を指す)酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、Luminex(登録商標)アッセイプラットフォーム(Invitrogen)等のビーズベースのアッセイ、タンパク質マイクロアレイ、表面プラズモン共鳴アッセイ(例えば、BioCore(登録商標)技術を使用)、マイクロカンチレバー、免疫沈降、ウエスタンブロット、フローサイトメトリーが挙げられる。伝統的ELISAアッセイは、典型的には、基質において作用して検出可能シグナルを産生し(例えば、有色産物の産生)、抗原または他の分析物の存在を指示する、酵素に連結した一次または二次抗体の使用に關与する。本明細書において使用される場合、用語「ELISA」は、定量化できるシグナルを生じる蛍光発生、電気化学発光またはリアルタイムPCRレポーター等、非酵素レポーターの使用も包含する。用語「ELISA」

10

20

30

40

50

が、「間接的」、「サンドイッチ」、「競合的」および「逆」E L I S A等、いくつかの変種を包含することを認められよう。本明細書において使用される場合、I H Cは、免疫細胞化学的検査(I C C)を包含すると考慮され、この用語は一般に、組織試料において典型的に存在するであろう細胞外マトリックス構成成分および組織微小構造を基本的に欠く、単離された細胞における細胞構成物の免疫学的検出を指す。一部の実施形態において、例えば、I H Cが使用される一部の実施形態において、試料は、様々な実施形態において、固定もしくは新鮮(例えば、新鮮凍結)組織切片であってよい組織切片または細胞スミアの形態である。試料、例えば、組織切片は、例えば、パラフィンもしくは合成樹脂またはこれらの組合せに包埋されていてよい。試料、例えば、組織切片は、ホルマリンベースの固定液等、適した固定液を使用して固定することができる。切片は、パラフィン包埋されたホルマリン固定組織切片となり得る。切片は、脱パラフィン処理(組織切片が包埋されているパラフィンまたは他の物質が、組織切片部分の染色が可能に少なくとも十分に除去される過程)することができる。固定された組織または細胞における抗原と抗体との免疫学的反応を容易にするため、試料の前処理により抗原をアンマスクまたは「回収」することが役立つ。種々の抗原回収手順(抗原回復と呼ばれることがある)は、I H Cにおいて使用することができる。係る方法は、例えば、熱(任意選択で、圧力と共に)を加えるステップおよび/または様々なタンパク質分解酵素で処置するステップを含むことができる。方法は、電子レンジ照射、電子レンジ照射とタンパク質分解酵素消化の組合せ、圧力釜加熱、オートクレーブ加熱、ウォーターバス加熱、蒸し器加熱、高温インキュベーター等を含むことができる。I H Cにおけるバックグラウンド染色を低下させるため、試料は、それなしでは一次または二次抗体が結合し得る反応性部位をブロックするバッファーと共にインキュベートすることができる。一般的なブロックングバッファーとして、例えば、正常血清、脱脂粉乳、ウシ血清アルブミン(B S A)またはゼラチンおよび様々な市販のブロックングバッファーが挙げられる。免疫学的染色後に例えば、最初の染色の際立ちがよくなるコントラストを与えるために、第2の染色を行ってよい。係る染色は、「対比染色」と称され得る。係る染色は、別々の細胞区画または抗原に対する特異性を示すことができる、あるいは細胞全体を染色することができる。一般に使用されている対比染色の例として、例えば、ヘマトキシリン、ヘキスト染色またはD A P Iが挙げられる。一部の実施形態において、親和性に基づく方法は、例えば、抗体の代わりに、検出試薬として他の特異的結合剤の非抗体リガンドを使用することができる。一部の実施形態において、任意選択でコンピュータ支援の細胞イメージングを使用して、S H M T 2 m R N Aまたはポリペプチドを検出および任意選択で測定することができる。C e l l P r o f i l e rは、例示的な細胞画像解析プログラムである。

10

20

30

40

50

【0105】

一部の実施形態において、方法は、少なくとも1種のS H M T 2アイソフォームまたはS H M T 2アイソフォームをコードする少なくとも1種の転写物を評価するステップを含む。一部の実施形態において、少なくともS H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム1、S H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム1前駆体またはS H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム1前駆体をコードする転写物が評価される。一部の実施形態において、少なくともS H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム2、S H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム2前駆体またはS H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム2前駆体をコードする転写物が評価される。一部の実施形態において、少なくともS H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム3、S H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム3またはS H M T 2ミトコンドリアアイソフォーム3をコードする転写物が評価される。適した試薬、例えば、特異的アイソフォームもしくは転写物または複数のアイソフォームもしくは転写物を検出することができるプローブ、プライマー、抗体を使用することができる。例えば、様々な実施形態において、1種の、2種以上のまたは全アイソフォームに結合する結合剤、例えば、抗体が使用される。様々な実施形態(embodiments)において、1種のまたは2種以上のまたは全転写物バリエーションに結合するプローブまたはプライマーが使用される。

【0106】

S H M T 2、例えば、ヒト S H M T 2 に特異的に結合する様々な抗体は、例えば、S i g m a - A l d r i c h (6 3 1 0 3 ミズーリ州セントルイス、スプルース (Spruce) 通り 3 0 5 0) から、例えば、カタログ番号 H P A 0 2 0 5 4 3、H P A 0 2 0 5 4 9 A V 4 6 1 2 9、A V 4 6 1 2 8 で市販されている。当業者は、S H M T 2 ポリペプチドを検出するための使用に適した追加的な抗体を容易に作製することができよう。一部の実施形態において、組織切片における S H M T 2 を検出することのできる抗体が使用される。

【 0 1 0 7 】

一部の実施形態において、S H M T 2 を検出するための使用のための抗体 (または他の親和性試薬) または手順は、必要に応じて、分類、例えば、抗体または手順を使用して得られる腫瘍の分類が、適切な試料セットにおける G C S 阻害剤に対する腫瘍感受性等、対象の特徴と相関することを示すことにより検証することができる。例えば、抗体は、S H M T 2 の検出ならびに G C S 阻害剤に対する感受性と相関する異なるカテゴリーへの試料および対象の分類のための I H C における使用に関して検証することができる。一部の実施形態において、抗体もしくは抗体調製物または I H C を行うためのプロトコールもしくは手順は、その使用が、適切な被験試料セットにおいて実施例に記載されている抗体または手順を使用して得られた結果と同様の結果をもたらすことを確立することにより検証することができる。例えば、抗体または抗体調製物または手順は、その使用が、適切な被験試料セットにおける試料の少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 % 以上の、実施例に記載されている抗体を使用して得られたものと同じ分類 (調和した分類) をもたらすことを確立することにより検証することができる。特定の抗体または手順が検証されたら、これを使用して、追加的な抗体または手順を検証することができる。同様に、プローブ、プライマー、マイクロアレイもしくは他の試薬 (複数可) または S H M T 2 R N A を検出するための手順 (複数可) は、必要に応じて、試薬または手順を使用して得られる分類が、適切な試料セットにおいて G C S 阻害剤に対する感受性等、対象の特徴と相関することを示すことにより検証することができる。

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態において、S H M T 2 m R N A またはタンパク質レベルは、1 または複数の種類のがんにおいて、診断、予後、予測または処置選択目的の分類に関するその有用性のため選択される 1 種または複数の (例えば、最大 1 0 種の) 他の m R N A またはタンパク質のレベルと共に使用することができる。特定の実施形態において、S H M T 2 発現、例えば、S H M T 2 m R N A またはタンパク質のレベルは、単に、少なくとも 2 0 ; 5 0 ; 1 0 0 ; 5 0 0 ; 1 , 0 0 0 種以上の遺伝子の発現が評価される遺伝子発現プロファイリングに基づくクラスター解析、デンドログラムまたはヒートマップに寄与する因子として測定または解析されるものではない。特定の実施形態において、S H M T 2 m R N A またはタンパク質レベルが、係る遺伝子発現プロファイルの一部として測定される場合、S H M T 2 m R N A またはタンパク質のレベルは、遺伝子発現プロファイルにおける多くのまたは大部分の他の遺伝子の発現が使用される様式とは別個の様式で、試料または腫瘍の分類 (例えば、診断、予後、予測または処置選択目的の) に使用される。例えば、S H M T 2 m R N A またはポリペプチドのレベルは、他の測定された発現レベルの大部分または全てとは無関係に使用することができる、あるいは結果の解析または使用において、多くのまたは大部分の他の m R N A またはタンパク質よりも強く重みを加えることができる。

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態において、S H M T 2 タンパク質のレベルの測定は、S H M T 2 活性の測定を含むことができる。例えば、セリンからグリシンへの変換における S H M T 2 活性を評価することができる (例えば、参考文献 8 を参照)。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍によるグリシンレベルおよび / またはグリシン産生を評価することができる。一部の実施形態において、グリシンレベルは、対象から得られた 1 種または複数の試料 (複数可) において測定される。試料は、血液、脳脊髄液 (C S F)、尿、痰、気管支肺胞上皮 (bronchialveolar) 洗浄液、穿刺吸引 (aspirate fine needle) 生検吸引液

10

20

30

40

50

等、流体試料、あるいは一部の実施形態において、組織試料、例えば、生検試料または外科的試料となり得る。一部の実施形態において、グリシンレベルの上昇（正常グリシンレベルと比較した）は、対象が、GCS阻害に対し感受性である腫瘍を有することを指示することができる。一部の実施形態において、in vivo方法を使用して、SHMT2活性を測定することができる。例えば、磁気共鳴分光法を使用して、in vivo（例えば、腫瘍の領域における）またはex vivo（例えば、対象から得られた試料における）におけるグリシン、例えば、グリシンの上昇を検出することができる。

【0110】

適した対照および正規化手順を使用して、適切であれば、SHMT2発現または活性を正確に定量化することができる。例えば、測定された値は、その発現が腫瘍間で有意に変動するとは予想されない1種または複数のRNAまたはポリペプチドの発現に基づき正規化することができる。一部の実施形態において、発現は、ハウスキーピング遺伝子の発現に基づき正規化される。一部の実施形態において、ハウスキーピング遺伝子は、アクチン、例えば、ベータ-アクチン等、構造的遺伝子である。一部の実施形態において、測定された値は、異なる試料が、異なる割合の対象の細胞型、例えば、がん細胞対非がん細胞を含有し得るという事実を説明するために正規化することができる。例えば、一部の実施形態において、様々な細胞型（腫瘍または非腫瘍細胞となり得る）のパーセンテージは、係る細胞により特徴的に発現される1種または複数の細胞マーカーの発現を検出することにより評価することができる。例えば、間質細胞、例えば、線維芽細胞は、間質細胞特異的細胞マーカーの発現を検出することにより評価することができる。結果は、特に腫瘍細胞または特定の細胞位置におけるmRNAまたはポリペプチドまたは活性レベルをより正確に反映するよう調整することができる。組織切片等、試料が、腫瘍の周縁部等、新生物および非新生物組織の区別できる（例えば、標準病理組織学的判断基準に基づき）区域を含有する場合、発現のレベル、コピー数または活性は、例えば、任意選択で、非新生物組織において測定されたレベルであってよい対照レベルとの比較目的で、特に、新生物組織の区域において評価することができる。

10

20

【0111】

一部の実施形態において、SHMT2遺伝子産物のレベルまたはSHMT2活性のレベルは、適した対照レベルまたは参照レベルとの比較により、「増加した」または「増加していない」と決定される。適した対照レベルは、SHMT2遺伝子産物またはSHMT2活性の正常レベルを表すレベル、例えば、非罹患細胞または組織におけるSHMT2遺伝子産物またはSHMT2活性のレベルとなり得る。（a）SHMT2発現または活性のレベルを評価するステップを含むいずれかの方法は、（b）SHMT2発現または活性のレベルを、SHMT2発現または活性の対照レベルと比較するステップを含むことができ、（a）において決定されたレベルが、対照レベルよりも大きい場合、（a）において決定されたレベルは、「増加した」と考慮される（あるいは、（a）において決定されたレベルが、対照レベルよりも大きくない場合、（a）において決定されたレベルは、「増加していない」と考慮される）。例えば、腫瘍が、対照レベルと比較して増加したレベルのSHMT2発現または活性を有する場合、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性である見込みが増加したと分類されるが、腫瘍が、対照レベルと比べて有意に増加したレベルのSHMT2を有さない場合、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性である見込みが減少したと分類される。対照レベルは、種々の仕方で行うことができる。一部の実施形態において、対照レベルは、絶対的レベルである。一部の実施形態において、対照レベルは、SHMT2染色を呈する腫瘍細胞のパーセンテージまたはSHMT2の強い染色を呈する腫瘍細胞のパーセンテージ等、相対レベルである。比較は、様々な仕方で行うことができる。例えば、一部の実施形態において、1種または複数の試料は、腫瘍から得られ、1種または複数の試料は、同じ患者の同様の細胞型で構成される近傍の正常な（非腫瘍）組織から得られる。腫瘍試料（複数可）対非腫瘍試料（複数可）におけるSHMT2遺伝子産物またはSHMT2活性の相対レベルが決定される。一部の実施形態において、腫瘍試料対非腫瘍試料（複数可）におけるSHMT2遺伝子産物の相対レベル（比）が、所定の値よりも大

30

40

50

きい場合（腫瘍の細胞が増加したSHMT2を有することを指示）、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性である可能性が高いと分類される。一部の実施形態において、所定の値は、例えば、少なくとも1.5、2、2.5、3、5、10、20以上となり得る。対照レベルは、病歴測定値となり得る。少なくとも一部の実施形態において、値が、半定量的、定性的または概算的となり得ることを理解されよう。例えば、染色されたIHC試料の目視検査（例えば、光学顕微鏡を使用）は、必ずしも細胞を計数すること、または染色の強度を的確に定量化することなく、SHMT2発現または活性のレベルの評価をもたらすことができる。主に、SHMT2発現が増加（過剰発現）した場合に導き出すまたは為すことのできる結論または予測の観点から、特定の手法が、本明細書において記述されている。方法は、SHMT2発現が増加していない場合に導き出すまたは為すことのできる結論または予測の観点から記述することができる。例えば、SHMT2発現が存在しない場合、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性である見込みが増加していないと分類することができる。

10

【0112】

本明細書における説明目的のため、対照または参照レベルは、非がん細胞および組織に存在するSHMT2発現または活性の正常レベルを表すことが仮定される。しかし、GCS阻害剤感受性がんの特徴的なSHMT2発現またはSHMT2活性のレベルは、一部の実施形態において、参照または対照レベルとして使用することができる。この場合、例えば、対照レベルとほぼ同じまたはこれを超えるレベルに匹敵するレベルにおけるSHMT2発現またはSHMT2活性の存在は、GCS阻害剤に対し感受性である可能性が高いが

20

【0113】

方法のいずれかは、特定の実施形態において、試料において測定されるSHMT2発現またはSHMT2活性のレベルに基づき、例えば、SHMT2遺伝子産物のレベルもしくはSHMT2活性のレベルまたはこれらの組合せに基づき、試料（または試料を得た腫瘍）にスコアを割り当てるステップを含むことができる。一部の実施形態において、2種以上のスコアを割り当てることができる。例えば、スコア化は、SHMT2を発現または過剰発現する細胞のパーセンテージに基づき第1のスコアを割り当てるステップと、発現レベルに基づき第2のスコアを割り当てるステップとを含むことができる。一部の実施形態において、2種以上のスコアから複合スコアを作成することができる。スコアの範囲は、複数のより小さい範囲（部分範囲）に分けることができ、試料または腫瘍は、そのスコアが収まる部分範囲に基づき、GCS阻害に対する感受性の異なる見込みを割り当てることができる。例えば、より高いスコアは、腫瘍がGCS阻害に対し感受性となる見込みの増加を指示することができる。有用なスコア化または分類系におけるカテゴリーの数は、例えば、2～10の間、例えば、2、3または4となり得るが、カテゴリーの数は、一部の実施形態において、10を超えてもよい。

30

【0114】

一部の実施形態において、スコアは、0～Xのスケールを使用して割り当てることができる。該スケールにおいて、0は、試料がSHMT2に関して「陰性」である（例えば、検出可能なSHMT2ポリペプチドが存在しない）ことを指示し、Xは、大多数の細胞における強い（高い強度）染色を表す数である。一部の実施形態において、スコアは、0、1または2のスケールを使用して割り当てられ、該スケールにおいて、0は、試料がSHMT2に関して陰性である（検出可能なSHMT2タンパク質が存在しない）ことを指示し、1は、低レベル染色であり、2は、大多数の細胞において強い（高い強度）染色である。より高いスコアは、腫瘍がGCS阻害に対し感受性となる見込みの増加を指示する。スコアは、数を使用して、あるいは数の代わりにまたはそれと組み合わせて、いずれかの適したセットの記号または単語を使用して表すことができる。例えば、スコアは、0、1、2；陰性、陽性；陰性、低、高；-、+、++、+++；等として表すことができる。カ

40

50

テゴリーの数は、例えば、2、3、4以上となり得る。

【0115】

スコアは、細胞試料または組織試料における1個の視野または複数の視野を評定することにより得ることができる。一部の実施形態において、腫瘍由来の複数の試料を評定することができる。「検出可能なSHMT2が存在しない」は、検出されたレベル（検出されるのであれば）が、バックグラウンドレベルと著しくまたは有意に異なることを意味することを理解されよう。一部の実施形態において、少なくとも10、20、50、100、200、300、400、500、1000個以上の細胞（例えば、腫瘍細胞）が評価されて、試料または腫瘍におけるSHMT2発現または活性を評定する、例えば、試料または腫瘍にスコアを割り当てる。

10

【0116】

本明細書に記載されている様々な方法、例えば、分類、診断、予後、予測または処置選択の方法は、試料、腫瘍または対象の観点から記載することができる。係る記載は、均等かつ自由に互換できると考慮することができる。例えば、本明細書において、試料を分類する方法に関して言及されている場合、係る方法は、試料を得た腫瘍を分類する方法として表現することができる。同様に、本明細書において、試料におけるSHMT2のレベルの評価に関して言及されている場合、係る方法は、試料を得た腫瘍におけるSHMT2発現のレベルを評価する方法として表現することができる。

【0117】

当業者であれば、有用な診断、予後、予測または処置選択の方法が、完全に正確である必要がないことを認めるであろう。例えば、「予測」、「見込みの予測」および同様の用語は、典型的には、例えば、特定の判断基準または条件が満たされない場合に、対象の結果、成績または事象等が存在するまたは発生するであろう確率と比較した、係る判断基準または条件が満たされる場合に、係る結果、成績、事象等が存在するまたは発生するであろう確率の増加または減少の予見を指す。「予測」、「見込みの予測」および同様の用語は、100%の精度で予測する能力を暗示または要求せず、見込みの数的な値をもたらす能力を暗示または要求しない（但し、一部の実施形態においては、係る値を提供することができる）。腫瘍感受性を見込みを予測するための方法を、1種または複数の他の方法と共に使用することができることも理解できよう。よって、見込みを予測する方法は、1種または複数の他の方法と組み合わせた、例えば、全体的な方法の一部として、見込みの予測を補助するのに有用な方法となり得る。

20

30

【0118】

SHMT2発現は、GCS阻害に対する感受性と相関するが、SHMT2を過剰発現しなくてもGCS阻害に対し感受性である腫瘍または腫瘍型も存在し得る。係る腫瘍は、GCS阻害剤により有用に処置することができる。係る腫瘍または腫瘍型は、現在までに検査したことがあるパネルよりも大きいパネルの腫瘍または腫瘍細胞株を検査することにより同定することができる。さらに、いかなる理論に制約されることも望まないが、GCS阻害剤の投与は、SHMT2を過剰発現する腫瘍サブクローンの出現を阻害することができる。SHMT2過剰発現が、腫瘍細胞に生存または増殖利点を付与する場合、係るサブクローンの出現の抑制は、治療上有用となり得る。SHMT2活性が、SHMT2発現の増加に関与しない機序により、一部の腫瘍において上昇され得ると予想することは合理的である。例えば、SHMT2は、特定の突然変異により活性化され得る。例えば、SHMT2以外の選択されたRNAまたはタンパク質の発現に基づく、GCS阻害剤に対し感受性である腫瘍または腫瘍細胞株を同定するための代替のアプローチが発見され得ると予想することも合理的である。

40

【0119】

一部の実施形態において、ごく少数のSHMT2陽性細胞を含有するまたはSHMT2陽性細胞の証拠を欠く腫瘍は、GCS阻害剤により有用に処置することができる。例えば、いかなる理論に制約されることも望まないが、腫瘍形成細胞は、SHMT2陽性である（例えば、SHMT2を過剰発現する）見込みが増加し得る。GCS阻害剤は、腫瘍形成

50

細胞の排除または腫瘍形成細胞の増殖の阻害またはさらなる腫瘍形成細胞の出現の阻害において有用となり得る。腫瘍形成細胞は、*in vivo*において腫瘍のごく一部を構成することができる。一部の実施形態において、任意選択で、大容積の腫瘍細胞集団を阻害する薬剤と組み合わせて、GCS阻害剤を使用して、腫瘍細胞のこの亜集団を特異的に阻害することができる。一部の実施形態において、GCS阻害剤による処置は、例えば、腫瘍形成細胞の生存または増殖または出現を阻害することにより、腫瘍再発を阻害することができる。一部の実施形態において、GCS阻害剤による処置は、例えば、外科手術、放射線照射および/または薬理療法により腫瘍が見かけ上は根絶された後に、始めるまたは継続することができる。

【0120】

一部の態様において、本開示は、腫瘍のための処置を必要とする対象をモニターする方法であって、(a)前記対象にGCS阻害剤を投与するステップと、(b)投与後の1または複数の時点において前記対象をモニターするステップとを含む方法を提供する。一部の態様において、腫瘍のための処置を必要とする対象をモニターする方法は、(a)腫瘍のモニターを必要とする対象であって、GCS阻害剤を投与した対象を用意するステップと、(b)投与後の1または複数の時点において前記対象をモニターするステップとを含む。一部の実施形態において、腫瘍は、SHMT2を過剰発現する。一部の実施形態において、腫瘍は、SHMT2を過剰発現すると決定されている。一部の実施形態において、対象のモニターは、腫瘍の存在、腫瘍サイズ、転移または1種もしくは複数の症状、例えば、腫瘍に関連する1種もしくは複数の症状に関するモニターを含む。モニターは、例えば、がんを有するまたはがんを処置した対象をモニターするいずれかの標準手段、例えば、症状評価、身体検査、イメージング等を含むことができる。モニターは、例えば、腫瘍感受性の評価、対象に対するGCS阻害剤の認容性の評価または用量レベルの選択に有用となり得る。

【0121】

一部の態様において、本開示は、GCS阻害に対する腫瘍細胞または腫瘍感受性をモジュレートする方法であって、前記腫瘍におけるSHMT2発現または活性をモジュレートするステップを含む方法を提供する。例えば、一部の実施形態において、GCS阻害に対する腫瘍細胞または腫瘍(例えば、SHMT2を発現または過剰発現する腫瘍細胞または腫瘍)の感受性(sensitivity)は、腫瘍細胞または腫瘍におけるSHMT2発現または活性を阻害することにより減少させることができる。一部の実施形態において、SHMT2発現は、例えば、SHMT2に標的化されたRNAi剤、低分子、アンチセンス剤等となり得るSHMT2阻害剤を使用して阻害させることができる。一部の実施形態において、係る阻害は、例えば、研究または検査目的に有用となり得る。

【0122】

一部の実施形態において、GCS阻害に対する腫瘍細胞または腫瘍(例えば、SHMT2を発現または過剰発現しない腫瘍細胞または腫瘍)の感受性は、腫瘍細胞または腫瘍にSHMT2またはその機能的バリエーションを過剰発現させることにより、あるいは他の仕方により腫瘍細胞または腫瘍に増加したレベルのSHMT2または増加したSHMT2活性を持たせることにより増加させることができる。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍に増加したSHMT2または増加したSHMT2活性を持たせることは、腫瘍細胞または腫瘍を核酸と接触させることによる、腫瘍細胞または腫瘍へのSHMT2またはその機能的バリエーションをコードする核酸の送達を含む。一部の実施形態において、核酸は、ベクター内に存在する。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍に増加したSHMT2または増加したSHMT2活性を持たせることは、例えば、腫瘍細胞または腫瘍を、SHMT2またはその機能的バリエーションを含むポリペプチドと接触させることによる、腫瘍細胞または腫瘍へのSHMT2または機能的バリエーションを含むポリペプチドの送達を含む。一部の実施形態において、ポリペプチドは、タンパク質形質導入ドメインまたはミトコンドリア標的化配列を含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍への接触は、対象への投与を含む。一部の実施形態において、腫瘍細胞または腫瘍に、増加したSHMT

10

20

30

40

50

2 または増加した S H M T 2 活性を持たせる薬剤は、腫瘍細胞または腫瘍にまたはその近傍に標的化すること、そこにおいて発現させること、またはそこに直接的に塗布することができる。

【 0 1 2 3 】

I V . G C S 阻害剤

【 0 1 2 4 】

一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、低分子、核酸またはポリペプチドを含む。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、R N A i 剤、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアプタマーを含む。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、直接的な G C S 阻害剤である、即ち、G C S 阻害剤は、少なくとも一部には、G C S 構成成分との物理学的相互作用、例えば、それとの結合により作用する。例えば、G C S 阻害剤は、G C S タンパク質の活性部位に結合することができる。一部の実施形態において、G C S タンパク質への G C S 阻害剤の結合は、例えば、基質または補因子の接近を立体的に遮断することにより、天然の基質または補因子の結合を阻害する。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、間接的な G C S 阻害剤となり得る、即ち、G C S 阻害剤は、G C S 構成成分と阻害剤との物理学的相互作用を要求しない機序により作用し得ることが企図される。例えば、間接的な G C S 阻害剤は、G C S タンパク質の翻訳後修飾または局在化に關与するタンパク質をモジュレートすることができる。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、少なくとも一部には、細胞質において作用する。例えば、一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、G C S タンパク質をコードする細胞質 m R N A の分解または翻訳抑圧を誘導する。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、細胞質における G C S タンパク質と相互作用、例えば、これと結合することができる。阻害剤は、例えば、ミトコンドリアへの G C S タンパク質の侵入を阻害することができる、あるいは、ミトコンドリアに進入する G C S タンパク質と会合し続けこれを阻害することができる。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、少なくとも一部には、ミトコンドリアにおいて作用する、例えば、G C S 阻害剤は、ミトコンドリアに位置する G C S タンパク質を阻害する。

10

20

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、減少した量のタンパク質が産生されるよう、G C S タンパク質をコードする遺伝子の発現を阻害する。一部の実施形態において、G C S 構成成分をコードする遺伝子の発現は、R N A i によりまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドを使用して阻害される。例えば、細胞は、G L D C、G C S H、A M T または D L D をコードする m R N A に標的化された R N A i 剤と接触させることができる。一部の実施形態において、R N A i 剤は、第 1 の部分および第 2 の部分を含み、第 1 の部分と第 2 の部分は、15 ~ 30 ヌクレオチドの間の長さの二重鎖を形成し、第 1 の部分は、哺乳動物 G L D C、G C S H、A M T または D L D をコードする m R N A の少なくとも 10、12、15、17 または 19 個の連続的ヌクレオチドを含む配列と少なくとも 90% 相補的な配列を含む。一部の実施形態において、第 1 の部分は、哺乳動物 G L D C、G C S H、A M T または D L D をコードする m R N A の少なくとも 10、12、15、17 または 19 個の連続的ヌクレオチドを含む配列と 100% 相補的な配列を含む。一部の実施形態において、第 1 および第 2 の部分は、互いに少なくとも 80%、90% または 100% 相補的である。一部の実施形態において、R N A i 剤は、s i R N A である。一部の実施形態において、R N A i 剤は、R N A i ベクターである。一部の実施形態において、R N A i 剤は、細胞内で、例えば、R N A i ベクターを取り入れた細胞により発現され得る s h R N A または m i R N A 前駆体である。一部の実施形態において、R N A i 剤は、G L D C、G C S H および A M T から選択される標的をコードする R N A に標的化される。一部の実施形態において、R N A i 剤は、G L D C および G C S H から選択される標的をコードする R N A に標的化される。ヒト G L D C または G C S H 発現を阻害する R N A i 剤の例示的な標的配列が、実施例に提供されている。例えば、G 1、G 4 および G 5 で示される s h R N A は、G L D C 発現を有効に阻害し、腫瘍細胞に対し毒性を有していた。G S 1、G S 2、G S 3 および G S 4 で示される s h R N A は、G C S H 発現を有効に阻害

30

40

50

し、腫瘍細胞に対し毒性を有していた。一部の実施形態において、RNAi剤は、G1、G4、G5、GS1、GS2、GS3またはGS4の標的配列の18、19、20または21個の連続的ヌクレオチドと完璧に相補的な第1の配列と、第1の配列と完璧に相補的な第2の配列とを含む。GCS構成成分をコードするmRNA内の追加的な標的の配列と、GCS構成成分の発現の阻害に有用なRNAi剤の配列は、例えば、RNAi剤の設計に有用な様々な公知のアプローチのいずれかを使用して選択することができる。一部の実施形態において、1種または複数の配列は、「オフターゲット」効果を最小化するために選択することができる。例えば、対象の種（例えば、ヒト）の公知もしくは予測されるmRNA（標的GCS mRNA以外）と約70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%未満の相補性を有する配列は、ガイド鎖として選択することができる、および/または対象の種の公知もしくは予測されるmRNAと約70%、75%、80%、85%、90%もしくは95%未満の相補性を有する配列は、パッセンジャー鎖として選択することができる。一部の実施形態において、RNAi剤は、ガイド鎖として、GCS構成成分をコードするRNAと相補的な（とアンチセンスである）鎖の使用を促進するように設計される。例えば、一部の実施形態において、RNAi剤は、RNAi剤の二重鎖部分が、ガイド鎖の5'端において3'端よりも低い熱力学的安定性を有するように設計することができる（例えば、Khvorova、A.ら、（2003年）Cell、115巻（2号）：209～216頁を参照）。一部の実施形態において、ポジション特異的修飾を使用して、潜在的オフターゲット効果を低下させることができる。一部の実施形態において、少なくとも2種の異なるRNAi剤を組み合わせ使用することができる。異なるRNAi剤は、様々な実施形態において、同じ遺伝子に標的化させても、異なるGCS構成成分をコードする遺伝子に標的化させてもよい。一部の実施形態において、GLDCに標的化された2種以上の異なるRNAi剤が使用される。一部の実施形態において、GCSHに標的化された2種以上の異なるRNAi剤が使用される。一部の実施形態において、GLDCに標的化された1種または複数のRNAi剤およびGCSHに標的化された1種または複数のRNAi剤が使用される。一部の実施形態において、GLDC、GCSHおよびAMTに標的化されたRNAi剤が組み合わせ使用される。一部の実施形態において、最大5、10種以上の異なるRNAi剤が使用される。RNAi剤は、様々な実施形態において、異なる量または濃度で、あるいはほぼ同じ量または濃度で使用することができる。一部の実施形態において、RNAi剤は、少なくとも一部には、経験的に、例えば、その標的の高い程度の阻害および/または高い特異性を達成するために選択することができる。例えば、複数のRNAi剤は、細胞培養において検査、あるいは被験動物に投与して、その意図された標的に対し選択された程度のサイレンシングおよび/または選択された特異性を呈する1種または複数のRNAi剤を同定することができる。

【0126】

一部の実施形態において、GCS構成成分をコードする遺伝子の発現は、アンチセンスアプローチを使用して阻害することができる。アンチセンスアプローチは、その阻害が望まれるタンパク質（例えば、GCSタンパク質）をコードするRNA（例えば、mRNA）に相補的な1種または複数の一本鎖オリゴヌクレオチドが、例えば、培養培地において、あるいは対象への投与により細胞と接触される方法を包含する。一本鎖オリゴヌクレオチドは、細胞に進入し、RNA標的にハイブリダイズする。係るハイブリダイゼーションは、例えば、RNase HによるmRNAの分解または翻訳の遮断をもたらすことができる。少なくとも10、12、14、16、18、20、22、24、26、28または30 ntにわたって、RNA標的と約90%、95%、99%または100%相補性となり得るオリゴヌクレオチド配列を選択することができる。オリゴヌクレオチド配列は、オフターゲット効果を最小化するように選択することができる。例えば、少なくとも10、12、14、16、18、20、22、24、26、28または30 ntにわたって、アンチセンス剤が投与される種の公知または予測されるmRNA（GCS mRNA以外）と約70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%未満の相補性を有する配列を選択することができる。アンチセンス剤は、GLDC、GCSH、AM

T または D L D を阻害することができる。複数のアンチセンス剤を組み合わせることで細胞と接触させることができる。アンチセンス剤は、同じ G C S 構成成分または異なる G C S 構成成分を阻害するように設計することができる。

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、G C S 構成成分の少なくとも 1 種の活性を阻害する。「活性」は、典型的には、例えば、生体分子または細胞もしくは生物等の生物系に効果を生じる対象の実体、例えば、G C S 構成成分の能力を指す。G C S タンパク質の様々な活性、例えば、触媒活性は、上に記載されている。活性の変更、例えば、活性の低下（阻害）は、例えば、タンパク質の分子基盤、モル基盤または重量基盤で測定することができる。一部の実施形態において、G C S タンパク質の触媒活性が阻害される。一部の実施形態において、薬剤は、G C S タンパク質の直接阻害剤である。例えば、直接阻害剤は、G L D C、G C S H または A M T に結合し、反応を触媒する酵素の能力に干渉することができる、および/または活性部位への基質の進入を妨げることができる。一部の実施形態において、直接阻害剤は、基質の構造的アナログ、遷移状態の構造的アナログまたは酵素の補因子の構造的アナログであり、アナログは、酵素と物理的に相互作用できるが、例えば、生産的に作用または酵素により使用できなくなるように、正常な基質、遷移状態または補因子と構造が十分に同様である。一部の実施形態において、基質アナログ、遷移状態アナログまたは補因子アナログは、酵素との結合に関して正常な基質または補因子と競合する。

10

【 0 1 2 8 】

一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、グリシンの構造的アナログ（グリシンアナログ）を含む。一部の実施形態において、グリシンアナログは、P タンパク質を阻害するための基質アナログとして作用することができる。一部の実施形態において、グリシンの構造的アナログは、第一級アミン基と、グリシンのカルボキシル官能基を置換する基とを含む分子である。一部の実施形態において、カルボキシル官能基を置換する基は、 π -電子系を含む。例えば、第一級アミン基と、カルボキシル官能基を置換する基に存在する π -電子系とを有するアミノアセトニトリル ($H_2NCC(=O)R$)、プロパルギルアミン (3-アミノ-1-プロピン; $HC\equiv CCH_2NH_2$) および様々な他のグリシンアナログが、G C S を阻害することが報告されている (Benavides J, Biochemical Pharmacology ; 32 巻 (2 号) : 287 ~ 291 頁 (1983 年))。一部の実施形態において、グリシンアナログは、アミノ基を含むグリシンのアミノ基またはグリシンアナログのアミノ基が、アミノオキシ (ONH_2) 基に置き換えられた分子である。例えば、カルボキシメトキシアミン (アミノオキシ) 酢酸 (acetic acid) は、P タンパク質を阻害することが報告されたグリシンアナログである (Gueguen, 1999 年、上記参照; Sarojini GR, Inhibition of glycine oxidation by carboxymethoxylamine, methoxylamine, and acetylhydrazide, Plant Physiol. 77 巻 (3 号) : 786 ~ 9 頁 (1985 年))。

20

30

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、システアミン (2-アミノエタンチオール; 化学式 $HSCCH_2CH_2NH_2$)、システアミンの塩またはシステアミンの誘導体を含む。システアミンは、G C S の公知の阻害剤である (Hayasaka K, Tada K. Effects of the metabolites of the branched-chain amino acids and cysteamine on the glycine cleavage system. Biochem Int 6 巻 : 225 ~ 230 頁 (1983 年))。いかなる理論に制約されることも望まないが、システアミンは、少なくとも一部には、P タンパク質を阻害することにより作用することができる。一部の実施形態において、G C S 阻害剤は、システアミン二酒石酸塩 (メルカプタミン二酒石酸塩としても公知) を含む。システアミン二酒石酸塩は、シスチン排泄障害 (シスチン症) の処置において臨床的に使用され、商品名 C y s t a g o n (商標) として経口カプセルの形態で利用することができる。

40

【 0 1 3 0 】

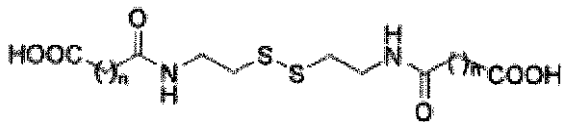
50

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、システアミノプロドラッグを含む。一部の実施形態において、システアミノプロドラッグは、ジスルフィドおよび/またはアミド結合の開裂によりシステアミンの複数の分子を放出することのできる薬剤を含む。例えば、一部の実施形態において、GCS阻害剤は、シスタミン(2,2'-ジチオビス(エチルアミン))を含む。シスタミンにおけるジスルフィド結合は、例えば、*in vivo*で容易に開裂して、2分子のシステアミンを生成することができる。

【0131】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、式Iで表される化合物を含む。

【化3】



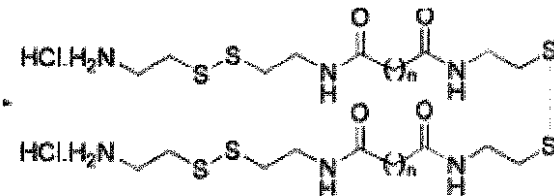
式 I

10

【0132】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、次の構造を有する化合物を含む。

【化4】



式 II

20

【0133】

様々な実施形態において、式IおよびIIにおけるnの各事例は独立的に、1~20に及び得る。式IまたはIIで表される化合物は、システアミノプロドラッグとして作用することができる。

【0134】

大部分の臓器の細胞におけるシステインのリソソームレベル上昇により特徴付けられる常染色体劣性疾患である腎障害システイン症は、システアミンの定期投与により処置することができる。システアミンまたはシスタミンの様々なプロドラッグおよび誘導体が、腎障害システイン症の潜在的処置として設計されており(少なくとも一部の事例においては、評定されている)、上述の化合物のいくつか等が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、McCaughan Bら、*Bioorg Med Chem Lett.*、18巻(5号):1716~9頁(2008年);Omran, Z.ら、*Bioorg Med Chem Lett.*、21巻(8号):2502~4頁(2011年);Omran, Z.ら、*Bioorg Med Chem.*19巻(11号):3492~6頁(2011年);Omran, Z.ら、*Bioorg Med Chem Lett.*21巻(1号):45~7頁(2011年)を参照されたい。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、腎障害システイン症の潜在的処置として設計および/または評定された、システアミンまたはシスタミンのプロドラッグまたは誘導体である。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、例えば、細胞培養物または動物における、システイン症の(cystinotic)細胞における細胞内システインを減少させる能力を有する。

30

40

【0135】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、バルプロ酸(CAS No. 99-66-1、他の名称の中でもとりわけ、ジプロピル酢酸または2-プロピルペンタン酸とも称される)を含む。ラットへのバルプロ酸の投与は、肝臓におけるグリシン開裂活性を阻害することを示した(Kochiら、1979年、上記参照)。Pタンパク質活性が*in vitro*で低下することも示されたが、活性の低下は、主にPタンパク質のレベルの低下によ

50

るものと思われることが示唆された。NKH患者へのバルプロ酸の投与は、発作頻度の増加を伴った。いかなる理論に制約されることも望まないが、この結果は、バルプロ酸が、GCSを阻害することにより、これらの患者に存在し得る残渣GCS活性のさらなる低下を引き起こすという概念と一貫する。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、バルプロエート (valproate) またはバルプロエート塩を含む。一部の実施形態において、バルプロエート塩は、バルプロ酸ナトリウムである。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、ジバルプロエクスナトリウムとも呼ばれるバルプロ酸セミナトリウムである。バルプロ酸セミナトリウムは、1:1モル濃度関係性のバルプロ酸ナトリウムおよびバルプロ酸からなる配位化合物であり、ナトリウム水素ビス(2-プロピルペンタノエート)としても公知である。バルプロ酸セミナトリウムは、胃腸管においてバルプロエートイオンへと解離する。これは、Depakote (登録商標) として腸溶コーティング錠形態で利用できる。例えば、*in vitro* または *in vivo* において腫瘍細胞の生存または増殖を阻害するために、バルプロ酸、バルプロエート、バルプロエート塩またはバルプロ酸もしくはバルプロエートのプロドラッグ、アナログもしくは誘導体を使用するステップを含む方法が、本明細書に開示されている。一部の実施形態において、腫瘍細胞の生存または増殖を阻害する方法は、腫瘍細胞を、バルプロ酸、バルプロエート、バルプロエート塩またはバルプロ酸もしくはバルプロエートのプロドラッグ、アナログもしくは誘導体と接触させるステップを含む。一部の実施形態において、方法は、バルプロ酸、バルプロエート、バルプロエート塩またはバルプロ酸もしくはバルプロエートのプロドラッグ、アナログもしくは誘導体を、腫瘍のための処置を必要とする対象に投与するステップを含む。特定の実施形態において、GCS阻害剤は、バルプロ酸、バルプロエート、バルプロエート塩またはバルプロ酸もしくはバルプロエートのプロドラッグ、あるいは一部の実施形態において、バルプロエートのアナログを含まない。

10

20

【0136】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、コエンザイム (co-enzyme) A (CoA)、またはチグリルCoA、イソブチリルCoA、スクシニルCoA、メチルマロニルCoA、イソバレリルCoAもしくはプロピオニルCoA等のCoA誘導体を含む (Hayasaka and Tada、1983年、上記参照)。

【0137】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、葉酸または葉酸塩の構造的アナログである。一部の実施形態において、葉酸または葉酸塩アナログは、Tタンパク質を阻害するための基質アナログとして作用することができる。例えば、上に記す通り、5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-CH₃-H₄葉酸) は、Tタンパク質を阻害する葉酸塩アナログである。他の葉酸塩アナログは、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、プラトトレキサート、トリメトプリム、プレビトレキセド (plevitrexed)、GW1843、AG337、ZD1694、ノラトレキセド (nolatrexed) およびピリトレキシムを含む。一部の実施形態において、葉酸塩アナログは、ジヒドロ葉酸還元酵素、 β -グリシンアミドリボヌクレオチドトランスホルミラーゼ、5'-アミノ-4'-イミダゾールカルボキサミドリボヌクレオチドトランスホルミラーゼまたはチミジル酸合成酵素等、葉酸代謝に関与する酵素の阻害剤である。例えば、Gangjee Aら、Recent advances in classical and non-classical antifolates as anti-tumor and antiopportunistic infection agents: part I. Anti-cancer Agents Med Chem、7巻 (5号) : 524 ~ 42頁 (2007年) ; Gangjee Aら、Recent advances in classical and non-classical antifolates as anti-tumor and antiopportunistic infection agents: part II. Anti-cancer Agents Med Chem、8巻 (2号) : 205 ~ 31頁 (2008年) ; Hagner N and Joerger M. Cancer chemotherapy: targeting folic acid synthesis、Cancer Manag Res、2巻 : 293 ~ 30頁 (2010年) を参照されたい。特定の実施形態において、GCS阻害剤は、葉酸または葉酸塩のアナログを含まない。

30

40

【0138】

50

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、GCS構成成分、例えば、様々な実施形態において、GLDC、GCSH、AMTまたはDL Dに結合するアプタマー、抗体または非抗体ポリペプチドである。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、単鎖抗体またはナノボディを含む。GCSタンパク質に結合する抗体は、当技術分野において公知のものであり、いくつもの係る抗体が市販されている。追加的な抗体は、ルーチン方法を使用して産生することができる。一部の実施形態において、単鎖抗体または他の抗体断片は、フルサイズの抗体から作製することができる。一部の実施形態において、例えば治療目的のヒト化抗体または抗体断片を使用することができる。

【0139】

一部の実施形態において、抗体に匹敵する親和性および特異性で標的に結合する1種または複数の非抗体ペプチドまたはポリペプチドは、GCS阻害剤として使用することができる。対象の標的(例えば、GLDC、GCSH、AMTまたはDL D)に結合するペプチドは、ツーハイブリッドアッセイ(例えば、酵母または哺乳動物細胞における)またはファージディスプレイ、酵母ディスプレイ、リボソームディスプレイ、細菌ディスプレイもしくはmRNAディスプレイ技術等の様々なディスプレイ技術等、種々の異なる手順を使用して同定することができる。一部の実施形態において、ペプチドは、例えば、ディスプレイライブラリーまたは化学合成ライブラリーであってよいペプチドライブラリーから選択することができる。1回または複数の選択ラウンド(例えば、パニング)を行って、例えば、1または複数の目的に有用となるのに十分な特異性および親和性で標的に結合する1種または複数のペプチドを同定することができる。一部の実施形態において、ペプチドは、例えば、ペプチドを立体配座的に制約することにより特異性および/または親和性を増強し得る支持用タンパク質足場に挿入することができる。一般に、足場は、合理的な溶解度を有する種々の適したタンパク質のいずれかとなり得る。当技術分野において公知の有用な足場は、例えば、タンパク質Z(アフィボディ(affibody))、フィブロネクチン(アドネキシン(adnexin))、アンキリン反復タンパク質(DARPin); システインノットミニタンパク質(ノッチン)もしくはアルマジロ反復タンパク質由来のフォールド、またはリポカリン(アンチカリン(anticalin))、ColE7免疫タンパク質(Im7)、GFP、チオレドキシニンAもしくはシスタチンA等の全長タンパク質に基づく足場を含む。足場は、天然起源のタンパク質と比べて1種または複数の変更を含むことができる。例えば、ヒトタンパク質と反応する可能性のある部位(複数可)が変更され得る。足場としての使用のための様々なタンパク質の記述に関して、例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、国際出願PCT/US2009/041570号明細書; Gebauer, M. and Skerra, A., *Current Opinion in Chemical Biology*, (2009年)、13巻(3号): 245~255頁; Hoffman, T.ら、*Protein Eng Des Sel.*, 23巻(5号): 403~13頁、2010年およびこれらの参考文献を参照されたい。用語「ペプチドアプタマー」は、係るペプチドまたはこれを含むポリペプチドを指すよう使用されることがある。例えば、Colas, P.ら、*Nature*, 380巻: 548~50頁、1996年; Bickle, M.B.ら、*Nat. Protoc.*, 1巻、1066~1091頁、2006年; Colas, P., *J Biol.*, 7巻(1号): 2頁、2008年を参照されたい。

【0140】

一部の実施形態において、ポリペプチドは、GCS構成成分のドミナントネガティブバージョン、例えば、GLDC、GCSH、AMTまたはDL Dのドミナントネガティブバージョンを含む。一部の実施形態において、タンパク質のドミナントネガティブバージョンは、活性を欠くまたは正常と比べて実質的に低下した機能的活性を有し、細胞により発現される該タンパク質の正常バージョンの機能をアンタゴナイズするまたはこれに干渉するバリエーションである。一部の実施形態において、ドミナントネガティブバリエーションは、正常なタンパク質の断片である、あるいは機能的活性を低下または排除する1個または複数のアミノ酸(例えば、触媒残基)の変更を有する。一部の実施形態において、ドミナントネガティブバリエーションは、正常な活性に要求される少なくとも一部のアミノ酸(複数可)

10

20

30

40

50

またはドメイン（複数可）を欠くが、正常なタンパク質の基質、補因子、調節因子または結合パートナーと物理学的に相互作用する（例えば、これに結合する）能力を保持する。ドミナントネガティブバリエーションは、例えば、基質、補因子、調節因子または結合パートナーとの相互作用に関してタンパク質の正常バージョンと競合することができる。ドミナントネガティブバリエーションは、基質と結合することができるが、タンパク質の正常バージョンと比較して基質に關与する反応を触媒する能力が低下している。複合体（例えば、二量体）の一部として正常に作用するタンパク質の場合、ドミナントネガティブバリエーションは、タンパク質の正常バージョンと複合体を形成することができるが、その結果生じた複合体は、活性を欠く、あるいは正常なタンパク質を含みドミナントネガティブバリエーションではない複合体が形成された場合と比べて低下した活性を有する。

10

【0141】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、GCS構成成分、例えば、Pタンパク質またはLタンパク質のホモ二量体化を阻害する。係る薬剤を同定する例示的な方法について後述する。

【0142】

一部の実施形態において、GCS阻害剤とその標的との結合は、非共有結合である。一部の実施形態において、GCS阻害剤とその標的との結合が共有結合であることが企図される。GCS阻害剤によるGCS構成成分の阻害は、様々な実施形態において、可逆的であっても基本的に不可逆的であってもよい。基本的に不可逆的な阻害剤は、系における阻害されたGCS構成成分の活性の回復が、非結合GCS阻害剤の除去後に検出されない（これはGCS構成成分の追加的な分子が系において合成または添加されない場合に限り、合成または添加される場合、係る分子の活性が検出され得る）ことを特徴とし得る。一部の実施形態において、非共有結合により結合するGCS阻害剤は、GCSタンパク質と反応して共有結合を形成することのできる官能基を含むよう修飾することができる。

20

【0143】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、上に記載されているまたは本明細書に記載されている通りに同定されたGCS阻害剤のエステル、溶媒和物、塩または水和物を含む。

【0144】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、例えば、その特性の1種または複数を修飾するためまたは修飾を試みるために変更される。一部の実施形態において、方法のいずれかは、変更されたGCS阻害剤を産生するステップと、任意選択で、GCS阻害剤または抗腫瘍剤としての活性に関して前記変更されたGCS阻害剤を検査するステップとをさらに含むことができる。変更することのできる例示的な特性および例示的な変更方法は、さらに上に記載されている。係る方法のいずれかは、本明細書に記載されているまたは本明細書に記載されている通りに同定されたGCS阻害剤に適用することができる。一部の実施形態において、変更されたGCS阻害剤（例えば、構造的アナログ、第2の部分に付着したGCS阻害剤）を作製する方法が提供される。

30

【0145】

V. GCS構成成分の発現もしくは活性またはGCSの活性の評価

40

【0146】

一部の実施形態において、1種もしくは複数のGCS構成成分の発現もしくは活性またはGCSにより触媒されるグリシン異化反応経路（またはグリシン合成をもたらす逆経路）の全体活性を評価（例えば、検出および任意選択で測定）することができる。係る評価は、種々の目的のいずれかに使用することができる。例えば、さらに後述する通り、係る評価は、薬剤（例えば、GCS阻害剤）の同定、特徴付けまたは検査に使用することができる。一部の実施形態において、1種もしくは複数のGCS構成成分の発現もしくは活性またはグリシン異化反応経路の全体活性は、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の分類に使用することができる。例えば、腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍は、参照、例えば、正常細胞と比較して増加または減少したGCS構成成分またはGCSの発現または活性を有す

50

ると分類することができ、あるいは同じまたは異なる腫瘍型の他の腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍と比較してもよい。

【0147】

一般に、GCS構成成分の発現は、遺伝子発現の評価、例えば、対象の特異的RNAまたはタンパク質の検出または測定に有用な、当技術分野において公知のいずれかの適した方法、例えば、マイクロアレイ、RNA-Seq、免疫学的方法を使用して評価することができる。例えば、上述および実施例の記述を参照されたい。一部の実施形態において、GCS構成成分の発現は、GCS構成成分の発現を阻害することが公知の薬剤または例えば、GCSをモジュレート（例えば、阻害）する能力もしくはGCS構成成分の発現をモジュレート（例えば、阻害）する能力に関して評定されている薬剤と細胞を接触させた後に評価される。一部の実施形態において、薬剤は、RNAi剤である。RNAまたはタンパク質の量を測定し、任意選択で、対照値、例えば、薬剤の非存在下で予想される値により正規化するおよび/またはこれと比較することができる。細胞を薬剤と接触させた後に測定された量が対照値に満たない場合、薬剤は、GCS阻害剤または特に、GCS構成成分の発現の阻害剤であると確認または同定することができる。

10

【0148】

GCS構成成分の活性またはGCSの全体活性は、種々のアプローチのいずれかを使用して評価することができる。個々のGCS構成成分または2種以上のGCS構成成分の組合せの活性の評価（例えば、検出、測定等）に使用することのできるいくつかの方法は、当技術分野において公知のものである。例示的なグリシン開裂アッセイならびにP、T、Hおよび/またはLタンパク質活性のアッセイの説明に関して、例えば、Sato, T.ら、Glycine metabolism by rat liver mitochondria. III. The glycine cleavage and the exchange of carboxyl carbon of glycine with bicarbonate. J. Biochem. (Tokyo). 65巻：77～83頁（1969年）；Motokawa, Y. and G. Kikuchi. Glycine metabolism by rat liver mitochondria. II. Methylene tetrahydrofolate as the direct one carbon donor in the reaction of glycine synthesis. J. Biochem. (Tokyo). 65巻：71～76頁（1969年）；Hayasaka K.ら、Purification and properties of glycine decarboxylase, a component of the glycine cleavage system, from rat liver mitochondria and immunochemical comparison of this enzyme from various sources. J Biochem. 88巻（4号）：1193～9頁（1980年）；Hayasaka K.ら、The mitochondrial glycine cleavage system: Purification and properties of glycine decarboxylase from chicken liver mitochondria. J Biol Chem 255巻：11664～11670頁（1980年）；Hiraga K.ら、Defective glycine cleavage system in nonketotic hyperglycinemia. Occurrence of a less active glycine decarboxylase and an abnormal aminomethyl carrier protein. J Clin Invest. 68巻（2号）：525～34頁（1981年）、Walker JL & Oliver DJ. Glycine decarboxylase multienzyme complex. Purification and partial characterization from pea leaf mitochondria J Biol Chem. 15；261巻（5号）：2214～21頁（1986年）を参照されたい。

20

30

40

【0149】

一部の実施形態において、GCSまたはGCSタンパク質の活性のアッセイの実施は、(a) GCSタンパク質およびGCS構成成分により触媒される反応の基質を含む組成物を用意するステップと、(b) 前記反応の少なくとも1種の指標を評価するステップとを含む。適したアッセイおよびアッセイ詳細、例えば、適した基質（複数可）、適した反応条件、検出方法等は、GCS構成成分（複数可）および反応の必要に応じて選択される。反応の少なくとも1種の指標を評価するステップは、指標または指標の変化を検出することと、一部の実施形態において、これを測定することとを含むことができる。組成物は、バッファー、塩またはベータ-メルカプトエタノールもしくはジチオスレイトール等の抗酸化剤等、1種または複数の他の成分を含有することができる。組成物は、反応を促進す

50

るまたは反応に必要な1種または複数の補因子または他の成分を含むことができる。組成物は、様々な実施形態において、いずれか1種または複数のGCSタンパク質（複数可）を含むことができる。一部の実施形態において、基質は標識されている。組成物におけるその成分および量は、少なくともGCS阻害剤の非存在下で検出可能な度合いまで反応が起こるのに十分となるよう典型的に選択される。組成物は、チューブ、ウェル、皿等、いずれかの適した容器において提供することができる。一部の実施形態において、アッセイは、単離されたGCSタンパク質（複数可）、例えば、1種または複数の少なくとも部分的に精製されたGCSタンパク質（複数可）を利用する。一部の実施形態において、GCSタンパク質（複数可）は、組換えにより産生され、任意選択で、少なくとも部分的に精製される。一部の実施形態において、ヒトGCS構成成分（複数可）が使用される。一部の実施形態において、反応は、例えば、グリシン開裂反応、グリシン合成反応または全体的なグリシン開裂反応もしくはグリシン合成反応を含む上述の個々の反応のいずれかである。一部の実施形態において、反応の基質、産物または中間体は、反応の指標として働く。例えば、一部の実施形態において、増加した量の産物または減少した量の基質は、反応を示す。一部の実施形態において、細胞ベースのアッセイが使用され、このアッセイにおいて、反応は生細胞において起こり、続いて反応の指標が評価される。一部の実施形態において、反応の指標は、細胞において評価される。一部の実施形態において、反応の指標は、細胞を溶解した後に評価される。

10

【0150】

一部の実施形態において、GCSまたはGCSタンパク質の活性は、所定の期間におけるタンパク質1ミリグラム（mg）当たりの、生成された産物の量または消費された基質の量の観点から表すことができる。例えば、活性は、生成された産物の $\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ として表すことができる。

20

【0151】

一般に、指標または指標の変化を検出することのできるいずれかの適した方法および/または機器を使用することができる。例えば、検出および/または測定は、様々な実施形態において、分光法、比色分析、電気化学（例えば、電流測定または電量測定）、クロマトグラフィー（例えば、ガスまたは液体クロマトグラフィー）、光学、熱量測定、温度測定、測光、圧電気、放射測定および/または磁気アプローチを使用することができる。特定の実施形態において、放射線は、シンチレーションカウンティングを使用して検出される。特定の実施形態において、吸光度および/または発光は、例えば、分光計を使用して検出される。一部の実施形態において、基質または産物は、直接的に検出されて、これにより反応の直接的な指標として働く。一部の実施形態において、反応の指標として検出試薬が使用される。例えば、一部の実施形態において、検出試薬は、比色分析、蛍光定量的または化学発光検出の影響を受けやすい（またはより影響を受けやすい）化合物に変換される。様々な実施形態において、種々の発色性、蛍光発生的（*fluorogenic*）または化学発光発生的（*chemiluminogenic*）検出試薬のいずれかを使用してよい。一部の実施形態において、アッセイ組成物の1種または複数の成分からの干渉なしで容易に検出することのできる検出試薬が選択される。一部の実施形態において、共役アッセイが使用される。例えば、一部の実施形態において、GCSにより触媒される反応の産物は、別の反応（共役反応）、例えば、より容易に検出可能なまたはより簡便に検出可能な反応の基質として使用される。一部の実施形態において、共役反応は、酵素により触媒され、この場合、アッセイは、共役酵素アッセイと称され得る。一部の実施形態において、GCSにより触媒される1または複数の反応は、検出試薬に検出可能な変化をもたらす反応と共役される。例えば、一部の実施形態において、GCSにより触媒される反応の産物は、共役反応の基質として働く。一部の実施形態において、共役反応は、適した酵素により触媒される。一部の実施形態において、第1の共役反応は、例えば、第1の共役反応由来のシグナルを増幅することのできるまたは検出試薬に検出可能な変化をもたらす1種または複数の追加的な反応に共役される。検出可能な産物は、一般に少なくとも一部には特定の産物に依存する適した検出アプローチおよび器具を使用して検出される。例えば、有色産物の吸光度

30

40

50

または蛍光産物による発光は、Victor 2 (PerkinElmer、マサチューセッツ州ニュートン) またはSpectraMax M5 (Molecular Devices) 等、マイクロプレートリーダーを使用して検出することができる。一部の実施形態において、反応は、例えば、色の変化により視覚的に検出可能である。蛍光産物が、その発光を生じる適切な波長で典型的に励起されることを理解されよう。様々な実施形態において、生成された検出可能な産物の量 (例えば、規定の期間内の) または検出可能な産物の産生速度 (例えば、反応開始後の規定の時間における) は、反応の指標を提供する。様々な実施形態において、反応は、連続的にまたは1もしくは複数の時点でモニターされる。一部の実施形態において、反応は、試料の取り出しを要求することなく、それが行われている容器において評価される。一部の実施形態において、1種または複数の試料が容器から取り出され、評価される。

10

【0152】

一部の実施形態において、GCS活性は、グリシン開裂アッセイを使用して評価され、該アッセイにおいては、GCS構成成分 (P、H、TおよびLタンパク質) および補因子が用意され、基質としてグリシンが用意される。一部の実施形態において、グリシン開裂は、GCS構成成分がグリシンの存在下でインキュベートされる際に産生されたCO₂の量を測定することにより評価することができる。グリシンは、例えば、カルボキシル基に炭素または酸素同位元素 (例えば、C¹⁴、O¹⁸) を取り込ませることにより標識することができる。放射標識CO₂の産生は、例えば、シンチレーションカウンターを使用して検出することができる。一部の実施形態において、CO₂は、適した物質 (ハイアミン (hyamine) 等) により吸収される、あるいは係る測定を容易にすることができる液体または固体を生じるような1種または複数の反応物で処理される。例えば、Satoら (1969年) を参照されたい。一部の実施形態において、固体二酸化炭素センサーが使用される。一部の実施形態において、グリシン消費は、例えば、グリシンを検出するための高速液体クロマトグラフィー (HPLC) またはラマン (Raman) 分光法を使用して測定される。

20

【0153】

一部の実施形態において、GCS活性は、グリシン依存性NADH生成 (例えば、340nmにおける分光光度による、または励起340nmおよび発光450nmにおける蛍光定量による) またはH4葉酸の消失 (例えば、エンドウマメ葉由来のGCS構成成分を使用して行われる係るアッセイの例として、Bourguignon, J.ら、Resolution and characterization of the glycine-cleavage reaction in pea leaf mitochondria: Properties of the forward reaction catalysed by glycine decarboxylase and serine hydroxymethyltransferase、Biochem J.、255巻、169~178頁 (1988年) を参照) を測定することにより評価される。

30

【0154】

一部の実施形態において、NADHが検出され、一部の実施形態において、共役アッセイを使用して測定され、該アッセイにおいて、検出試薬として働く化合物へと水素化物が移動すると同時にNADHが酸化されてNAD⁺となり、続いて、その結果得られた還元型化合物が検出される。特定の実施形態において、検出試薬の還元は、試薬の検出可能な変化、例えば、直接的に検出可能な特性の変化を生じる。例えば、一部の実施形態において、検出試薬は、還元されると有色となる (または最初から有色であった場合、変色または退色する) または蛍光を発するようになる (または最初から蛍光であった場合、その蛍光特性が変化する (例えば、その放射周波数が変化するまたはクエンチされる))。一部の実施形態において、検出試薬は、還元されて有色産物 (ホルマザン) を生じることのできるテトラゾリウム塩 (例えば、MTT、XTT、INT、XTS、WTS (水溶性テトラゾリウム塩)) を含む。一部の実施形態において、検出試薬は、還元されて蛍光産物 (レゾルフィン (resofurin)) となることのできるレサズリンを含む。一部の実施形態において、共役反応におけるNADHの酸化は、適したNAD⁺酸化還元酵素、例えばジアホラーゼ (例えば、EC 1.8.1.4) により、あるいはフェナジンメトサルフェー

40

50

ト (P M S) 等の非酵素電子伝達剤により達成される。一部の実施形態において、生成された検出可能な産物の量は、産生された N A D H の量と、従って G C S の活性の指標を提供する。一部の実施形態において、生成された検出可能な産物の生成速度は、N A D H の産生速度と、従って G C S の活性の指標を提供する。

【 0 1 5 5 】

一部の実施形態において、例えば、P および / または H タンパク質の活性を評価するために、および / または P および / または H タンパク質の活性を阻害する薬剤を同定するために、グリシン交換反応が使用される。グリシン交換反応は、C O ₂ または炭酸水素塩 (H C O ₃⁻) における炭素原子によるグリシカルボキシル炭素の交換を測定する。例えば、グリシンのカルボニル炭素において固定された [¹⁴ C] 炭酸水素塩の量を測定することができる。反応は、T タンパク質を要求しない。グリシン交換反応を使用して、過剰な精製 H タンパク質が反応に加えられたときの、P タンパク質活性を特異的に測定することができる (例えば、Hayasaka、1980年またはToone、JR、Biochemical and molecular investigations of patients with nonketotic hyperglycinemia. Mol Genet Metab. 70 巻 (2 号) : 116 ~ 21 頁 (2000 年) を参照) 。 H タンパク質活性は、反応混合物に過剰な P タンパク質が補充されること以外は、P タンパク質のアッセイと同様の様式でグリシン交換反応を使用してアッセイすることができる。一部の実施形態において、変動量の P タンパク質および / または H タンパク質の存在下で反応を行うことにより、グリシン交換反応を阻害する薬剤は、P タンパク質の阻害剤または H タンパク質の阻害剤として分類することができる。例えば、P タンパク質の量の変更が反応に有意に影響を及ぼさない場合、および / または H タンパク質の量の変更が反応に有意に影響を及ぼす場合、阻害剤は、P タンパク質を阻害せず、その代わりに H タンパク質を阻害すると結論付けることができる。他方では、H タンパク質の量の変更が反応に有意に影響を及ぼさない場合、および / または P タンパク質の量の変更が反応に有意に影響を及ぼす場合、阻害剤は、H タンパク質を阻害せず、その代わりに P タンパク質を阻害すると結論付けることができる。一部の実施形態において、薬剤および変動量の各構成成分の存在下で反応を行い、この結果を薬剤の非存在下で反応が行われる場合に得られる結果と比較し、薬剤の存在によりいずれの反応セットが影響されたかどうかを決定することにより、グリシン開裂反応を阻害する薬剤は、特定の G C S 構成成分の阻害剤として分類することができる。一部の実施形態において、例えば後述する通り、阻害剤が C O ₂ 産生を遮断する能力を検査することにより、あるいは D L D または A M T 単独の活性を阻害するその能力を検査することにより、グリシン開裂反応を阻害する薬剤は、特定の G C S 構成成分の阻害剤として分類することができる。一部の実施形態において、阻害剤 (例えば、低分子) が G C S 構成成分の 1 種に結合する能力を検査することにより、グリシン開裂反応を阻害する薬剤は、特定の G C S 構成成分の阻害剤として分類することができる。

【 0 1 5 6 】

一部の実施形態において、H タンパク質活性は、5 , 5 ' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸) (N b s) と H タンパク質との反応を追跡して評価することができる (Neuburger Mら、Biochem J. 1991年9月15日 ; 278 巻 (P t 3) : 765 ~ 9 頁 (1991 年)) 。 N A D H の存在下において、リポアミド脱水素酵素は、リポアミドのジスルフィド結合から 2 個の S H 基への変換を触媒する。大過剰の N b s は、2 分子の 2 - ニトロ - 5 - チオベンゾエート (thiobenzoate) (N b s) の生成により S H 基からジスルフィド結合への変換を急速に触媒する。反応は、412 nm において分光光度的に追跡され、H タンパク質活性は、生成された N b s の p m o l 数として表される。

【 0 1 5 7 】

T タンパク質活性は、種々のアプローチを使用して評価することができる。一部の実施形態において、T タンパク質がグリシン開裂経路においてこれが触媒する反応の逆行を触媒 (catalyze) する能力が測定される。逆反応において、T タンパク質は、メチレントラヒドロ葉酸、アンモニアおよび還元型リポイル補欠分子族を有する H タンパク質からの H タンパク質結合型中間体の合成を触媒する。一部の実施形態において、逆反応における

Tタンパク質活性は、Okamura-Ikeda Kら、Mechanism of the glycine cleavage reaction. Properties of the reverse reaction catalyzed by T-protein. J Biol Chem. 15 ; 262巻(14号) : 6746~9頁(1987年)に記載されている通りに測定することができる。5, 10-CH₂-H₄葉酸からH₄葉酸への変換は、290nmにおける吸光度の減少を測定することにより追跡することができる。一部の実施形態において、Tタンパク質活性は、例えば、Motokawa, Y. and G. Kikuchi、上記参照(1969年)またはHiragaら、上記参照(1981年)に記載されている方法に従って、過剰Pタンパク質およびHタンパク質の存在下におけるメチレンテトラヒドロ葉酸、NH₄Clおよび[14C]炭酸水素塩からグリシンの合成を測定することによりアッセイすることができる。

10

【0158】

一部の実施形態において、Tタンパク質により触媒される反応において産生されるアンモニア(NH₃)は、指標として働く。一部の実施形態において、アンモニアは、ベルトロー(Berthelot)反応を使用して検出される。一部の実施形態において、アンモニアは、例えば、NADHが酸化されてNAD⁺となる反応を触媒するグルタミン酸脱水素酵素(GLDH)を使用する共役アッセイを使用して検出され、これによって、例えば、NADHの消費を測定することによるアンモニアの間接的モニタリングを可能にする。一部の実施形態において、アンモニアは、直接的に、例えば、イオン選択的プローブを使用して検出される。NADHの消費は、340nmの波長においてモニターすることができる、あるいはNADHは、例えば、後述する共役アッセイを使用して検出することができる。

20

【0159】

Lタンパク質は、水素供与体としてジヒドロリポ酸(リシン残基にN-連結した補欠分子族としてまたは縮小した活性を有する遊離型で、Hタンパク質における)を利用して、NAD⁺からNADHへの還元を触媒する。一部の実施形態において、リポ酸の還元体としてTCEPが使用されるジヒドロリポアミド脱水素酵素/TriS(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)アッセイを使用して、Lタンパク質および/またはHタンパク質の活性を測定することができる。この還元は、例えば、340nmにおいて分光光度的に測定することができる(例えば、Gueguen, V.ら、Structural and functional characterization of H protein mutants of the glycine decarboxylase complex. J. Biol. Chem. 274巻(37号) : 26344~26352頁(1999年)を参照;Zayら、2011年、上記参照も参照)。

30

【0160】

本明細書および/または本明細書に引用されている参考文献に記載されているアッセイ詳細は例示的なものであり、種々の仕方のいずれかにおいて改変してよいことを理解されよう。例えば、GCS構成成分の異なる供給源もしくは量および/または異なる標識、試薬、方法もしくは機器を使用することができる。

【0161】

一部の実施形態において、GCS構成成分の活性は、GCS構成成分の活性を阻害することが公知の薬剤または例えば、GCSをモジュレート(例えば、阻害)する能力もしくはGCS構成成分の活性をモジュレート(例えば、阻害)する能力に関して評定されている薬剤と、GCS構成成分を接触させた後に測定することができる。一部の実施形態において、薬剤は、低分子であるまたはこれを含む。測定された活性は、対照値、例えば、薬剤の非存在下で予想されるまたは得られる値と比較することができる。薬剤と細胞を接触させた後に測定された活性が対照値に満たない場合、薬剤は、GCS阻害剤または特に、GCS構成成分の活性の阻害剤であると確認または同定することができる。

40

【0162】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、例えば、上述のアッセイの1種または複数を使用して評価される選択された量もしくはレベルまでまたは選択された範囲内までに、GCS活性を低下させるまたは特定のGCS構成成分活性を低下させる濃度で使用することができる。一部の実施形態において、低下は、適したアッセイを使用した参照レベル(

50

例えば、対照レベル)の少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%もしくは100%またはいずれかの介在する範囲である。一部の実施形態において、低下は、参照レベル(例えば、対照レベル)の少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%または100%である。一部の実施形態において、参照レベルは、GCS阻害剤の非存在下において存在するレベルである。一部の実施形態において、100%阻害は、バックグラウンドレベルまでの低下を指す。

【0163】

10

VI. 薬剤を同定、評価または作製する方法

【0164】

一部の態様において、がんの処置のための候補薬剤(本明細書において、「候補抗がん剤」または「候補抗腫瘍剤」とも称される)を同定または評価する方法が提供される。一部の態様において、がんの処置のための候補薬剤を同定または評価する方法の1種または複数の実施に有用な組成物が提供される。一(ome)実施形態において、がんの処置のための候補薬剤を同定する方法は、(a)GCSの阻害剤を同定するためのスクリーニングまたはアッセイを行うステップを含む。一部の実施形態において、方法は、ステップ(a)において同定された阻害剤を腫瘍モデルにおいて検査するステップをさらに含む。

【0165】

20

様々な実施形態において、GCSまたはGCS構成成分のモジュレーター、例えば、阻害剤を同定または評価するために、種々の無細胞または細胞ベースのアッセイのいずれかを使用してよい。一部の実施形態において、無細胞アッセイは、生細胞外の組成物において1種または複数のGCS構成成分(複数可)と薬剤(例えば、被験薬剤)を接触させるステップを含む。一部の実施形態において、組成物は、細胞ライセートまたは生細胞外で少なくとも部分的に精製もしくは合成された1種もしくは複数のGCS構成成分(複数可)を含む。GCS構成成分(複数可)は、選択された程度の純度まで精製することができる。一部の実施形態において、組成物は、細胞質ライセートまたはオルガネラ特異的ライセートを含むことができる。一部の実施形態において、ライセートは、GCS構成成分を天然に発現するまたはこれを発現するよう操作された細胞から調製される。一部の実施形態において、組成物は、膜または膜構成物(例えば、脂質)を含むことができる。係る膜または構成物は、様々な実施形態において、天然起源(例えば、ミトコンドリアまたはミトコンドリア膜に存在する構成成分)、人工的またはこれらの組合せとなり得る。一部の実施形態において、組成物は、細胞下オルガネラ、例えば、ミトコンドリアを含むことができる。一部の実施形態において、組成物は、1種もしくは複数のGCSタンパク質(複数可)またはGCSタンパク質をコードするRNAを含む。一部の実施形態において、RNAまたはタンパク質は、組換え核酸技法を使用して合成されている。例えば、GCSタンパク質は、適切な原核生物または真核生物宿主細胞において発現させ、精製することができる。

30

【0166】

40

一部の実施形態において、RNAまたはタンパク質は、天然起源の配列、例えば、正常な配列からなるまたはこれを含む配列を有する。一部の実施形態において、GCS構成成分の配列は、天然起源のGCS構成成分の配列を含む。一部の実施形態において、天然起源の正常なGCS構成成分のバリエーション、例えば、機能的バリエーションであるGCS構成成分が使用される。例えば、一部の実施形態において、哺乳動物、例えば、ヒト、GLDC、GCSH、AMTもしくはDLLDと少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一もしくは100%同一のまたは哺乳動物、例えば、ヒト、GLDC、GCSH、AMTもしくはDLLDの機能的部分と少なくとも80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一もしくは100%同一の配列を含むポリペプチドが使用される。一部の実施形態において、哺乳動物、例えば、ヒトGLDC、GCSHま

50

たは A M T の少なくとも触媒ドメインと少なくとも 80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 同一または 100% 同一の配列を含むポリペプチドが使用される。一部の実施形態において、タグを含む G C S 構成成分が使用される。一部の実施形態において、配列比較、突然変異解析、天然起源の突然変異体の解析、構造解析から得られる情報を使用して、機能的パリアントを作製することができる。一部の実施形態において、少なくとも一部には、天然起源の前駆体タンパク質（前タンパク質）に存在するミトコンドリア標的化配列を欠くタンパク質が使用される。一部の実施形態において、断片が使用される。一部の実施形態において、断片は、少なくとも触媒ドメインを含む。細胞ベースのアッセイは、少なくとも一部には生細胞を使用して行われるアッセイである。一部の実施形態において、細胞ベースのアッセイは、G C S 構成成分を発現する生細胞を被験薬剤と接触させるステップと、G C S 構成成分の発現または活性における被験薬剤の効果を評価するステップとを含む。G C S 構成成分は、細胞環境において評価することができる、あるいは先ず細胞から単離して、続いて評価することができる。用語「被験薬剤」は、例えば、1種もしくは複数の活性（複数可）または1種もしくは複数の目的との適合性に関して評価されようとする、評価されているまたは評価された薬剤を指すよう使用することができるが、薬剤またはその使用におけるいかなる限定を暗示するものとも解釈するべきではない。

10

20

30

40

50

【0167】

一部の実施形態において、G C S 阻害剤を同定するためのアッセイの実施は、(a) 被験薬剤および少なくとも1種の G C S 構成成分または G C S 構成成分をコードする R N A を含む組成物を用意するステップと、(b) G C S または G C S 構成成分または G C S 構成成分をコードする R N A における被験薬剤の効果を評価するステップ、例えば、被験薬剤が、G C S を阻害するまたは G C S 構成成分を阻害するかどうかを決定するステップとを含む。被験薬剤が、G C S または G C S 構成成分を阻害する場合、被験薬剤は、G C S 阻害剤として同定される。一部の実施形態において、ステップ (b) は、G C S 構成成分の発現を評価することを含む。一部の実施形態において、ステップ (b) は、G C S 構成成分の活性を評価することまたは G C S の活性を評価することを含む。一部の実施形態において、方法は、(a) G C S 阻害剤を同定するステップと、(b) ステップ (a) において同定された G C S 阻害剤を少なくとも1種の腫瘍モデルにおいて検査するステップとを含む。一部の実施形態において、候補抗腫瘍剤を評価するための方法は、(a) G C S 阻害剤を同定するためのアッセイを行うステップと、(b) ステップ (a) において同定された G C S 阻害剤を少なくとも1種の腫瘍モデルにおいて検査するステップとを含む。一部の実施形態において、候補抗腫瘍剤を評価する方法は、(a) G C S 阻害剤を用意するステップと、(b) 少なくとも1種の腫瘍モデルにおいて G C S 阻害剤を検査するステップとを含む。一部の実施形態において、検査するステップは、G C S 阻害剤が、少なくとも1種の抗腫瘍効果を呈するかどうかを決定することを含む。方法の一部の実施形態において、ステップ (b) は、(i) 1種または複数の腫瘍細胞を G C S 阻害剤と接触させることと、(ii) 1種または複数の腫瘍細胞の生存（生存率）または増殖を評価することとを含み、1種または複数の腫瘍細胞の生存または増殖が阻害される場合、G C S 阻害剤は、候補抗がん剤として確認される。一部の実施形態において、方法は、1種または複数の腫瘍細胞の生存または増殖が、例えば、1種または複数の適した対照細胞の生存または増殖と比較して阻害されるかどうかを決定するステップをさらに含む。適した対照細胞は、例えば、G C S 阻害剤と接触されていないまたはより少量の G C S 阻害剤と接触された腫瘍細胞となり得る。一部の実施形態において、腫瘍細胞は、培養系において被験薬剤と接触される。一部の実施形態において、腫瘍細胞の少なくとも一部は、S H M T 2 を過剰発現する。

【0168】

一部の実施形態において、G C S タンパク質をコードする遺伝子の発現をモジュレートする薬剤を同定する方法は、(a) G C S タンパク質をコードする遺伝子と被験薬剤を接触させるステップと、(b) 遺伝子の発現における被験薬剤の効果を評価するステップと

を含む。一部の実施形態において、遺伝子の発現をモジュレートする薬剤を同定する方法のステップ (b) は、遺伝子の発現産物 (例えば、mRNA またはタンパク質) のレベルを評価することを含む。レベルは、適した参照レベル、例えば、被験薬剤の非存在において、例えば、薬剤の非存在下または系において不活性であることが公知もしくは不活性であると考えられている薬剤の存在下において予想されるレベルと比較することができる。ステップ (b) において測定されたレベルが、参照レベルと異なる場合、被験薬剤は、遺伝子の発現のモジュレーターとして同定される。例えば、ステップ (b) において測定されたレベルが、参照レベルと比較して増加または減少する場合、被験薬剤は、遺伝子の発現をそれぞれ増強または阻害する。一部の実施形態において、測定されたレベルは、例えば、1 種または複数の適した遺伝子の発現に基づき正規化される。一部の実施形態において、発現は、その発現レベルが被験薬剤により特異的に影響されることが予想されない遺伝子の発現に基づき正規化される。一部の実施形態において、測定されたレベルは、構造的遺伝子の発現に基づき正規化される。

10

20

30

40

50

【0169】

一部の実施形態において、方法は、細胞を被験薬剤と接触させるステップと、細胞による遺伝子の発現における被験薬剤の効果を評価するステップとを含む。細胞を被験薬剤と接触させるステップは、様々な実施形態において、培養または *in vivo* で行うことができる。細胞または組成物は、被験薬剤と接触させた後、被験薬剤の効果を評価する前に、適した期間維持することができる。適した期間は、接触時に存在する遺伝子産物の少なくとも一部が分解されるのに十分な期間となり得る。一部の実施形態において、期間は、例えば、少なくとも 1、4、8、12、24 または 48 時間、最大約 7 日間、例えば、12 ~ 24 時間の間、24 ~ 48 時間の間、48 ~ 72 時間の間等となり得る。一部の実施形態において、細胞は、係る期間のほんの一部の間、被験薬剤に曝露される。一部の実施形態において、細胞は、期間の間中、被験薬剤に曝露される。期間中に追加的な被験薬剤を加えることができる。一部の実施形態において、標的遺伝子を天然に発現する細胞を使用することができる。一部の実施形態において、標的遺伝子もしくはその部分を発現するよう操作されたまたはレポーター遺伝子を発現するよう操作された細胞を使用することができる。一部の実施形態において、薬剤は、RNAi により標的遺伝子の発現を阻害する能力に関して評価することができる。一部の実施形態において、例えば、細胞を含有する培地に薬剤を添加することにより、RNAi 剤が細胞と接触され、標的 RNA またはその翻訳産物のレベルにおける効果が評価される。例えば、標的 RNA の分解を検出することができる。一部の実施形態において、RNAi 剤は、細胞内で発現され、標的遺伝子の発現における効果が評価される。

【0170】

発現産物、例えば、mRNA またはタンパク質を検出または測定するために、当技術分野において公知の方法を使用することができる。RNA またはタンパク質の評価に使用することのできるアッセイのさらなる詳細に関して、例えば、上の記述を参照されたい。一部の実施形態において、GCS タンパク質活性のアッセイは、タンパク質レベルの指標として使用することができる。一部の実施形態において、レポーター遺伝子ベースのアッセイが使用される。レポーター遺伝子は、標的遺伝子の 1 種または複数の発現制御エレメント (例えば、少なくともプロモーター) が、レポーター分子 (「レポーター」) をコードする配列に作動可能に連結されている核酸を含む。例えば、一部の実施形態において、GCS レポーター遺伝子は、GLDC、GCSH、AMT または DLD 遺伝子の 1 種または複数の発現制御エレメント (例えば、少なくともプロモーター) が、レポーターをコードする配列に作動可能に連結されている核酸を含む。レポーターのレベルは、検出されて、発現制御エレメント (複数可) の転写活性を反映する読み取り情報として働く。レポーターは、蛍光、ルミネセンスもしくは比色分析シグナルを生じるまたは特定の波長の光を吸収することのできるタンパク質等、検出可能分子となり得る。一部の実施形態において、レポーター分子は、基質に作用して、蛍光、ルミネセンスまたは比色分析シグナルを生じる酵素を含む。例示的なレポーター分子として、例えば、緑色、青色、サファイア色、黄

色、赤色、橙色およびシアン色蛍光タンパク質およびこれらの誘導体；「mFruits」例えば、mCherry、mStrawberry、mTomatoとして公知のタンパク質等、単量体赤色蛍光タンパク質および誘導体；ルシフェラーゼ；ベータ-ガラクトシダーゼ；西洋わさびペルオキシダーゼ；アルカリホスファターゼ等、酵素等が挙げられる。一部の実施形態において、レポーターは、分泌型タンパク質である。

【0171】

GCSタンパク質の活性をモジュレート、例えば、阻害する薬剤は、種々の異なる無細胞または細胞ベースのアッセイを使用して同定することができる。一部の実施形態において、例えば、被験薬剤およびGCSタンパク質（複数可）を含む組成物を調製することにより、被験薬剤は、1種または複数のGCSタンパク質（複数可）と接触される。組成物は、例えば結合または反応が起こり得る適した条件下で、適した期間インキュベートすることができる。1種または複数のパラメータ、例えば、GCSタンパク質への被験薬剤の結合、GCSタンパク質の活性（例えば、酵素活性）等が測定される。組成物は、反応または結合もしくは酵素活性の検出または対象の化合物の同定に必要なまたはこれに役立つ構成成分（複数可）を含むことができる。一部の実施形態において、アッセイは、被験薬剤がGCSタンパク質に結合するかどうかを決定するステップおよび/または1種または複数の結合特徴を定量化するステップを含む。数多くの結合アッセイフォーマットが、当技術分野において公知である。一部の実施形態において、標識フリーアッセイを使用することができるが、他の実施形態において、標的または被験薬剤を標識することができる。結合アッセイは、固相または液相結合事象を含むことができる。被験薬剤、GCSタンパク質、いずれかの指標または結合事象の指標を検出することができる。一部の実施形態において、GCSタンパク質または被験薬剤は、支持体に付着される。一部の実施形態において、支持体は、硬質または半硬質表面を有する物品である。一部の実施形態において、少なくとも一表面は、実質的に平坦である。一部の実施形態において、支持体は、ほぼ球状である。支持体は、無機もしくは有機材料またはこれらの組合せで構成され得る。一部の実施形態において、支持体は、少なくとも一部には、金属、セラミック、ガラス、プラスチック、ゲルまたは他のマトリックスで構成される。係る物品は、例えば、プレート（例えば、マルチウェルプレート）、スライド、粒子（例えば、「ビーズ」、例えば、磁気ビーズ）、ペレット、バー、ロッド、ピン、ディスク、チップ、フィルターまたは他の適した形態の形をとることができる。一部の実施形態において、支持体は、センサー、例えば、結合または結合の変化を検出することができるセンサーを含む。例えば、センサーは、重量または蛍光等のシグナルの変化を検出することができる。一部の実施形態において、支持体は、電極を含む。一部の実施形態において、被験薬剤は、低分子マイクロアレイとして配置することができる。被験薬剤は、表面上の複数の位置に、個々のウェルまたは容器等に存在し得る。例えば、Vegas AJら、Chem Soc Rev. 37巻（7号）：1385～94頁、2008年を参照されたい。一部の実施形態において、GCSタンパク質または被験薬剤は、非共有結合によりまたは共有結合により支持体に付着される。一部の実施形態において、複数の被験薬剤が、複数の位置に（例えば、アレイフォーマットで）固定化される。GCSタンパク質を添加し、組成物を適した期間維持して結合を行わせる。一部の実施形態において、非結合材料が洗浄により除去され、GCSタンパク質が検出される。一部の実施形態において、洗浄ステップは省略してもよい。一部の実施形態において、結合は、蛍光偏光、蛍光共鳴エネルギー転移または電気化学発光の変化を測定することにより検出することができる。一部の実施形態において、GCSタンパク質が固定化され、被験薬剤が添加され、同様のアプローチを使用して結合が測定される。一部の実施形態において、1種または複数の被験薬剤をスクリーニングしてGCS構成成分に結合する薬剤を同定するための方法は、（a）1種または複数のGCS構成成分およびGCS構成成分へのその結合を評定しようとする1種または複数の被験薬剤を、1個または複数の反応容器のそれぞれに導入するステップと、（b）適した条件下で結合を行わせるのに十分な時間、前記容器をインキュベートするステップと、（c）結合に関してアッセイし、これにより被験薬剤の1種または複数がGCS構成成分に結合するかどうかを決定するステッ

10

20

30

40

50

ブとを含む。反応容器は、例えば、マルチウェルプレートのウェルとなり得る。様々な実施形態において、スクリーニングは、所定の容器において単一のGCS構成成分または複数のGCS構成成分を使用して行うことができる。様々な実施形態において、スクリーニングは、所定の反応容器において単一の被験薬剤または複数の被験薬剤を使用して行うことができる。

【0172】

一部の実施形態において、表面プラズモン共鳴(SPR)を使用して、動態学(オンレートおよび/またはオフレート)を測定するおよび/または被験薬剤とGCSタンパク質との間の結合強度(親和性)を検出もしくは測定することができる。例えば、SPR技術(例えば、Biacore、Life Sciences、GE Healthcare から入手できるシステム等、システム)を使用して、チップに固定化されたタンパク質への被験薬剤の結合および解離を測定することができ、測定された値は、被験化合物を含有しない溶液がチップにロードされた場合に得られる値と比較することができる。タンパク質に結合することのできる被験薬剤は、結合および解離速度、および/または結合レベルに基づいて選択することができる。結合を検出および/または定量化するための他の有用な方法は、水晶振動子マイクロバランス、光学カンチレバー(optical cantilever)、マイクロチャンネル共鳴器、二重偏光干渉計、共役導波管プラズモン共鳴、免疫沈降または他の抗体ベースの検出方法、等温滴定および示差走査熱量測定、キャピラリー電気泳動、共鳴エネルギー転移法、電気化学発光(electrochemiluminescence)、蛍光異方性または蛍光偏光ならびに蛍光相関解析の使用を含む。

10

20

【0173】

一部の実施形態において、GCSタンパク質に結合することが公知の薬剤が、標的GCSタンパク質に結合するおよび/またはその活性を阻害する能力に関して被験薬剤(例えば、低分子)をスクリーニングするためのツールとして使用される。標的に結合することが公知の薬剤は、標識することができる。標識は、例えば、放射性、蛍光または他の検出可能部分を含むことができる。被験薬剤が標識された薬剤と競合する能力は、検出されて、標的タンパク質への被験薬剤の結合の指標として働くことができる。一部の実施形態において、シンチレーション近接アッセイ(SPA)を使用することができる。標的タンパク質に結合する薬剤を同定するためのSPAの一部の実施形態において、標的タンパク質は、光を発する(scintillant)材料を含有するビーズに付着される。ビーズは、典型的に、ウェルまたは他の容器内に置く。一部の実施形態において、標的タンパク質は、ウェルに直接的に包埋された光を発する材料に付着される。被験薬剤および標的タンパク質に結合することのできる放射標識された化合物が、ウェルに添加される。標的タンパク質への放射標識された化合物の結合は、シグナルをもたらす。シグナルは、結合に関して放射標識化合物と競合する被験薬剤の存在下で低下する。SPAの総説に関して、例えば、J. Fraser Glickmanら、Scintillation Proximity Assays in High-Throughput Screening. Assay and Drug Development Technologies. 6巻(3号): 433~455頁、2008年を参照されたい。

30

【0174】

一部の実施形態において、およそ1mM、500μM、100μM、50μM、10μM、5μMまたは1μM以下のKdでGCSタンパク質に結合する被験薬剤が同定または選択される。一部の実施形態において、およそ500nM、100nM、50nMまたは10nM以下のKdでGCSタンパク質に結合する被験薬剤が同定または選択される。一部の実施形態において、0.1~10nMの間のKdでGCSタンパク質に結合する被験薬剤が同定または選択される。GCSタンパク質に結合する被験薬剤は、例えば、1種または複数の無細胞または細胞ベースのアッセイにおいてさらに検査して、これが標的タンパク質の活性をモジュレート、例えば、阻害する度合いを決定、および/またはこれがGCSの全体活性をモジュレート、例えば、阻害する度合いを決定することができる。例えば、GCSタンパク質に結合する被験薬剤は、例えば、1種または複数の無細胞または細胞ベースのアッセイにおいてさらに検査して、これがタンパク質の活性および/またはG

40

50

C Sの全体活性をモジュレート、例えば、阻害する度合いを決定することができる。一部の実施形態において、被験薬剤がG C S構成成分の二量体化を阻害する能力を評価することができる。タンパク質断片相補性アッセイ(P C A)またはF R E TもしくはB R E Tベースのアッセイ、S P Aアッセイ等、タンパク質-タンパク質相互作用を評価する方法。

【0175】

一部の実施形態において、G C S阻害剤を同定するためのアッセイの実施は、(a)被験薬剤、基質および1種または複数のG C S構成成分(複数可)を含む組成物を用意するステップと、(b)1種または複数のG C S構成成分(複数可)により触媒される反応における被験薬剤の効果を評価するステップとを含む。一部の実施形態において、被験薬剤がG C Sタンパク質による化学反応の触媒作用を阻害する能力が評価される。被験薬剤が反応を阻害する場合、被験薬剤は、G C S阻害剤として同定される。様々な実施形態において、反応は、上述のG C Sの反応のいずれかである。様々な実施形態において、反応は、本明細書に記載されている方法のいずれかを使用して評価される。一部の実施形態において、G C Sタンパク質のモジュレーターを同定する方法は、(a)G C Sタンパク質、G C Sタンパク質により触媒される反応の基質および被験薬剤を含む組成物を用意するステップと、(b)反応の少なくとも1種の指標を検出するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(c)ステップ(b)の結果を参照値と比較するステップと、(d)ステップ(b)の結果が、被験薬剤が反応を増加または阻害したことを指示する場合、被験薬剤をG C Sモジュレーターとして同定するステップとをさらに含む。一部の実施形態において、G C S阻害剤を同定する方法は、(a)被験薬剤、基質および1種または複数のG C Sタンパク質(複数可)を含む組成物を用意するステップと、(b)1種または複数のG C Sタンパク質(複数可)により触媒される反応の指標を測定するステップと、(c)ステップ(b)の結果を参照値と比較するステップと、(d)ステップ(c)の結果が、被験薬剤が反応を阻害したことを指示する場合、被験薬剤をG C S阻害剤として同定するステップとを含む。様々な実施形態において、組成物は、G C Sタンパク質のいずれか1種、2種以上または全種を含む。G C Sタンパク質(複数可)、基質および被験薬剤は、適した液体培地において用意される。一部の実施形態において、液体培地は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%以上の水(v/v)を含む水性培地である。一部の実施形態において、液体培地は、例えば、有機溶媒の非存在における活性と比較して標的タンパク質の活性に有意に影響を及ぼさない量で、D M S O等、有機溶媒を含むことができる。補因子、緩衝物質等、他の成分が組成物に存在してもよい。緩衝物質は、例えば、T r i s - H C l、ホウ酸ナトリウム、H E P E S、M O P S等を含む。基質、G C Sタンパク質(複数可)、他の成分の濃度ならびにp Hおよび温度等の条件は変動し得る。これらは、典型的には、合理的な期間、少なくともG C Sの阻害剤の非存在下で反応の検出可能なレベルをもたらすように選択される。組成物は、適した期間、(潜在的な阻害剤である被験薬剤の非存在で)G C Sタンパク質が、基質(複数可)が検出可能レベルで1種または複数の産物(複数可)に変換される反応を触媒するために適切となる条件下で維持される。反応は、例えば、反応を停止する薬剤を添加することにより、選択された期間の後に停止することができる。反応の指標が検出される。一部の実施形態において、産生された産物の量および/または産物生成速度が決定される。産生された産物の量および/または産物が産生される速度における被験薬剤の効果は、例えば、適した参照値との比較により評価される。産物の量または産物生成速度が、適した参照値と比較して被験薬剤の存在下で減少する場合、被験薬剤は、G C Sタンパク質が反応を触媒する能力を阻害すると考慮される、即ち、被験薬剤は、G C Sタンパク質の阻害剤と考慮される。一部の実施形態において、基質消費速度または消費された基質の量が決定される、あるいは残存する基質の量が決定される。消費された基質の量または基質消費速度が、適した参照値と比較して被験薬剤の存在下で減少する(または残存する基質の量が増加する)場合、被験薬剤は、タンパク質が反応を触媒する能力を阻害すると考慮される、即ち、被験薬剤は、タンパク質の阻害剤と考慮される。一

10

20

30

40

50

部の実施形態において、組成物は、検出試薬を含む。一部の実施形態において、GCSの少なくとも1種の反応は、検出試薬が検出可能な変化を経る反応と共役され、この変化は、反応の指標として検出される。例えば、一部の実施形態において、検出試薬は、検出可能な化合物に変換され、この化合物は、反応の指標として検出される。一部の実施形態において、検出試薬は、反応が停止された後に添加される、あるいは反応が起こった容器から取り出された試料と組み合わせられる。一部の実施形態において、組成物は、1種または複数の酵素、電子伝達剤または共役アッセイの実施に適した他の成分を含む。このようなアッセイのいずれかにおける参照値は、例えば、被験薬剤の非存在下（任意選択で、ピヒクルまたは不活性薬剤の存在下）またはアッセイにおいて使用されたものよりも実質的に低い量の被験薬剤の存在下で、同様の、実質的に同一のまたは同一のアッセイ条件下で測定される値となり得る。一般に、参照値は、以前に得られた、同時期に得られた、その後

10

20

30

40

50

【0176】

検出および測定することのできる様々な基質および産物は、上に記載されている。例えば、一部の実施形態において、アンモニアの産生が測定される。一部の実施形態において、NAD⁺の消費またはNADHの産生が測定される。一部の実施形態において、二酸化炭素の産生が測定される。一部の実施形態において、グリシンの消失が測定される。一部の実施形態において、基質は、標的タンパク質により触媒される反応の産物の検出を容易にする部分を含む。例えば、基質は、1種または複数の標識（例えば、放射性原子、蛍光標識および/または蛍光クエンチャー）を含むことができる。一部の実施形態において、基質は、基質の反応によりシグナルを放射する部分を含む。一部の実施形態において、基質は、基質からの放出により容易に検出され得る部分を含む。例えば、部分は、別の化合物と反応して、比色分析、蛍光またはルミネセンスシグナルを生じることができる。一部の実施形態において、アッセイ読み取りは、共鳴エネルギー転移法（RET）、例えば、蛍光共鳴エネルギー転移法（FRET）、ルミネセンス共鳴エネルギー転移法（LRET）またはバイオルミネセンス共鳴エネルギー転移法（BRET）に基づくことができる。多種多様なRETベースのアッセイを実行することができる。一般に、係るアッセイは、2種の部分（供与体およびアクセプターと呼ばれることもある）の間のエネルギー移動に

【0177】

一般に、少なくとも一部には、標的に特徴的な特定の活性（複数可）に依存した対象の標的に関して適切なアッセイを選択することができる。例えば、GCSタンパク質の活性またはGCSの全体活性の評価に使用することのできる様々なアッセイが、上に記載されている。一部の実施形態において、グリシン開裂アッセイを使用することができる。一部の実施形態において、グリシン交換反応を使用して、例えば、Pおよび/またはHタンパク質の活性を評価する、および/またはPおよび/またはHタンパク質の活性を阻害する薬剤を同定することができる。一部の実施形態において、Hタンパク質活性は、NbsによるHタンパク質の反応後に測定することができる。一部の実施形態において、Tタンパク質が、グリシン開裂経路においてこれが触媒する反応の逆行を触媒（catalyze）する能力が測定される。一部の実施形態において、リポ酸の還元体としてTCEPが使用されるジヒドロリポアミド脱水素酵素/Tris（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）アッセイを使用して、Lタンパク質および/またはHタンパク質の活性を測定することができる。

【0178】

実施形態は、例えば G C S 阻害剤を同定または特徴付けするための本明細書に記載されているアッセイのそれぞれを対象とする。

【 0 1 7 9 】

一部の実施形態において、G C S または G C S 構成成分において効果を発揮する被験薬剤を同定するために 1 種または複数の被験薬剤をスクリーニングするための方法は、(a) 1 種または複数の G C S 構成成分；1 種または複数の基質；および G C S または G C S 構成成分に対するその効果を評定しようとする 1 種または複数の被験薬剤を 1 個または複数の反応容器に導入するステップと、(b) 適した条件下で、反応を行わせるのに十分な時間、前記容器をインキュベートするステップと、(c) 反応の発生をアッセイし、これにより前記 G C S または G C S 構成成分における前記被験薬剤の効果を明らかにするステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、ステップ (c) の結果を参照値、例えば、被験薬剤の非存在下、それ以外の点では同様の条件下で得られるまたは予想される値と比較するステップを含む。一部の実施形態において、方法は、ステップ (c) において評価される反応の度合いが参照値と比較して低下する場合、被験薬剤を G C S または G C S 構成成分の阻害剤として同定するステップをさらに含む。様々な実施形態において、スクリーニングは、所定の容器において単一の G C S 構成成分または複数の G C S 構成成分を使用して行うことができる。様々な実施形態において、スクリーニングは、所定の容器において単一の基質または複数の基質を使用して行うことができる。様々な実施形態において、スクリーニングは、所定の反応容器において単一の被験薬剤または複数の被験薬剤を使用して行うことができる。一部の実施形態において、反応容器が、複数の被験薬剤を含有した場合、方法は、被験薬剤の少なくとも一部を個々に検査して、いずれの薬剤 (複数可) が G C S または G C S 構成成分において効果 (effet) を発揮するかどうかを決定するステップをさらに含む。様々な実施形態において、反応容器および / または被験薬剤の数は、少なくとも 1 0 ; 1 0 0 ; 1 0 0 0 ; 1 0 , 0 0 0 ; 1 0 0 , 0 0 0 個以上である。一部の実施形態において、反応容器は、マルチウェルプレートのウェルである。

10

20

【 0 1 8 0 】

一部の実施形態において、初回 (「一次」) アッセイまたはスクリーニングにおいて G C S モジュレーター、例えば、G C S 阻害剤として同定された被験薬剤は、「候補モジュレーター」と考慮することができる。1 種または複数の「確証的」または「二次」アッセイまたはスクリーニングを行って、被験薬剤が G C S タンパク質もしくは G C S 活性をモジュレートすることを確認する、またはモジュレーションの度合いもしくは特異性 (specificity) を測定する、または特異性を評価することができる。係る確証的検査は、被験薬剤の同定に使用されるアッセイと同じアッセイまたは異なるアッセイを利用することができる。一部の実施形態において、二次アッセイは、被験薬剤が、G C S もしくは G C S 構成成分の特異的阻害剤としてまたは例えば、転写、翻訳もしくはタンパク質活性の非特異的阻害剤として機能するかどうかを決定するステップを含む。一部の実施形態において、G C S または G C S 構成成分に対する特異性の合理的な程度を呈する被験薬剤は、例えば、さらなる検査または開発または使用のために同定または選択される。

30

【 0 1 8 1 】

本明細書に記載されている 1 または複数の目的のために、例えば、本明細書に記載されている 1 種または複数のアッセイまたはスクリーニングにおいて、多種多様な細胞を使用することができる。一部の実施形態において、細胞は、天然に、あるいは遺伝子改変の結果、標的、例えば、G C S 遺伝子産物を発現または含有する。一部の実施形態において、標的を発現しない細胞が、例えば、対照目的に有用となり得る。細胞は、いずれかの対象の生物、例えば、脊椎動物、例えば、哺乳動物から生じ得る。一部の実施形態において、細胞は、霊長類細胞、例えば、ヒト細胞である。細胞は、様々な実施形態において、初代細胞、不死化細胞、正常細胞、異常細胞、非腫瘍細胞、腫瘍細胞等となり得る。細胞は、特定の対象の組織または臓器から生じ得る、あるいは特定の細胞型のものとなり得る。一部の実施形態において、細胞は、細胞集団、例えば、非不死化または不死化細胞株のメンバーである。一部の実施形態において、「細胞株」は、少なくとも 1 0 継代の間、あるい

40

50

は少なくとも10回の集団倍加の間、培養において維持されてきた細胞集団を指す。一部の実施形態において、細胞株は、単一の細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞株は、複数の細胞に由来する。一部の実施形態において、細胞株は、特定の個体から得られる細胞の試料に由来する。一部の実施形態において、細胞株の細胞は、単一の試料（例えば、腫瘍から得られる試料）または個体から生じる細胞（単数または複数）の子孫である。細胞は、培養における遷延された増殖（例えば、約3ヶ月より長くまたは約25回の集団倍加より長く）が可能な細胞株のメンバーとなり得る。一部の実施形態において、細胞株は、培養における無期限増殖が可能である（不死化細胞）。不死化細胞株は、基本的に無限寿命を獲得している、即ち、この細胞株は、基本的に無期限に増殖することができる。本明細書の目的のため、培養において少なくとも100回の集団倍加を行ったまたはこれを行うことができる細胞株は、不死と考慮することができる。非不死化細胞株は、例えば、老化前に培養において約20～80回の間集団倍加を行うことができる。一部の実施形態において、細胞は、個体からこれを単離した後、本明細書に開示されている方法においてこれを使用する前に、培養において維持されて、1回または複数回継代または倍加させることができる（例えば、2～5、5～10、10～20、20～50、50～100回以上）。一部の実施形態において、細胞は、個体からこれを単離した後、本明細書に開示されている方法においてこれを使用する前に、1、2、5、10、20または50回以下継代または倍加されている。必要に応じて、細胞を検査して、DNAフィンガープリンティング（例えば、短いタンDEM反復（STR）解析）または一塩基多型（SNP）解析（例えば、SNPアレイ（例えば、SNPチップ）または配列決定を使用して行うこと）等、当技術分野において公知の種々の方法のいずれかにより、単一の個体または特定の細胞株に由来するか確認することができる。

10

20

30

40

50

【0182】

一部の実施形態において、ハイスループットスクリーニング（HTS）が行われる。ハイスループットスクリーニングは、1種または複数の無細胞または細胞ベースのアッセイを利用することができる。ハイスループットスクリーニングは、多くの場合、多数の被験薬剤を高効率で、例えば並行して検査することに関与する。例えば、数十、数百または数千種の薬剤をルーチンに短い期間で、例えば、数時間から数日間でスクリーニングすることができる。係るスクリーニングは、多くの場合、例えば、96、384、1536、3456個以上のウェルを含有するマルチウェルプレート（マイクロウェルまたはマイクロタイタープレートまたはマイクロプレートと称されることがある）または複数の物理学的に分離したくぼみ、ウェル、空洞もしくは区域（まとめると「ウェル」）が基板中またはその上に存在する他の容器において行われる。異なる被験薬剤（複数可）は、異なるウェルに存在することができるまたはこれに添加することができる。いくつかのウェルは、空であっても、複製物を含んでいても、対照薬剤またはビヒクルを含有していてもよいことを理解されよう。ハイスループットスクリーニングは、例えば、液体取り扱い方法、イメージングおよび/またはデータ取得もしくは加工等のための自動化の使用に関与し得る。一部の実施形態において、1種または複数のロボットを含む統合ロボットシステムは、例えば、アッセイ構成物（例えば、被験薬剤、標的、基質）の添加、混合および/またはインキュベーションと、一部の実施形態においては読み取りまたは検出のためにステーションからステーションへとアッセイマイクロプレートを輸送する。HTSシステムは、多くのプレートを同時に調製、インキュベートおよび解析することができる。HTSの実施形態において適用することのできる特定の一般原理および技法は、Macarro 'n R & Hert zberg RP. Design and implementation of high-throughput screening assays. Methods Mol Biol.、565巻：1～32頁、2009年および/またはAn WF & Tolliday NJ.、Introduction: cell-based assays for high-throughput screening. Methods Mol Biol. 486巻：1～12頁、2009年、および/またはこれらいずれかにおける参考文献に記載されている。例示的な方法は、High Throughput Screening: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology)、William P. Janzen著（2002年）およびHigh-Throughput Screening in Drug Discovery (M

methods and Principles in Medicinal Chemistry) (2006年)、Jorg Hueser 著においても開示されている。対象の活性を示す被験薬剤(複数可)(「ヒット」と呼ばれることがある)は、再検査することができる、および/または、任意選択で(例えば、少なくとも一部には、再検査(restesting)の結果に応じて)さらなる検査、開発または使用のために選択することができる。

【0183】

アッセイのいずれかにおいて陽性および/または陰性対照を使用することができる。適切な陽性または陰性対照は、少なくとも一部には、アッセイに基づき選択することができる。一部の実施形態において、GCSタンパク質をモジュレートすることが公知の薬剤は、陽性対照として使用することができる。例えば、公知のGCS阻害剤をスクリーニングにおいて陽性対照として使用して、さらなるGCS阻害剤を同定することができる。陰性対照は、被験薬剤の非存在下でアッセイを行うものとなり得る。一部の実施形態において、選択された程度の活性(例えば、GCSタンパク質における阻害活性)を呈する1種または複数の被験薬剤を同定し、任意選択で、さらなる検査または開発または使用のために選択することができる。例えば、陽性対照の活性の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、200%以上を呈する1種または複数の被験薬剤を同定し、任意選択で、さらなる検査、開発または使用のために選択することができる。

10

【0184】

一部の実施形態において、標的タンパク質、例えば、GCSタンパク質に結合する薬剤を同定するために第1のスクリーニングが行われ、標的タンパク質を阻害するおよび/または選択された効力を有する薬剤を同定するために第2のスクリーニングが行われる。一部の実施形態において、GCSタンパク質に結合および/または阻害する被験薬剤を同定するために1種または複数のアッセイまたはスクリーニングが行われ、次に、同定された被験薬剤が、腫瘍細胞、例えば、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞の生存または増殖を阻害する能力が評価される。被験薬剤の効果は、1種または複数の腫瘍細胞株、例えば、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞株を使用して評価することができる。一部の実施形態において、2、5、10種以上の腫瘍細胞株において有効性を評価することができる。一部の実施形態において、有効性は、CSCを含む腫瘍細胞株を使用して評価することができる。

20

30

【0185】

GCSタンパク質(またはこれをコードするRNA)または細胞は、様々な期間、1種または複数の被験薬剤(複数可)と接触させることができる。適切な持続時間は、例えば、種々の検討事項、例えば、検出しようとする指標、評価されている反応、合成もしくは分解の量もしくは速度、または標的の活性、被験薬剤の濃度もしくは量等に基づき選択することができる。一部の実施形態において、標的RNA(複数可)、タンパク質(複数可)または細胞は、5分間~20日間の間、例えば、5~60分間の間、1時間(h)~6hの間、6h~12hの間、12h~48hの間、48h~72hの間、3日間~5日間の間、5日間~10日間の間、10日間~20日間の間(またはいずれかの介在する範囲もしくは特定の値)、被験薬剤(複数可)と接触される。細胞は、培養期間の全期間または一部の期間、被験薬剤と接触させることができる。被験薬剤は、培養期間において1回または複数回、例えば、培地交換間または培地交換時に補充することができる。一部の実施形態において、被験薬剤は、発現または活性を評価する前に除去することができる。一部の実施形態において、細胞は、被験薬剤を対象、例えば、被験動物に投与することにより*in vivo*で接触される。被験薬剤は、1回または2回以上(複数用量)投与することができる。腫瘍または対象における被験薬剤の効果は、投与後の1または複数の時点で評価することができる。一部の実施形態において、腫瘍または対象における被験薬剤の効果は、初回投与後12h~52週間の間、1または複数の時点で評価することができる。例えば、効果は、投与後1週間~4週間の間、投与後4週間~12週間の間、投与後12週間~24週間の間、投与後24週間~48週間の間(またはいずれかの介在する範囲

40

50

または特定の値)例えば、初回投与後約1、2、4、6、8、12、16、20、24週間以上評価することができる。

【0186】

一部の実施形態において、方法は、(a)1個または複数の被験細胞をGCS阻害剤と接触させるステップと、(b)前記1個または複数の被験細胞の生存および/または増殖を評価するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、1個または複数の対照細胞をGCS阻害剤と接触させるステップと、前記GCS阻害剤による前記1個または複数の対照細胞の生存および/または増殖を評価するステップとをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、(a)1個または複数の被験細胞をGCS阻害剤と接触させるステップと、(b)前記GCS阻害剤による前記1個または複数の被験細胞の生存および/または増殖の阻害のレベルを検出するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、1個または複数の対照細胞をGCS阻害剤と接触させるステップと、前記GCS阻害剤による前記1個または複数の対照細胞の生存および/または増殖の阻害のレベルを検出するステップとをさらに含む。一部の実施形態において、1個または複数の被験細胞は、腫瘍細胞を含む。一部の実施形態において、1個または複数の被験細胞は、腫瘍形成細胞を含む。一部の実施形態において、1個または複数の被験細胞は、腫瘍細胞を含み、1個または複数の対照細胞は、非腫瘍細胞を含む。一部の実施形態において、1個または複数の被験細胞は、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞を含む。一部の実施形態において、1個または複数の被験細胞および1個または複数の対照細胞は、同一個体または細胞株から生じる。一部の実施形態において、1個または複数の被験細胞および1個または複数の対照細胞は、同一組織型または臓器型から生じる。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、第2の抗腫瘍剤と組み合わせて細胞と接触される。

10

20

【0187】

一部の実施形態において、被験細胞および対照細胞は、薬剤に接触されるときに、実質的に同一条件下で別々の容器(例えば、マイクロウェルプレートの別々のウェル)において維持される。一部の実施形態において、薬剤(例えば、リード化合物)の活性は、共培養において育成した被験細胞および対照細胞を接触させることにより検査することができる。共培養は、共通培養容器における薬剤と接触させた2種以上の細胞集団(例えば、被験および対照細胞)の選択的生存および/または増殖特性の評定を可能にする。典型的には、共培養物における各細胞集団は、共培養物における他の細胞集団(複数可)の同定用特徴と別個の検出可能な同定用特徴を有するであろう。一部の実施形態において、同定用特徴は、GFPもしくは他のレポータータンパク質および/または腫瘍細胞マーカーの発現のレベルを含む。しかし、当技術分野において公知の他の同定用特徴は、該同定用特徴が、共培養物における2種以上の細胞集団それぞれの生存および/または増殖のレベルの測定を可能にするのであれば、適したものとなり得る。共培養物は、一部の実施形態において、例えば、1%~99%の間の被験細胞を含むことができる。一部の実施形態において、被験細胞のパーセンテージは、10%~90%の間、20%~80%の間、30%~70%の間、40%~60%の間、例えば、約50%である。

30

【0188】

方法のいずれかの一部の実施形態において、GCS構成成分は、複数の異なる用量(例えば、異なる濃度または量)の被験薬剤と接触される、および/またはGCS構成成分は、複数の異なる持続時間において被験薬剤と接触される。例えば、方法のいずれかの一部の実施形態において、細胞は、複数の異なる用量(例えば、異なる濃度または量)の被験薬剤と接触される、および/または細胞は、複数の異なる持続時間において被験薬剤と接触される。一部の実施形態において、方法のいずれかは、薬剤の用量応答曲線を得るステップまたは解析するステップを含むことができる。一部の実施形態において、用量応答曲線は、複数の用量の薬剤による標的の活性の阻害のレベルを指示する。一部の実施形態において、複数の用量のピヒクルまたは不活性薬剤による標的の阻害のレベルを指示する、対照用量応答曲線を得るまたは解析することができる。一部の実施形態において、方法は、例えば、用量応答アッセイを使用して薬剤の効力を評価するステップを含む。一部の実

40

50

施形態において、解析は、薬剤のIC50またはEC50値の決定を含む。一部の実施形態において、効力は、本明細書において、所定の生物学的過程または構成成分等を50%（半量）阻害する薬剤の濃度を指すよう使用されている、薬剤の最大半量阻害濃度（IC50）として特徴付けられる。一部の実施形態において、効力は、本明細書において、薬剤により誘導される最大応答（例えば、阻害、活性化）の50%が観察される薬剤の濃度を指すよう使用されている、薬剤の最大半量有効濃度（EC50）として特徴付けられる。一部の実施形態において、生物学的過程は、代謝経路、例えば、GCSにより触媒される反応である。一部の実施形態において、構成成分は、代謝経路の構成成分、例えば、酵素である。一部の実施形態において、生物学的過程は、細胞増殖または生存率である。一部の実施形態において、方法は、薬剤のGI50を決定するステップを含み、この用語は、細胞増殖の50%阻害に要求される薬剤の濃度を指す。一部の実施形態において、用量応答曲線、IC50、EC50またはGI50は、1種もしくは複数の異なる組成物における薬剤または1もしくは複数の異なる薬剤と組み合わせた薬剤を使用して決定することができる。一部の実施形態において、用量応答曲線、IC50、EC50またはGI50は、選択された期間、例えば、本明細書に言及されている期間のいずれかにおける薬剤への曝露に対して決定することができる。

10

20

30

40

50

【0189】

一部の実施形態において、方法のいずれかは、被験細胞および/または対照細胞を使用して用量応答曲線を得るステップまたは解析するステップを含むことができる。一部の実施形態において、被験用量応答曲線は、複数の用量の薬剤による被験細胞生存または増殖の阻害のレベルを指示し、対照用量応答曲線は、複数の用量の薬剤による対照細胞生存または増殖の阻害のレベルを指示する。被験細胞は、例えば、薬剤の標的を発現する腫瘍細胞となり得る。対照細胞は、例えば、非腫瘍細胞または薬剤の標的を発現しない腫瘍細胞となり得る。一部の実施形態において、対照細胞は、被験細胞と同じ組織、臓器または細胞型から生じる非腫瘍細胞である。一部の実施形態において、被験用量応答曲線は、複数の用量の薬剤による被験細胞生存または増殖の阻害のレベルを指示し、対照用量応答曲線は、複数の用量のピヒクルまたは不活性薬剤による対照細胞生存または増殖の阻害のレベルを指示する。一部の実施形態において、解析は、被験細胞および/または対照細胞における薬剤のIC50値の決定を含む。一部の実施形態において、被験細胞における薬剤のIC50値は、対照細胞における薬剤のIC50値と統計的に有意な様式で異なる。一部の実施形態において、腫瘍細胞における薬剤のIC50値は、非腫瘍細胞における薬剤のIC50値よりも統計的に有意に低い。一部の実施形態において、GCS阻害剤のIC50は、対照細胞に対して被験細胞で約2～約1000倍低く、例えば、約2、5、10、20、50、100、250、500または1000倍低くなり得る。一部の実施形態において、薬剤のIC50は、正常な（非腫瘍）細胞よりも腫瘍細胞で約2～約1000倍低く、例えば、約2、5、10、20、50、100、250、500または1000倍低くなり得る。

【0190】

被験薬剤、例えば、候補抗腫瘍剤の抗腫瘍活性のアッセイは、細胞（例えば、いずれかの適した方法を使用して同定される、得られるまたは作製される腫瘍細胞、腫瘍細胞株）および/または非ヒト対象、ヒト対象、または有効性の検査に適したいずれかの系を使用して*in vitro*および/または*in vivo*で行うことができる。一般に、いずれかの適したアッセイを使用して、腫瘍細胞または腫瘍における候補抗腫瘍剤の効果を評価することができる。例えば、様々な実施形態において、細胞生存率および/または増殖のための種々のアッセイのいずれかを使用することができ、様々な実施形態において、腫瘍サイズ、成長速度、進行のための種々のアッセイのいずれかを使用することができる。例えば、上の記述を例えば参照されたい。一部の実施形態において、薬剤は、まず、1種または複数の無細胞および/または細胞ベースのアッセイまたはスクリーニングにおいて同定または特徴付けられ、次に、例えば、腫瘍に対するその効果を*in vivo*で評価するために対象（例えば、被験動物）において検査される。一般に、被験薬剤、例えば、

候補抗腫瘍剤は、いずれかの適した投与経路を使用して対象に投与することができ、選択された投与経路に適切に（例えば、1種または複数の担体と共に）製剤化することができる。一部の実施形態において、本明細書に記載されているまたは本明細書に記載されている通りに同定された候補抗腫瘍剤は、第2の抗腫瘍剤と組み合わせて検査することができる。

【0191】

一部の実施形態において、1種または複数の被験薬剤、例えば、化合物ライブラリーを検査して、GCS阻害剤の活性を増強する化合物（複数可）を同定する。例えば、一部の実施形態において、被験薬剤は、公知のGCS阻害剤と組み合わせて検査され、組合せの効果は、被験薬剤の非存在下におけるGCS阻害剤の効果と比較される。一部の実施形態において、GCS活性のモジュレーター（例えば、阻害剤）として同定された被験薬剤を二次アッセイにおいて検査して、1種または複数の個々のGCS構成成分に対するその効果を測定する。例えば、同定された被験薬剤を検査して、これがGLDC、GCSHまたはAMTを特異的に阻害するかどうかを決定することができる。

10

【0192】

様々な実施形態において、多種多様な被験薬剤のいずれを使用してもよい。例えば、被験薬剤は、低分子、ポリペプチド、ペプチド、核酸、オリゴヌクレオチド、脂質、炭水化物またはハイブリッド分子となり得る。薬剤は、天然供給源から得ることができる、あるいは合成的に産生することができる。薬剤は、少なくとも部分的に純粋となり得る、あるいは抽出物または他の種類の混合物に存在し得る。抽出物またはその画分は、例えば、植物、動物、微生物、海洋生物、発酵ブロス（例えば、土壌、細菌または真菌発酵ブロス）等から産生することができる。一部の実施形態において、化合物コレクション（「ライブラリー」）が検査される。ライブラリーは、例えば、100～500,000種の間またはそれ以上の化合物を含むことができる。化合物は、多くの場合、マルチウェルプレートにおいて整列される。化合物は、溶媒（例えば、DMSO）に溶解することができる、あるいは乾燥形態で、例えば、粉末または固体として提供することができる。合成、半合成および/または天然起源の化合物のコレクションを検査することができる。化合物ライブラリーは、構造的に関係する、構造的に多様なまたは構造的に無関係の化合物を含むことができる。化合物は、人工的（人間により考案された構造を有し、天然に存在しない）であっても天然起源であってもよい。一部の実施形態において、ライブラリーは、創薬プログラムにおいて「ヒット」または「リード」として同定されている少なくともいくつかの化合物および/またはそのアナログを含む。化合物ライブラリーは、天然の産物および/または非指向性もしくは指向性合成有機化学を使用して作製された化合物を含むことができる。化合物ライブラリーは、低分子ライブラリーとなり得る。他の対象のライブラリーは、ペプチドまたはペプチドライブラリー、cDNAライブラリーおよびオリゴヌクレオチドライブラリーを含む。

20

30

【0193】

ライブラリーは、重点的に取り組むことができる（例えば、主に、同じ前駆体に由来する同じコア構造を有するまたは少なくとも1種の生化学的活性を共通して有する化合物で構成される）。化合物ライブラリーは、Tocris Bioscience、Nanosyn、BioFocus等、いくつかの商業的ベンダーおよび政府機関から入手することができる。例えば、米国国立衛生研究所（U.S. National Institutes of Health）（NIH）分子ライブラリープログラム（Molecular Libraries Program）の構成機関である分子ライブラリー低分子リポジトリ（Molecular Libraries Small Molecule Repository）（MLSMR）は、例えば、ハイスループットスクリーニングアッセイにおける使用のための、公知および未知の生物活性を有する>300,000種の化学的に多様な化合物のコレクションを配布する（<https://mli.nih.gov/mli/>を参照）。NIH臨床コレクション（NCC）は、ヒト臨床試験における使用の歴史を有するおよそ450種の低分子のプレティングされたアレイである。これらの化合物は、公知の安全性プロファイルを有する高度に「薬物様」である。NCCコレクションは、6枚の96ウェルプレー

40

50

トに整列されている。50 μ lの各化合物が、100% DMSOに溶解されたおよそ10 mM溶液として供給されている。一部の実施形態において、「認可されたヒト薬物」を含む化合物のコレクションを検査することができる。「認可されたヒト薬物」は、米国食品医薬局 (US Food and Drug Administration)、欧州医薬品審査庁 (European Medicines Evaluation Agency) またはその販売を許可する前に治療剤の少なくとも安全性を評定する責任がある同様の機関等、政府規制機関によってヒトの処置における使用に認可された薬剤である。被験薬剤は、例えば、抗新生物薬、抗細菌薬、抗ウイルス薬、抗真菌薬、抗原虫薬、抗寄生虫薬、抗うつ薬、抗精神病、麻酔薬、抗狭心症薬、降圧薬、抗不整脈薬、抗炎症薬、鎮痛薬、抗血栓薬、制吐薬、免疫調節薬、抗糖尿病薬、脂質もしくはコレステロール降下薬 (例えば、スタチン)、抗痙攣薬、抗凝固薬、抗不安薬、睡眠薬 (睡眠誘導剤)、ホルモン薬または抗ホルモン薬等となり得る。一部の実施形態において、薬剤は、少なくともいくつかの前臨床または臨床開発を経ている、あるいは「薬物様」特性を有することが決定または予測されている。例えば、薬剤は、第I相治験または少なくとも非ヒト動物における前臨床試験を完了し、安全性および認容性の証拠を示している。一部の実施形態において、薬剤は、例えば、脊椎動物、例えば、哺乳動物細胞を培養するための、当技術分野において公知のまたは使用されている細胞培養培地に存在する薬剤、例えば、細胞培養目的に提供される薬剤ではない、あるいは薬剤が、当技術分野において公知のまたは使用されている細胞培養培地に存在する場合、薬剤は、本明細書に記載されている方法または組成物において使用される際に、異なる、例えばより高い濃度で使用することができる。一部の実施形態において、薬剤は、腫瘍の処置に (例えば、腫瘍細胞生存もしくは増殖の阻害または腫瘍の維持、成長もしくは進行の阻害に) または化学療法に伴う副作用の処置に有用であることが当技術分野において公知の薬剤ではない。

10

20

【0194】

一部の実施形態において、配列解析、突然変異解析および/または構造解析に由来する情報は、GCSモジュレーター、例えば、GCS阻害剤 (複数可) の同定または解析において使用することができる。例えば、一部の実施形態において、少なくとも一部には、例えば、核磁気共鳴、相同性モデリングおよび/またはX線結晶学を使用して作成された標的、例えば、GCSタンパク質の構造 (例えば、二次元または三次元構造) が使用される。一部の実施形態において、リガンド (例えば、阻害剤) が標的に結合している状態で得られる構造を使用することができる。一部の実施形態において、「仮想スクリーニング」と称されることがあるコンピュータ支援計算機的アプローチが、候補モジュレーター、例えば、候補GCS阻害剤の同定において使用される。化合物の構造は、酵素に、例えば、化合物に到達できる領域 (例えば、「ポケット」) に結合する能力に関してスクリーニングすることができる。領域は、公知のもしくは潜在的な活性部位、または化合物に到達できるいずれかの領域、例えば、表面における凹面領域または中裂となり得る。種々のドッキングおよびファルマコフォアに基づくアルゴリズムは、当技術分野において公知のものであり、係るアルゴリズムを実行するコンピュータプログラムが利用できる。一般に使用されるプログラムは、Gold、Dock、Glide、FlexX、FredおよびLigandFit (これらの最新リリースを含む) を含む。例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、Ghosh, S.ら、Current Opinion in Chemical Biology、10巻 (3号) : 194 - 2 - 2、2006年; McInnes C., Current Opinion in Chemical Biology; 11巻 (5号) : 494 ~ 502頁、2007年および前述の論文のいずれかにおける参考文献を参照されたい。一部の実施形態において、仮想スクリーニングアルゴリズムは、2つの主要なフェーズに参与し得る: 検索 (「ドッキング」とも呼ばれる) およびスコア化。第1のフェーズにおいて、プログラムは、2種の分子 (被験化合物および標的分子) の候補複合体のセットを自動的に作成し、該候補複合体の相互作用のエネルギーを決定する。スコア化フェーズは、候補複合体にスコアを割り当て、少なくとも一部にはエネルギーに基づき、有利な相互作用を表示する構造を選択する。仮想スクリーニングを行うため、多数の被験化合物を用いてこの過程を反復して、例えば、標的と最も有利な相互作用を表示する化合物を同定することができる。一部の

30

40

50

実施形態において、活性部位または可能な活性部位内における低分子の低エネルギー結合モードが同定される。変種は、硬直したまたは柔軟なドッキングアルゴリズムおよび/または潜在的な水分子の結合の包含の使用を含むことができる。一部の実施形態において、酵素活性部位の三次元構造は、潜在的阻害剤の同定に使用することができる。活性部位においてまたはその近傍に結合する潜在能力を有する薬剤（複数可）を同定することができる。次に、実際の化合物を使用して、これらの予測を検査することができる。続いて、このようにして同定された新たな阻害剤を使用して、阻害剤/酵素複合体における酵素の構造を得て、分子が活性部位に結合する仕方を示すことができる。例えば、結合改善を試みるために、阻害剤にさらなる変化を生じさせることができる。このサイクルは、十分な予測されるまたは実際の効力（例えば、治療目的の所望の効力）の阻害剤が同定されるまで反復することができる。数多くの低分子構造を利用することができ、仮想スクリーニングに使用することができる。化合物構造のコレクションは、「仮想ライブラリー」と称されることもある。例えば、ZINCは、仮想スクリーニングに使用することができる、数百万種の市販の化合物の構造を含有する公表されているデータベースである（<http://zinc.docking.org/>；Shoichet, J. Chem. Inf. Model., 45巻（1号）：177～82頁、2005年）。約250,000種の低分子構造を含有するデータベースが、国立癌研究所（National Cancer Institute）（米国）ウェブサイト（<http://129.43.27.140/ncidb2/>）において利用することができる。一部の実施形態において、複数の低分子は、例えば、最大50,000；100,000；250,000；500,000または最大百万、2百万、5百万、一千万以上をスクリーニングすることができる。化合物は、スコア化し、任意選択で、標的に結合するその潜在能力により順位付けすることができる。仮想スクリーニングにおいて同定された化合物は、無細胞もしくは細胞ベースのアッセイまたは動物モデルにおいて検査して、標的、例えば、GCSまたはGCS構成成分の活性を阻害するその能力を確認することができる、および/または腫瘍細胞生存もしくは増殖または腫瘍の維持もしくは進行に対するその効果を評価することができる。計算機的アプローチを使用して、物理的または仮想スクリーニングにおいて同定された化合物の1種または複数の物理化学的、薬物動態学的および/または薬力学的特性を予測することができる。係る情報を使用して、例えば、さらなる検査、開発または使用のための1種または複数のヒットを例えば選択することができる。例えば、「薬物様」分子に典型的な特徴を有する低分子を選択することができる、および/または1種または複数の望まれない特徴を有する低分子を回避することができる。

【0195】

一部の実施形態において、1種もしくは複数の薬剤、例えば、GCSもしくはGCS構成成分の1種もしくは複数の公知のモジュレーターまたはスクリーニングにおいて同定された1種もしくは複数のヒットは、例えば、さらなる検査、開発または使用のために選択することができる。選択されたヒットは、「リード」または「リード薬剤」と称することができる。例えば、リードは、例えば、1種または複数の他のヒットと比較して、例えば、大多数の他のヒットと比較して、より高い効力、標的に対するより優れた選択性、1もしくは複数の薬物様特性、有用な修飾の潜在能力または他のいずれかの対象の特性（複数可）を有すると決定または予測された薬剤となり得る。さらなる検査は、例えば、ヒットの再合成、同じまたは異なるアッセイにおけるヒットの再検査等を含むことができる。薬剤の開発は、変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤を産生するステップを含むことができる。一部の実施形態において、ヒット化合物の構造を検査して、追加的な化合物（例えば、構造的アナログ）の設計に使用することができる。一部の実施形態において、方法のいずれかは、変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤を産生するステップを含むことができる。一部の実施形態において、方法は、1種または複数の特性の変更、例えば、（1）対象の標的に対する親和性の増加；（2）非標的分子に対する親和性の減少；（3）溶解度の増加（例えば、水溶解度の増加）；（4）安定性の増加（例えば、*in vivo*）；（5）効力の増加；（6）例えば、標的分子または腫瘍細胞に対する選択性の増加、例えば、腫瘍対非腫瘍細胞に対

10

20

30

40

50

するより高い選択性（例えば、より高い細胞傷害性）；（ 7 ） 1 種または複数の副作用の減少（例えば、有害副作用の減少、例えば、毒性の減少）；（ 8 ）治療指数の増加；（ 9 ） 1 種または複数の薬物動態学的特性（例えば、吸収、分布、代謝および/または排泄）の修飾；（ 10 ）治療作用発現または効果の持続時間の修飾；（ 11 ）経口バイオアベイラビリティの修飾、例えば、増加；（ 12 ）組織または腫瘍浸透の修飾、例えば、増加；（ 13 ）細胞透過性の修飾、例えば、増加；（ 14 ）選択された細胞下オルガネラへの送達 of 修飾、例えば、増加；（ 15 ）血液脳関門を通過する能力の修飾、例えば、増加（薬剤が、中枢神経系腫瘍、例えば、一部の実施形態において、脳腫瘍の処置に使用される場合、血液脳関門を通過する能力の増加が望ましくなり得る；一部の実施形態において、薬剤が CNS に有害効果を有する場合、血液脳関門を通過する能力の減少が望ましくなり得る）；（ 16 ）免疫原性の変更；（ 17 ）血漿タンパク質結合の変更；を達成するまたは達成を探究するための薬剤を修飾するステップを含む。

10

【 0 1 9 6 】

一部の実施形態において、方法のいずれかは、変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤の *in vitro* 活性または *in vivo* 活性または毒性学プロファイルを決定するステップをさらに含む。例えば、少なくとも一部には係る解析に基づき、1 種または複数の追加的な変更を行うことができる。複数サイクルの変更および検査を行って、これにより追加的な変更された薬剤を作製することができる。一部の実施形態において、方法のいずれかは、複数のヒット、リードまたは変更された薬剤の定量的構造活性関係性解析を行うステップをさらに含むことができる。変更は、様々な実施形態において、少なくとも部分的にランダムなまたは予め定められていない修飾、予め定められた修飾および/または計算機的アプローチの使用により達成することができる。一部の実施形態において、変更は、医薬化学の確立された原理または技法を利用して、例えば、1 種または複数の特性を予想可能に変更することができる。一部の実施形態において、被験薬剤の第 1 のライブラリーは、本明細書に記載されている方法のいずれかを使用してスクリーニングされ、「ヒット」または「リード」である 1 種または複数の被験薬剤が同定され、係るヒットまたはリードの少なくとも 1 種は、系統的な構造的変更が付されて、ヒットまたはリードと構造的に関係する化合物の第 2 のライブラリーを作製する。次に、第 2 のライブラリーは、本明細書に記載されている方法または他の方法を使用してスクリーニングされる。

20

【 0 1 9 7 】

一部の実施形態において、本明細書に記載されている通りに同定された薬剤、例えば、本明細書に記載されている通りに同定された GCS 阻害剤は、未知の構造を有することができる、および/または複数の潜在的な活性薬剤を含む混合物の一部となり得る。薬剤の構造の決定に有用な種々の技法は、公知のものであり、NMR、赤外 (IR) 分光法、紫外 - 可視光 (UV - Vis) 分光法、質量分析、X 線結晶学等、必要に応じて構造の決定に使用することができる。薬剤の分離に有用な種々の技法は、公知のものであり、混合物に存在する薬剤の分離に使用することができる。

30

【 0 1 9 8 】

一部の実施形態において、同じ標的または異なる標的、例えば、同じ GCS 構成成分または異なる GCS 構成成分に作用する 1 種もしくは複数の公知のモジュレーターまたは 1 もしくは複数の同定されたヒット、リードもしくは変更された薬剤は、直接的に、または 1 もしくは複数のリンカーもしくは足場を介して互いに連結させてよい。

40

【 0 1 9 9 】

一部の実施形態において、方法のいずれかは、標識を取り込むまたは標識に付着するよう薬剤を修飾することにより、変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤を産生するステップを含むことができ、標識は、任意選択で、例えば薬物動態学的試験において薬剤または薬剤の代謝物の検出または測定に使用することができる。一部の実施形態において、方法のいずれかは、第 2 の部分（または 3 種以上の部分）を取り込むまたはこれに付着するよう薬剤を修飾することにより、変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤を産生するステップを含むことができる。一部の実施形態において、第 2 の（または追加

50

的な)部分は、リンカー、タグまたは標的化部分を含む。一部の実施形態において、第2の(または追加的な)部分は、上に記載されている1種または複数の特性(1)~(17)を修飾することができる。一部の実施形態において、修飾は、対象の身体における所望の活性の部位への薬剤の送達または該部分における薬剤の蓄積を増加させることができる。部位は、例えば、腫瘍、臓器、組織、細胞区画(例えば、細胞質、オルガネラ)等となり得る。

【0200】

一部の実施形態において、細胞透過性を増強する部分は、タンパク質形質導入ドメイン(PTD)を含むことができる。「細胞透過性」は、本明細書において「細胞取込み」と互換的に使用されており、いずれか特定の機序の暗示を意図しない。取込みは、原形質膜を横断した細胞質への侵入を含むことができる。PTDは、これを含むまたはこれが付着した実体の、細胞、例えば、哺乳動物細胞による取込みを増強することができるペプチドまたはペプチドである。多くのPTDは、当技術分野において公知のものである。例示的なPTDとして、アルギニンリッチペプチド等の正電荷を持つ側鎖(例えば、グアニジノ、アミジノおよびアミノ含有側鎖(例えば、米国特許第6,593,292号明細書))を有するアミノ酸に富む様々な配列、HIV Tatタンパク質由来の配列(例えば、米国特許第6,316,003号明細書);ペネトラチン(アンテナペディアのホメオドメインに由来する配列);ファージディスプレイライブラリー由来の配列(例えば、米国特許出願公開第20030104622号明細書);MTSペプチド(カポジ線維芽細胞増殖因子シグナルペプチドに由来する配列)等が挙げられる。オルガネラ特異的PTDは、特異的細胞下部位を標的化するための手段を提供する。例えば、ここに本明細書の一部を構成するものとしてその内容を援用する、Jain MR、Cancer Res. 65巻:7840~7846頁、2005年;Torchilin VP、Adv Drug Deliv Rev. 58巻:1532~1555頁、2006年;Juliano RLら、Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 1巻:324~335頁、2009年;Stewart KMら、Org Biomol Chem. 6巻(13号):2242~55頁、2008年;Fonseca SBら、Adv Drug Deliv Rev.、61巻(11号):953~64頁、2009年;Heitz FR、Br J Pharmacol.、157巻(2号):195~206頁、2009年および前述のいずれかにおける参考文献を参照されたい。一部の実施形態において、PTDは、GCS構成成分を阻害する低分子、RNAi剤、アプタマーもしくはポリペプチドまたはGCS阻害剤を取り込むマイクロ粒子もしくはナノ粒子の細胞取込みの増強に使用することができる。

【0201】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、薬剤のミトコンドリア局在化を増加する、例えば、ミトコンドリアへの薬剤の侵入を増加させる部分を含むまたはこれと物理的に会合している。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、係る部分を含むようまたはこれと物理的に会合するよう修飾される。ミトコンドリア標的化部分は、特定の実施形態において、種々のペプチド、ペプチドミメティックおよび非ペプチド種を含むことができる。一部の実施形態において、係る部分は、薬剤をミトコンドリアに標的化するため、GCS阻害剤にコンジュゲートされる、あるいはGCS阻害剤との融合タンパク質として発現される。一部の実施形態において、ミトコンドリア標的化部分は、天然起源のミトコンドリア標的化シグナル(MTS)を含むまたはその機能的バリエーションである。MTSは、多くの場合正電荷を持ち、相対的に少数の負電荷残基を有する、例えば約15~40残基の長さの、多くの場合N末端、それほど多くはないがC末端開裂可能アミノ酸配列である。これは、例えば、複数の塩基性(例えば、アルギニン)、疎水性(例えば、アラニン、ロイシン)および極性残基(例えば、セリン)を含むことができる。標的化シグナルは一般に、ミトコンドリアマトリックスへの移入の間にまたはその内側で、ミトコンドリアプロセシングペプチダーゼによってタンパク質分解により除去される。一部のミトコンドリアタンパク質は、開裂を行わない同様の内部配列によってミトコンドリアに標的化される。MTSは、ミトコンドリア外膜(TOM複合体)および内膜(TIM複合体)における転位置機構によるその認識に重要となり得る、両親媒性 - ヘリックスを形成すると考え

られる。一般に、塩基性残基由来の局在化された正電荷と組み合わせた両親媒性を有する配列は、ミトコンドリア移入の成功を導くことができる。ミトコンドリア移入の増強に使用することのできる例示的なペプチドは、例えば、SSペプチドもしくはXJBペプチドミメティック、またはリシン(K)およびアルギニン(R)もしくはd-アルギニン(r)(正電荷を与えるよう選択される)ならびにフェニルアラニン(F)およびシクロヘキシルアラニン(FX)残基(親油性を付与するため)を含む少なくとも4~8アミノ酸の長さの一連のカチオン性、親油性細胞透過性ミトコンドリア浸透ペプチドを含む(Horton, KHら、Chemistry & Biology 15巻: 375~382頁(2008年))。SSテトラペプチドは、交互に現れる芳香族および塩基性残基の共通構造的モチーフを特色とする。XJBペプチドは、グラミシジンS抗生物質の配列に由来する。非ペプチドミトコンドリア標的化種は、トリフェニルホスホニウム(TPP)等の様々な親油性カチオン性化合物またはその誘導体、例えば、その低級アルキル誘導体(例えば、C1~6アルキル、例えば、メチル誘導体)、(2-オキソ-エチル)-トリフェニル-ホスホニウムまたはステアリルトリフェニルホスホニウムを含む。例えば、ミトコンドリア標的化の追加的な記述のため、Hoye, ATら、Accounts of Chemical Research、41巻(1号): 87~97頁(2008年)および/またはMossalam, M.ら、Ther Deliv. 1巻(1号): 169~193頁(2010年)、または前述のいずれかにおける参考文献を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0202】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、血液脳関門(BBB)の通過を増加させる部分を含む、またはこれを含むようもしくはこれと物理的に会合するよう修飾されている。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、例えば、親油性部分をそこにコンジュゲートすることによりその親油性を増加させるよう修飾されている。一部の実施形態において、薬剤、例えば、GCS阻害剤をポリエチレングリコール(PEG)もしくはその誘導体または別の生体適合性有機ポリマー(天然起源または人工的)等の部分にコンジュゲートして、体内における循環時間(例えば、静脈内投与後の)が増加した、サイズが増加した薬剤をもたらすことができる。部分は、例えば、様々な実施形態において、10kD~200kDの間の分子量または平均分子量を有することができる。ペグ化(別の分子へのポリエチレングリコールポリマー鎖の共有結合による付着の過程)は、標的分子とPEGの反応性誘導体とのインキュベーションにより達成することができる。一部の実施形態において、薬剤へのPEGの共有結合による付着は、免疫系から薬剤を「マスク」し(免疫原性および抗原性を低下させる)、薬剤の水力学的サイズを増加させて、これにより、腎クリアランスを低下させることによりその循環時間を遷延することができる。ペグ化は、疎水性薬剤に水溶解度の増強をもたらすことができる。

【0203】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、標的化部分を含むまたはこれに連結されている。一部の実施形態において、標的化部分は、腫瘍細胞表面マーカーに結合する。一部の実施形態において、標的化部分は、細胞表面マーカー、例えば、腫瘍細胞表面マーカーに結合する抗体を含む。一部の実施形態において、標的化部分は、細胞表面マーカーに結合するリガンドを含む。一部の実施形態において、低分子リガンド、アプタマーまたはポリペプチドを使用することができる。例えば、葉酸塩は、葉酸受容体を発現する腫瘍へとGCS阻害剤を方向付けるための標的化部分として使用することができる。

【0204】

一部の態様において、変更されたGCS阻害剤および変更されたGCS阻害剤を作製する方法が提供される。一部の実施形態において、変更されたGCS阻害剤は、融合タンパク質として産生することができる。一部の実施形態において、変更されたGCS阻害剤は、少なくとも一部には、第2の部分を薬剤に共有結合により付着させることにより産生することができる。一部の実施形態において、GCS阻害剤および部分は、リンカーを使用して連結される。多種多様なリンカー、共有結合による付着に有用な反応性官能基、および様々な分子または他の実体を連結する方法は、当技術分野において公知のものであり、様々な実施形態において使用することができる。非限定的な例は、Hermanson, G., Bioc

onjugate Techniques、第2版、Academic Press(2008年)に見出すことができる。当業者であれば、適切なリンカーおよび方法を選択することができる。標的化されたGCS阻害剤を作製するために、いずれかの適したリンカーおよび/または方法を使用して、GCSを阻害する薬剤を標的化部分に連結することができる。例えば、二官能性リンカーを使用することができる。一部の実施形態において、リンカーは、細胞内酵素の開裂部位を含み、これにより、この酵素を含有する細胞内部において標的化部分からGCS阻害剤を放出させることができる。

【0205】

一部の実施形態において、方法のいずれかは、薬剤、例えば、リード薬剤または変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤を薬学的に許容される担体と共に製剤化することにより、組成物を産生するステップを含むことができる。一部の実施形態において、方法のいずれかは、1または複数用量の組成物を対象、任意選択で、腫瘍細胞または腫瘍を持つ対象に投与することにより、リードまたは変更された薬剤を*in vivo*で検査するステップ、1種または複数の薬物動態学的パラメータを評定するステップ、対象における薬剤の効果を評定する(例えば、有害効果をモニターする)ステップ、および/または対象におけるがん細胞の成長および/または生存における薬剤の効果を評定するステップを含むことができる。一部の実施形態において、方法のいずれかは、腫瘍モデルとして働く非ヒト動物に1または複数用量の組成物を投与することにより、腫瘍モデルにおいて*in vivo*でリードまたは変更された薬剤を検査するステップと、対象における腫瘍における薬剤の効果を評定するステップとを含むことができる。例えば、腫瘍サイズ、数、成長速度または転移は、例えば、上に記す通りに評価することができる。一部の実施形態において、試料またはデータは、用量または一連の用量の間のまたはその後の複数の時点で獲得することができる。一部の実施形態において、適したコンピュータプログラムをデータ解析のために使用して、例えば、1種または複数の薬物動態学的パラメータを計算することができる。特定の実施形態において、対象は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、非ヒト霊長類またはヒトである。変更された薬剤、例えば、変更されたリード薬剤は、いずれかの適した方法を使用して産生することができることを理解されよう。一部の実施形態において、薬剤または薬剤の合成経過で得られる中間体は、変更のための出発材料として使用することができる。一部の実施形態において、変更された薬剤は、いずれかの適した材料および/または合成経路を使用して合成することができる。

10

20

30

【0206】

一部の実施形態において、GCSまたはGCS構成成分を阻害する1種または複数の薬剤は、公知のGCS阻害剤またはGCS阻害剤のスクリーニングにおいて同定された1種もしくは複数のヒットに基づき同定、設計または産生することができる。例えば、公知のGCS阻害剤またはアッセイもしくはスクリーニングにおいてGCS阻害剤として同定された薬剤を変更して、例えば、上述の1種または複数の変更された特性を有する変更された薬剤を例えば産生することができる。

【0207】

一部の態様において、コンピュータ可読媒体が提供される。一部の実施形態において、コンピュータ可読媒体は、GCSまたはGCS構成成分を阻害する薬剤を同定するためのスクリーニングの少なくとも一部の結果を記憶する。結果は、データベースにおいて記憶させることができ、1種もしくは複数のスクリーニングプロトコル、スクリーニングから得られる結果、ヒット、リードもしくは変更されたリードの予測される特性またはヒット、リードもしくは変更されたリードの追加的な検査の結果を含むことができる。

40

【0208】

一部の実施形態において、無細胞または細胞ベースのアッセイにおいて、およそ1 mM、500 μM、100 μM、50 μM、10 μM、5 μMまたは1 μM以下の濃度で使用した場合、標的、例えば、GCSまたはGCS構成成分のレベルまたは活性の少なくとも50%の減少を引き起こすことができる薬剤は、同定、選択、設計、提供または使用に関してスクリーニングすることができる。一部の実施形態において、無細胞または細胞ベー

50

スのアッセイにおいてより低い濃度で、例えば、およそ500 nM以下、100 nM、50 nMまたは10 nM以下で使用した場合、標的、例えば、GCSまたはGCS構成成分のレベルまたは活性の少なくとも50%の減少（即ち、化合物の非存在下で予想される活性の50%以下となる減少）を引き起こすことができる薬剤を同定、選択、設計または使用することができる。一部の実施形態において、0.1~10 nMの間の濃度で使用した場合、標的、例えば、GCSまたはGCS構成成分のレベルまたは活性の少なくとも50%の減少を引き起こすことができる薬剤は、同定、選択、設計、提供または使用に関してスクリーニングすることができる。

【0209】

一部の実施形態において、薬剤、例えば、適した細胞培養系においておよそ1 mM、500 μM、100 μM、50 μM、10 μM、5 μMまたは1 μM以下の濃度で使用した場合、腫瘍細胞生存または増殖に少なくとも50%の減少（即ち、薬剤の非存在下で予想される生細胞数の50%以下となる減少）を引き起こすことができるGCS阻害剤は、同定、選択、設計、産生、提供または使用に関してスクリーニングすることができる。一部の実施形態において、薬剤、例えば、適した細胞培養系においてより低い濃度で、例えば、およそ500 nM、100 nM、50 nMまたは10 nM以下で使用した場合、腫瘍細胞生存または増殖に少なくとも50%の減少を引き起こすことができるGCS阻害剤は、同定、選択、設計、産生、提供または使用に関してスクリーニングすることができる。一部の実施形態において、薬剤、例えば、0.1~10 nMの間の濃度を使用して適した細胞培養系において使用した場合、腫瘍細胞生存または増殖に少なくとも50%の減少を引き起こすことができるGCS阻害剤は、同定、選択、設計、産生、提供または使用に関してスクリーニングすることができる。一部の実施形態において、少なくとも50%とは、50%~75%の間、75%~90%の間、90%~95%の間、95%~100%の間である。100%の減少は、バックグラウンドレベルまでの低下または基本的に生細胞なしもしくは細胞増殖なしとなり得る。

【0210】

一部の実施形態において、被験薬剤を腫瘍細胞（例えば、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞）と*ex vivo*で接触させ、続いて、腫瘍モデルとして働く被験動物にこの腫瘍細胞を導入することができる。被験薬剤が腫瘍発達、腫瘍サイズまたは腫瘍成長を阻害する能力が評価される。

【0211】

一部の実施形態において、被験薬剤は、腫瘍モデルとして働く被験動物に投与される。被験薬剤は、様々な実施形態において、経路またはレジメンにより投与することができる。例えば、被験薬剤は、腫瘍細胞の投与または腫瘍の発達の前に、それと同時に、および/またはその後投与することができる。被験薬剤は、検査期間の経過において1回または複数回、例えば、腫瘍細胞投与前または後に始めて、1日に1、2、3、4回以上、毎週、隔週または毎月投与することができる。一部の実施形態において、被験薬剤は、対象に連続的に投与される（例えば、静脈内に、またはインプラント、ポンプ、持続放出製剤等からの放出による）。投与される被験薬剤の用量は、薬剤の種類、被験動物の体重、投与の頻度等を含む複数の因子に依存し得る。投薬量の決定は、当業者にとってルーチンである。一部の実施形態において、用量は、0.01~200 mg/kg（例えば、0.1~20 mg/kgまたは1~10 mg/kg）である。一部の実施形態において、薬剤は、非ヒト対象、例えば、非ヒト哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギもしくはモルモット等の齧歯類；イヌ、ネコ、ウシまたはヒツジ、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザルまたはアカゲザル等、サル）に投与される。非ヒト動物を使用して、腫瘍形成、成長、進行（例えば、局所的浸潤、局部的または遠位転移）等における薬剤または薬剤の組合せの効果を評価することができる。一部の実施形態において、非ヒト動物は、薬剤または薬剤の組合せの有効性および/または毒性を評価するために使用される。当技術分野において公知の方法を、係る評価に使用することができる。

【0212】

10

20

30

40

50

ex vivoまたはin vivo腫瘍モデルにおいて評価され、腫瘍細胞生存もしくは増殖を阻害することまたは腫瘍の維持、成長、浸潤、転移、化学療法に対する抵抗性、再発を阻害することを示した、あるいは有用な抗腫瘍効果を他の仕方で示した候補抗腫瘍剤は、抗腫瘍剤と考慮することができる。抗腫瘍剤を、がんのための処置を必要とする対象の集団における臨床治験において検査して、その治療上の有用性を確認する、または有効性と相関する（例えば、有効性を予測する）対象の特徴もしくは腫瘍の特徴をさらに定義するまたは特に有効な薬剤、組合せ、用量等を同定することができる。

【0213】

一部の態様において、方法、アッセイまたはスクリーニングのいずれかの実施に適した物品、システムおよび組成物が提供される。一部の実施形態において、組成物は、GCS阻害剤と、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞とを含む。組成物は、細胞培養培地をさらに含むことができる。組成物は、薬剤、例えば、被験薬剤をさらに含むことができる。薬剤は、生理的に許容される物質またはその組合せとなり得る1種または複数の物質と組み合わせることができる。一般に、生理的に許容される物質は、使用した量において過度の細胞傷害性を引き起こすことなく、多くの種類の脊椎動物細胞、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞と接触させることができる。

10

【0214】

2種以上の値（例えば、測定値）もしくは群の間の差または2種以上の変数の間の関係性は、統計的に有意となり得る。例えば、参照または対照レベルと比較した、例えば、阻害のレベルまたは発現、活性、細胞増殖、細胞生存もしくは腫瘍サイズの低下は、統計的に有意となり得る。本明細書において、「統計的に有意」は、適切な統計検定を使用した0.05未満のp値を指すことができる。当業者であれば、所定の文脈における、例えば測定値における差、変数間の関係性等の統計的有意性を評価するための適切な統計検定およびモデルに気づくであろう。例示的な検定およびモデルとして、例えば、t検定、ANOVA、カイ二乗検定、ウィルコクソン順位和検定、対数順位検定、コックス比例ハザードモデル等が挙げられる。一部の実施形態において、複数の回帰分析を使用することができる。一部の実施形態において、p値は、0.025未満となり得る。一部の実施形態において、p値は、0.01未満となり得る。一部の実施形態において、両側性統計検定が使用される。一部の実施形態において、2種以上の値の間の結果または成績または差は、5%未満、2.5%未満または1%未満の偶然に起こる確率を有する場合、「統計的に有意」である。一部の実施形態において、2種以上の値の間の差または2種以上の変数の間の関係性は、0.05未満、0.025未満または0.01未満のp値で統計的に有意となり得る。一部の実施形態において、値は、異なる個体、異なる試料または異なる実験複製から得られる測定値セットから得られる平均値となり得る。SAS、GraphPad等、ソフトウェアパッケージを統計解析の実行に使用することができる。

20

30

【0215】

一部の実施形態において、GCS阻害に対する感受性をモジュレートする薬剤を同定する方法は、(a)スクリーニングまたはアッセイを実施して、SHMT2の発現または活性をモジュレート、例えば、増加させる薬剤を同定するステップを含む。一部の実施形態において、がんの処置のための候補薬剤を同定する方法は、(a)スクリーニングまたはアッセイを実施して、SHMT2の発現または活性をモジュレート、例えば、増加させる薬剤を同定するステップを含む。一部の実施形態において、方法は、(b)ステップ(a)において同定された薬剤を、例えば、GCS阻害剤と組み合わせ、腫瘍モデルにおいて検査するステップをさらに含む。様々な実施形態において、結合アッセイ、活性アッセイ、コンピュータ支援スクリーニングおよび/または本明細書に記載されている変更された薬剤を作製する方法を使用して、SHMT2発現または活性をモジュレートする薬剤を同定することができる。

40

【0216】

VII. 処置方法、システムおよびキット

【0217】

50

一部の態様において、本開示は、処置方法を提供する。一部の実施形態において、腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法は、腫瘍におけるGCSを阻害するステップを含む。一部の実施形態において、方法は、対象にGCS阻害剤を投与するステップを含む。一部の実施形態において、方法のいずれかは、腫瘍がGCS阻害剤に対し感受性となる見込みを予測するステップを含むことができる。例えば、一部の実施形態において、方法は、腫瘍が、SHMT2を過剰発現するかどうかを決定するステップを含み、腫瘍が、SHMT2を過剰発現する場合、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性である見込みが増加している。一部の実施形態において、方法は、腫瘍が、SHMT2を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップを含み、腫瘍が、SHMT2を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである場合、腫瘍は、GCS阻害剤に対し感受性である見込みが増加している。一部の実施形態において、方法は、(a)対象が、腫瘍のための処置を必要とすることを決定するステップと、(b)前記対象にGCS阻害剤を投与するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(a)対象が、SHMT2過剰発現腫瘍のための処置を必要とすることを決定するステップと、(b)前記対象にGCS阻害剤を投与するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(a)対象が腫瘍を有すると診断するステップと、(b)前記対象にGCS阻害剤を投与するステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(a)SHMT2過剰発現腫瘍を有すると対象を診断するステップと、(b)前記対象にGCS阻害剤を投与するステップとを含む。様々な実施形態において、GCS阻害剤は、本明細書に記載されている、当技術分野において公知の、あるいは本明細書に記載されている通りに同定または産生されたいかなるGCS阻害剤であってもよい。

10

20

【0218】

対象は、様々な実施形態において、いずれかの種類の腫瘍の処置を必要とし得る。一部の実施形態において、腫瘍のための処置を必要とする対象の用意は、腫瘍を有すると対象を診断することを含む。対象は、当技術分野において公知のいずれかの診断方法を使用して、がんを有すると診断することができる、あるいは、がんを有すると診断されていてよい。方法は、例えば、身体検査、イメージング(例えば、CTスキャン、MRI)、病理組織学的検査および/または生検もしくは外科的検体の分子解析あるいはこれらの組合せを含むことができる。例えば、DeVita、上記参照を参照されたい。一部の実施形態において、対象は、固形腫瘍を有する。一部の実施形態において、対象は、癌腫を有する。一部の実施形態において、対象は、肉腫を有する。一部の実施形態において、対象は、SHMT2を過剰発現する傾向を有する種類の腫瘍のための処置を必要とする。一部の実施形態において、対象は、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳がん、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫のための処置を必要とする。一部の実施形態において、腫瘍は、中枢神経系(CNS)腫瘍である。一部の実施形態において、CNS腫瘍は、脳腫瘍である。一部の実施形態において、CNS腫瘍は、神経膠腫である。一部の実施形態において、神経膠腫は、星状細胞神経膠腫、例えば、未分化星状細胞腫(世界保健機関グレードIII)または神経膠芽腫(世界保健機関グレードIV)である。一部の実施形態において、対象は、ヒトである。一部の実施形態において、対象は、非ヒト動物である。一部の実施形態において、対象における腫瘍を処置する方法は、有効量のGCS阻害剤を、それを必要とする対象に投与するステップを含む。一部の実施形態において、腫瘍は、SHMT2を過剰発現する。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、臨床寛解における対象の処置に有用である。一部の実施形態において、対象は、外科手術により処置されたことがあり、限定された切除不能(unresected)疾患を有することができる。

30

40

【0219】

一部の実施形態において、対象は、がんのリスクまたはがん再発のリスクがある。がんのリスクがある対象は、例えば、がんであると診断されたことがないが、がん発症のリスクが増加した対象となり得る。がんのリスクが増加した対象は、例えば、がんであると診断されたことがないが、年齢、性別等、1種または複数の人口統計学的特徴に関してマッ

50

チし得る対照と比較して、がん発症のリスクが増加した対象となり得る。例えば、対象は、様々な実施形態において、同齢対照（例えば、同性の）の少なくとも1.2、1.5、2、3、5、10倍以上のリスクを有し得る。「同齢」は、対象と同じ年齢または対象と同じ年齢範囲（例えば、5または10歳の範囲）内を指すことができることを理解されよう。例えば、対照は、対象よりも最大5歳年上または年下となり得る。対象が、がんの「リスクが増加した」と考慮されるかどうかを決定することは、通常の技能を有する医師の技能範囲内である。いずれかの適した検査（複数可）および/または判断基準を使用することができる。例えば、次のうちいずれか1種または複数が適用される場合、対象は、がん発症の「リスクが増加した」と考慮することができる。（i）対象が、突然変異または遺伝的多型を持たない一般集団の他のメンバーと比べた、がんを発症するまたはこれを有するリスクの増加に関連する遺伝的突然変異または遺伝的多型を有する（例えば、特定のTSGにおける遺伝的突然変異は、がんリスク増加に関連することが公知である）；（ii）対象が、一般集団と比べたがんを発症するまたはこれを有するリスクの増加に関連する、遺伝子もしくはタンパク質発現プロファイルを有するおよび/または対象から得られる試料（例えば、血液）における特定の物質（複数可）の存在；（iii）対象が、がんの家族歴、腫瘍促進剤または発癌性物質（例えば、紫外線または電離放射等、物理学的発癌性物質；アスベスト、タバコまたは煙構成成分、アフラトキシン、ヒ素等、化学的発癌性物質；特定のウイルスまたは寄生生物等、生物学的発癌性物質）への曝露等、1種または複数のリスク因子を有する；（iv）対象が、規定の年齢を超えている、例えば、60歳を超えている。がんを有すると疑われる対象は、がんの1種または複数の症状を有する、あるいはがん存在の可能性を示唆するまたはこれと一貫した診断手順を受けた対象となり得る。がん再発のリスクがある対象は、がんを処置されたことがあり、例えば、適切な方法により評価してがんがないと思われる対象となり得る。

10

20

【0220】

候補抗腫瘍剤および抗腫瘍剤、例えば、GCS阻害剤を、組成物、例えば、医薬組成物に取り込むことができる。活性薬剤（複数可）、例えば、抗腫瘍剤に加えて、医薬組成物は、典型的に、1種または複数の薬学的に許容される担体を含む。一部の態様において、GCS阻害剤および薬学的に許容される担体を含む組成物が提供される。一般に、GCS阻害剤は、上述のまたは上述の通りに同定されたGCS阻害剤のいずれかとなり得る。様々な実施形態において、GCS阻害剤およびいずれかの薬学的に許容される担体（複数可）を含む医薬組成物が提供される。様々な実施形態において、2種以上のGCS阻害剤およびいずれかの薬学的に許容される担体（複数可）を含む医薬組成物が提供される。一部の実施形態において、組成物は、第1および第2のGCS阻害剤を含み、第1および第2のGCS阻害剤は、異なるGCS構成成分を阻害する。特定の実施形態は、いずれかの薬学的に許容される担体（複数可）と共に、上述のまたは本明細書に記載されている通りに同定された2種以上のGCS阻害剤の各組合せを含む組成物を対象とする。一部の実施形態において、GCS阻害剤の少なくとも1種は、GLDCを阻害する。一部の実施形態において、GCS阻害剤の少なくとも1種は、GCSHを阻害する。一部の実施形態において、GCS阻害剤の少なくとも1種は、システアミンまたはシステアミンの塩もしくはプロドラッグを含む。

30

40

【0221】

本明細書において使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、ヒトまたは非ヒト動物への医薬品投与と適合性のビヒクル、希釈剤、溶媒、フィラー、分散媒、賦形剤、カプセル封入物質、コーティングおよび他の物質を包含する。一部の実施形態において、薬学的に許容される担体は、組成物の活性成分の生物活性に有意に干渉しない無毒性材料（少なくとも、使用される量および典型的な対象においては）である。医薬組成物の文脈における用語「適合性」は、医薬組成物の成分が、例えば通常使用条件下で、医薬組成物の有効性を実質的に低下させ得る、あるいはこれを投与に不適なものとする相互作用が存在しないような様式で活性薬剤と混ぜてよく、また互いに混ぜてよいことを意味する。

【0222】

50

様々な実施形態において、補足的活性薬剤を組成物に取り込むことができる。一部の実施形態において、補足的活性薬剤は、抗腫瘍剤（例えば、上述の）である。一部の実施形態において、補足的活性薬剤は、これと共に投与されるGCS阻害剤の有効性を増強するまたは毒性を低下させるまたはGCS阻害剤の副作用を処置する。

【0223】

薬学的に許容される担体（複数可）の選択は、例えば、少なくとも一部には、活性薬剤の性質、例えば、溶解度または安定性等の特性；適合性（物質が、通常の使用状況下で医薬組成物の有効性を実質的に低下し得る様式で相互作用することなく、組成物において共に存在し得ることを意味する）；投薬形式（例えば、錠剤、注射用の液体等）；および/または組成物の投与経路に依存し得る。

10

【0224】

一般に、医薬組成物は、その意図される投与経路に適するように製剤化することができる。例示的な投与経路として、例えば、静脈内、動脈内、骨内（intraosseus）、呼吸（例えば、吸引による）、くも膜下腔内、大槽内、鼻腔内、腹腔内、経口または胃腸管（例えば、胃または小腸）への他の導入手段、舌下、頬側、皮下、筋肉内、皮内、眼内、滑膜内（intrasynovial）、膀胱内、経皮、皮膚性（皮膚上に）（「外用」とも呼ばれる）、腔内または直腸投与が挙げられる。

【0225】

医薬組成物は、様々な実施形態において、例えば、液体、ジェル、ローション、錠剤、丸剤、カプセル、スプレー、エアロゾル、軟膏、経皮パッチ、坐薬、インプラント等の形態となり得る。経口投与のため、薬剤は、錠剤、丸剤、糖衣錠（dragee）、カプセル、液体、ジェル、シロップ、スラリー、懸濁液等として、薬学的に許容される担体と共に製剤化することができる。注射または他の非経口的投与方法に適した薬学的に許容される担体は、例えば、ヒトまたは非ヒト対象への投与に適した、水（例えば、注射用の水）、5%デキストロース、リンゲルのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル、生理緩衝食塩水（例えば、塩化ナトリウム溶液）、アルコール性/水性溶液、エマルションもしくは懸濁液等、水性溶液；またはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油等の植物油および注射用有機エステル等、非水性溶媒もしくはビヒクルを含むことができる。一部の実施形態において、医薬組成物、例えば、非経口的使用、例えば、注射に意図される医薬組成物は無菌である。一部の実施形態において、薬学的に許容される担体または組成物は無菌である。無菌溶液は、例えば、適切な溶媒において要求される量の活性薬剤（複数可）を、任意選択で上に記す成分の1種または組合せと共に取り込み、続いて、フィルター滅菌することにより調製することができる。一般に、分散は、基礎分散媒および上に列挙されている成分由来の要求される他の成分を含有する無菌ビヒクルに活性化化合物を取り込むことにより調製することができる。無菌注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製方法は、以前に滅菌濾過したその溶液から活性成分プラスいずれかの追加的な所望の成分（複数可）の粉末を生じる、真空乾燥またはフリーズドライ（凍結乾燥）を含むことができる。

20

30

【0226】

医薬組成物は、活性薬剤に加えて、例えば、増量剤、フィラー、可溶化剤、安定剤、界面活性剤、浸透圧性薬剤、保存料、抗菌剤、キレート化剤、バッファー、崩壊剤、吸収賦活薬、流動性賦活薬等として作用する1種または複数の生理的に許容される薬剤を含むことができる。医薬品投与と適合性の生理的に許容される化合物は、例えば、グルコース、スクロース、ラクトース等、炭水化物；デキストラン；マンニトール等、ポリオール；アスコルビン酸またはグルタチオン等、抗酸化剤を含む。数多くの薬学的に許容される担体および剤形を調製する方法は、当技術分野において公知のものである。薬学的に許容される担体および医薬組成物を調製する方法の追加的な記述のため、例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、E. W. Martin、第19版、1995年、Mack Publishing Co.；ペンシルベニア州イーストン、およびRemington: The Science and Practice of Pharmacy.第21版、ペンシルベニア州フィラデルフィア、Lippincott Willi

40

50

ams & Wilkins、2005年等、そのより最新の版またはバージョンを参照されたい。多くの薬学的に許容される担体が、種々の異なる種類の医薬組成物における使用に適していること、および/または種々の投与経路のいずれかと適合性であること、また、本明細書における記述が限定を目的とするものと考慮するべきではないことを理解されたい。一部の実施形態において、GCS阻害剤を含む医薬組成物を作製する方法は、例えば、GCS阻害剤を1種または複数の薬学的に許容される担体と組み合わせるステップと、対象への投与に適した剤形を調製するステップとを含むことができる。一部の実施形態において、活性薬剤、例えば、GCS阻害剤の調製物は、医薬組成物において使用する場合、少なくとも90%純粋、例えば、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%以上純粋である。一部の実施形態において、医薬組成物は、製造管理および品質管理に関する基準 (good manufacturing practice) (GMP) に一貫して製造することができる。一部の実施形態において、医薬組成物における少なくとも一部の、大部分のまたは全ての薬学的に許容される担体および他の成分は、適用できる場合、医薬品グレード (USP) である。

10

【0227】

薬剤、例えば、GCS阻害剤の用量は、いずれかの適切な単位を使用して、例えば、総量 (例えば、ミリグラム (mg))、量/体重 (例えば、mg/kg)、量/表面積 (例えば、mg/m²) 等として表すことができる。本明細書に記載されている薬剤の用量は、様々な実施形態において、例えば、約0.1 μg ~ 10,000 mg、例えば、約1 μg ~ 5,000 mg、例えば、約10 μg ~ 1000 mgを、1日、1週間、1ヶ月または他の時間間隔に1回または複数回に及び得る。対象の体重の観点から述べると、特定の実施形態における用量は、1日当たり体重1 kg当たり約0.0001 mg ~ 約100 mgの薬剤、例えば、体重1 kg当たり0.001 mg ~ 50 mgの薬剤、例えば、体重1 kg当たり0.01 mg ~ 10 mgの薬剤に及び得る。しかし、より低いまたはより高い用量を使用してもよい。特定の実施形態において、用量は、表面積の観点から表され、例えば、約1 mg/m² ~ 約5,000 mg/m²の間とされる。当業者であれば、様々な活性薬剤の間から選ぶことができ、効力、バイオアベイラビリティ、投与のモード、薬剤 (複数可) の活性、投与の経路、投与の時間、用いられている薬剤の排泄または代謝の速度、処置の持続時間、典型的なまたは予想される有害副作用 (あるとすれば) の重症度、他の薬剤および/または薬剤と組み合わせて使用される材料、処置されている患者の年齢、性別、体重、体調、全体的な健康および以前の病歴ならびに実質的なまたは許容できない毒性を回避しつつ有効な予防的または治療的処置レジメンを選択する目標による医学技術分野において周知の同様の因子等、因子を考慮することができる。

20

30

【0228】

様々な実施形態において、GCS阻害剤は、最大耐用量もしくは治療量以下の用量またはその間のいずれかの用量、例えば、治療効果の達成に有効な最低用量で使用することができる。最大耐用量 (MTD) は、許容できない毒性なしで投与することのできる薬理的または放射線学的処置の最高用量、即ち、健全な医学的判断に従って許容されるリスク/利益比を有する最高用量を指す。一般に、通常技能の医者は、健全な医学的判断に従って合理的なリスク/利益比を有する用量を選択することができる。MTDは、例えば、臨床試験における対象の集団において確立することができる。特定の実施形態において、薬剤は、MTDよりも低い量で投与される、例えば、薬剤は、MTDの約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%の量で投与される。

40

【0229】

一部の実施形態において、薬剤または医薬組成物は、1ヶ月または数ヶ月、1ヶ月~1年間の間、1年間または数年間以上の反復的投与等、延長した期間において対象に提供される。一部の実施形態において、処置は、対象の生涯にわたる薬剤または医薬組成物の反復的な投与に關与する。一部の実施形態において、処置は、定期投与、例えば、1日に1回もしくは複数回、1週間に1回もしくは複数回または1ヶ月に1回もしくは複数回に關与する。一部の実施形態において、有効一日用量は、1日中適切な間隔で間をおいて、任

50

意選択で単位剤形において投与された2、3、4、5、6回以上の用量下(sub-dose)として投与することができる。例示的な用量は、*in vitro*試験を使用して選択し、当技術分野における標準として、動物モデルおよび/または臨床試験において検査することができる。当業者であれば、必要以上に実験することなく特定の薬剤(例えば、GCS阻害剤)の有効量を決定することができる。

【0230】

一部の実施形態において、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物は、併用療法において使用することができる、即ち、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物は、1種または複数の他の所望の治療法または手順と同時発生的に、その前にまたはその後投与することができる。併用レジメンにおいて用いるための治療法(治療法または手順)の特定の組合せは、一般に、所望の治療法および/または手順と達成される所望の治療効果との適合性を考慮に入れるであろう。用いた治療法が、同じ障害の所望の効果を達成することができる(例えば、GCS阻害剤は、別の抗がん剤と同時発生的に投与することができる)、あるいは異なる効果を達成することができる(例えば、いずれかの有害効果の制御)ことも認められよう。例えば、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物と組み合わせて使用することのできる他の治療法または抗がん剤として、例えば、腫瘍のための処置を必要とする対象の処置に有用な、他の抗がん剤、例えば、化学療法薬、外科手術、放射線療法(例えば、線照射、中性子ビーム放射線療法、電子ビーム放射線療法、プロトン療法、密封小線源治療および全身性放射性同位元素)、内分泌療法、生物学的応答修飾因子(例えば、インターフェロン、インターロイキン)、温熱療法、寒冷療法、有害効果を弱毒化するための薬剤またはこれらの組合せが挙げられる。組み合わせて使用した薬剤は、様々な実施形態において、同じ組成物においてまたは別々に投与することができる。これらが別々に投与される場合、2種以上の薬剤を同時にまたは逐次的に(任意の順序で)与えることができる。別々に投与される場合、薬剤の投与間の時間間隔は変動し得る。一部の実施形態において、第1および第2の薬剤の投与は、(i)第2の薬剤の用量が、直前に投与された第1の薬剤の用量の90%超が、不活性型に代謝されるまたは身体から排泄される前に投与される、あるいは(ii)第1および第2の薬剤の用量が、互いに8週間以内(例えば、互いに1、2、4もしくは7日間以内または2、3、4、5、6、7もしくは8週間以内)に少なくとも1回投与される、(iii)治療法が、重複した期間中に投与される(例えば、連続的または間欠的インフュージョンにより)、あるいは(iv)前述のいずれかの組合せとなるように行われる。一部の実施形態において、薬剤は、実質的に同じ時間(例えば、互いに1、2、5または10分間未満以内)に個々に投与することができる。一部の実施形態において、薬剤は、3時間未満、例えば、1時間未満以内に個々に投与することができる。一部の実施形態において、薬剤は、同じ投与経路により投与することができる。一部の実施形態において、薬剤は、異なる投与経路により投与することができる。

【0231】

「レジメン」または「処置プロトコール」は、1種または複数の薬剤(複数可)、用量レベル(複数可)と共に、任意選択で、投薬間隔、投与経路、ボラス投与またはインフュージョンの速度および持続時間、放射線照射を投与するための適切なパラメータ等の治療法が対象に投与される様式を説明する他の態様(複数可)の選択を指す。多くのがん化学療法レジメンは、異なる細胞傷害性もしくは細胞増殖抑制性機序を有する、および/または異なる用量制限有害効果を典型的にもたらす薬物の組合せを含む。例えば、DNAに作用する薬剤(例えば、アルキル化剤)および抗微小管剤は、多くの化学療法レジメンに見られる一般的な組合せである。

【0232】

本明細書における目的のため、臨床試験において検査されたレジメン、例えば、安全性の観点から許容されることを示し、一部の実施形態において、有効性の少なくともいくつかの証拠を示すレジメンは、「標準レジメン」と称され、係るレジメンにおいて使用される薬剤は、「標準化学療法剤」と称され得る。一部の実施形態において、標準レジメンま

10

20

30

40

50

たは標準化学療法剤は、腫瘍学における臨床業務において使用されるレジメンまたは化学療法剤である。一部の実施形態において、標準レジメンにおいて使用される医薬品剤は、全て認可された薬物である。標準レジメンの例に関して、例えば、DeVita、上記参照を参照されたい。

【0233】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、標準レジメンに加えられる、あるいは標準レジメンにおいて典型的に使用される薬剤の1種または複数に置き換わる。係る併用療法が本明細書に提供される。使用することのできるがん化学療法剤の非限定的な例として、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミドおよびメルファラン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ホテムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン）等、アルキル化およびアルキル化様剤；白金剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、BBR3464、サトラプラチン等、アルキル化様剤）、プスルファン、ダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロミド、チオTEPA、トレオスルファンおよびウラムスチン（uramustine）；葉酸（例えば、アミノプテリン、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド）等、抗代謝剤；クラドリピン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン等、プリン；カペシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、フロクスウリジン、ゲムシタピン等、ピリミジン；タキサン（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル）、ビンカ（例えば、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビンデシンおよびビンレルピン）、エポチロン等、紡錘体毒/有糸分裂阻害剤；アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、ピクサントロンおよびバルルビシン）、Streptomyce属の様々な種によって天然に産生される化合物（例えば、アクチノマイシン、プレオマイシン、マイトマイシン、プリカマイシン）およびヒドロキシウレア等、細胞傷害性/抗腫瘍抗生物質；カンプトテカ（例えば、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン）およびポドフィルム（例えば、エトポシド、テニポシド）等、トポイソメラーゼ阻害剤；抗受容体チロシンキナーゼ（例えば、セツキシマブ、パニツムマブ、トラスツズマブ）、抗CD20（例えば、リツキシマブおよびトシツモマブ）およびその他、例えば、アレムツズマブ、アエバシズマブ（aevacizumab）、ゲムツズマブ等、がん療法のためのモノクローナル抗体；アミノレプリン酸、メチルアミノレプリネート、ポルフィマーナトリウムおよびベルテポルフィン等、光感受性物質；チロシンおよび/またはセリン/スレオニンキナーゼ阻害剤、例えば、Abl、Kit、インスリン受容体ファミリーメンバー（複数可）、VEGF受容体ファミリーメンバー（複数可）、EGF受容体ファミリーメンバー（複数可）、PDGF受容体ファミリーメンバー（複数可）、FGF受容体ファミリーメンバー（複数可）、mTOR、Rafキナーゼファミリー、PI3キナーゼ等のホスファチジルイノシトール（PI）キナーゼ、PIキナーゼ様キナーゼファミリーメンバー、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）ファミリーメンバー、オーロラキナーゼファミリーメンバーの阻害剤（例えば、セジラニブ、クリゾチニブ、ダサチニブ、エルロチニブ、ゲフィチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、バンデタニブ等、市場に出回っている、あるいは腫瘍における少なくとも1種の第III相試験における有効性を示したキナーゼ阻害剤）、増殖因子受容体アンタゴニストおよびレチノイド（例えば、アリトレチノインおよびトレチノイン）等のその他、アルトレタミン、アムサクリン、アナグレリド、亜ヒ酸、アスパラギナーゼ（例えば、ペグアスパラガーゼ（pegasparagase））、ベキサロテン、ボルテゾミブ、デニロイキンジフチトクス、エストラムスチン、イクサベピロン、マソプロコール、ミトタンおよびテストラクトン、Hsp90阻害剤、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）、血管新生阻害剤、例えば、ベバシズマブ（Avasitin）もしくはVEGF受容体アンタゴニスト等の抗血管内皮増殖因子剤、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、様々なアポトーシス促進性薬剤（例えば、アポトーシス誘導因子）、Ras阻害剤、抗炎症剤、がんワクチンまたは他の免疫調節性治療法等が挙げられる。先の分類が非限定的であることを理解されよう。多数の抗腫瘍剤が、複数

10

20

30

40

50

の活性または作用機序を有し、複数のカテゴリまたはクラスに分類することができる、あるいは追加的な作用機序または標的を有する。

【0234】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、ミトコンドリアにまたはその中で作用する薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0235】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、1種または複数の標準化学療法剤またはレジメンに対し実証された抵抗性を有する腫瘍のための処置を必要とする対象に投与することができる。

【0236】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、S H M T 2 発現または活性を増加させる薬剤と組み合わせて投与することができる。

【0237】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、脳腫瘍の処置に有用であると当技術分野において認可または許容される1種または複数の化合物と組み合わせて、脳腫瘍、例えば、GBMのための処置を必要とする対象に投与される。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、テモゾロミド、カンナビノイド、抗血管新生剤（例えば、セジラニブまたはベバシズマブ等、VEGFR阻害剤）、ペリリルアルコール（POH）（Ras阻害剤）およびHedgehog-Gliシグナル伝達阻害剤、例えば、GDC-0449等のHedgehog阻害剤からなる群から選択される化合物と組み合わせて、脳腫瘍のための処置を必要とする対象に投与される。

【0238】

薬剤が組み合わせて投与される場合、一部の実施形態において、がんを有するまたはその発症リスクがある対象の処置において、各薬剤の治療的投薬量、2種以上の薬剤の治療量以下の投薬量またはそれぞれの治療量以下の投薬量を使用することができる。「治療量以下の用量」は、本明細書において、少なくとも1種の他の薬剤の非存在で投与される場合、対象において治療的結果を産生するまたはその産生に十分であると通常考慮される投薬量に満たない投薬量を指す。

【0239】

一部の実施形態において、標準または実験的な化学療法剤またはレジメンと組み合わせたGCS阻害剤の投与は、標準または実験的な化学療法剤またはレジメンと比べて、1種または複数の腫瘍型における増強された有効性をもたらし得る。

【0240】

一部の実施形態において、GCS阻害剤または薬剤の組合せは、例えば、投与および投薬量の均一性を容易にするため、単位剤形で製剤化される。用語「単位剤形」は、本明細書において使用される場合、処置される対象に適切な薬剤（複数可）の物理的に別々の単位を指す。例えば、単位剤形は、経口投与のための丸剤、錠剤もしくは他の別々の剤形または単一の投与に適切な液体組成物の量を含む予め充填されたシリンジもしくはアンブルもしくは他の容器等となり得る。

【0241】

一般に、GCS阻害剤および任意選択で1種または複数の他の活性薬剤を含む医薬組成物において用いられる薬学的に許容される担体（複数可）は、投薬量関係性に実用的サイズをもたらすのに十分な濃度で典型的に使用される。薬学的に許容される担体（複数可）は、特定の実施形態において、全体で、例えば、医薬組成物の約50重量%～約99.99999重量%、例えば、約80%～約99.99%、例えば、約90%～約99.95%、約95%～約99.9%または約98%～約99%を含むことができる。

【0242】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、がん細胞が存在するもしくは存在し得るまたは腫瘍を発症するリスクが増加した組織または臓器へと局所的に投与することができる。一部の実施形態において、例えば、組織もしくは臓器へのもしくはそこにごく接近した

10

20

30

40

50

、または該組織もしくは臓器に直接的に供給するもしくはこれを横切る血管への直接注射により、あるいは組織または臓器内にまたはそこにごく接近して持続放出インプラントを植え込むことにより、あるいは組織または臓器へとまたはそこにごく接近して組成物を送達するためのポンプまたは他の薬物送達デバイスを使用することにより、局所的投与が達成される。一部の実施形態において、腫瘍を含有する全身性循環の部分が循環の残り部分から一時的に単離される、局部灌流を使用することができる。一部の実施形態において、薬剤は、腫瘍が除去された後の、あるいは腫瘍が除去された後の部位と流体連絡している体腔または間隙に投与される。体腔または間隙は、例えば、腹膜腔、くも膜下腔内間隙または膀胱となり得る。一部の実施形態において、薬剤は、腫瘍へとまたはそこにごく接近して直接的に投与される。一部の実施形態において、薬剤は、例えば、腫瘍を含有するまたは腫瘍が除去された後の組織もしくは臓器または体腔もしくは間隙へと、外科手術の際に局所的に投与される。本明細書において使用される場合、「ごく接近して」は典型的に、25 cm以内、例えば、20 cm以内、例えば、10 cm以内、例えば、5 cm以内を指す。一部の実施形態において、投与は、自己投与または指導 (directing) 投与となり得る。

10

【0243】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、ウイルスベクターを使用して投与される。例えば、対象への投与に適したRNAiベクターを使用することができる。一部の実施形態において、ベクターは、腫瘍細胞に対し指向性を有する。

【0244】

持続放出インプラントは、いずれかの適した部位に植え込むことができる。一部の実施形態において、持続放出インプラントを使用して、がん再発の発症リスクがある対象を処置することができる。一部の実施形態において、持続放出インプラントは、少なくとも14日間、例えば、少なくとも30日間、例えば、少なくとも60日間、例えば、最大3ヶ月、6ヶ月以上、治療上有用なレベルの活性薬剤を送達することができる。

20

【0245】

一部の実施形態において、吸入された組成物は、例えば、肺がん患者における肺への局所的送達の達成に役立つものとなり得る。数種類の定量吸入器が、吸引による投与のために定期的に使用される。このような種類のデバイスは、定量吸入器 (MDI)、呼気駆動式MDI、ドライパウダー吸入器 (DPI)、MDIと組み合わせたスパーサ/保持チャンバおよびネブライザーを含む。一部の実施形態において、吸入された組成物は、全身性送達に使用することができ、この場合、薬剤は、呼吸上皮を通して吸収され、循環器系に進入し、血液中に輸送されて、これにより、身体内の1種または複数の部位、例えば、腫瘍または腫瘍細胞を持つまたはこれを持ち得る1種または複数の部位に達することができる。

30

【0246】

一部の実施形態において、例えば、鼻腔内腫瘍の処置のために、鼻腔内組成物 (例えば、点鼻薬または粉末) を使用することができる。一部の実施形態において、鼻腔内組成物は、中枢神経系 (例えば、脳) への局所的送達のために使用して、例えば、脳腫瘍のための処置を必要とする対象を処置することができる。一部の実施形態において、鼻腔内組成物は、全身性送達のために使用することができ、この場合、薬剤は、鼻粘膜を通して吸収され、循環器系に進入し、血液中に輸送されて、これにより、身体内の1種または複数の部位、例えば、腫瘍または腫瘍細胞を持つまたはこれを持ち得る1種または複数の部位に達することができる。

40

【0247】

一部の実施形態において、脳腫瘍または脳への転移の処置のために、浸透圧性血液脳関門 (BBB) 破壊を使用して、脳への治療剤の送達を増強することができる。浸透圧性BBB破壊は典型的に、動脈内カテーテルの設置および脳に供給する動脈への25%マンニトール等、高浸透圧性溶液のインフュージョン、続いて治療剤のインフュージョンに関与する。

50

【0248】

一部の実施形態において、投与 (administration) のために内部 (植え込み式) または外部 (体外) ポンプを使用することができる。係るポンプは典型的に、カテーテルを介してそこから標的組織またはその近傍への連続的または間欠的な放出が行われる薬物リザーバを含む。特定の実施形態において、植え込み式ポンプと、ポンプにカップリングした近位端、および脊柱管等の身体内の臓器または組織または間隙における選択されたインフュージョン部位へと治療的投薬量の薬剤をインフュージョンするための発射部分を有するカテーテルとが使用される。ポンプは、所定の (predetermined) 時間間隔で所定の量の薬剤を放出するようプログラムすることができる。脳実質への薬剤の送達のため、発射部分が脳実質に置かれるように、ポンプに装着されたカテーテルを植え込むことができる。米国特許第 6, 263, 237 号明細書は、例示的なポンプおよびカテーテルシステムならびにこれらを対象の身体内に植え込み、脳における所望の位置へと薬剤の投与を方向付けるための方法について記載する。一部の実施形態において、対流強化送達 (CED) が使用されて、例えば脳における選択された位置に薬剤を送達する。CED は、加えられた外圧勾配を利用して、脳または腫瘍等、標的組織へと流体対流を誘導する。流体リザーバによる流れにおける制御された圧力源は、定圧における操作を確実にする。流体は典型的に、例えば、最大約 70 mmHg の圧力でポンプを使用して小型のカテーテルを介して投与されて、対流を駆動する。挿入方向に垂直な軸に沿って出口を有する微細加工シリコンプローブを使用して、送達を改善することができる。例えば、Sawyer, AJ, New methods for direct delivery of chemotherapy for treating brain tumors, Yale J Biol Med. (2006年) 79巻 (3~4号): 141~52頁およびその参考文献を参照されたい。米国特許出願公開第 20040215173 号明細書は、対流強化送達による組織および/または腫瘍への薬剤の投与に使用することのできる例示的な器具について記載する。

【0249】

一部の実施形態において、薬剤は、中枢神経系の CSF 含有房の 1 個または複数、例えば、脳室または大槽のいずれか 1 個または複数に送達される (脳内には 2 個の側脳室ならびに正中第 3 および第 4 脳室が存在する)。インフュージョンポンプを使用して脳室または大槽 (cisterna magna) に薬剤を送達するため、それぞれ脳室または大槽 (cisterna magna) に発射部分が置かれるように、カテーテルを植え込むことができる。薬剤は典型的に、少なくとも一部には、脳室または大槽 (cisterna magna) から拡散する。よって、これらの位置への送達は、これを特異的部位へとより緊密に局在化するのではなく、脳の相対的に広い区域への薬剤の送達を可能にするが、当然ながら、係る方法は、脳室または大槽 (cisterna magna) の腫瘍 (例えば、脳室上皮腫瘍) のために使用することができる。特定の実施形態において、CSF 含有間隙への送達は、先端が間隙に接近するように、頭蓋を通してカテーテルを外科的に植え込むことにより達成される。次に、カテーテルの他端は、頭皮の真下 (皮下) に置かれたリザーバ (例えば、オンマヤ (Ommaya) リザーバ) に接続される。

【0250】

一部の実施形態において、GCS 阻害剤は、インプラントにおいて脳へと直接的に投与される。例えば、GCS 阻害剤は、例えば、脳腫瘍が切除される際に形成された外科的空洞に置かれる、植え込み式生分解性ポリマーインプラントへと取り込ませることができる。カルムスチンを投与するために使用される GLIADEL (登録商標) Waf er は、係るインプラントの一例であり、20:80 モル比のポリ [ビス (p-カルボキシフェノキシ) プロパン:セバシン酸からなるポリ酸無水物コポリマーポリフェプロザン (polifeprosan) 20 が生分解性ポリマーとして使用されている。ポリエチレン-co-ビニルアセテート (EVAc) 等、実質的に非生分解性ポリマーを使用してインプラントを産生することができる。これは、治療剤の放出が選択されたレベル (例えば、治療上有効レベル) を下回った後に除去することができる。

【0251】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、活性薬剤（例えば、GCS阻害剤）は、塩として存在する。薬において使用される場合、塩は、薬学的に許容されている必要があるが、薬学的に許容されない塩を簡便に使用して、その薬学的に許容される塩を調製することもできるため、これも排除されない。薬学的に許容される塩として、次の酸：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、クエン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸その他から調製される塩が挙げられるがこれらに限定されない。また、薬学的に許容される塩は、ナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩等、アルカリ金属またはアルカリ土類塩として調製することができる。薬学的に許容されるプロドラッグとして薬剤を用意することができることも理解されよう。一部の実施形態において、活性代謝物を使用することができる。さらに、例えば、上述の標的化リガンド、その取込みを増加させる部分、その生物学的半減期を増加させる部分（例えば、ペグ化）等により薬剤を修飾してよいことを認められよう。

10

【0252】

一部の実施形態において、GCS阻害剤は、胃腸管において持続および/または遅延放出をもたらす調製物において投与される。例えば、コーティングされた経口剤形を使用して、持続および/または遅延放出もたらしことができ、この剤形では、コーティングが、少なくとも一部には、活性薬剤を含有するコアを取り囲み、活性薬剤が放出される消化器系における位置を制御する。一部の実施形態において、腸溶コーティングを含む経口剤形が使用され、この剤形では、腸溶コーティングは、胃の中では実質的に無傷のまま維持されるが、小腸に達すると溶解し薬物を放出する。腸溶コーティングの非限定的な例に関して、例えば、国際出願PCT/US2007/002325号明細書（国際公開第2007/089670号パンフレットとして公表されるEnterically coated cystamine, cysteamine and derivatives thereof）を参照されたい。一部の実施形態において、腸溶コーティングを含む剤形を使用して、例えば、システアミン、システアミンの塩、システアミンの誘導体または他のGCS阻害剤を投与することができる。一部の実施形態において、腸溶コーティングは、胃環境から活性薬剤を保護する、プロドラッグから活性薬剤への変換を促進する、あるいは化合物の吸収を促進することができる。

20

【0253】

一部の実施形態において、薬剤、例えば、GCS阻害剤は、粒子と物理学的に会合している。一部の実施形態において、粒子は、マイクロ粒子またはナノ粒子またはリポソームを含む。用語「マイクロ粒子」は、マイクロカプセル、マイクロスフェア、マイクロキャリアおよび同様の用語と互換的に使用することができる。用語「ナノ粒子」は、ナノカプセル、ナノスフェア、ナノキャリアおよび同様の用語と互換的に使用することができる。一部の実施形態において、薬剤は、ステント、シャントまたはカテーテル等、医療用デバイスと物理学的に会合している。例えば、薬剤は、係るデバイスのコーティングと会合してよい。一部の実施形態において、薬剤は、一部の実施形態においてはハイドロゲルであってよいゲルと物理学的に会合している。一部の実施形態において、薬剤は、フィルムと物理学的に会合している。一部の実施形態において、物理学的会合は、非共有結合的な会合である。例えば、薬剤は、マトリックスにより取り込ませるまたはカプセル封入することができる。一部の実施形態において、物理学的会合は、共有結合を含む。例えば、薬剤は、粒子または医療用デバイスのコーティングに共有結合により付着してよい。一部の実施形態において、活性薬剤は、少なくとも一部には、マトリックスからの拡散またはマトリックスの少なくとも部分の崩壊の結果、放出され得る。一部の実施形態において、マトリックスは、薬剤に対し少なくとも幾分は透過性となり得る。崩壊は、物理的力、化学的分解（例えば、自発的加水分解、酵素による開裂）等によって起こり得る。マトリックスは、経時的に瓦解または溶解し得る、あるいは低密度となり得る。

30

40

【0254】

一部の実施形態において、粒子、ゲル、フィルムまたはコーティングは、生体適合性ポリマーを含む。一部の実施形態において、生体適合性ポリマーは、生分解性である。多数の人工的（非天然起源の）または天然起源の生体適合性ポリマーは、薬物送達の技術分野

50

において公知のものであり、様々な実施形態において使用することができる。一部の実施形態において、ポリマーは、有機ポリマーである。有機ポリマーの例として、ポリラクチド、ポリグリコライド (polyglycolide)、ポリラクチド - c o - グリコライド、ポリカプロラクトン、ポリエチレン、ポリエチレングリコール、ポリカーボネート、ポリ酸無水物 (例えば、ポリ(セバシン酸無水物))、ポリヒドロキシ酸 (例えば、ポリ(-ヒドロキシアルカノエート))、ポリエステル (例えば、ポリプロピレンフマレート)、ポリオルトエステル、ポリ(-アミノエステル)、ポリビニルアルコール、ポリカーボネート、ポリアルキレン、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリウレタン、ポリアミド、ポリアセタール、ポリエーテル、ポリアクリレート、ポリメタクリレート、ポリシアノアクリレート、ポリ尿素、炭水化物 (例えば、セルロース、デンプン、多糖)、ポリペプチドが挙げられる。一部の実施形態において、多糖は、キトサン、アルギン酸塩、デキストランまたはシクロデキストリンを含む。一部の実施形態において、ポリペプチドは、コラーゲンまたはアルブミンを含む。一部の実施形態において、ポリマーは、第1のポリマーの誘導体またはバリエーションである。本明細書において使用される場合、第1のポリマーの「誘導体」は、化学基の置換、付加または当業者に公知の他の修飾を有するポリマーを含む。一部の実施形態において、ポリマー誘導体は、第1のポリマーのペンダント基または側鎖の修飾を含む。一部の実施形態において、ポリマー誘導体は、第1のポリマーと同じ骨格鎖を含むが、少なくともいくつかのペンダント基または側鎖に関して異なる。一部の実施形態において、誘導体は、少なくとも一部には、第1のポリマーを修飾することにより合成することができる。一部の実施形態において、誘導体は、少なくとも一部には、適切な単量体の重合により合成することができる。

10

20

【0255】

様々な実施形態において、ポリマーは、親水性ポリマー、疎水性ポリマー、カチオン性ポリマーまたはアニオン性ポリマーを含む。一部の実施形態において、ポリマーは、ホモポリマーまたは2種以上の異なる単量体を含むコポリマーとなり得る。コポリマーは、様々な実施形態において、ランダムポリマー、ブロックポリマーとなり得る、あるいはランダムおよびブロック配列の組合せを含むことができる。ポリマーは、様々な実施形態において、直鎖状であっても分枝状であってもよい。一部の実施形態において、ポリマーは、架橋されていてよい。一部の実施形態において、ポリマーは、グラフトポリマーとなり得る。ポリマーは、様々な実施形態において、櫛形もしくはブラシ形ポリマー、星形ポリマーまたは dendrimer となり得る。一部の実施形態において、ポリマーは、2種以上のポリマーのブレンドを含むことができる。

30

【0256】

ポリマーを得る (例えば、合成によりまたは天然の供給源から得る) ためおよびポリマーからマトリックスを形成するための多種多様な方法は、当技術分野において公知のものであり、様々な実施形態において使用することができる。マイクロ粒子およびナノ粒子を作製するための方法は、当技術分野において公知のものである。例示的な方法として、例えば、噴霧乾燥、相分離、シングルおよびダブルエマルジョン、溶媒蒸発、溶媒抽出ならびに単純および複合コアセルベーションが挙げられる。粒子性ポリマー組成物は、例えば、製粉、顆粒化、押し出し成形、球形化または沈殿等の技法を使用して作製することができる。活性薬剤を含む粒子の産生に役立つ様々な技法および材料に関して、例えば、米国特許出願公開第20040092470号; 同第20050181059号明細書および前述のいずれかにおける参考文献を参照されたい。

40

【0257】

インプラント、例えば、巨視的インプラントを作製するための方法は、当技術分野において公知のものである。一部の実施形態において、予備成形されたインプラントは、単量体、ポリマーまたは他の適した材料を含有する液体組成物を、選択された形状のモールドに導入し、半固体または固体構造の形成のための適切な条件下で組成物を維持することにより作製することができる。一部の実施形態において、重合、架橋またはゲル化が起こって、半固体または固体構造を形成する。一部の実施形態において、適切な条件は、モールド

50

ドに液体を導入する前または後のいずれかに添加することのできる、適した濃度のイオン、塩、架橋剤または重合開始剤の存在を含む。一部の実施形態において、適切な条件は、加熱または加圧を含む。一部の実施形態において、インプラントは、少なくとも一部には、任意選択で熱に曝露しつつ、乾燥または固体粒子を圧縮することにより成形することができる。一部の実施形態において、インプラントは、少なくとも一部には、組成物から溶媒を蒸発または昇華することにより成形することができる。モールドは、例えば、液体を導入することのできる適した形状および寸法の空洞、ウェル、間隙またはくぼみを含有するいずれかの物品となり得る。一部の実施形態において、インプラントの成形に使用する液体組成物は、活性薬剤を含む。活性薬剤は、例えば、インプラントの成形において封入させることができる。一部の実施形態において、インプラントを産生し、その後、活性薬剤を浸透させるまたは少なくとも一部にはこれでコーティングすることができる。

10

【0258】

当業者であれば、例えば、活性薬剤の特性、所望の放出プロファイル、意図される投与経路等、様々な因子に基づき、薬物送達系を作製するための適切な構成成分および技法を選択することができる。一部の実施形態において、選択された速度または量の活性薬剤放出をもたらす薬物送達系は、少なくとも一部には、例えば、変動的なサイズまたは割合の活性薬剤および他の構成成分（複数可）で複数の組成物を製剤化し、適した溶解または放出検査を行うことにより経験的に決定することができる。

【0259】

粒子は、組成物において実質的に均一となり得る、あるいは組成物において不均一となり得る。一部の実施形態において、粒子は、コアおよび1または複数の外層（殻（複数可）と呼んでもよい）を含み、コアおよび外層（複数可）は組成が異なる。一部の実施形態において、薬剤は、コアに実質的に含有される。一部の実施形態において、薬剤は、コアの外側に実質的に含有される。

20

【0260】

様々な実施形態において、活性薬剤は、少なくとも一部には、粒子にカプセル封入されていてよい（例えば、中空、液体、半固体または固体コア内に含有される）、あるいは実質的にマトリックス中に分散されていてよい、あるいはコーティング層内に存在またはこれに付着していてよい。液体コアは、様々な実施形態において、水、有機溶媒または脂質等、水性担体を含むことができる。フィルムまたはコーティングは、単一の層を含むことができる、あるいは複数の層を含むことができる。多層フィルムまたはコーティングの層は、組成が異なっていてよい。一部の実施形態において、活性薬剤は、少なくとも、活性薬剤を送達するための使用に先立ち、例えば、対象への投与に先立ち、実質的に1または複数の層に含有される。

30

【0261】

粒子は、例えば、その表面への1種または複数の部分の共有結合もしくは非共有結合による付着またはその取り込みにより修飾することができる。係る部分（複数可）は、例えば、粒子の電荷、非特異的結合、免疫原性、毒性を低下させることができる、あるいはその生体適合性、溶解度または安定性を増強させることができる、あるいは標的化部分として働くことができる。一部の実施形態において、粒子は、ポリエチレングリコール（PEG）またはその誘導体等、ポリマーをそこに付着することにより修飾される。一部の実施形態において、粒子は、標的化部分を付着するまたは取り込むことができる。標的化部分は、粒子が対象に投与される時点で既に粒子表面に露出されていても、投与後に露出されるようになってよい。標的化部分は、例えば、身体内の特定の位置（例えば、腫瘍が存在するまたは存在が疑われるまたは転移を起こし易い部位）または腫瘍が除去された後の部位における粒子の局在化を増強し、特定の細胞（例えば、腫瘍細胞）への粒子の局在化を増強し、細胞取込みを増強すること等ができる。様々な実施形態において、標的化部分は、粒子が少なくとも一部には含まれる材料に共有結合により付着することができる、粒子の形成の際に材料と混合することができる、粒子においてまたはコーティング層の一部として塗布すること等ができる。

40

50

【0262】

一部の実施形態において、マイクロ粒子は、500ミクロン(μm)以下、例えば、50μm~500μmの間、20μm~50μmの間、1μm~20μmの間、例えば、1μm~10μmの間の直径または最長寸法を有する。一部の実施形態において、ナノ粒子は、1μm(1000nm)以下、例えば、1nm~100nmの間、100nm~200nmの間、200nm~500nmの間または500nm~1000nmの間の直径または最長寸法を有する。この文脈における「最長寸法」は、粒子表面上の2点間の最長直線寸法を指す。一部の実施形態において、フィルムまたはコーティングは、500ミクロン(μm)以下、例えば、50μm~500μmの間、20μm~50μmの間、1μm~20μmの間、例えば、1μm~10μmの間の厚さを有する。

10

【0263】

一部の実施形態において、粒子は、少なくとも一部には、1種または複数の脂質で構成され得る。例えば、リン脂質または他の脂質を含むことができるリポソームは、一部の実施形態において使用することのできる無毒性の生理的に許容される担体である。リポソームは、当業者に公知の方法に従って調製することができる。一部の実施形態において、例えば、リポソームは、米国特許第4,522,811号明細書に記載されている通りに調製することができる。標的化リポソーム、ペグ化リポソームおよび重合リポソームを含むリポソームは、当技術分野において公知のものである(例えば、Hansen C Bら、*Biochim Biophys Acta*、1239巻(2号):133~44頁、1995年;Torchilin V Pら、*Biochim Biophys Acta*、1511巻(2号):397~411頁、2001年;Ishida Tら、*FEBS Lett.*460巻(1号):129~33頁、1999年を参照)。一部の実施形態において、脂質含有粒子は、次のPCT出願公開またはその参考文献のいずれかに記載されている通りに調製することができる:国際公開第2011/127255号パンフレット;国際公開第2010/080724号パンフレット;国際公開第2010/021865号パンフレット;国際公開第2010/014895号パンフレット;国際公開第2010147655号パンフレット。

20

【0264】

一部の実施形態において、送達系の構成成分は、米国食品医薬局(FDA)、欧州医薬品庁(European Medicines Agency)(EMA)または別の国もしくは管轄権における同様の機関等、治療剤(例えば、医薬品剤)の製造、販売、売却および/または使用を規制する責任がある政府機関によって、ヒトにおける使用が認可されている。一部の実施形態において、送達系の構成成分は、獣医学分野の薬における使用が認可されている。一部の実施形態において、送達系の構成成分は一般に、米国FDAにより安全(GRAS)と認識される。

30

【0265】

一部の実施形態において、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む組成物を含有する医薬品パックまたはキットが提供される。一部の実施形態において、GCS阻害剤は、粉末化または他の固形状である。粉末化または固形状となり得るGCS阻害剤または組成物は、投与に先立ち薬学的に許容される担体と混合することができる。一部の実施形態において、パックまたはキットは、投与に先立ち混合するための、別々に包装された薬学的に許容される担体または組成物をさらに含有する。GCS阻害剤および担体または組成物の量を選択して、適切な濃度または選択された数の用量をもたらすことができる。一部の実施形態において、医薬品パックまたはキットは、がんの処置のための1種または複数のGCS阻害剤および1種または複数の追加的な薬剤を含有する。薬剤は、別々にまたは一体に包装することができる。キットは、医薬の使用のための説明書を含むことができる。特定の実施形態において、キットは、複数用量の各薬剤を含む。キットは、例えば、1週間、2週間、3週間、4週間または数ヶ月、例えば、2~6ヶ月にわたる対象の処置に十分な含量の各薬剤を含むことができる。キットは、化学療法の完全サイクルを含むことができる。特定の実施形態において、キットは、化学療法の複数のサイクルを含む。

40

【0266】

50

薬剤または医薬組成物は、医薬品剤および/または医薬組成物の製造、販売、売却および/または使用を規制する責任がある政府機関によって認可されたラベルを貼った器において提供することができ、その内容物の説明、本発明の方法におけるその使用の説明等、医薬組成物に関連する情報を含む、係る機関によって認可された添付文書と共に包装することができる。一部の実施形態において、情報は、がんのための処置を必要とする対象を処置するための組成物の使用のための説明書を含む。

【0267】

一部の実施形態において、ラベル、添付文書または説明書は、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物が、例えば、患者がGCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物による処置に適した候補であるかどうかを決定するための「コンパニオン診断」と称され得る適切な診断検査と併せて使用するべきであることを推奨または明記することができる。一部の実施形態において、コンパニオン診断検査は、SHMT2の発現または活性の評価をもたらす。一部の実施形態において、診断検査を行うための試薬またはキットは、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物を包装することまたは他の仕方

10

で供給することができる。一部の実施形態において、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物は、政府規制機関（米国FDA、欧州医薬品庁（EMA）、または他の管轄権における治療剤の認可に同様の権威を有する政府機関等）によって認可され、ヒトの処置または獣医学目的のために、少なくとも一部には、処置される対象の腫瘍または対象から得られる腫瘍試料におけるSHMT2発現またはSHMT2活性のレベルの評価に基づき、対象がGCS阻害剤による処置に適した候補であると決定されることを推奨または

20

要件として、販売、促進、流通、売却または他の仕方

で商業的に提供することができる。例えば、認可は、対象または腫瘍または腫瘍試料が、高レベルまたは増加したレベルのSHMT2発現またはSHMT2活性を有すると分類されるという要件を含む「指示」のためのもとなり得る。係る要件または推奨は、例えば、GCS阻害剤または医薬組成物と共に提供される添付文書またはラベルにおいて含まれ得る。一部の実施形態において、SHMT2遺伝子産物もしくはSHMT2活性の検出もしくは測定のための特定の

30

方法または特異的検査試薬（例えば、SHMT2ポリペプチドに結合する抗体またはSHMT2 mRNAにハイブリダイズするプローブ）またはキットを規定することができる。一部の

実施形態において、方法、検査試薬またはキットは、臨床試験において使用されており、

試験の結果が、少なくとも一部には、GCS阻害剤または医薬組成物の認可の基盤を形成

した。一部の実施形態において、方法、検査試薬またはキットは、GCS阻害剤またはGCS阻害剤を含む医薬組成物による処置成績と

40

関連する結果をもたらすことが検証されている。

【0268】

一部の実施形態において、GCS阻害剤が、がん処置以外の目的で（「他の目的」）で、例えば、がん以外の状態の処置のために、がんのための処置を必要とする対象（例えば、ヒト）に以前に（即ち、本発明の前に）投与されたことのある薬剤である場合、（i）がんのための処置を必要とする対象は、係る他の目的のために薬剤が正常に投与される対象となり得る；あるいは（ii）GCS阻害剤は、係る他の目的に有用であることが当技術分野において公知のものとは別個の組成物または組合せにおいて、あるいは係る他の目的のために有用であることが当技術分野において公知のものとは別個の用量または投与経路または標的化アプローチを使用して、がんを処置するために投与され得る；および/または（iii）GCS阻害剤は、少なくとも一部には、腫瘍がGCS阻害剤に対し感受性であるまたはその可能性があるかどうかを決定する検査、例えば、SHMT2ベースのアッセイの結果に基づき投与され得る。SHMT2ベースのアッセイは、SHMT2の発現または活性のいずれかのアッセイを含むことができる。

【0269】

一部の実施形態において、GCS阻害剤による処置方法のいずれかは、NKHの処置に有用な薬剤による処置をさらに含むことができる。NKHの処置は、（i）安息香酸ナトリウム処置によるグリシンの血漿中濃度の低下および/または（ii）最も一般的にはN

10

20

30

40

50

- メチル D - アスパラギン酸 (N M D A) 受容体部位におけるグリシン作動性受容体の遮断を含むことができる。ベンゾエートは、排泄のためにグリシンをコンジュゲートするために肝臓によって使用され、その投与は、血漿中グリシンレベルの減少をもたらす。

【 0 2 7 0 】

一部の実施形態において、腫瘍から得られた試料における S H M T 2 遺伝子発現のレベルまたは S H M T 2 遺伝子コピー数の決定は、検査施設への腫瘍試料の提供を含む。一部の態様において、方法は、(a) 対象から得られた試料 (例えば、腫瘍試料) と、(b) S H M T 2 ベースのアッセイを行うための説明書を検査施設に提供するステップを含む。一部の実施形態において、方法は、アッセイの結果を受け取るステップと、任意選択で、少なくとも一部には結果に基づき対象を処置するステップまたは対象のための処置を選択するステップとをさらに含む。一部の実施形態において、方法は、(a) 試料、例えば、対象から得られた腫瘍試料を検査施設に提供するステップと、(b) S H M T 2 ベースのアッセイの結果を受け取るステップとを含む。一部の実施形態において、方法は、(a) 試料、例えば、対象から得られた腫瘍試料を検査施設に提供するステップと、(b) G C S 阻害剤に対する感受性に関するアッセイの結果を受け取るステップとを含む。一部の実施形態において、検査施設への「提供」は、直接的な提供、別の個体または実体が提供するよう手配または指導または許可すること等を包含する。一部の実施形態において、検査施設への「提供」は、例えば、ヘルスケア施設の電子発注システムへのアッセイの発注を包含する。一部の実施形態において、方法は、例えば、電子的に、S H M T 2 ベースのアッセイまたは G C S 阻害剤に対する感受性に関する他のアッセイの結果を提供するステップを含む。一部の実施形態において、試料が対象から得られた場所から遠く離れた (例えば、少なくとも 1 キロメートル離れた) 検査施設においてアッセイを行ってよいことが企図される。一部の実施形態において、S H M T 2 ベースのアッセイまたは G C S 阻害剤に対する感受性に関する他のアッセイは、アッセイを行い、任意選択で、結果、例えば、結果を含む報告を提供する資格があるまたはそのように認定された (例えば、一部の実施形態において政府組織または専門家組織である、国内または国際組織による) 1 または複数の中心検査施設において行われる。結果は、1 種または複数のスコアおよび / または記述的説明を含むことができる。一部の実施形態において、試料を研究室に送り、アッセイ結果を含む報告が、任意選択で解釈と共に、要求する個体または実体に提供されてよい。一部の実施形態において、結果は、電子フォーマットで提供され、任意選択で、電子フォーマットの代わりにまたはそれに加えて紙のコピーが提供される。

10

20

30

【 0 2 7 1 】

一部の実施形態において、結果は、少なくとも一部には、コンピュータ、例えば、データベース、電子医療記録等に結果を入力することにより提供され、結果は、要求元の指示によりまたは指示の下、アクセスされ得る。一部の実施形態において、結果は、少なくとも一部には、ネットワーク、例えば、インターネットを通じて提供される。方法またはアッセイの 1 もしくは複数のステップを行うことができる、またはその結果を伝達もしくは受け取ることができる 1 または複数の異なる実体または個体を通して、試料および / または結果が伝達され得ることが企図される。係る活動およびその中間ステップならびに実行方法の全ては、個々にかつ組み合わせて、本開示の範囲内である。

40

【 0 2 7 2 】

一部の態様において、種々のキットが提供される。一部の実施形態において、キットは、G C S 阻害に対し感受性である腫瘍細胞もしくは腫瘍の同定に有用なおよび / または腫瘍細胞もしくは腫瘍が G C S 阻害に対し感受性である見込みの評価に有用な少なくとも 1 種の試薬を含む。キットまたはその使用を決して限定することなく、係るキットは、本明細書において便宜上、「診断キット」と称することができる。一部の実施形態において、キットは、S H M T 2 の発現または S H M T 2 遺伝子コピー数に基づく腫瘍または腫瘍細胞の分類に有用な薬剤を含有する。例えば、薬剤は、S H M T 2 遺伝子または S H M T 2 遺伝子産物、例えば、S H M T 2 m R N A またはポリペプチドの検出に役立つ。一部の実施形態において、薬剤は、核酸、例えば、S H M T 2 D N A または m R N A またはそ

50

の補体に特異的にハイブリダイズするプローブまたはプライマーである。一部の実施形態において、薬剤は、S H M T 2 ポリペプチドに特異的に結合する抗体（一次抗体）または他の薬剤である。一部の実施形態において、キットは、（ a ）一次抗体に結合する二次抗体、または S H M T 2 遺伝子産物を検出（detet）するためのアッセイにおいて使用するための基質等、検出試薬；（ b ）1種または複数の対照薬剤（例えば、S H M T 2 D N A もしくは m R N A に結合しないプローブもしくはプライマーまたは S H M T 2 ポリペプチドに結合しない抗体）；（ c ）試料の調製（例えば、細胞ライセートまたは組織切片の調製）に有用な試薬；（ d ）酵素アッセイの実施に有用な試薬（例えば、基質溶液）；（ e ）試薬希釈剤をさらに含む。一部の実施形態において、キットは、細胞溶解、抗原回収、染色の実施、または酵素反応の実施もしくは停止、または試料の洗浄に有用な液体組成物（またはその構成成分）を含む。液体組成物は、例えば、緩衝物質、一価（monvalent）または二価カチオン（例えば、塩として）、水等を含むことができる。一部の実施形態において、キットは、I H C の実施に役立つ。一部の実施形態において、キットは、E L I S A アッセイキットである。

10

20

30

40

50

【 0 2 7 3 】

一部の実施形態において、診断キットは、キットが、本明細書に記載されている方法における使用のために、診断検査、デバイス、ヘルスケア製品その他を規制する責任があるまたはその管轄権がある政府機関によってクリアしたまたは認可されたことを指示するラベルまたは添付文書を含む。一部の実施形態において、政府機関は、米国食品医薬局（F D A）、または診断検査、デバイス、ヘルスケア製品その他の規制に関して同様の責任もしくは権威を有する地方もしくは米国以外の国における国内もしくは地方の規制機関である。

【 0 2 7 4 】

一部の実施形態において、システムは、S H M T 2 の発現または活性を測定するためのアッセイを行うよう適応またはプログラムされる。一部の実施形態において、システムは、1種または複数の機器（例えば、P C R 機械）、自動化細胞もしくは組織染色器具、画像を作製、記録もしくは記憶するデバイス、および/または1種または複数のコンピュータプロセッサを含むことができる。システムは、例えば腫瘍試料における、S H M T 2 遺伝子産物の検出および/または定量化に関して選択されたパラメータによりプログラムすることができる。システムは、複数の試料において並行してアッセイを行うよう適応させることができる、および/または結果の解釈を提供するための適切なソフトウェアを有することができる。システムは、適切な入力および出力デバイス、例えば、キーボード、ディスプレイ、プリンタ等を含むことができる。

【 0 2 7 5 】

キットは、使用説明書を含むことができる。一部の実施形態において、説明書は、例えば、紙または電子フォーマット（例えば、コンピュータ可読媒体における）の、書面のまたは説明目的の材料を含む。説明書は、例えば、腫瘍分類または処置選択または G C S 阻害に関する、アッセイを行うためのおよび/または結果を解釈するための指示を含むことができる。一部の実施形態において、キットは、G C S 阻害に対する感受性を予測するまたは感受性腫瘍を同定するための抗体を使用して得られた結果の解釈に有用な例を例証する、染色された細胞または組織切片の画像を含むことができる。例えば、画像は、S H M T 2 の標的の発現が「陽性」または「陰性」と考慮されるであろう、あるいは S H M T 2 の発現のレベルを示す数値的スコアを割り当てられるであろう細胞または組織を示すことができる。キットは、参照標準または対照として働く物品を含むことができる。例えば、キットは、陰性対照として働く、S H M T 2 に結合しない抗体を含むことができる。

【 0 2 7 6 】

一部の実施形態において、キットは、G C S の阻害剤を同定するための使用のアッセイのための成分を含む。様々な実施形態において、キットは、いずれか1種もしくは複数の G C S 構成成分または1種もしくは複数の G C S 構成成分の産生に適した発現ベクターを含む。一部の実施形態において、キットは、検出試薬、対照試薬またはアッセイの実施に

適した少なくとも 1 種の追加的な試薬を含む。

【0277】

キットにおける物品は、個々に包装されても、ボール紙または発泡スチロールの箱等、より大きな器において一体に提供することのできる個々の器に含有されてもよい。一部の実施形態において、1 種または複数の試薬またはキットは、規定の製造および/または品質管理判断基準、例えば、製造管理および品質管理に関する基準との一貫性を満たすことができる。

【実施例】

【0278】

(実施例 1)

G L D C の s h R N A 媒介ノックダウンは G B M 幹細胞に毒性である。

がん細胞は、それらの形質転換された状態を支持する役割を演じる種々の代謝活性における変化をしばしば提示する。例えば、多数の種類のがん細胞は、急速な増殖に貢献するようにグルコース代謝物がバイオマスに優先的に取り込まれることを可能にするピルビン酸キナーゼアイソフォーム発現の変更を通じた解糖の増加を用いる(1、2)。近年の研究は、代謝酵素イソクエン酸脱水素酵素(I D H 1)における変異が、ある種の神経膠腫および急性骨髄性リンパ腫において発がんを駆動する可能性があることを報告している(3、4)。代謝酵素 L - 2 - ヒドロオキシグルタル酸脱水素酵素における変異は、G B M または髄芽腫についての素因になる可能性がある(5、6)。

【0279】

広範囲な代謝反応ががん細胞において生じる一方で、本発明者らは、多数の理由からアミノ酸異化反応経路ががん治療のための特に有望な標的である可能性があるかと仮定した。フェニルケトン尿症またはメープルシロップ尿症などの一連の先天性障害は、アミノ酸分解のために必要な遺伝子中の機能消失変異によって生じ、これらの酵素/経路が生物学的に重要であることを示し、それらが非重複性であるらしいことを示唆する。さらに、生涯の十分早期に開始する適切な処置を受ければ患者が生存および成長でき、機能消失変異についてヘテロ接合性である個体は典型的には無症候性であることから、多数のこれらの遺伝子の消失は条件付きで許容できる。本発明者らは、ある種のがんはこれらの酵素に具体的に依存する場合、酵素は許容できない副作用をもたらすことなく治療的な標的になる可能性があるかと結論した。

【0280】

本発明者らは、その機能の消失が先天性障害に関連するアミノ酸異化反応に関与する一連の遺伝子を同定した。情報に基づくアプローチでの遺伝子発現プロファイルを使用して、本発明者らは、遺伝子発現が G B M、G B M 腫瘍形成細胞(例えば、G B M がん幹細胞)および「幹細胞性」に正に関連するこれらの遺伝子のサブセットを同定した。次いで本発明者らは、20 個のそのような遺伝子の方向付けられた調査を G B M 腫瘍由来腫瘍形成細胞株、B T 1 4 5 での増殖/生存におけるそれらの要求について s h R N A 媒介ノックダウンを使用して実施した。

【0281】

(実施例 2)

G L D C の s h R N A 媒介ノックダウンは G B M 幹細胞に毒性である。

本発明者らは、G B M 幹細胞(G B M - S C)株 B T 1 4 5 での G L D C ノックダウンの効果を検討するために G L D C に対して方向付けられた s h R N A のレンチウイルス送達発現を使用した。B T 1 4 5 細胞に G L D C (G 1 から G 5)を標的化するヘアピンを発現しているレンチウイルスまたは G F P を標的化する対照ヘアピンのいずれかを感染させた。図 1 A に示す通り、G L D C についてのウエスタンブロッティングは、ヘアピン G 1、G 4 および G 5 について G L D C 発現の強い抑制を実証するが、G 2 または G 3 についてはしない。細胞生存率を A T P アッセイを使用して測定した場合、本発明者らは、G F P 対照ヘアピンと比較して s h R N A G 1、G 4 および G 5 が、細胞生存率を顕著に減らしたが、一方 s h R N A G 2 および G 3 はしなかったことを見出した(図 1 B)。

10

20

30

40

50

GFP対照に対するG1、G4およびG5の差異は、5日目および7.5日目でそれぞれ統計的に有意であった ($p < 0.05$) (エラーバーは明確さのために示さない)。

【0282】

GLDCノックダウン後のBT145ニューロスフェアの形態は毒性を示す。図1Cに示す通りshRNA G2、G3およびGFPで感染させたニューロスフェアは、大きく、円形で正常なスフェアを形成し、生存を示す。一方G1、G4またはG5で感染させたスフェアは、小さく、不規則であって、崩壊の工程にあり、細胞死および増殖障害を示す。さらに二次スフェアは、G1、G4またはG5感染ニューロスフェアからは形成できなかった(未記載)。図1A、1B、および1Cに示すのと同様の結果が追加的GBM-SC株-株0308について得られた(未記載)。

10

【0283】

要約として、GLDC(G1、G4およびG5)に対して方向付けられた3つのshRNAのレンチウイルス送達発現は、GBM-SC株BT145それぞれに対して毒性であり、それぞれGLDC発現の強い抑制に対応した。一方、shRNA G2およびG3はGLDC発現をわずかに低下させただけであり、BT145細胞に毒性ではなかった。

【0284】

GLDC mRNA中の次の配列を標的化するshRNAを使用した：

【化5】

G1: CGAGCCTACTTAAACCAGAAA (配列番号1)

G2: CCTGCCAACATCCGTTTGAAA (配列番号2)

G3: CCACGGAAACTGCGATATTAA (配列番号3)

G4: GCCACTGGGAAAGAAGTGTAT (配列番号4)

G5: GAAGTTTATGAGTCTCCATTT (配列番号5)

20

【0285】

(実施例3)

様々な腫瘍細胞株は、GLDCのshRNA媒介ノックダウンに対して感受性または抵抗性のいずれかである。

本発明者らは、非分化GBMSCおよび(培地への血清の添加を介して分化された)GBMSCの両方を含む複数の細胞株ならびにGBMおよび他の種類のがん由来の種々の細胞株を検討するために本発明者らの分析を発展させた。本発明者らは、各細胞型はGLDCノックダウンに非常に強く応答するか、または全くしないかのいずれかであることを見出し(図2)、それにより検査した全ての細胞株をGLDCノックダウン感受性または非感受性群に分けた。このパターンは、がんの種類に従わず；例えば、GBM由来および乳がん由来株のGLDCノックダウン感受性および非感受性の例の両方が見出された。

30

【0286】

(実施例4)

GCSの薬理的阻害はGLDCノックダウン感受性細胞の生存率を減らす。

本発明者らは、システアミン(GCSの阻害剤(9))での処置の効果を実施例3において記載された実験で検討された多数の腫瘍細胞株で評価した。細胞をシステアミン(1mM)で4日間処置し、次いで細胞生存率をATPアッセイを使用して評価した。本発明者らは、システアミンもGLDCノックダウン感受性細胞だけで生存率を減らし、非感受性群の細胞ではしないことを観察した(図3A)。

40

【0287】

(実施例5)

グリシン開裂系タンパク質H(GCSH)の阻害は、GLDCノックダウン感受性群における細胞株の生存率を減らす。

次いで本発明者らは、実施例4で使用したのと同じ生存率アッセイを使用してGCSの別の構成成分、グリシン開裂系タンパク質H(GCSH)の阻害の効果を検討し、GCS

50

HのshRNA媒介ノックダウンもGLDCノックダウン感受性群の細胞株で生存率を減らしたが、非感受性群の細胞ではしなかったことを見出した(図3C)。別のGCS構成成分を阻害することと、GCSを薬理的に阻害することとの密接に相関する効果(実施例4)は、GLDC siRNAでの感染の効果がオフターゲット効果ではなかったことを確認し、様々ながん細胞株のGLDCノックダウン感受性または非感受性の性質が生物学的に重要であったことを示す。

【0288】

GCSH shRNA中の次の配列を標的化するshRNAを使用した：

【化6】

GS1: CGTTGGGAGATGTTGTTTATT (配列番号6)

GS2: GTGCGTAAATTCACAGAGAAA (配列番号7)

GS3: GTGAACTCTATTCTCCTTTAT (配列番号8)

GS4: GATGAACTTATGAGTGAAGAA (配列番号9)

【0289】

(実施例6)

ミトコンドリアセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ発現は、GLDCへの感受性と密接に相関する。

何がGLDCノックダウンへの感受性を決定するかを明らかにするために、本発明者らはGLDCおよびこれらの細胞型でグリシン代謝に直接関連する酵素の発現レベルを検討した。予想外に本発明者らは、GLDCの発現レベルが細胞が、GLDCノックダウンに感受性であるかに相関しなかったことを観察した(図4)。相関しないことは、GCSHまたは(グリシンおよびセリンの相互変換に関与する)細胞質性セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT1)について観察された。一方本発明者らは、(ミトコンドリアにおいてセリンからグリシンへの変換に関与する(8))ミトコンドリアセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ(SHMT2)がGLDCノックダウンへの感受性に密接に相関したことを観察した。GLDCノックダウンに感受性であった細胞は、非感受性細胞と比べて著しく高いSHMT2の発現を有した。

【0290】

図4に示す通り、GLDC、GCSHまたはSHMT1のタンパク質発現レベルは、GLDCノックダウン/阻害に対する感受性と相関しなかった。一方SHMT2のタンパク質発現レベルは、GLDCノックダウン/阻害に対する感受性に密接に相関し；感受性細胞は高レベルのSHMT2を発現し、一方非感受性細胞は低レベルであった。

【0291】

(実施例7)

SHMT2のノックダウンはGLDCノックダウンへの感受性を大きく低減する。

GLDCノックダウン感受性細胞におけるSHMT2の高発現が機能的に関連するか、または相関関係にあるだけであるかを検討するために、本発明者らは、SHMT2をノックダウンする効果をshRNAを使用して検討した。最初に本発明者らは、細胞の感受性または非感受性群いずれかにおいてSHMT2をノックダウンすることが細胞生存率に影響を与えるかを検討した(図5)。本発明者らは、SHMT2ノックダウンが感受性または非感受性細胞いずれにおいても細胞生存率に顕著な影響を与えなかったことを観察した(図5B)。SHMT2発現がGLDCノックダウンへの感受性に直接影響を与えるかを検討するために、最初に本発明者らは、GLDCのレンチウイルスノックダウンの前に、対照shRNAまたはSHMT2に対するshRNAのいずれかを安定に発現している細胞株(GBM由来腫瘍形成細胞およびGBM由来細胞株)を生成した。SHMT2の消失がGLDCノックダウンに対する細胞感受性に影響を与えるかを検討するために、細胞株を最初にSHMT2に対して方向付けられたshRNAで感染させ、次いで安定な組み込みおよびshRNAの安定な発現を有する細胞を得るためにピューロマイシン中で5日間選

10

20

30

40

50

扱した。次にこれらの細胞をGLDCに対して方向付けられたshRNAでの2回目の感染に供し、細胞生存率を5～7日目に測定した。本発明者らは、対照shRNA(GFP)を安定に発現している細胞において、GLDCのノックダウンが予測された通り有意な毒性を生じたことを観察した。一方、SHMT2の安定なshRNA媒介ノックダウンを有する細胞は、GLDCノックダウン媒介毒性に対して劇的にレスキューされた。例えば図5Dは、SHMT2またはGFP shRNA(X軸に標示)で安定に感染させ、次いでG1 shRNAで二次的に感染させたBT145細胞の細胞生存率を示す。点線は、最初にGFP shRNAを発現しており、次いでG1で7日間感染させた細胞の細胞生存率のレベルを示す。生存率は、各安定株を二次的にGFP shRNAで感染させた場合の生存率(100%として設定した)の%として表す。同様のレスキューが二次的にG4またはG5ヘアピンで感染させたSHMT2 shRNA発現細胞について得られた(データ未記載)。同様の結果がBT112 GBM-SC株ならびにLN229およびU251 GBM-由来細胞株(データ未記載)について得られた。図5Eは、GFPまたはS3 shRNAのいずれかを最初に発現しており、次いでG1、G4またはG5 shRNAで二次的に感染させたニューロスフェアの代表的な光学顕微鏡像を示す。示される通り、shGFP発現細胞のG1、G4またはG5感染が細胞死を示唆する小さな、崩壊しているニューロスフェアを生じる一方で、S3を発現している細胞は保護される。同様の結果がS1、S2またはS5の初感染についても観察された。

10

【0292】

図4でのデータと共にこれらの結果は、SHMT2の発現レベルが多種多様な腫瘍細胞でのGLDC/GCSのノックダウンまたは阻害へのがん細胞感受性の主要な決定因子であることを示す。

20

【0293】

SHMT2 mRNA中の次の配列を標的化するshRNAを使用した：

【化7】

S1: TAGGGCAAGAGCCAGGTATAG (配列番号10)

S2: CGGAGAGTTGTGGACTTTATA (配列番号11)

S3: CCGGAGAGTTGTGGACTTTAT (配列番号12)

S4: GCTCCAGGATTTCAAATCCTT (配列番号13)

30

【0294】

(実施例8)

SHMT2 mRNA発現は、多数の様々な種類のがんにおいて顕著に上昇している。

本発明者らは、SHMT2レベルが上昇しているがん(それらがGCSを減らすことに基づく治療に適した標的であることを示す)があるかを決定するために、様々ながんの遺伝子発現プロファイルを検討した。本発明者らは、がんアレイデータベースOncomine(10)を使用する包括的遺伝子発現プロファイル分析を実施し、SHMT2転写物が高い統計的有意性を有して($P < 1E^{-4}$ 、全ての過発現遺伝子の上位10%以内の遺伝子順位)少なくとも2倍増加しているがんを探した。本発明者らは、SHMT2 mRNAレベルは正常組織対照と比較して多数のがんにおいて顕著に上昇しており、大部分の場合ではSHMT2は特定のがん(表1)での過発現遺伝子の上位1%以内であったことを見出した。これらの結果は、グリシン開裂系を標的化することがSHMT2の上昇を提示する多種多様ながんサブタイプでの有効な治療戦略であると考えられることを示す。

40

【0295】

【表 1】

表 1: SHMT2 転写物は、Oncomine(www.oncomine.com)で分析された通り、多数のがんにおいて顕著に上昇している。「PMID」は、マイクロアレイデータが公表されている研究での PubMed 参照 ID 番号を示す。「倍」は、対応する正常組織に対する倍数変化を示す。「順位%」は具体的な比較においてがん上方制御された遺伝子中で SHMT2 が位置づけられる百分率を示す。

がんの種類	具体的サブタイプ	PMID	倍	P 値	順位%
脳	退形成乏突起膠腫対正常	16357140	4.470	3.07E-14	1%
	神経膠芽腫対正常	16616334	3.239	4.48E-12	5%
	乏突起神経膠腫対正常	16616334	2.798	3.13E-10	3%
	退形成星状細胞腫対正常	16616334	2.417	1.02E-08	2%
	びまん性星状細胞腫対正常	16616334	2.132	4.44E-06	1%
	神経膠芽腫対正常	16204036	2.124	6.42E-09	2%
膀胱	浸潤性尿路上皮癌腫対正常	15930339	4.666	1.79E-11	1%
	表在性膀胱がん対正常	16432078	3.841	2.17E-22	1%
	表在性膀胱がん対正常	15930339	3.323	8.58E-10	1%
	表在性膀胱がん対正常	15173019	2.727	1.75E-11	1%
	浸潤性尿路上皮癌腫対正常	15173019	2.649	6.94E-10	1%
	浸潤性尿路上皮癌腫対正常	16432078	2.575	3.93E-17	1%
頸部	頸部がん対正常	17510386	2.996	1.64E-06	10%
結腸直腸	直腸腺腫対正常	18171984	4.275	3.54E-09	1%
	大腸腺腫対正常	18171984	2.439	8.65E-17	1%
	盲腸腺癌対正常	17615082	2.185	1.07E-07	2%
	大腸粘液癌対正常	17615082	2.119	3.27E-06	4%
	大腸腺癌対正常	17615082	2.117	1.21E-08	4%
胃	胃腸腺癌対正常	19081245	2.076	4.09E-09	5%
頭頸部	口底癌腫対正常	17510386	5.121	2.90E-05	4%
腎臓	腎ウィルムス(Renal Wilms)腫瘍対正常	19445733	4.165	3.72E-05	1%
	腎明細胞癌腫対正常	17699851	3.991	3.53E-08	2%
	非遺伝性 CCRCC 対正常	19470766	3.482	1.29E-10	2%
	腎明細胞癌腫対正常	19445733	3.234	6.21E-06	3%
	遺伝性 CCRCC 対正常	19470766	3.022	9.34E-10	4%
白血病	T細胞急性リンパ性白血病対正常	17410184	2.215	4.56E-07	5%
	急性骨髄性白血病対正常	17410184	2.203	4.60E-09	3%
卵巣	卵巣漿液性嚢胞腺癌対正常	N/A	2.238	1.32E-11	1%
肉腫	粘液性/円形細胞脂肪肉腫対正常	20601955	2.476	6.02E-12	2%
その他	胸膜悪性中皮腫対正常	15920167	5.904	4.23E-10	1%
	混合生殖細胞腫瘍対正常	16424014	5.093	2.20E-22	1%
	胚性癌腫対正常	16424014	4.389	9.47E-11	1%
	セミノーマ対正常	16424014	4.215	2.26E-10	1%
	卵黄嚢腫瘍対正常	16424014	3.822	4.10E-08	1%
	奇形腫対正常	16424014	3.104	1.99E-09	2%

(実施例 9)

S H M T 2 タンパク質発現は G B M において上昇している。

【0297】

次に本発明者らは、S H M T 2 mRNA レベルの上昇を示すがんサブタイプの 1 つ、即ち G B M において S H M T 2 タンパク質レベルが上方制御されているかを検討した。免疫組織化学を使用して本発明者らは、全体のレベルで、S H M T 2 発現が正常脳と比べて G B M 腫瘍において劇的に増加していたことを観察した (図 6 A)。S H M T 2 発現は G B M 腫瘍において変化する一方で、最も低い S H M T 2 レベルを有する腫瘍でさえ対照脳と比べていまだ劇的に高いシグナルを有していた。細胞レベルでは (正常脳では) S H M T 2 発現は星状細胞に限定されており、ミトコンドリアの発現パターンと一致する点状細胞質性シグナルとして存在した (図 6 B)。脈管構造などのいくつかの腫瘍特性は、S H M T 2 発現を完全に欠いており (最左 G B M パネル)、I H C シグナルの特異的性質を支持している。さらに二次では、対照だけがいかなるシグナルも示さなかった (未記載)。腫瘍組織では、S H M T 2 は細胞あたりのレベルで大部分の (全部ではないが) 腫瘍細胞において高く発現されており、星状細胞において見られるよりも劇的に高かった。これらの結果は、G B M では、S H M T 2 発現レベルが正常細胞と比較して非常に上昇しており、それにより G C S を標的化することは G B M 腫瘍細胞の選択的標的化を十分可能にできることを確認する。これらの実験において使用された抗 S H M T 2 抗体は、S i g m a (S I G M A 抗 S H M T 2 抗体 (A b 2)) 由来であり、1 : 2 5 0 で使用された。

【0298】

(参考文献)

1. Warburg, O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-70 (1956).
2. Christofk, H.R. et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230-3 (2008).
3. Dang, L. et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739-44 (2009).
4. Parsons, D.W. et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807-12 (2008).
5. Haliloglu, G. et al. L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain tumors in children with mutations in the L2HGDH gene: neuroimaging findings. *Neuropediatrics* 39, 119-22 (2008).
6. Van Schaftingen, E., Rzem, R. & Veiga-da-Cunha, M. L: -2-Hydroxyglutaric aciduria, a disorder of metabolite repair. *J Inherit Metab Dis* 32, 135-42 (2009).
7. Kikuchi, G., Motokawa, Y., Yoshida, T. & Hiraga, K. Glycine cleavage system: reaction mechanism, physiological significance, and hyperglycinemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 84, 246-63 (2008).
8. Narkewicz, M.R., Sauls, S.D., Tjoa, S.S., Teng, C. & Fennessey, P.V. Evidence for intracellular partitioning of serine and glycine metabolism in Chinese hamster ovary cells. *Biochem J* 313 (Pt 3), 991-6 (1996).
9. Yudkoff, M., Nissim, I., Schneider, A. & Segal, S. Cysteamine inhibition of [15N]-glycine turnover in cystinosis and of glycine cleavage system in vitro. *Metabolism* 30, 1096-103 (1981).
10. Rhodes, D.R. et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 6, 1-6 (2004).
11. Di Pietro, E., Wang, X.L. & MacKenzie, R.E. The expression of mitochondrial methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-cyclohydrolase supports

10

20

30

40

50

a role in rapid cell growth. Biochim Biophys Acta 1674, 78-84 (2004).
12. Fu, T.F., Rife, J.P. & Schirch, V. The role of serine hydroxymethyltransferase isozymes in one-carbon metabolism in MCF-7 cells as determined by ¹³C NMR. Arch Biochem Biophys 393, 42-50 (2001).

【0299】

当業者は、日常の実験だけを使用して本明細書に記載の具体的な実施形態への多数の等価物を認識するまたは解明できる。本発明の範囲は、上に記載の実施形態に限定されることを意図されない。

【0300】

本明細書において使用されるセクションの表題は、いかなる方法においても限定として解釈されない。任意のセクション表題の下に示される対象物が、本明細書に記載の任意の態様または実施形態に適用可能であることは明確に意図される。

【0301】

本明細書の実施形態または態様は、本明細書に記載の任意の薬剤、組成物、物品、キットおよび/または方法に方向付けられる。任意の1つまたは複数の実施形態または態様が、任意の1つまたは複数の他の実施形態または態様と、適切であれば自由に組み合わせられることは意図される。例えば、相互に不整合でない2つ以上の薬剤、組成物、物品、キットおよび/または方法の任意の組合せは、提供される。

【0302】

「a」、「an」、「the」などの冠詞は、そうでないと示されるまたは他に内容から明らかである場合を除いて、1つまたは1つより多いことを意味できる。

【0303】

明細書および特許請求の範囲において使用される句「および/または」は、等位結合された構成要素の「いずれかまたは両方」を意味すると理解されるべきである。「および/または」で列挙された複数の構成要素は、同じ様式で解釈されるべきである、即ち「1つまたは複数」の構成要素は等位結合されている。他の構成要素が「および/または」節によって具体的に同定された構成要素以外に任意選択で存在してもよい。明細書および特許請求の範囲において使用される「または」は、上に定義の「および/または」と同じ意味を有すると理解されるべきである。例えば、構成要素の一覧において使用される場合、「または」または「および/または」は包括的である（即ち一覧の構成要素の少なくとも1つ、しかし任意選択で1つより多いおよび任意選択で追加的な未列挙の構成要素の包含）として解釈されるべきである。「1つだけの」または「厳密に1つの」などの反対であると明確に示す語だけが、多数のまたは表の構成要素の厳密に1つの構成要素の包含を指す。したがって、群のメンバーの1つまたは複数の間に「または」を含む請求項は、群のメンバーの1つ、1つより多くまたは全てが存在する、用いられるまたは他に所与の産物もしくは工程に関連する場合に（そうでないと示される場合を除いて）満たされたと見なされる。群のメンバーの厳密に1つが存在する、用いられるまたは他に所与の産物もしくは工程に関連する実施形態は、提供される。群のメンバーの1つより多く、または全てが存在する、用いられるまたは他に所与の産物もしくは工程に関連する実施形態は、提供される。

【0304】

任意の請求項（または明細書中の他所での関連する記載）の任意の1つまたは複数の制限、構成要素、節、記述用語などが別の請求項に導入される実施形態は、提供される。例えば、別の請求項に従属する請求項は、同じ基本請求項に従属する任意の他の請求項において見出される1つまたは複数の構成要素または制限を含むように改変できる。属クレームまたは包括クレームへの任意の修正が、包括クレームを組み込むまたは従属する属クレームの任意の種または任意の種クレームに適用できることは明確に意図される。

【0305】

請求項が組成物を列挙する場合、本明細書に開示の組成物を使用する方法は提供され、本明細書に開示の任意の作製方法による組成物の作製方法は、提供される。請求項が方法

10

20

30

40

50

を列挙する場合、方法を行うための組成物は提供される。構成要素が一覧または群として表される場合、各サブグループも開示される。一般に実施形態または態様が、具体的な構成要素（複数可）、特性（複数可）、薬剤（複数可）、物質（複数可）、ステップ（複数可）など（またはそれらの組合せ）を含むとしてここで参照される場合、特定の実施形態または態様は、そのような構成要素（複数可）、特性（複数可）、薬剤（複数可）、物質（複数可）、ステップ（複数可）など（またはそれらの組合せ）からなるとよいまたは本質的になつてよいことは理解されるべきである。そうでないと明らかに示される場合を除いて、1つより多いステップまたは作用を含む本明細書で特許請求される任意の方法では、方法のステップまたは作用の順序は方法のステップまたは作用が列挙される順序に限定される必要は無いことも理解されるべきである。処置の任意の方法は、そのような処置を必要とする対象に提供するステップを含むことができる。処置の任意の方法は、そのような処置を必要とする疾患を有する対象に提供するステップを含むことができる。処置の任意の方法は、そのような処置の必要があるとして対象を診断するステップを含むことができる。処置の任意の方法は、そのような処置を必要とする疾患を有するとして対象を診断するステップを含むことができる。

10

【0306】

範囲が本明細書に示される場合、端点が含まれている実施形態、両方の端点が除かれている実施形態、および一方の端点が含まれており他方が除かれている実施形態は提供される。他に示す場合を除いて、両方の端点が含まれると想定されるべきである。他に示すまたは内容および当業者の理解から他に明確である場合を除いて、範囲として表される値は、任意の具体的な値または種々の実施形態において述べられた範囲内のサブ範囲を、範囲の下限の単位の十分の一まで（内容がそうでないと明らかに示す場合を除いて）で想定できる。数値を参照するときの「約」は、他に述べる場合または内容から他に明確である場合を除いて、値の $\pm 10\%$ 以内、いくつかの実施形態では $\pm 5\%$ 、いくつかの実施形態では $\pm 1\%$ 、いくつかの実施形態では $\pm 0.5\%$ の範囲にある値を一般に指す。数値が「約」で始まる任意の実施形態では、厳密な値が列挙されている実施形態は提供される。数値が「約」で始まっていない実施形態が提供される場合、値が「約」で始まる実施形態も提供される。範囲の前に「約」が置かれる場合、他にそうでないと明らかに示される場合を除いて、「約」が範囲の下限および上限にまたは下限もしくは上限のいずれかに適用される実施形態が提供される。「少なくとも」、「まで」、「を超えない」などの句または同様の句が一連の数の前に置かれる場合、他にそうでないと明らかに示される場合を除いて、句が種々の実施形態での一覧中の各数に適用されることは理解されるべきである（内容に応じて、 100% の値（例えば百分率として表される値）が上限である場合があることは理解される）。例えば「少なくとも1つ、2つまたは3つ」は、種々の実施形態において「少なくとも1つ、少なくとも2つまたは少なくとも3つ」を意味すると理解されるべきである。任意および全ての合理的な下限および上限が明確に意図されることも理解される。任意の実施形態、態様、特性もしくは特徴、または任意のそれらの組合せが、任意の1つまたは複数の請求項からはっきりと除外される場合があることも理解される。例えば任意の薬剤、組成物、量、用量、投与経路、腫瘍型、細胞型、標的、細胞性マーカーなどは、任意の1つまたは複数の請求項からはっきりと除外される場合がある。

20

30

40

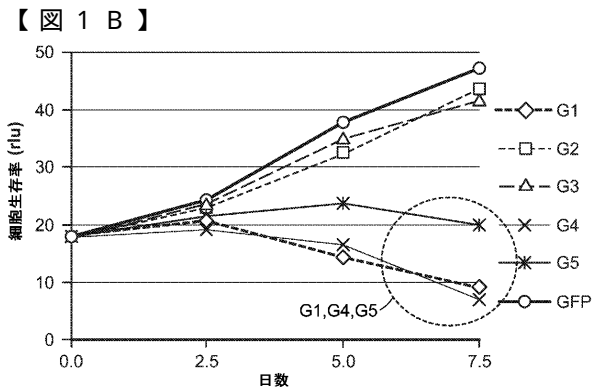


FIG. 1B

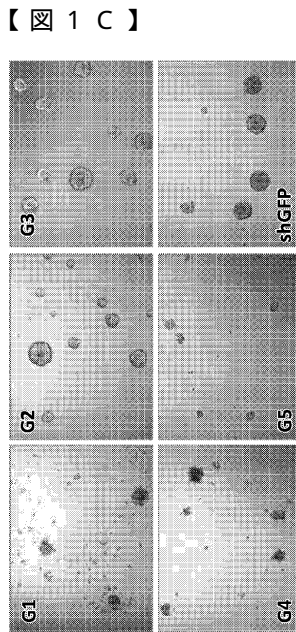


FIG. 1C

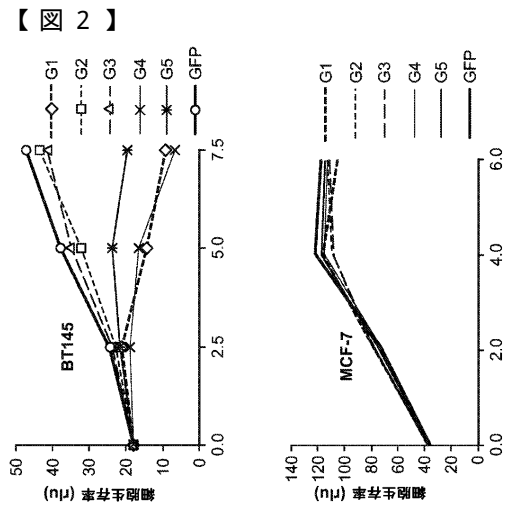


FIG. 2

感受性群	感受性%
BT145	69.4
308	40.1
LN-229	50.5
A2058	76.8
ACHN	28.1
U-251	41.7
T47D	56.9

GBM由来CSC
GBM由来CSC
神経膠芽腫
悪性メラノーマ
腎細胞癌腫
「幹線」神経膠腫
乳管がん

抵抗性群	感受性%
BT145DIF	4.2
308DIF	-14.3
MCF7	5.3
HMC-1-8	-1.4
U87	-13.0
PC3	0.6
DoTc2-4510	5.3

分化したCSC
分化したCSC
乳がん
乳房、脾水
神経膠芽腫
前立腺がん
頸部がん

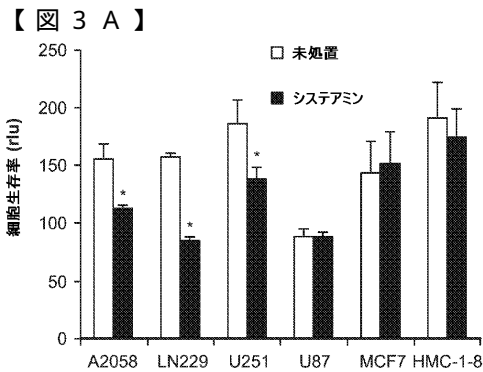


FIG. 3A

【 図 3 C 】

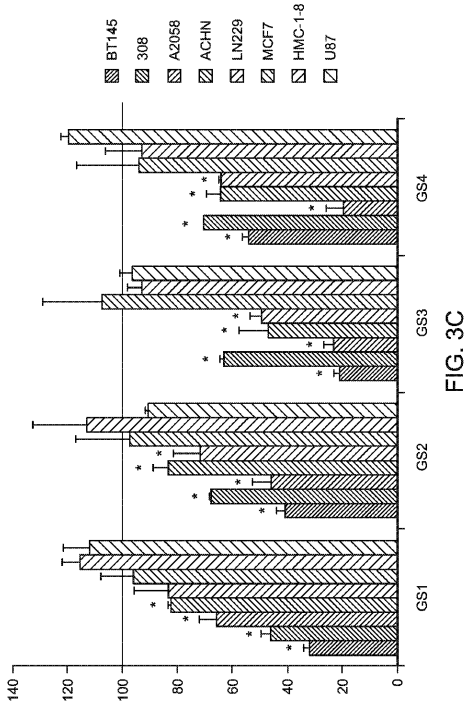


FIG. 3C

【 図 5 B 】

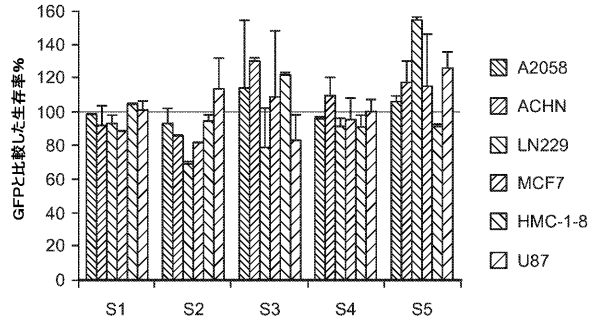


FIG. 5B

【 図 5 C 】

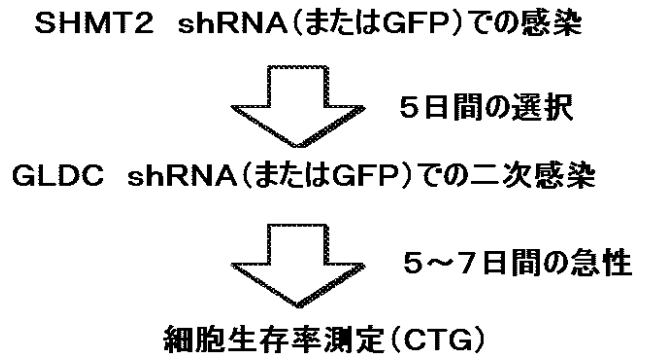


FIG. 5C

【 図 5 D 】

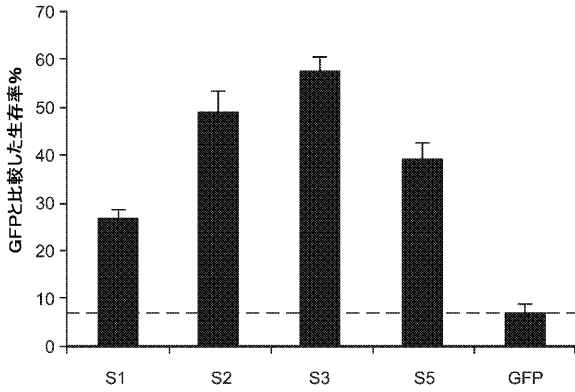


FIG. 5D

【図 1 A】

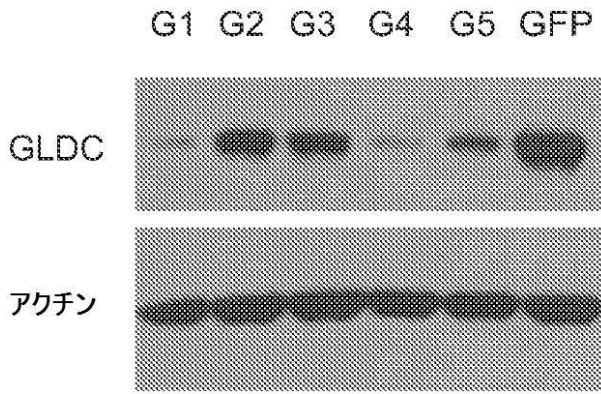


FIG. 1A

【図 3 B】

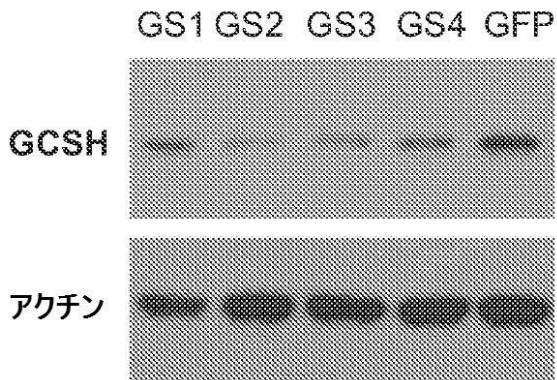


FIG. 3B

【 図 4 】

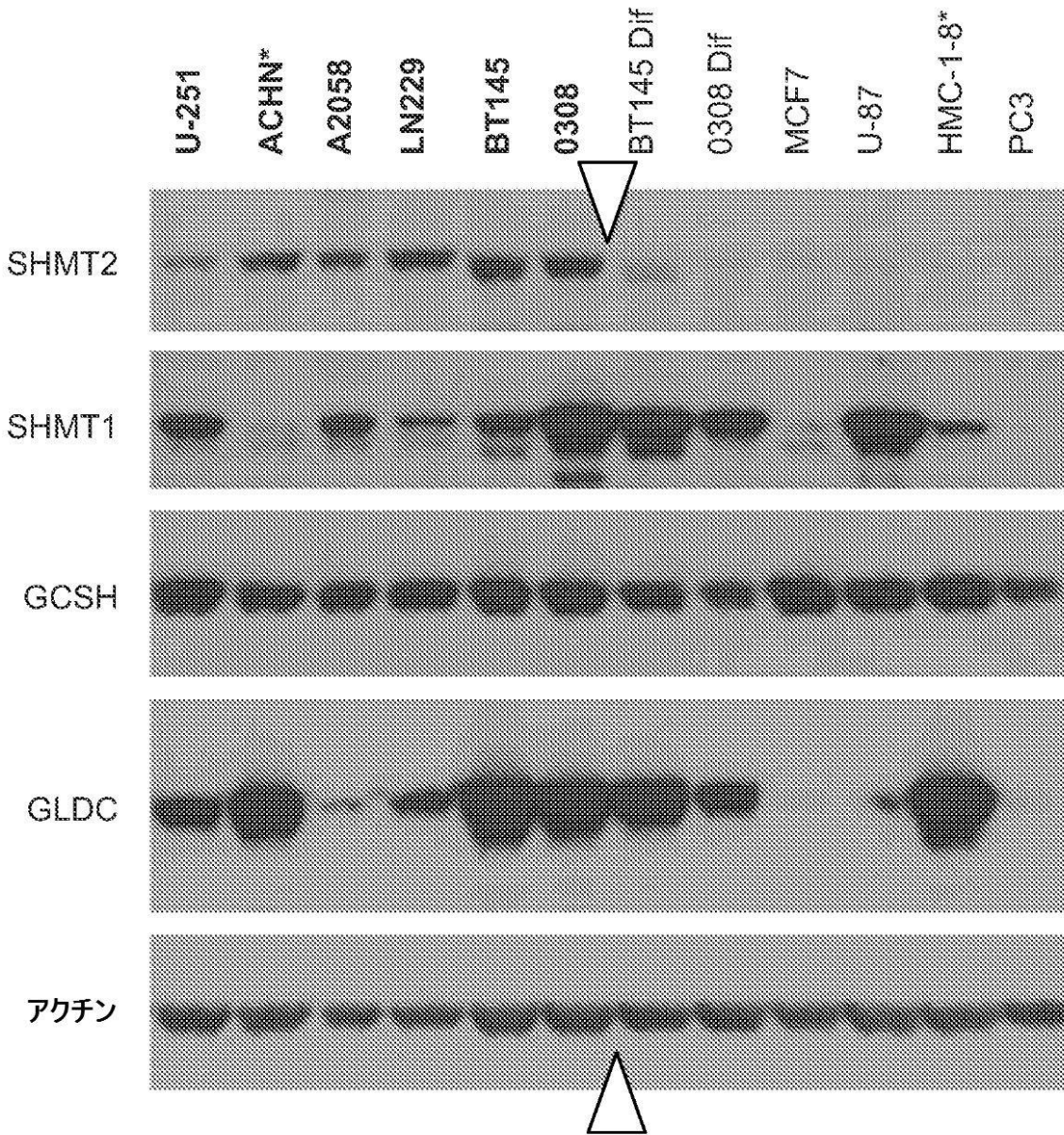


FIG. 4

【 図 5 A 】

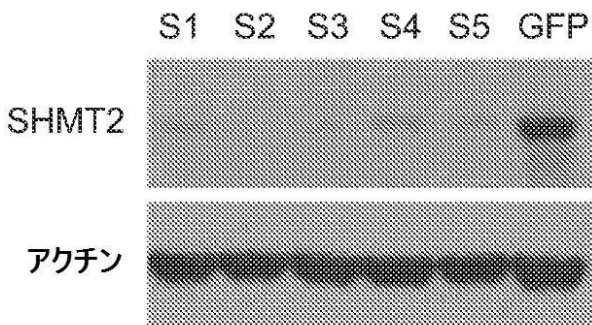


FIG. 5A

【 図 5 E 】

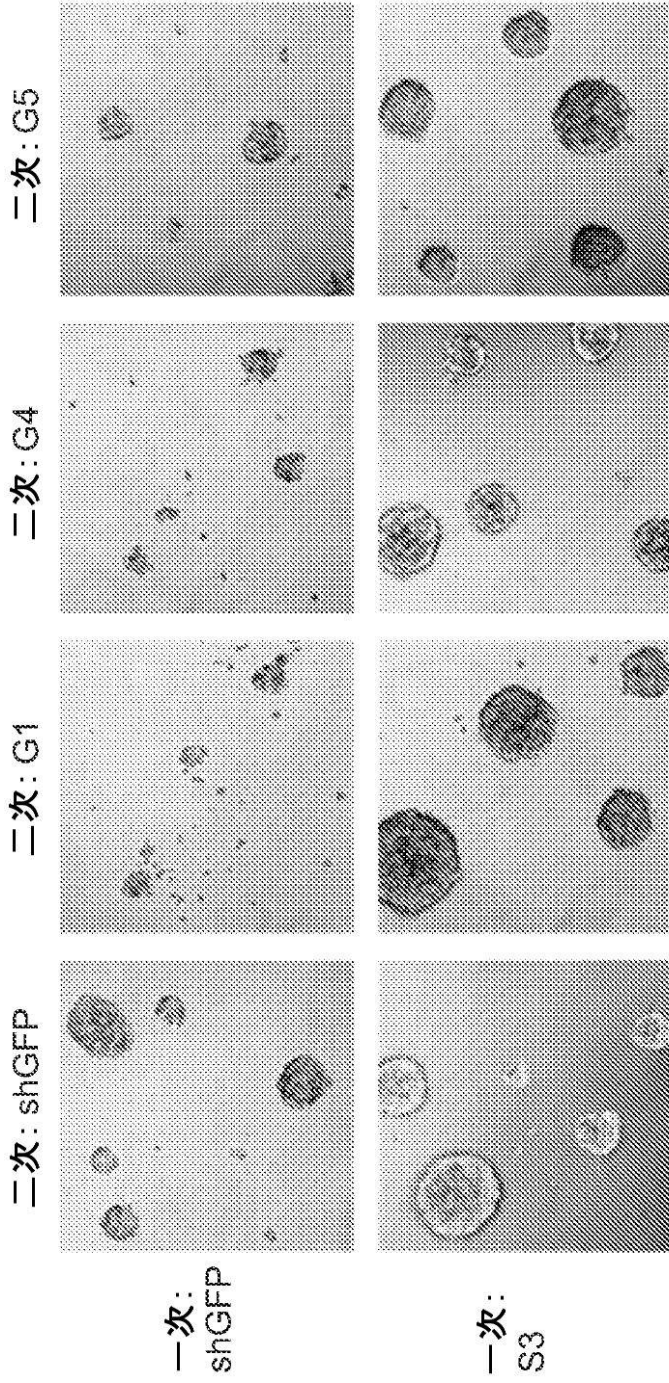
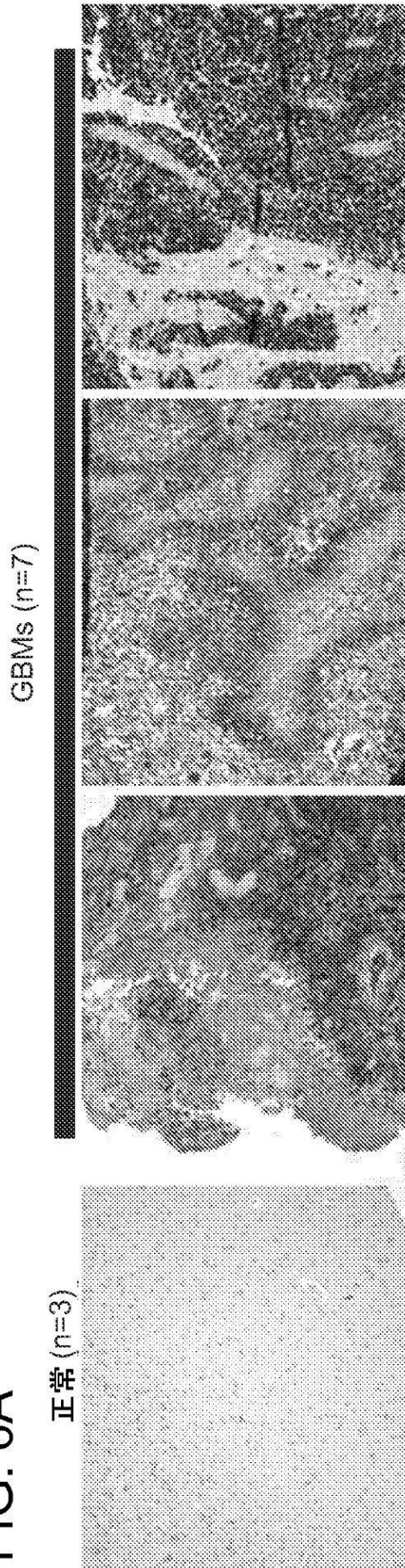


FIG. 5E

【 図 6 A 】

FIG. 6A



【 図 6 B 】

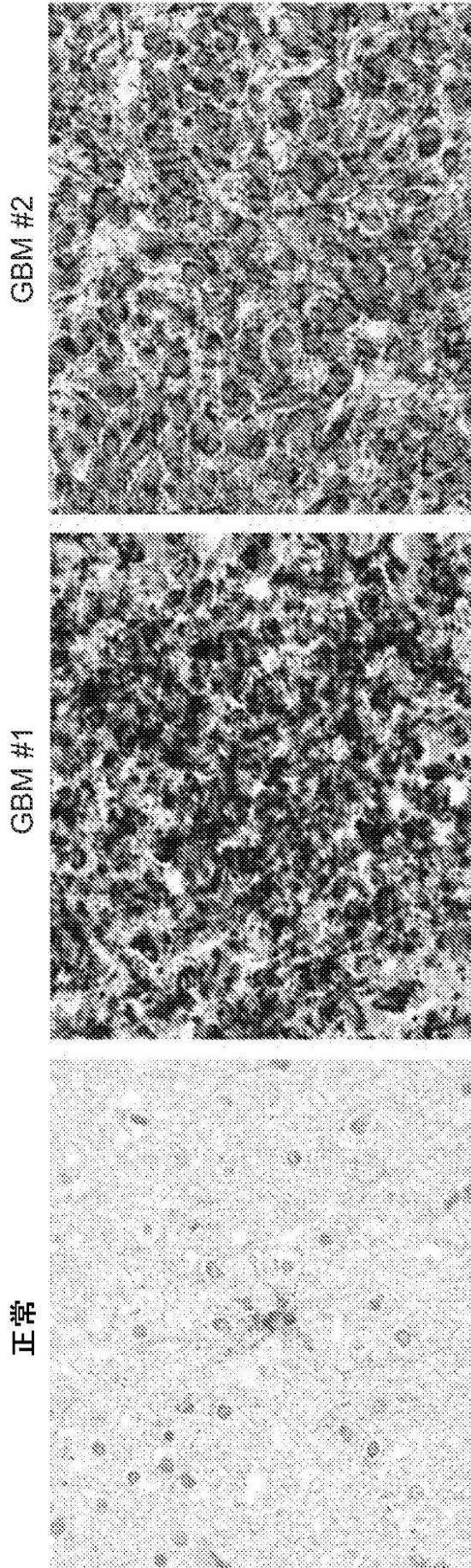


FIG. 6B

【 配列表 】

2015509489000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成26年10月9日(2014.10.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

一部の態様において、本開示は、GCS阻害剤による処置に適した候補である対象を同定する方法であって、前記対象から得られた腫瘍試料におけるSHMT2発現を評価するステップを含む方法を提供する。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

腫瘍細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、前記細胞をグリシン開裂系(GCS)の阻害剤と接触させるステップを含む方法。

(項目2)

前記腫瘍細胞が、対照細胞と比較してセリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ2(SHMT2)を過剰発現する、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記腫瘍細胞が、脳腫瘍細胞、膀胱腫瘍細胞、乳房腫瘍細胞、頸部腫瘍細胞、結腸直腸腫瘍細胞、胚性腫瘍細胞、胃腫瘍細胞、生殖細胞腫瘍細胞、頭頸部腫瘍細胞、血液系腫瘍細胞、腎臓腫瘍細胞、メラノーマ細胞、中皮腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、卵黄嚢腫瘍細胞または肉腫細胞である、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記腫瘍細胞が、多形神経膠芽腫(GBM)細胞である、項目1に記載の方法。

(項目5)

前記腫瘍細胞が、腫瘍幹細胞である、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記腫瘍細胞が、ヒト腫瘍細胞である、項目1に記載の方法。

(項目7)

前記GCS阻害剤が、低分子を含む、項目1に記載の方法。

(項目8)

前記GCS阻害剤が、RNAi剤を含む、項目1に記載の方法。

(項目9)

前記GCS阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、アナログもしくはプロドラッグを含む、項目1に記載の方法。

(項目10)

前記GCS阻害剤が、グリシン脱水素酵素(GLDC)阻害剤である、項目1に記載の方法。

(項目11)

前記GCS阻害剤が、グリシン開裂系タンパク質H(GCSH)阻害剤である、項目1に記載の方法。

(項目12)

前記腫瘍細胞が、対象中に存在する、項目1に記載の方法。

(項目13)

SHMT2を過剰発現する細胞の増殖または生存を阻害する方法であって、前記細胞をGCSの阻害剤と接触させるステップを含む方法。

(項目14)

前記細胞が、腫瘍細胞である、項目13に記載の方法。

(項目15)

候補抗腫瘍剤を同定する方法であって、被験薬剤が、GCS構成成分に結合するもしくはGCS構成成分を阻害するかまたはGCSを阻害するかどうかを決定するステップを含み、前記被験薬剤がGCS構成成分に結合するもしくはGCS構成成分を阻害するまたはGCSを阻害する場合、前記被験薬剤が候補抗腫瘍剤として同定される方法。

(項目16)

(a) 1種または複数のGCS構成成分を用意するステップと、(b) 被験薬剤を用意するステップと、(c) 前記被験薬剤が、前記GCS構成成分の1種または複数に結合するかまたは前記GCS構成成分の1種または複数に阻害するかどうかを決定するステップとを含む、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記GCS構成成分が、組換えにより産生されたポリペプチドである、項目16に記載の方法。

(項目18)

前記被験薬剤が、低分子である、項目15に記載の方法。

(項目19)

ハイスループットスクリーニングを含む、項目15に記載の方法。

(項目20)

少なくとも1,000種の被験薬剤を検査するステップを含む、項目15に記載の方法。

(項目21)

前記被験薬剤が、GCS構成成分の酵素活性を阻害するかどうかを決定するステップを含む、項目15に記載の方法。

(項目22)

前記被験薬剤が、GLDCに結合するかまたはGLDCを阻害するかどうかを決定するステップを含む、項目15に記載の方法。

(項目23)

前記被験薬剤が、GCSHに結合するかまたはGCSHを阻害するかどうかを決定するステップを含む、項目15に記載の方法。

(項目24)

前記被験薬剤が、腫瘍細胞の増殖もしくは生存を阻害するかまたは腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、項目15に記載の方法。

(項目25)

前記被験薬剤が、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞の増殖もしくは生存を阻害するかまたはSHMT2を過剰発現する腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、項目15に記載の方法。

(項目26)

前記被験薬剤が、非腫瘍細胞に対するその効果と比較して、腫瘍細胞の増殖または生存を選択的に阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、項目15に記載の方法。

(項目27)

前記被験薬剤が、非腫瘍細胞に対するその効果と比較して、SHMT2を過剰発現する腫瘍細胞の増殖または生存を選択的に阻害するかどうかを決定するステップをさらに含む、項目15に記載の方法。

(項目28)

前記被験薬剤を、腫瘍を患っている対象に投与するステップをさらに含む、項目15に記載の方法。

(項目29)

変更された被験薬剤を産生するステップと、前記変更された被験薬剤が、GCS構成成分を阻害するか、GCSを阻害するか、腫瘍細胞の生存もしくは増殖を阻害するか、また

は腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害する能力を評価するステップとをさらに含む、項目 15 に記載の方法。

(項目 30)

変更された被験薬剤を産生するステップと、前記変更された被験薬剤が、GCS 構成成分を阻害するか、GCS を阻害するか、SHMT2 を過剰発現する腫瘍細胞の生存もしくは増殖を阻害するか、または SHMT2 を過剰発現する腫瘍の維持、成長もしくは転移を阻害する能力を評価するステップとをさらに含む、項目 15 に記載の方法。

(項目 31)

抗腫瘍剤を同定する方法であって、(a) 腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍を GCS 阻害剤と接触させるステップと、(b) 前記腫瘍細胞または腫瘍の生存、増殖、成長または転移が阻害されたかどうかを決定するステップとを含み、前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の生存、増殖、成長または転移が阻害された場合、前記 GCS 阻害剤が抗腫瘍剤である方法。

(項目 32)

ステップ (b) が、(a) の前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の生存、増殖、成長または転移を対照値と比較することを含み、(a) の前記腫瘍細胞または腫瘍の生存、増殖、成長または転移が対照値と比較して低下している場合、前記 GCS 阻害剤が抗腫瘍剤として同定される、項目 31 に記載の方法。

(項目 33)

前記腫瘍細胞または腫瘍が、SHMT2 を過剰発現する、項目 31 に記載の方法。

(項目 34)

前記対照値が、前記 GCS 阻害剤と接触されなかった場合の前記腫瘍細胞、腫瘍細胞株または腫瘍の生存、増殖、成長または転移を表す、項目 31 に記載の方法。

(項目 35)

腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、GCS 阻害に対し感受性である見込みを予測する方法であって、(a) 前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、SHMT2 を過剰発現するかまたは SHMT2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型に属するかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、SHMT2 を過剰発現する場合または SHMT2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型に属する場合、腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、SHMT2 を過剰発現しない場合または SHMT2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型に属さない場合よりも、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、GCS 阻害に対し感受性である見込みが増加している方法。

(項目 36)

腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、SHMT2 を過剰発現するかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、SHMT2 を過剰発現する場合、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、SHMT2 を過剰発現しない場合よりも、前記腫瘍、腫瘍細胞または腫瘍細胞株が、GCS 阻害に対し感受性である見込みが増加している、項目 35 に記載の方法。

(項目 37)

腫瘍または腫瘍細胞株が SHMT2 を過剰発現するかどうかを決定するステップが、(a) 前記腫瘍または腫瘍細胞株から得られた試料における SHMT2 遺伝子産物のレベルを決定することと、(b) 前記レベルを SHMT2 遺伝子産物の対照レベルと比較することとを含み、(a) において決定された前記レベルが前記対照レベルを超える場合、(a) において決定された前記レベルが前記対照レベルを超えない場合よりも、前記腫瘍または腫瘍細胞株が、GCS 阻害に対し感受性である見込みが増加している、項目 35 に記載の方法。

(項目 38)

SHMT2 遺伝子産物の前記対照レベルが、非腫瘍組織または非腫瘍細胞における前記遺伝子産物のレベルである、項目 35 に記載の方法。

(項目 39)

前記 S H M T 2 遺伝子産物が、S H M T 2 R N A または S H M T 2 ポリペプチドである、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 4 0)

腫瘍が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップが、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して、前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うことを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 4 1)

腫瘍が S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップが、前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫であるかどうかを決定することを含む、項目 3 5 に記載の方法。

(項目 4 2)

G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加した腫瘍細胞または腫瘍を同定する方法であって、前記腫瘍細胞または腫瘍における S H M T 2 の発現を評価するステップを含み、前記腫瘍細胞または腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する場合、S H M T 2 が過剰発現されていない場合よりも、前記腫瘍細胞または腫瘍が、G C S 阻害に対し感受性である見込みが増加している方法。

(項目 4 3)

前記腫瘍細胞または腫瘍における S H M T 2 遺伝子産物のレベルを評価するステップを含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うステップを含み、I H C が、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して行われる、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 5)

腫瘍のための処置を必要とする対象が、G C S 阻害剤による処置に適した候補であるかどうかを決定する方法であって、前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現するかまたは S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップを含み、前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する場合または S H M T 2 を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである場合、前記対象が、G C S 阻害剤による処置に適した候補である方法。

(項目 4 6)

前記腫瘍が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するステップが、(a) 前記腫瘍から得られた試料における S H M T 2 遺伝子産物のレベルを決定することを含む、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記レベルを S H M T 2 遺伝子産物の対照レベルと比較するステップをさらに含み、(a) において決定された前記レベルが、前記対照レベルを超える場合、前記対象が、G C S 阻害剤による処置に適した候補である、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

S H M T 2 遺伝子産物の前記対照レベルが、非腫瘍組織または非腫瘍細胞における前記遺伝子産物のレベルである、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

前記 S H M T 2 遺伝子産物が、S H M T 2 R N A または S H M T 2 ポリペプチドである、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 5 0)

前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学 (I H C) を行うステップを含み、I H C が、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を使用して行われる、項目 4 6 に記載の方法。

(項目51)

前記腫瘍が、SHMT2の過剰発現を起こし易い腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップが、前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫であるかどうかを決定することを含む、項目45に記載の方法。

(項目52)

腫瘍のための処置を必要とする対象のための治療剤を選択する方法であって、(a)前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現するかまたはSHMT2を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものであるかどうかを決定するステップと、(b)前記対象のための治療剤を、ステップ(a)の結果の少なくとも一部に基づき選択するステップとを含む方法。

(項目53)

前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現する場合またはSHMT2を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである場合、ステップ(b)が、治療剤としてGCS阻害剤を選択することを含む、項目52に記載の方法。

(項目54)

ステップ(a)が、前記腫瘍から得られた試料において免疫組織化学(IHC)を行うことを含み、IHCが、SHMT2ポリペプチドに結合する抗体を使用して行われる、項目52に記載の方法。

(項目55)

腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、前記対象にGCS阻害剤を投与するステップを含む方法。

(項目56)

前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現する、項目55に記載の方法。

(項目57)

前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現する傾向を有する腫瘍型のものである、項目55に記載の方法。

(項目58)

前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現することを決定するステップを含む、項目55に記載の方法。

(項目59)

前記腫瘍から得られた試料においてIHCを行うことにより、前記腫瘍が、SHMT2を過剰発現することを決定するステップを含む、項目55に記載の方法。

(項目60)

前記腫瘍が、前記GCSの阻害に対し感受性であることを決定するステップを含む、項目55に記載の方法。

(項目61)

前記対象が、前記腫瘍を処置するためのGCS阻害剤による処置に適した候補であることを決定するステップを含む、項目55に記載の方法。

(項目62)

前記GCS阻害剤が、RNAi剤を含む、項目55に記載の方法。

(項目63)

前記GCS阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、アナログもしくはプロドラッグを含む、項目55に記載の方法。

(項目64)

前記GCS阻害剤が、GLDC阻害剤である、項目55に記載の方法。

(項目65)

前記GCS阻害剤が、GCSH阻害剤である、項目55に記載の方法。

(項目66)

前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫

瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記腫瘍が、G B M である、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 8)

放射線療法を前記対象に施すステップをさらに含む、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 6 9)

第 2 の抗腫瘍剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 7 0)

腫瘍のための処置を必要とする対象を処置する方法であって、(a) 対象が、S H M T 2 を過剰発現する腫瘍を有することを決定するステップと、(b) 前記対象を G C S 阻害剤により処置するステップとを含む方法。

(項目 7 1)

前記腫瘍が S H M T 2 を過剰発現することを決定するステップが、前記腫瘍から得られた試料において I H C を行うことを含む、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記 G C S 阻害剤が、R N A i 剤を含む、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 3)

前記 G C S 阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、プロドラッグもしくはアナログを含む、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記 G C S 阻害剤が、G L D C 阻害剤である、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記 G C S 阻害剤が、G C S H 阻害剤である、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 6)

前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 7)

前記腫瘍が、G B M である、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 8)

放射線療法を使用して前記対象を処置するステップをさらに含む、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 7 9)

第 2 の抗腫瘍剤により前記対象を処置するステップをさらに含む、項目 7 0 に記載の方法。

(項目 8 0)

腫瘍のための処置を必要とする対象をモニターする方法であって、(a) 前記対象に G C S 阻害剤を投与するステップと、(b) 投与後の 1 または複数の時点において前記対象をモニターするステップとを含む方法。

(項目 8 1)

前記腫瘍が、S H M T 2 を過剰発現する、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 2)

前記 G C S 阻害剤が、R N A i 剤を含む、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 3)

前記 G C S 阻害剤が、システアミンまたはシステアミンの塩、プロドラッグもしくはアナログを含む、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記 G C S 阻害剤が、G L D C 阻害剤である、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記 G C S 阻害剤が、G C S H 阻害剤である、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 6)

前記腫瘍が、脳腫瘍、膀胱腫瘍、乳房腫瘍、頸部腫瘍、結腸直腸腫瘍、胚性腫瘍、胃腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭頸部腫瘍、血液系腫瘍、腎臓腫瘍、メラノーマ、中皮腫瘍、卵巣腫瘍、卵黄嚢腫瘍または肉腫である、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記腫瘍が、G B M である、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 8)

放射線療法を使用して前記対象を処置するステップをさらに含む、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 8 9)

第 2 の抗腫瘍剤により前記対象を処置するステップをさらに含む、項目 8 0 に記載の方法。

(項目 9 0)

(a) 有効量の G C S 阻害剤と、(b) 薬学的に許容される担体とを含む、抗腫瘍療法のための医薬組成物。

(項目 9 1)

腫瘍の処置のための対象への投与に適切な量で G C S 阻害剤を含む単位剤形。

(項目 9 2)

(a) G C S 阻害剤と、(b) 第 2 の抗腫瘍剤とを含む組成物。

(項目 9 3)

(a) S H M T 2 遺伝子産物に結合する試薬と、(b) (i) 腫瘍が S H M T 2 を過剰発現するかどうかを決定するために前記試薬を使用するための説明書、(i i) 検出試薬および (i i i) 対照試薬からなる群から選択される少なくとも 1 種の物品とを含むキット。

(項目 9 4)

(a) の前記試薬が、S H M T 2 ポリペプチドに結合する抗体を含む、項目 9 3 に記載のキット。

(項目 9 5)

(a) の前記試薬が、S H M T 2 ポリペプチドをコードする m R N A に結合するプローブまたはプライマーを含む、項目 9 3 に記載のキット。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 2 8 8

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 2 8 8 】

G C S H m R N A 中の次の配列を標的化する s h R N A を使用した：

【 化 6 】

GS1: CGTTGGGAGATGTTGTTTATT (配列番号 6)

GS2: GTGCGTAAATTCACAGAGAAA (配列番号 7)

GS3: GTGAACTCTATTCTCCTTAT (配列番号 8)

GS4: GATGAACTTATGAGTGAAGAA (配列番号 9)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 2013/025601
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>A61K 31/145 (2006.01)</i> <i>A61K 31/7088 (2006.01)</i> <i>A61K 45/06 (2006.01)</i> <i>A61P 35/00 (2006.01)</i> <i>G01N 33/53 (2006.01)</i>		
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) A61K 31/13, 31/131, 31/145, 31/7088, 45/06, A61P 35/00, G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) "Rossiyskaya meditsina", DWPI, EAPATIS, Esp@cenet, MEDLINE, PAJ, PatSearch (RUPTO internal), RUPTO, USPTO, WIPO		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101797242 A (UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY OF CHINA) 11.08.2010, abstract, examples, claims	1, 3, 4, 6, 7, 9, 10, 12-14, 31-32, 34, 55, 60-61, 63-64, 66-69, 80, 83-84, 86-89, 90-92
Y		2, 5, 8, 33, 56-59, 62, 68, 70-79, 81-82, 85, 88
X	XIAO-MEI WAN et al. Autophagy-mediated chemosensitization by cysteamine in cancer cells. International Journal of Cancer, 2011, Vol. 129, Issue 5, pp. 1087-1095	1, 3, 6, 7, 9, 10, 12-14, 31, 32, 34, 55, 60-61, 63-64, 66, 69, 80, 83-84, 86, 89-90, 92
X	JEITNER T.M. et al. "Inhibition of the proliferation of human neural neoplastic cell lines by cysteamine". Cancer Lett., 1996, 103(1): pp. 85-90, (abstract), Medline [online] [retrieved on 17.05.2013]. Retrieved from the PubMed, PMID: 8616813	1, 7, 9, 10, 13-14
X	WO 2004/024129 A1 (CHACHOUA SAMIR) 25.03.2004, abstract, claims	1, 6, 7, 9, 12-14, 55, 63, 64
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 May 2013 (16.05.2013)		Date of mailing of the international search report 30 May 2013 (30.05.2013)
Name and mailing address of the ISA/ FIPS Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezhkovskaya nab., 30-1		Authorized officer K. Savchenko
Facsimile No. +7 (499) 243-33-37		Telephone No. (495)531-65-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 2013/025601

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2011/031308 A1 (CYTOKINETICS, INCORPORATED et al.) 17.03.2011, claims 1, 2, 10, 11, 12, paragraph [0008]	1, 3, 6, 11, 12-14, 55, 65, 66, 69, 90, 92 22-23, 75, 85
X Y	WO 2008/133292 A1 (NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL INNOVATION et al.) 06.11.2008, abstract BD Derwent	52-54, 93-95 42-51
X Y	ZHANG WC. et al. Glycine Decarboxylase Activity Drives Non-Small Cell Lung cancer Tumor-Initiating Cells and Tumorigenesis. Cell., 2012, January 20, Vol. 148, pp.259-272, especially, p. 263, right col., p. 266, right col., p. 270, left col., lines 34 - 42, right col., lines 24 - 33	15-21, 24-30, 35-41 2, 5, 22, 23, 33, 42-51, 56-59, 70-79, 81
Y	PAI SI. et al. "Prospects of RNA interference therapy for cancer" Gene Therapy, 2006, Vol.13(6), pp. 464-477, (abstract), Medline [online] [retrieved on 17.05.2013]. Retrieved from the PubMed, PMID: 16341059	8, 62, 72, 82
A	WO 2000/066110 (MERCK PATENT GMBH et al.) 09.11.2000, claims 1, 4	1-95
A	HAYASAKA K. et al. "Effects of the metabolites of the branched-chain amino acids and cysteamine on the glycine cleavage system" Biochem. Int., 1983, 6(2), pp. 225-230, (abstract), Medline [online] [retrieved on 17.05.2013]. Retrieved from the PubMed, PMID: 6679320	1-95
A	LEIVONEN S.K. et al. "Identification of miR-193b Targets in Breast Cancer cells and Systems Biological Analysis of Their Functional Impact". Molecular & Cellular Proteomics, 2011, 10(7), (abstract), Medline [online] [retrieved on 20.05.2013]. Retrieved from the PubMed, PMID:21512034	1-95

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 41/00 (2006.01)	A 6 1 K 41/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	Z N A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 3
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/573 (2006.01)	G 0 1 N 33/573	A
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	P
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/53	M

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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ドフーン, キム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 3, サマービル, ハイランド アベニュー 2
7 0, アpartment 1 2

(72)発明者 サバティーニ, デイビッド エム.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, サレー ストリート 1 2

(72)発明者 ポセマト, リチャード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 5, ブライトン, ノッティングヒル ロード
ナンバー 1 1 4 1

F ターム(参考) 2G045 AA26 BB24 CB01 DA14 DA20 DA36 FB02 FB03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR35

QR36 QR42 QR50 QR55 QR62 QR66 QR72 QR77 QS10 QS25

QS28 QS34 QS36 QS39 QX02

4C084 AA11 AA17 NA14 ZB26 ZC20

4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC20

4C206 AA01 AA02 JA25 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC20

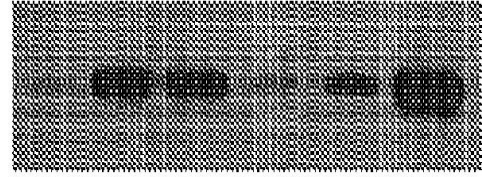
专利名称(译)	抑制甘氨酸裂解系统用于癌症治疗		
公开(公告)号	JP2015509489A	公开(公告)日	2015-03-30
申请号	JP2014556787	申请日	2013-02-11
申请(专利权)人(译)	怀特黑德生物医学研究所		
[标]发明人	ドフーンキム サバティーニデイビッドエム ポセマトリチャード		
发明人	ドフーン, キム サバティーニ, デイビッド エム. ポセマト, リチャード		
IPC分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K31/7105 A61K31/713 A61K31/145 A61K41/00 A61P43/00 C12Q1/04 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N37/00 G01N33/574 G01N33/573 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/145 A61K31/7088 A61K45/06 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/57407 G01N2333/91028 A61K2300/00 A61N5/1001 A61N5/1077 A61N2005/1087 A61N2005/1089 A61N2005/109 C12N15 /1137 C12N2310/14 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/5011 G01N33/573 G01N2500/04 G01N2800/52		
FI分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61K31/7105 A61K31/713 A61K31/145 A61K41/00 A61P43/00.111 C12Q1/04. ZNA C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N37/00.103 G01N33/574.A G01N33/573.A G01N33 /48.P G01N33/53.Y G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045 /FB03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063 /QR62 4B063/QR66 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS10 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA11 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084 /ZC20 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/JA25 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206 /ZB26 4C206/ZC20		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/597550 2012-02-10 US		
其他公开文献	JP2015509489A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在一些方面, 提供了抑制肿瘤细胞存活或增殖的方法, 所述方法包括抑制肿瘤细胞的甘氨酸切割系统 (GCS)。在一些方面, 治疗需要治疗肿瘤的受试者的方法, 所述方法包括抑制肿瘤中的GCS。在一些实施方案中, 所述方法包括使肿瘤细胞或肿瘤与GCS抑制剂接触。在一些实施方案中, 肿瘤细胞或肿瘤具有升高的丝氨酸羟甲基转移酶2 (SH1VIT2) 的表达。在一些方面, 提供了鉴定对抑制GCS敏感的肿瘤细胞或肿瘤的方法, 所述方法包括确定肿瘤细胞或肿瘤是否过表达SHMT2。在一些方面, 提供了鉴定候选抗癌剂的方法, 所述方法包括鉴定或修饰GCS抑制剂。

G1 G2 G3 G4 G5 GFP

GLDC



actin

