

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6463685号
(P6463685)

(45) 発行日 平成31年2月6日 (2019.2.6)

(24) 登録日 平成31年1月11日 (2019.1.11)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
請求項の数 84 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-538225 (P2015-538225)	(73) 特許権者	514017714
(86) (22) 出願日	平成25年10月30日 (2013.10.30)		パシレックス・ファーマシューティカルズ
(65) 公表番号	特表2016-506362 (P2016-506362A)		・インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成28年3月3日 (2016.3.3)		カナダ・アルバータ・T 5 J・3 Y 2・エ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2013/050821		ドモントン・101ストリート・1018
(87) 国際公開番号	W02014/067002		0・マヌライフ・プレイス・2600
(87) 国際公開日	平成26年5月8日 (2014.5.8)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成28年10月3日 (2016.10.3)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	61/720, 218	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成24年10月30日 (2012.10.30)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100133400
(31) 優先権主張番号	61/870, 418		弁理士 阿部 達彦
(32) 優先日	平成25年8月27日 (2013.8.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 合成致死性および癌の治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

NMT2合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT2のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害によって定義される、NMT2に欠陥がある癌を有する対象を治療するための組成物であって、NMT1阻害剤およびドキソルビシンを含み、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

【請求項 2】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンスト্রেーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

前記対象がヒト対象である、請求項1または2に記載の組成物。

10

20

【請求項4】

対象由来のサンプルが、NMT2合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT2のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害によって定義される、ならびに、前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する分析の結果によって定義される、NMT2に欠陥がある場合、対象に投与するための、NMT1阻害剤およびドキシソルビシンを含む、癌を有する対象を治療するための組成物であって、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

【請求項5】

癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを処理する工程、
処理サンプルとNMT2タンパク質に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間で複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらし結合アッセイを実施する工程を含み、
対照と比較して、前記サンプル中のNMT2タンパク質の量が少ないまたは存在しないとき、前記対象への組成物の投与が示される方法によって、対象を治療するための、NMT1阻害剤およびドキシソルビシンを含む組成物であって、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

10

【請求項6】

対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析が、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらし結合アッセイを実施する工程を含む、請求項4に記載の組成物。

20

【請求項7】

前記結合アッセイが蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む、請求項5または6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項8】

前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項5から7のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項9】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイスまたは電気化学デバイスである、請求項8に記載の組成物。

【請求項10】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巢明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巢癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項4から9のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項11】

前記対象がヒトである、請求項4から10のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項12】

癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを処理する工程、
処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検

50

出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含み、
 対照と比較して、前記サンプル中のNMT2核酸に対する量が少ないまたは存在しないとき、
 前記対象への組成物の投与が示される方法によって対象を治療するための、NMT1阻害剤およびドキシソルビシンを含む組成物であって、
 前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
 組成物。

【請求項 1 3】

対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析が、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含む、請求項4に記載の組成物。

10

【請求項 1 4】

前記結合アッセイが、検出可能に標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイを含む、請求項12または13に記載の組成物。

【請求項 1 5】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが定量的または半定量的である、請求項14に記載の組成物。

【請求項 1 6】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが、RT-PCR、in situハイブリダイゼーション、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅である、請求項15に記載の組成物。

20

【請求項 1 7】

サンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項16に記載の組成物。

【請求項 1 8】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイスまたは電気化学デバイスである、請求項17に記載の組成物。

30

【請求項 1 9】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項11から18のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項 2 0】

前記対象がヒトである、請求項12から19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 1】

癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを処理する工程、
 処理サンプルとサンプル内のミリスティル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリスティル化タンパク質に結合する抗体を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とミリスティル化タンパク質の間に複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのミリスティル化プロファイルをもたらす結合アッセイを実施する工程を含み、

50

対照と比較して、前記ミリストイル化プロファイルが、前記癌が、NMT2合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT2のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害によって定義される、NMT2に欠陥があることを示すとき、前記対象への組成物の投与が示される方法によって対象を治療するための、NMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物であって、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

【請求項 2 2】

前記処理が ω -アルキニル-ミリステートおよびデスチオビオチンアジド-PEGビオチンで前記サンプルを処置する工程を含む、請求項21に記載の組成物。

10

【請求項 2 3】

前記結合アッセイが、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノプロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む、請求項21または22に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項23に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイスまたは電気化学デバイスである、請求項24に記載の組成物。

20

【請求項 2 6】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項21から25のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 2 7】

前記対象がヒトである、請求項23から26のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 2 8】

NMT2合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT2のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害によって定義されるNMT2に欠陥がある癌を有する対象を治療するためのNMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物であって、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

40

【請求項 2 9】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮

50

癌である、請求項28に記載の組成物。

【請求項30】

前記対象がヒト対象である、請求項28または29に記載の組成物。

【請求項31】

癌を有する対象を治療するためのNMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物であって、対照と比較して、前記対象由来のサンプル中のNMT2タンパク質の量が少ないまたは存在しないとき、前記組成物の使用が示され、前記対象由来の処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間で複合体を形成する工程を含む結合アッセイが、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす、前記アッセイ結果が前記サンプル中の前記NMT2タンパク質の量を示し、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

10

【請求項32】

対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析が、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含む、請求項31に記載の組成物。

【請求項33】

前記結合アッセイが、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む、請求項31または32に記載の組成物。

20

【請求項34】

前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項31から33のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項35】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイスまたは電気化学デバイスである、請求項34に記載の組成物。

【請求項36】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項28から35のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項37】

前記対象がヒトである、請求項28から36のいずれか一項に記載の組成物。

40

【請求項38】

癌を有する対象を治療するためのNMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物であって、対照と比較して、前記対象由来のサンプル中のNMT2核酸の量が少ないまたは存在しないとき、前記組成物の使用が示され、前記対象由来の処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させて前記サンプルにおいて検出可能な標識とNMT2核酸の間で複合体を形成する工程を含む結合アッセイが、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

50

【請求項 39】

対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析が、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間で複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含む、請求項38に記載の組成物。

【請求項 40】

前記結合アッセイが、検出可能状態で標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイを含む、請求項38または39に記載の組成物。

【請求項 41】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが定量的または半定量的である、請求項40に記載の組成物。

10

【請求項 42】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが、RT-PCR、in situハイブリダイゼーション、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅である、請求項41に記載の組成物。

【請求項 43】

サンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項41に記載の組成物。

20

【請求項 44】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイスまたは電気化学デバイスである、請求項43に記載の組成物。

【請求項 45】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巢明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巢癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項39から44のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 46】

前記対象がヒトである、請求項39から45のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 47】

癌を有する対象を治療するためのNMT1阻害剤およびドキシソルビシンを含む組成物であって、対照と比較して、前記対象由来のサンプルからのミリストイル化プロファイルが、前記癌がNMT2合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT2のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害によって定義される、NMT2に欠陥があることを示すとき、前記組成物の使用が示され、処理サンプルとサンプル内のミリストイル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリストイル化タンパク質に結合する抗体を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とミリストイル化タンパク質の間で複合体を形成する工程を含む結合アッセイが、前記複合体を示す少なくとも1つのミリストイル化プロファイルをもたらす、かつ、前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、組成物。

40

【請求項 48】

前記処理がアルキニル-ミリステートおよびデスチオビオチンアジド-PEGビオチンで前

50

記サンプルを処置する工程を含む、請求項47に記載の組成物。

【請求項49】

前記結合アッセイが、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む、請求項47または48に記載の組成物。

【請求項50】

前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項49に記載の組成物。

10

【請求項51】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである、請求項50に記載の組成物。

【請求項52】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項47から51のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項53】

前記対象がヒトである、請求項48から52のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項54】

NMT1阻害剤およびドキシソルビシンを含む組成物で治療するのに適した対象を同定するための方法であって、
癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを処理する工程、
処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間の複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含み、
対照と比較して、前記サンプル中のNMT2タンパク質の量が少ないまたは存在しないとき、前記組成物を用いた治療が示される方法であって、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
方法。

30

【請求項55】

対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析が、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含む、請求項54に記載の方法。

40

【請求項56】

前記結合アッセイが、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む、請求項54または55に記載の方法。

【請求項57】

前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項54から56のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項58】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項54から58のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項60】

前記対象がヒトである、請求項54から59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

NMT1阻害剤およびドキシソルビシンを含む組成物で治療するのに適した対象を同定するための方法であって、
癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを処理する工程、
処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含み、
対照と比較して、前記サンプル中のNMT2核酸に対する量が少ないまたは存在しないとき、
前記対象への前記組成物の投与が示され、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
方法。

20

【請求項62】

対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析が、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施する工程を含む、請求項61に記載の方法。

30

【請求項63】

前記結合アッセイが、検出可能に標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが定量的または半定量的である、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが、RT-PCR、in situハイブリダイゼーション、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅である、請求項64に記載の方法。

40

【請求項66】

サンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである、請求項66に記載の方法。

50

【請求項 68】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項61から67のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 69】

前記対象がヒトである、請求項61から68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 70】

NMT1阻害剤およびドキシソルピシンを含む組成物で治療するのに適した対象を同定するための方法であって、

癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを処理する工程、
処理サンプルとサンプル内のミリストイル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリストイル化タンパク質に結合する抗体を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とミリストイル化タンパク質の間で複合体を形成する工程を含み、前記複合体を示す少なくとも1つのミリストイル化プロファイルをもたらす結合アッセイを実施する工程を含み

20

、
対照と比較して、前記ミリストイル化プロファイルが、前記癌が、NMT2合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT2のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害によって定義される、NMT2に欠陥があることを示すとき、前記対象への前記組成物の投与が示され、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
方法。

【請求項 71】

前記処理がアルキニル-ミリスレートおよびデスチオビオチンアジド-PEGビオチンで前記サンプルを処置する工程を含む、請求項70に記載の方法。

30

【請求項 72】

前記結合アッセイが、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む、請求項70または71に記載の方法。

【請求項 73】

前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する、請求項72に記載の方法。

【請求項 74】

前記機器が分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである、請求項73に記載の方法。

40

【請求項 75】

前記癌が、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、

50

膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である、請求項70から74のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記対象がヒトである、請求項70から75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

NMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物で治療するのに適した対象を同定するためのキットであって、NMT2に対する抗体、請求項54から60のいずれか一項に記載の方法に従って対象を同定するための説明書を含み、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
キット。

10

【請求項 7 8】

対照をさらに含む、請求項77に記載のキット。

【請求項 7 9】

NMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物で治療するのに適した対象を同定するためのキットであって、NMT2核酸に結合する核酸、請求項61から69のいずれか一項に記載の方法に従って対象を同定するための説明書を含み、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
キット。

【請求項 8 0】

対照をさらに含む、請求項79に記載のキット。

20

【請求項 8 1】

前記NMT2核酸に結合する核酸がRNAまたはDNAである、請求項79に記載のキット。

【請求項 8 2】

NMT1阻害剤およびドキソルビシンを含む組成物で治療するのに適した対象を同定するためのキットであって、ミリスチル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリスチル化タンパク質に結合する抗体、または、クイックケミストリーを用いるためのアルキニル-ミリスチレート、および、アジド-ビオチン、および、NeutrAvidin™-HRP、および請求項70から76のいずれか一項に規定の前記対象を同定するための説明書を含み、
前記NMT1阻害剤が、DDD85646およびDDD86481から選択される、
キット。

30

【請求項 8 3】

対照をさらに含む、請求項82に記載のキット。

【請求項 8 4】

ω-アルキニル-ミリスチレートまたはデスチオビオチンアジド-PEGビオチンをさらに含む、請求項83に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全容が本明細書に組み込まれている、2012年10月30日に出願されたUS61/720,218号、2013年8月27日に出願されたUS61/870,418号、2013年8月27日に出願されたUS61/870,435号に対する優先権を主張するものである。

40

【0002】

本発明の分野は一般に、癌を治療するための化合物、組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

癌はカナダにおける主な死因である。カナダ癌協会(Canadian Cancer Society)は、2011年には約170000の新たな癌症例、および癌の結果として約75000の死が存在すると推測している。

【0004】

50

癌を治療するための新たな手法は、合成致死性の概念に関する。いずれか一方の突然変異は生存率と適合性があるが、両者の突然変異は死をもたらす場合、2つの遺伝子(または2つの遺伝子産物)は合成致死性である。別の言い方をすれば、「合成致死性」は、突然変異と(例えば)薬剤が癌細胞の死を一緒に引き起こすが、突然変異または薬剤の一方が細胞死をもたらすことはない状況を記載する。癌関連突然変異に対して合成致死性である遺伝子(または遺伝子産物)の標的化は癌細胞のみを死滅させ、正常細胞は生存させるはずである。したがって合成致死性は、抗癌性特異的物質の開発の基盤をもたらす。

【0005】

癌を治療するための合成致死性の手法は新しく、大部分は合成致死性遺伝子(および遺伝子産物)を同定できないことが原因で、未だ一般的な手法ではない。

10

【0006】

タンパク質のN-ミリスチル化は、ミリスチン酸(14-炭素鎖飽和脂肪酸)が、様々な細胞、ウイルス、および腫瘍タンパク質(例えば、発癌性Src関連チロシンキナーゼ、ヘテロ三量体Gαサブユニットなど)のNH₂末端グリシンと共有結合した修飾である。

【0007】

細胞ミリスチル化タンパク質には、シグナル変換および発癌において多様な生物学的機能がある。ミリスチル化によるタンパク質の修飾は、細胞増殖において重要なシグナル変換および制御機能に必要とされるものを含めて、真核生物細胞における多くの重要なタンパク質の亜細胞標的化、タンパク質立体配座および生物学的活性に必要とされる。Srcファミリーのチロシンキナーゼ(原型癌遺伝子)は、特に最も広く研究されているミリスチル化タンパク質である。

20

【0008】

タンパク質のミリスチル化はN-ミリスチルトランスフェラーゼ(NMT)によって触媒される。NMTは真核生物細胞中でこの活性を担い、メチオニルアミノペプチダーゼによる開始メチオニン残基の除去後に、そのポリペプチド基質を修飾することによって働く。この修飾は同時翻訳プロセスとして主に起こるが、ミリスチル化は翻訳後、タンパク質のタンパク質分解切断後、典型的にはアポトーシス中に起こる可能性もある。哺乳動物NMT酵素の2つのアイソザイムがクローニングされており、NMT1およびNMT2で明示される。NMTは細胞中で生存促進的役割を果たす。この2つのNMTは全ての正常細胞に存在する。

【0009】

癌を治療するための化合物、組成物および方法が依然必要とされている。

30

【0010】

この背景情報は、本発明とおそらく関係があると本出願人によって考えられる既知の情報を得る目的で与える。任意の前述の情報が本発明に対する従来技術を構成することを必ずしも認めるものではなく、そう解釈すべきでもない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】 J.A.Freearson et al(2010)Nature.464.728~723頁

【非特許文献2】 Raju.R.V.,and Sharma.R.K.(1999)Preparation and assay of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase.Methods Mol Biol 116、193~211頁

40

【非特許文献3】 Towler,D.,and Glaser,L.(1986)Protein fatty acid acylation:enzymatic synthesis of an N-myristoylglycyl peptide.Proc Natl Acad Sci USA83、2812~2816頁

【非特許文献4】 <http://www.bioinformatics.org/primerx/>

【非特許文献5】 <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

【非特許文献6】 King et al.1991、Anal Biochem

【非特許文献7】 Barneda-Zahonero,B.,and M.Parra.2012.Histone deacetylases and cancer.Mol Oncol.6:579~589頁

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の一態様によれば、癌を有する対象を治療するための化合物および組成物を提供する。本明細書に記載する化合物、組成物および方法で治療するのに適した、癌を有する対象を同定するための方法も提供する。

【0013】

一態様によれば、NMT2に欠陥がある癌を有する対象を治療する方法であって、NMT阻害剤を前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0014】

具体的な態様では、前記NMT阻害剤はNMT1阻害剤を含む。

10

【0015】

具体的な態様では、前記NMT1阻害剤は小分子、抗体、ペプチド断片、核酸、またはそれらの組合せを含む。

【0016】

具体的な態様では、前記小分子はトリス-DBA、HMA、またはDDD85646、DDD86481、またはそれらの誘導体を含む。

【0017】

具体的な態様では、前記抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

【0018】

具体的な態様では、前記核酸はdsRNA分子、RNAi分子、miRNA分子、リボザイム、shRNA分子、またはsiRNA分子を含む。

20

【0019】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巢明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巢癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

30

【0020】

具体的な態様では、前記対象はヒト対象である。

【0021】

別の態様によれば、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象を治療するための方法であって、対象由来のサンプルがNMT2を発現するかどうか決定する分析の結果をもたらす試験を要求するステップ、およびサンプルがNMT2に欠陥がある場合NMT1阻害剤を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0022】

別の態様によれば、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含み、場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2タンパク質の量が少ないまたは存在しないとき、前記対象へのNMT1阻害剤の投与が示される方法を提供する。

40

【0023】

別の態様によれば、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2タンパク質に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間で複合体を形成す

50

るステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップ、および場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2タンパク質に対する量が少ないまたは存在しないとき、前記対象にNMT1阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

【0024】

具体的な態様では、対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析は、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含む。

【0025】

具体的な態様では、前記結合アッセイは蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む。

【0026】

具体的な態様では、前記サンプル中において前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

【0027】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0028】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巢明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巢癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

【0029】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0030】

別の態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含み、場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2核酸に対する量が少ないまたは存在しないとき、前記対象へのNMT1阻害剤の投与が示される方法を提供する。

【0031】

別の態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップ、および場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2核酸に対する量が少ないまたは存在しないとき、前記対象にNMT1阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

【0032】

具体的な態様では、対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析は、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含む。

【0033】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、検出可能に標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイを含む。

【0034】

具体的な態様では、前記ハイブリダイゼーションアッセイは定量的または半定量的である。

10

【0035】

具体的な態様では、前記ハイブリダイゼーションアッセイは、RT-PCR、in situハイブリダイゼーション、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅である。

【0036】

具体的な態様では、サンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

20

【0037】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0038】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

30

【0039】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0040】

別の態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとサンプル内のミリストイル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリストイル化タンパク質に結合する抗体を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とミリストイル化タンパク質の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのミリストイル化プロファイルをもたらす結合アッセイを実施するステップを含み、場合によっては対照と比較して、前記ミリストイル化プロファイルが、前記癌がNMT2に欠陥があることを示すとき、前記対象へのNMT1阻害剤の投与が示される方法を提供する。

40

【0041】

別の態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとサンプル内のミリストイル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリストイル化タンパク質に結合する抗体を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とミリストイル化タンパク質の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのミリストイル化プロファイ

50

ルをもたらす結合アッセイを実施するステップを含み、および場合によっては対照と比較して、前記ミリスチル化プロファイルが、前記癌がNMT2に欠陥があることを示すとき、前記対象にNMT1阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

【0042】

具体的な態様では、前記処理はアルキニル-ミリスチレートおよびデスチオビオチンアジド-PEGビオチンで前記サンプルを処置するステップを含む。

【0043】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む。

10

【0044】

具体的な態様では、前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

【0045】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0046】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

20

【0047】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

30

【0048】

別の態様では、NMT2に欠陥がある癌を有する対象を治療するためのNMT阻害剤の使用を提供する。

【0049】

具体的な態様では、前記NMT阻害剤はNMT1阻害剤を含む。

【0050】

具体的な態様では、前記NMT1阻害剤は小分子、抗体、ペプチド断片、核酸、またはそれらの組合せを含む。

【0051】

具体的な態様では、前記小分子はトリス-DBA、HMA、またはDDD85646、DDD86481、またはそれらの誘導体を含む。

40

【0052】

具体的な態様では、前記小分子はDDD86481を含む。

【0053】

具体的な態様では、前記抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。

【0054】

具体的な態様では、前記核酸はdsRNA分子、RNAi分子、miRNA分子、リボザイム、shRNA分子、またはsiRNA分子を含む。

【0055】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性

50

大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンス
トレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大
細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、
プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮
細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巢
明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳
癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巢癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜
腺癌、食道扁平上皮癌である。

【0056】

具体的な態様では、前記対象はヒト対象である。

10

【0057】

別の態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象を治療するためのNMT1
阻害剤の使用であって、場合によっては対照と比較して、前記対象由来のサンプル中のNM
T2タンパク質の量が少ないまたは存在しないとき、前記NMT1阻害剤の使用が示され、結合
アッセイが、前記対象由来の処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプ
ル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間で複合体を形成するステップを含み、前記複
合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらし、前記アッセイ結果が前記サンプ
ル中の前記NMT2タンパク質の量を示す使用を提供する。

【0058】

具体的な態様では、対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分
析は、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させて処理サンプル中に存在する抗体とNM
T2の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ
結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含む。

20

【0059】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッ
セイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共
鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共
免疫沈降アッセイを含む。

【0060】

具体的な態様では、前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体
を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を
決定する。

30

【0061】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化
学デバイスである。

【0062】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性
大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンス
トレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大
細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、
プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮
細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巢
明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳
癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巢癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜
腺癌、食道扁平上皮癌である。

40

【0063】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0064】

別の態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象を治療するためのNMT1
阻害剤の使用であって、場合によっては対照と比較して、前記対象由来のサンプル中のNM

50

T2核酸の量が少ないまたは存在しないとき、前記NMT1阻害剤の使用が示され、結合アッセイが、前記対象由来の処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させて前記サンプルにおいて検出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす使用を提供する。

【0065】

具体的な態様では、対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析は、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含む。

【0066】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、検出可能に標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイを含む。

【0067】

具体的な態様では、前記ハイブリダイゼーションアッセイは定量的または半定量的である。

【0068】

具体的な態様では、前記ハイブリダイゼーションアッセイは、RT-PCR、in situハイブリダイゼーション、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅である。

【0069】

具体的な態様では、サンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

【0070】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0071】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

【0072】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0073】

一態様では、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象を治療するためのNMT1阻害剤の使用であって、場合によっては対照と比較して、前記対象由来のサンプルからのミリストイル化プロファイルが、前記癌がNMT2に欠陥があることを示すとき、前記NMT1阻害剤の前記使用が示され、結合アッセイが、処理サンプルとサンプル内のミリストイル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリストイル化タンパク質に結合する抗体を接触させてサンプル中に存在する検出可能な標識とミリストイル化タンパク質の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのミリストイル化プロファイルをもたらす使用を提供する。

【0074】

具体的な態様では、前記処理はアルキニル-ミリステートおよびデスチオビオチンアジド-PEGビオチンで前記サンプルを処置するステップを含む。

【0075】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む。

【0076】

具体的な態様では、前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

10

【0077】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0078】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

20

【0079】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0080】

別の態様では、NMT1阻害剤で治療するのに適した対象を同定するための方法であって、前記癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させ処理サンプル中に存在する抗体とNMT2タンパク質の間の複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含み、場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2タンパク質の量が少ないまたは存在しないとき、前記NMT1阻害剤を用いた治療が示される方法を提供する。

30

【0081】

具体的な態様では、対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析は、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させ処理サンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップを含む。

【0082】

40

具体的な態様では、前記結合アッセイは、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む。

【0083】

具体的な態様では、前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

【0084】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化

50

学デバイスである。

【0085】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

10

【0086】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0087】

別の態様では、NMT1阻害剤で治療するのに適した対象を同定するための方法であって、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらし結合アッセイを実施するステップを含み、場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2核酸に対する量が少ないまたは存在しないとき、前記対象へのNMT1阻害剤の投与が示される方法を提供する。

20

【0088】

具体的な態様では、対象由来の前記サンプルがNMT2を発現するかどうか決定する前記分析は、処理サンプルとNMT2核酸に結合する検出可能な標識を接触させサンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間に複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらし結合アッセイを実施するステップを含む。

【0089】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、検出可能に標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイを含む。

30

【0090】

具体的な態様では、前記ハイブリダイゼーションアッセイは定量的または半定量的である。

【0091】

具体的な態様では、前記ハイブリダイゼーションアッセイは、RT-PCR、in situハイブリダイゼーション、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅である。

【0092】

具体的な態様では、サンプル中に存在する検出可能な標識とNMT2核酸の間の複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

40

【0093】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0094】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大

50

細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

【0095】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0096】

別の態様では、NMT1阻害剤で治療するのに適した対象を同定するための方法であって、癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとサンプル内のミリスティル化タンパク質またはアジド-ビオチン標識ミリスティル化タンパク質に結合する抗体を接触させサンプル中に存在する検出可能な標識とミリスティル化タンパク質の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのミリスティル化プロファイルをもたらし結合アッセイを実施するステップを含み、場合によっては対照と比較して、前記ミリスティル化プロファイルが、前記癌がNMT2に欠陥があることを示すとき、前記対象へのNMT1阻害剤の投与が示される方法を提供する。

10

【0097】

具体的な態様では、前記処理はアルキニル-ミリステートおよびデスチオビオチンアジド-PEGビオチンで前記サンプルを処置するステップを含む。

20

【0098】

具体的な態様では、前記結合アッセイは、蛍光活性化細胞選別、酵素結合免疫吸着アッセイ、免疫組織化学法、定量的免疫組織化学法、蛍光共鳴エネルギー移動、フォスター共鳴エネルギー移動、生体分子蛍光補足、質量分析法、イムノブロットアッセイまたは共免疫沈降アッセイを含む。

【0099】

具体的な態様では、前記サンプルにおいて前記抗体と前記NMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用して前記サンプル中の複合体の量を決定する。

30

【0100】

具体的な態様では、前記機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。

【0101】

具体的な態様では、前記癌は、リンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、黒色腫、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

40

【0102】

具体的な態様では、前記対象はヒトである。

【0103】

別の態様では、NMT1阻害剤で治療するのに適した対象を同定するためのキットであって、NMT2に対する抗体、請求項68から74のいずれか一項に記載の方法に従って対象を同定するための説明書を含むキットを提供する。

【0104】

50

具体的な態様では、キットは対照をさらに含む。

【0105】

別の態様では、NMT1阻害剤で治療するのに適した対象を同定するためのキットであって、NMT2に結合する核酸、請求項75から83のいずれか一項に記載の方法に従って対象を同定するための説明書を含むキットを提供する。

【0106】

具体的な態様では、キットは対照をさらに含む。

【0107】

前記核酸がRNAまたはDNAである、請求項93に記載のキット。

【0108】

別の態様では、NMT1阻害剤で治療するのに適した対象を同定するためのキットであって、NeutrAvidin™-HRP、および請求項84から90のいずれか一項に記載の前記対象を同定するための説明書を含むキットを提供する。

【0109】

具体的な態様では、キットは対照をさらに含む。

【0110】

具体的な態様では、キットはアルキニル-ミリスレートまたはデスチオビオチンアジド-PEGビオチンをさらに含む。

【0111】

本発明の実施形態を、単に例として、添付の図面を参照することによって、ここで記載する。

【図面の簡単な説明】

【0112】

【図1】正常B細胞の一型(L0)、ならびに様々なB細胞リンパ腫およびT細胞白血病における、NMT1およびNMT2発現のイムノブロット分析を示す図である。

【図2】NMT阻害剤、トリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)に対する、様々な正常細胞および様々なB細胞リンパ腫およびT細胞白血病の感受性を示すグラフである。

【図3】トリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)による、N-ミリストイルトランスフェラーゼ(NMT)の阻害を示す棒グラフである。

【図4A】NMT1およびNMT2に対する抗体でプロービングした、リンパ腫細胞系を示すイムノブロットの図である。

【図4B】図4A参照。

【図5】不死化正常Bリンパ球性細胞系と比較した、バーキットリンパ腫細胞系に対するNMT阻害剤の感受性を示す線グラフである。

【図6】pcDNA3.1-V5-NMT2によるRamosBリンパ腫細胞のトランスフェクションの結果を示す図であり、細胞生存率で示す、空プラスミドベクターでトランスフェクトした対照細胞に対して2.5倍のトリスDBA(5ug/ml)に対する生存の増大を示し(パネルA)、(パネルB)イムノブロットを示す。

【図7】様々なリンパ球性細胞系および固形リンパ腫腫瘍に存在したNMT2タンパク質のレベルの差を示す図である。

【図8A】免疫組織化学法により分析した、様々な固形リンパ腫腫瘍に存在したNMT2タンパク質のレベルの差を示す図である。正常リンパ節、バーキットリンパ腫(BL)およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)のNMT免疫組織化学法による染色、パネルC中では、NMT1およびNMT2に関するlog₂(マイクロアレイ蛍光強度NMT)をCCLEデータベースの全細胞系に対してプロットし、パネルD中では、NMT1およびNMT2に関するlog₂(マイクロアレイ蛍光強度NMT)を最も低いNMT2発現レベルでCCLEデータベースの100細胞系に対してプロットし、(パネルE)バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫および濾胞性リンパ腫におけるNMT2の発現を免疫組織化学法により分析し、Image Jを使用してペルオキシダーゼ染色を定量化した。正常リンパ節におけるNMT2含有量は0.392+/-0.3である(相対単位、

10

20

30

40

50

データ示さず)。

【図 8 B】図8A参照。

【図 8 C】NMT2の発現を欠く細胞系では、NMT1の発現が有意に増加することはないことを実証する。図8C中では、NMT1およびNMT2に関する $\log_2$ (マイクロアレイ蛍光強度NMT)をCCLEデータベースの全細胞系に対してプロットする。図8D中では、NMT1およびNMT2に関する $\log_2$ (マイクロアレイ蛍光強度NMT)を最も低いNMT2発現レベルでCCLEデータベースの100細胞系に対してプロットする。

【図 8 D】図8C参照。

【図 8 E】図8Eは、光学顕微鏡コンピュータ支援型光学濃度測定を使用してNMT2の測定値を定量化した一例を示す。視覚的に、これらの数値は悪性リンパ球の染色強度と非常に関連があった。選択したカットポイントは強力および無/微弱染色を示した。

10

【図 9 A】72時間DDD85646(パネルA)、DDD86481(パネルB)、およびDDD73226(パネルC)で処置した様々なBリンパ球性細胞系の残存率を示す図である。パネルDはIM9(i)およびBL2(ii)リンパ球でのDDD86481によるミリスチル化阻害の確認を示す図であり、パネルEはIM-9、BL2およびRamos細胞系でのミリスチル化を阻害するのに必要なDDD86481の最小用量を示す。

【図 9 B】図9A参照。

【図 9 C】図9A参照。

【図 9 D】図9A参照。

【図 9 E】図9A参照。

20

【図 10】(パネルA)は、24時間のNMT阻害剤トリスDBAに対する、様々な不死化正常LOBリンパ球、悪性Bリンパ腫細胞(RamosとBL2)、およびT細胞白血病(CEM)の感受性を示す図であり、(パネルB)は、pcDNA3.1-V5-NMT2を用いたRamosBリンパ腫細胞のトランスフェクションによって、空プラスミドベクターでトランスフェクトした対照細胞に対してトリスDBA(5ug/ml)に対する生存が2.5倍増大したことを示す図である。

【図 11 A】967の癌細胞系に関する専門書(CCLE)のデータベースにおけるNMT発現のレベル(パネルA)、ボックスおよびウィスカープロットを使用して選択した癌におけるNMT2発現のレベルを示す図(パネルB)であり、NMT2発現が最も低い50のCCLE細胞系を列挙し癌タイプによって選別する。

【図 11 B】図11A参照。

30

【図 11 C】少なくともNMT2を発現する50の細胞系の一覧を示す図である。

【図 12 A】NMTはアポトーシス中に切断されるが、依然として活性状態であることを示す図である。

【図 12 B】図12A参照。

【図 12 C】図12A参照。

【図 12 D】図12A参照。

【図 12 E】図12A参照。

【図 12 F】図12A参照。

【図 13 A】組換えGST-ならびにHis6-タグhNMT1およびhNMT2の精製を示す図である。

【図 13 B】図13A参照。

40

【図 13 C】図13A参照。

【図 13 D】図13A参照。

【図 14】精製組換え完全長His6-NMT1と組換え「カスパーゼ切断型」ct-His6-NMT1の間の酵素活性の比較を示す図である。

【図 15】様々なNMT阻害剤および異なる細胞系のEC50とIC50の比較を示す図である。

【図 16】DDD86481によるアポトーシスの誘導を示す図である。

【図 17 A】NMT2の存在を調べるための示したリンパ球様細胞系を用いたイムノプロットを示す図であり(パネルA)、CCLEデータの表示細胞系に関する $\log_2$ (マイクロアレイ蛍光強度NMT2)として示したNMT2mRNAの発現レベルを示す図である(パネルB)。

【図 17 B】図17A参照。

50

【図18】ストレプトアビジン-セファロースビーズを使用し白血病ジャーカットT細胞において、翻訳後 ω -アルキニル-ミリスチル化タンパク質をプルダウンするためのデスチオビオチン-PEG-アジドプローブの使用を示す図である。

【図19】ストレプトアビジン-磁気ビーズを使用し白血病ジャーカットT細胞において、翻訳後 ω -アルキニル-ミリスチル化タンパク質をプルダウンするためのデスチオビオチン-PEG-アジドプローブの拡大使用を示す図である。

【図20】アルキニル-ミリスチレートで標識した「正常」不死化B細胞(IM9)およびBL細胞(BL2とRamos)のミリスチル化プロファイルを示す図である。

【図21】DDD86481とドキシソルピシンの組合せからの時間および用量依存的細胞毒性グラフを示す図である。

10

【図22】DMSO、スタウロスポリン、 α FAS、または担体のみとインキュベートした細胞で実施したイムノブロットングを示す図である。

【図23】カスパーゼ切断型NMT2が完全長NMT2より3~4倍活性があることを示す図である。

【図24】24時間1 μ MのSAHA(HDACクラスI/II阻害剤)で処置した「正常」B細胞(IM9)および悪性BL細胞(Ramos、BL2)のイムノブロットを示す図である。

【図25】様々なBL細胞系においてNMT2タンパク質レベルが低下することを示す図である。

【図26】プロテオソームによる分解がBL細胞におけるNMT2枯渇の原因ではないことを示す図である。

20

【図27】NMT2ではなくNMT1がカスパーゼ-8により切断されることを示す図である。

【図28】NMT1とNMT2の両方がカスパーゼ-3により切断されたことを示す図である。

【図29】太字で示すエドマン分解により同定したNMT1とNMT2のカスパーゼ切断部位を示す図であり、正に帯電したリシン(K)ボックスをNMT1およびNMT2アミノ酸配列(アミノ酸1~80)で強調する。

【図30】部位特異的突然変異誘発によるNMT切断部位の確認を示す図である。

【図31】太字で示すエドマン分解により同定したNMT1とNMT2のカスパーゼ切断部位を示す図であり、正に帯電したリシン(K)ボックスをNMT1およびNMT2アミノ酸配列(アミノ酸1~80)で強調する。

【図32】細胞がアポトーシスの過程を経るときのNMTレベルの変化を示す図である。

30

【図33】一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞の溶解物における初期NMT活性を示す図である。

【図34】一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞の溶解物における初期NMT活性を示す図である。

【図35】スタウロスポリン(2.5 μ M)およびシクロヘキシミド(5 μ g/mL)とインキュベートしたV5-NMT1およびV5-NMT2を一過的に発現するCOS7細胞におけるNMT活性を示す図である。

【図36】組換えヘキサヒスチジン(His)-タグ完全長およびカスパーゼ切断型hNMT1の精製を示す図である。

【図37】組換えヘキサヒスチジン(His)-タグ完全長およびカスパーゼ切断型hNMT2の精製を示す図である。

40

【図38】ペプチドミリスチル化アッセイを使用してアッセイした、精製完全長およびカスパーゼ切断型ヘキサヒスチジン(His)-NMTのNMT活性を示す図である。

【図39】アポトーシス中のHeLa細胞における内在性NMTの細胞成分分画化を示す図である。

【図40】アポトーシス中のHeLa細胞における内在性NMTの細胞成分分画化後の、異なる分画中のNMTの量の定量化を示す図である。

【図41】アルキニル-ミリスチレートで標識しアポトーシスの過程を経たHeLa細胞の亜細胞分画化を示す図である。

【図42】アポトーシスの誘導に対する2-ヒドロキシミリスチン酸(HMA)の影響を示す図

50

である。ジャーカットT細胞はHMA(1mM)有り又は無しで処置し、アポトーシスは抗Fas(150 ng/ml)およびシクロヘキシミド(5 µg/mL)で誘導した。

【発明を実施するための形態】

【0113】

以下に発明を実施する形態において、肉太活字体の数字は、本発明の様々な実施形態を示す図面に関連して記載および参照する構成要素パーツを確認するために働く。本発明の様々な実施形態を記載する際に、同じ参照符号を使用して類似要素の同一性を確認していることを留意されたい。さらに、簡潔性のため、図面の幾つかの図から幾つかのパーツを省略してある。

【0114】

以下でより詳細に記載するように、癌を有する対象を治療するための化合物、組成物および方法を本明細書中に記載する。本明細書に記載する化合物、組成物および方法で治療するのに適した癌を有する対象を同定するための方法も本明細書中に記載する。癌を有する対象を同定するための方法も本明細書中に記載する。

【0115】

本出願は、対象におけるNMTに欠陥がある癌を治療するための方法および組成物を提供する。NMTに欠陥がある癌には、NMT2またはNMT1に欠陥がある癌がある。具体的な例では、NMTに欠陥がある癌はNMT2に欠陥がある癌である。

【0116】

本明細書中で使用する、用語「癌」は、細胞の異常で制御不能な成長によって引き起こされる様々な状態を指す。「癌細胞」と呼ばれ癌を引き起こし得る細胞は、制御不能な増殖、不死性、転移能力、急激な成長および増殖率、および/または幾つかの典型的な形態学的特徴などの特徴的性質を有する。癌細胞は腫瘍の型であり得るが、このような細胞は対象内に単独で存在する可能性もあり、または非腫瘍形成癌細胞である可能性がある。(例えば、臨床的または放射線医学的手段による)1つまたは複数の腫瘍の存在の検出、腫瘍内または別の生物サンプル由来の(例えば、組織バイオプシー由来の)細胞検査、癌を示す血中マーカーの測定、および癌を示す遺伝子型の検出だけには限られないが、これらを含めた任意の幾つかの方法で、癌を検出することができる。しかしながら、前述の検出法の1つまたは複数における陰性結果が癌の不在を必ずしも示すわけではなく、例えば、癌治療に対して完全な応答を示した患者が、後の再発によって証明されるように、依然として癌を有する可能性がある。

【0117】

本開示の具体的な例では、癌はリンパ腫である。

【0118】

本明細書中で使用する、用語「リンパ腫」は、リンパ系におけるBまたはT細胞の悪性増殖を指す。「リンパ腫」は、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫を含めた、多型の悪性増殖を含む。本明細書中で使用する、用語「非ホジキンリンパ腫」は、(例えば、癌性領域内のリード-ステルンベルグ細胞の存在によって特徴付けられる)ホジキンリンパ腫ではない、リンパ系におけるBまたはT細胞の悪性増殖を指す。非ホジキンリンパ腫は29を超える型のリンパ腫を包含し、その間の識別は癌細胞の型に基づく。

【0119】

本開示のより具体的な例では、癌はB-リンパ腫である。

【0120】

したがって一実施形態では、本開示の化合物、組成物および方法は、B細胞リンパ腫を有する対象を治療するのに適している。

【0121】

B細胞リンパ腫の例には、例えば、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、およびMALT型/単球B細胞リンパ腫があるが、これらだけには限られない。パーキットリンパ腫などの小児リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、前駆体B-LBL、前駆体T-

10

20

30

40

50

LBL、および未分化大細胞リンパ腫の治療も企図する。

【0122】

他の実施形態では、癌はリンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンタル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、プラスマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、メラノーマ、胃腺癌、子宮内膜腺癌、または食道扁平上皮癌である。

10

【0123】

本明細書中で使用する、用語「対象」は動物を指し、例えばネコ、イヌなどの飼育動物、家畜(例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど)、実験動物(例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモットなど)、哺乳動物、非ヒト哺乳動物、霊長類、非ヒト霊長類、げっ歯類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および任意の他の動物を、例えば含むことができる。具体的な例では、対象はヒトである。

【0124】

本明細書中で使用する、用語「治療」または「治療する」は、臨床結果を含めた、有益または望ましい結果を得ることを指す。有益または望ましい臨床結果は、検出可能であれ検出不能であれ、1つまたは複数の症状もしくは状態の軽減または改善、疾患程度の減退、疾患状態の安定化(すなわち非悪化)、疾患の蔓延防止、疾患進行の遅延または緩慢化、疾患状態の改善または緩和、疾患再発の減退、および(部分的であれ完全であれ)寛解だけには限られないが、これらを含み得る。「治療する」および「治療」は、治療を施さない場合の予想生存期間と比較した、生存期間の延長も意味することができる。本明細書中で使用する、「治療する」および「治療」は予防的治療も含む。例えば、初期の癌、例えば初期段階リンパ腫がある対象を治療して進行を妨げることができ、あるいは、本明細書に記載する化合物もしくは組成物で寛解中の対象を治療して、再発を防止することができる。

20

【0125】

B細胞リンパ腫細胞はNMT2ではなくNMT1を発現することを、本明細書中で示す。(図1および図4中に示すように)、これは、NMT1とNMT2の両方を発現する試験した白血病および他の細胞とは対照的である。

30

【0126】

Bリンパ腫細胞はNMT阻害剤による細胞生存率の阻害に感受性があることを、本明細書中でさらに示す。

【0127】

一例では、NMT阻害剤はトリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)である(図2)。

【0128】

他の例では、NMT阻害剤2-ヒドロキシミリスレート(HMA)を使用してBリンパ腫細胞を阻害する。

40

【0129】

さらに別の例では、T.brucie NMTのピラゾールスルホンアミド阻害剤[J.A.Freearson et al(2010)Nature.464.728~723頁](DDD85646)を使用してB細胞リンパ腫を阻害する(図5)。

【0130】

別の例では、阻害剤はDDD86481である。

【0131】

具体的な例では、B細胞リンパ腫を有する対象の治療は、NMT阻害剤を前記対象に投与す

50

るステップを含む。

【0132】

本発明においてNMT阻害剤化合物または誘導体は、NMT2に欠陥がある癌の治療に使用することができる。

【0133】

本明細書中で使用する、用語「欠陥がある」は、例えば、(野生型または対照サンプルと比較した)NMT合成、レベル、活性、もしくは機能の阻害、低下または排除、ならびにNMT(例えば、NMT1またはNMT2)のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激の阻害を広く指す。この用語は、NMTの合成、レベル、活性、もしくは機能を制御することができる、任意の代謝または制御経路も指す。この用語は、他の分子との結合および複合体形成から生じる阻害、低下または排除も含む。したがって、用語「NMTに欠陥がある」は、タンパク質機能またはタンパク質経路機能の阻害、低下または排除をもたらすことを指す。しかしながら、この用語は、これらの機能のどれもが、同時に阻害されなければならないことを意味するものではない。

【0134】

幾つかの例では、NMT遺伝子における突然変異の存在を決定することによって、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。このような核酸検出および増幅の方法は、当業者にはよく知られている。

【0135】

例えば、増幅する核酸は生物サンプルに由来してよい。(フェノールおよびクロロホルム抽出などの)様々な抽出法が、DNAまたはRNAを単離するのに適している。サンプルから抽出した核酸は、当技術分野でよく知られている核酸増幅技法を使用して増幅することができる。非制限的な例には、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、ネステッドPCR、リガーゼ連鎖反応、増幅可能RNAレポーター、Q-β複製、転写ベース増幅、ブーメランDNA増幅、鎖置換活性化、サイクリングプローブ技術、等温核酸配列ベース増幅(NASBA)があり、または他の配列複製アッセイもしくはシグナル増幅アッセイも使用することができる。

【0136】

増幅の方法は当技術分野でよく知られている。幾つかの方法は、cDNAへのRNAの逆転写を利用する。

【0137】

一例ではPCRを使用して、対象の標的配列、例えばNMT2配列を増幅する。

【0138】

核酸は検出前に増幅させることが可能であり、または増幅ステップ中に、例えば「リアルタイム」法で直接検出することができる。幾つかの実施形態では、生成するアンプリコンが検出可能に標識されるように、標識プライマーを使用して標的配列を増幅する。幾つかの実施形態では、プライマーを蛍光標識する。幾つかの実施形態では、標的配列を増幅し、生成したアンプリコンは電気泳動によって検出する。

【0139】

遺伝子発現のレベルは、サンプル中のNMT2mRNAの量を評価することにより決定することができる。サンプル中のmRNAの測定法は当技術分野で知られている。mRNAのレベルを測定するため、サンプル中の細胞を溶かすことができ、溶解物中または溶解物から精製もしくは半精製したRNA中のmRNAのレベルを、当業者に知られている任意の様々な方法によって測定することができる。このような方法には、非制限的に、検出可能に標識したDNAまたはRNAプローブを使用するハイブリダイゼーションアッセイ、例えばノーザンブロットティング、または適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用した定量もしくは半定量RT-PCR法がある。あるいは、定量もしくは半定量in situハイブリダイゼーションアッセイを、例えば組織切片、または非溶解細胞懸濁液、および検出可能に標識した、例えば蛍光、または酵素標識DNAもしくはRNAプローブを使用して実施することができる。mRNAを定量化するためのさらなる方法には、RNA保護アッセイ(「RPA」)、cDNAおよびオリゴヌクレオチド

マイクロアレイ、レプレゼンテーションディファレンス分析(「RDA」)、ディファレンシャルディスプレイ、EST配列分析、連続遺伝子発現解析(「SAGE」)、およびLuminex FlexMAP(「LMF」)での多重ライゲーション媒介増幅がある。

【0140】

「リアルタイム」法を使用して増幅をモニタリングすることもできる。リアルタイムPCRは、核酸標的の検出および定量化を可能にする。典型的には、定量PCRのためのこの手法は蛍光色素を利用し、色素はSYBR Green.RTM.Iなどの二本鎖特異的色素であってよい。あるいは、他の蛍光色素、例えばFAMまたはHEXを、オリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーと結合させることが可能である。リアルタイムPCRを実施することができる様々な器機が当技術分野で知られている。PCRの各サイクルで生じる蛍光シグナルは、PCR産物の量に比例する。蛍光とサイクル数のプロットを使用して増幅の動態を記載し、蛍光閾値レベルを使用して初期鋳型濃度と関係がある分画サイクル数を定義する。熱サイクル中に増幅を実施し、蛍光を読み取ることができる器機で検出するとき、融解分析を使用して、目的とするPCR産物と非特異的PCR産物を区別することができる。増幅およびシグナル生成後の反応の温度を段階的に上昇させながら、蛍光の変化を測定することによって、目的とする産物の(Δct)、および非特異的産物のそれを決定することができる。

10

【0141】

「多重検出」または「多重化」としても知られる方法は、サンプル中の多数の核酸の増幅を含むことができる。本明細書中で使用する、用語「多重PCR」は、2セット以上のPCRプライマーを反応に加えて、1つまたは複数の標的遺伝子マーカー由来の核酸を含めた多数の核酸を検出し定量化するステップを含むPCRを指す。さらに、内部対照(例えば、18s rRNA、GADPH、または β -アクチン)との多重化によって、反応なしでPCRの対照をもたらす。

20

【0142】

幾つかの例では、NMT遺伝子の後成的不活性化を決定することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。

【0143】

幾つかの例では、対象由来の細胞のサンプルにおける、(NMT1またはNMT2を含めた)NMTの活性を決定することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。例えば癌細胞に欠陥がある場合は対照に対して、好ましくは同じ組織由来の非癌細胞に対して、活性を決定することができる。したがって、NMTに欠陥がある癌にはNMT活性および/または発現の低減または排除があり得る。NMTの活性は、当技術分野でよく知られている、および/または本明細書に記載する技法を使用することにより決定することができる。これらの例では、NMTに欠陥がある癌には活性の低減または排除がある。

30

【0144】

幾つかの例では、NMTタンパク質の量、濃度および/またはレベルを決定することにより、NMT(例えば、NMT1 NMT2、または両方)に欠陥があるとして癌を同定することができる。

【0145】

幾つかの例では、癌を有する対象、もしくは癌を有する疑いがある対象由来の生物サンプルにおけるミリストイル化タンパク質の量を決定することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。この例では、ミリストイル化タンパク質の有無、または量を、例えば適切な脂肪酸アナログを使用する、クリックケミストリーを使用して決定することができる。非制限的な方法を、本明細書に記載する。ミリストイル化タンパク質の有無、または量を決定する別の方法は、当業者に知られている。(場合によっては対照と比較して)サンプル中に少量のミリストイル化タンパク質を有するサンプルは、NMTに欠陥があるサンプル、またはNMTに欠陥がある癌を示す。幾つかの例では、サンプル中に少量のミリストイル化タンパク質を有するサンプルはNMT2に欠陥があるサンプル、またはNMT2に欠陥がある癌を示す。

40

【0146】

幾つかの例では、癌を有する対象、もしくは癌を有する疑いがある対象由来の生物サン

50

プルにおけるアシル化タンパク質の量を決定することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。この例では、アシル化タンパク質の有無、または量を決定することができる。このような方法は、当業者には知られているはずである。(場合によっては対照と比較して)サンプル中に少量のアシル化タンパク質を有するサンプルは、NMTに欠陥があるサンプル、またはNMTに欠陥がある癌を示す。幾つかの例では、サンプル中に少量のアシル化タンパク質を有するサンプルはNMT2に欠陥があるサンプル、またはNMT2に欠陥がある癌を示す。

【0147】

幾つかの例では、突然変異などの1つまたは複数の配列変異の存在を決定することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができ、多型は、野生型ヌクレオチド配列に対する1つまたは複数のヌクレオチドの欠失、挿入または置換を含むことができる。1つまたは複数の変異は核酸配列のコードもしくは非コード領域中に存在する可能性があり、NMTの発現もしくは機能を低減または消失させる可能性がある。したがって、変異体核酸は活性が低減もしくは消失した変異体ポリペプチドをコードする可能性があり、または例えば制御エレメントの改変した活性により、細胞内での発現がほとんどもしくは全くない野生型ポリペプチドをコードする可能性がある。

10

【0148】

幾つかの例では、NMTの発現に影響を与えるかまたはそれをネガティブに制御する遺伝子を決定することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。

【0149】

20

様々な方法を、対象から得たサンプル中の特定核酸配列の有無を決定するために使用することができる。

【0150】

幾つかの例では、NMT経路の要素のNMTの、正または負のレギュレーターの発現または活性のレベルを評価することにより、NMTに欠陥があるとして癌を同定することができる。例えばイムノブロットおよびELISAなどのイムノアッセイ、ならびにRT-PCR、ナノストリング技術、RNA-seq、核酸ハイブリダイゼーションまたは核型分析などの核酸検出法によって、発現レベルを決定することができる。

【0151】

幾つかの例では、個体由来の細胞サンプル中の、1つまたは複数の変異、例えばNMT1および/またはNMT2の多型または突然変異の存在を決定することにより、NMT1および/またはNMT2に欠陥があるとして癌を同定することができる。

30

【0152】

癌と関係がある突然変異および多型は、変異体(すなわち、突然変異体または対立遺伝子変異体)ポリペプチドの存在を検出することによって、タンパク質レベルで検出することもできる。

【0153】

別の例では、癌を有する対象を治療する方法であって、前記癌がNMT2に欠陥がある癌細胞を含み、NMT阻害剤および/またはNMT1阻害剤を前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。

40

【0154】

本明細書中で使用する、用語「阻害する」または「阻害剤」は、タンパク質合成、レベル、活性、もしくは機能を阻害する任意の方法または技法、ならびに対象のタンパク質、例えばNMT2の合成、レベル、活性、もしくは機能の誘導または刺激を阻害する方法を指す。この用語は、対象のタンパク質の合成、レベル、活性、もしくは機能を制御することができる任意の代謝または制御経路も指す。この用語は、他の分子との結合および複合体形成を含む。したがって用語「阻害剤」は、その施用がタンパク質機能もしくはタンパク質経路機能の阻害をもたらす、任意の作用物質または化合物を指す。しかしながら、この用語は、これらの機能のどれもが、同時に阻害されなければならないことを意味するものではない。

50

【0155】

別の例では、癌を有する対象を治療する方法であって、前記癌がNMT1に欠陥がある癌細胞を含み、NMT阻害剤および/またはNMT2阻害剤を前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0156】

幾つかの例では、治療法は、治療有効量の本明細書に記載する化合物を対象に投与するステップを含み、場合によっては一回投与または施用からなり、あるいは一連の投与または施用を含む。具体的な例では、前記化合物はNMT阻害剤、NMT1阻害剤および/またはNMT2阻害剤である。

【0157】

より具体的な例では、NMT阻害剤はトリス-DBA、HMA、DDD85646、DDD86481、またはこれらの誘導体である。

【0158】

他の例では、対象に投与するのに適した薬学的に有効な量の化合物および/または組成物を提供する。

【0159】

本明細書中で使用する、用語「薬学的に有効な量」は、研究者または臨床医によって調査中である組織、系、動物もしくはヒトの生物学的または医学的応答を誘導する、薬剤または薬学的作用物質の量を指す。この量は治療有効量であり得る。

【0160】

化合物および組成物は薬学的に許容される形で提供する。

【0161】

本明細書中で使用する、用語「薬学的に許容される」は、過度の毒性、炎症、アレルギー反応、または他の問題もしくは合併症がなく妥当なベネフィット/リスク比で釣り合う対象の組織との接触における使用に適した、化合物、材料、組成物、および/または剤形(単位用量など)を指す。それぞれの担体、賦形剤なども、製剤の他の成分と適合性がある意味で「許容される」。

【0162】

実際の投与量、ならびに投与の速度および経時的变化は、治療される対象の性質および重症度に依存する。治療の処方、例えば用量に関する決定などは、一般開業医および他の医師の責任範囲内にあり、典型的には治療する障害、個々の患者の状態、送達の部位、投与の方法、および開業医に知られている他の要因を考慮に入れる。

【0163】

化合物または組成物は、治療する状態に応じて、同時的または連続的のいずれかで、単独または他の治療と併用して投与することができる。

【0164】

製剤は便宜上単位剤形で存在してよく、製薬の技術分野でよく知られている任意の方法によって調製することができる。このような方法は、1つまたは複数の補助成分を構成し得る担体と活性化合物を結合させるステップを含む。一般に製剤は、液状担体または微細固形担体または両方と活性化合物を均一かつ密接に結合させるステップ、および次いで必要であれば、生成物を成形するステップによって調製する。

【0165】

経口(例えば、摂取による)、局所(例えば、経皮、鼻腔内、眼部、頬、および舌下を含む)、肺(例えば、口または鼻を例えば介した、例えばエアロゾルを使用した吸入または注入療法による)、直腸、腔内、例えば皮下、皮内、筋肉内、静脈内、動脈内、心臓内、髄腔内、脊髄内、包内、被膜下、眼窩内、腹腔内、気管内、表皮下、関節内、くも膜下、および胸骨内を含めた注射による非経口、例えば皮下または筋肉内へのデポー剤インプラントだけには限られないが、これらを含めて、全身/末梢であれ望ましい作用部位であれ、任意の好都合な投与経路によって、対象に化合物および組成物を投与することができる。

【0166】

(例えば、摂取による)経口投与に適した製剤は、それぞれ所定量の活性化合物を含有する、カプセル、カシエ剤または錠剤などの別個単位として、粉末もしくは顆粒として、水溶液もしくは非水溶液に溶かした溶液もしくは懸濁した懸濁液として、または水中油滴型液状エマルジョンもしくは油中水滴型液状エマルジョンとして、ポーラスとして、舐剤として、またはペーストとして提供できる。

【0167】

(例えば、皮膚、皮下、筋肉内、静脈内および皮内を含めた注射による)非経口投与に適した製剤には、抗酸化剤、バッファー、防腐剤、安定剤、静菌剤、および目的とするレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含有し得る、水性または非水性の等張で、発熱物質を含まない滅菌注射溶液、ならびに懸濁剤および増粘剤、およびリポソーム、または血中成分または1つもしくは複数の器官を化合物が標的化するように設計した他のマイクロ粒子系を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液がある。このような製剤において使用するのに適した等張媒体の例には、塩化ナトリウム注射液、リンゲル液、または乳酸加リンゲル注射液がある。

10

【0168】

製剤は単位用量または多数回用量密閉容器、例えばアンプルおよびバイアル中で提供することができ、使用直前に滅菌液状担体、例えば注射用水の添加のみを必要とする凍結-乾燥(凍結乾燥)状態で保存することができる。即興の注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。製剤は、リポソーム、または血中成分または1つもしくは複数の器官を活性化合物が標的化するように設計した他のマイクロ粒子系の形であってよい。

20

【0169】

本明細書に開示する化合物を含む組成物は、標準的な化学療法レジメと併用して、または放射線療法と共に、本明細書に記載する方法中で使用することができる。

【0170】

患者におけるリンパ腫の場合、既知の治療は治療する対象、疾患の型、およびその段階に依存する。リンパ腫に関する既存の治療モダリティは当業者に知られている。したがって既知の治療は、本明細書に開示するNMT阻害剤と一緒に使用することができる。

【0171】

リンパ腫の治療において使用するための一般的な薬剤の組合せには、CHOP(すなわち、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニソン)、GAP-BOP(すなわち、シクロホスファミド、ドキソルビシン、プロカルバジン、ブレオマイシン、ビンクリスチン、およびプレドニソン)、m-BACOD(すなわち、メトトレキサート、ブレオマイシン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、デキサメタゾンおよびロイコボリン)、ProMACE-MOPP(すなわち、プレドニソン、メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、ロイコボリンと標準的なMOPP)、ProMACE-Cyt aBOM(プレドニソン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、エトポシド、シタラビン、ブレオマイシン、ビンクリスチン、メトトレキサート、およびロイコボリン)、ならびにMACOP-B(メトトレキサート、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン、プレドニソン、ブレオマイシン、およびロイコボリン)があるが、これらだけには限られない。再発侵襲性非ホジキンリンパ腫に関して、以下の化学療法剤の組合せ、IMVP-16(すなわち、イフォスファミド、メトトレキサート、およびエトポシド)、MIME(すなわち、メチル-gag、イフォスファミド、メトトレキサート、およびエトポシド)、DHAP(すなわち、デキサメタゾン、-16高用量シタラビン、およびシスプラチン)、ESHAP(すなわち、エトポシド、メチルプレドニソン、高用量シタラビン、およびシスプラチン)、CEFF(B)(すなわち、シクロホスファミド、エトポシド、プロカルバジン、プレドニソン、およびブレオマイシン)、ならびにCAMP(すなわち、ロムスチン、ミトキサントロン、シタラビン、およびプレドニソン)を、本明細書に記載する化合物および組成物と共に使用することができる。

30

40

【0172】

再発性、耐性ホジキン病などの特定リンパ腫に使用するための救済化学療法用の治療に

50

は、VABCD(すなわち、ビンブラスチン、ドキソルビシン、ダカルバジン、ロムスチンおよびブレオマイシン)、ABDIC(すなわち、ドキソルビシン、ブレオマイシン、ダカルバジン、ロムスチン、およびプレドニソン)、CBVD(すなわち、ロムスチン、ブレオマイシン、ビンブラスチン、デキサメタゾン)、PCVP(すなわち、ビンブラスチン、プロカルバジン、シクロホスファミド、およびプレドニソン)、CEP(すなわち、ロムスチン、エトポシド、およびプレドニムスチン)、EVA(すなわち、エトポシド、ビンブラスチンおよびドキソルビシン)、MOPLACE(すなわち、シクロホスファミド、エトポシド、プレドニソン、メトトレキサート、シタラビン、およびビンクリスチン)、MIME(すなわち、メチル-gag、イフォスファミド、メトトレキサート、およびエトポシド)、MINE(すなわち、ミトクアゾン(mitoguazone)、イフォスファミド、ビノレルビン、およびエトポシド)、MTX-CHOP(すなわち、メトトレキサートおよびCHOP)、CEM(すなわち、ロムスチン、エトポシド、およびメトトレキサート)、CEVD(すなわち、ロムスチン、エトポシド、ビンデシン、およびデキサメタゾン)、CAVP(すなわち、ロムスチン、メルファラン、エトポシド、およびプレドニソン)、EVAP(すなわち、エトポシド、ビンブラスチン、シタラビン、およびシスプラチン)、ならびにEPOCH(すなわち、エトポシド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、シクロホスファミド、およびプレドニソン)があるが、これらだけには限られない。

10

【0173】

NMT1またはNMT2を阻害するための別の方法を、癌の治療、特にB細胞リンパ腫の治療のための合成致死戦略において使用することができることは理解されよう。例えば、NMT1またはNMT2の発現は、アンチセンスまたはRNAi技術を使用して阻害することができる。遺伝子発現および/またはタンパク質活性を下方制御するための、これらの手法の使用は当業者に知られている。

20

【0174】

本開示の別の態様では、患者のNMT2阻害剤および/またはNMT1阻害剤治療の利点を決定する方法を提供する。

【0175】

一例では、本開示の方法は、NMT1および/もしくはNMT2の有無、または量または濃度に関して、癌を有する対象、もしくは癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを定性的または定量的に決定、分析または測定するステップを含む。

【0176】

別の例では、本開示の方法は、ミリストイル化タンパク質の有無、または量または濃度に関して、癌を有する対象、もしくは癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを定性的または定量的に決定、分析または測定するステップを含む。

30

【0177】

別の例では、本開示の方法は、アシル化タンパク質の有無、または量または濃度に関して、癌を有する対象、もしくは癌を有する疑いがある対象由来のサンプルを定性的または定量的に決定、分析または測定するステップを含む。

【0178】

本明細書中で使用する、用語「サンプル」は、遺伝子発現レベル、タンパク質レベル、酵素活性レベルなどに関してアッセイすることができる、癌細胞を含む、または癌細胞を含有する疑いがある、液体、細胞または組織サンプルだけには限られないが、これらを含めた、対象由来の任意のサンプルを指す。サンプルは、例えば、血液サンプル、分画血液サンプル、骨髄サンプル、バイオプシー、凍結組織サンプル、新たな組織試料、細胞サンプル、および/またはパラフィン包埋切片、そこから相対的mRNAレベルの測定を可能にするのに十分な量および適切な性質のRNAを抽出することができる材料、またはそこから相対的ポリペプチドレベルの測定を可能にするのに十分な量および適切な性質のポリペプチドを抽出することができる材料を含むことができる。

40

【0179】

NMT1もしくはNMT2の決定、分析または測定、またはNMT1および/もしくはNMT2の有無は、患者における癌のNMT1阻害剤またはNMT2阻害剤治療の利点と関連付けることができる。

50

【0180】

ミリスチル化タンパク質の決定、分析または測定、またはミリスチル化タンパク質の有無は、患者における癌のNMT1阻害剤またはNMT2阻害剤治療の利点と関連付けることができる。

【0181】

アシル化タンパク質の決定、分析もしくは測定、またはミリスチル化タンパク質の有無は、患者における癌のNMT1阻害剤またはNMT2阻害剤治療の利点と関連付けることができる。

【0182】

具体的な例では、本発明の抗体は、対象のタンパク質、例えばタンパク質NMT1またはNMT2に免疫反応的または免疫特異的であり、したがってそれと特異的および選択的に結合する。一例では、ヒトNMT1またはNMT2に免疫反応的および免疫特異的である抗体を使用することができる。ヒトNMT1またはNMT2に対する抗体は免疫特異的であることが好ましい。用語「抗体(antibody)」および「複数の抗体(antibodies)」は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体だけには限られないが、これらを含む。

10

【0183】

別の例では、本発明の抗体は、NMT1タンパク質またはNMT2タンパク質の両方に免疫反応的または免疫特異的であり、したがってそれらと特異的および選択的に結合する。この例では、ヒトNMT1またはNMT2の両方に免疫反応的および免疫特異的である抗体を使用することができる。ヒトNMT1またはNMT2に対する抗体は免疫特異的であることが好ましい。この例では、NMT1とNMT2の異なる分子量により、例えばSDS-PAGEおよびイムノブロッティングを使用して、両タンパク質の有無を単一抗体を使用して確認することができる。用語「抗体(antibody)」および「複数の抗体(antibodies)」は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体だけには限られないが、これらを含む。

20

【0184】

用語「特異的に結合する」は、特異的ポリペプチド、例えばNMT1またはNMT2のエピトープとの、抗体の高アビジニティーおよび/または高アフィニティー結合を指す。この特異的ポリペプチドにおけるそのエピトープと抗体の結合は、任意の他のエピトープ、特に対象の特異的ポリペプチドと結合している、またはそれと同じサンプル中の分子中に存在し得るエピトープと同じ抗体の結合より強い。対象のポリペプチドと特異的に結合する抗体は、弱い、ただし検出可能なレベルで他のポリペプチドと結合することができる。このような弱い結合、またはバックグラウンド結合は、当業者に知られているように、例えば適切な対照を使用することによって、対象の化合物またはポリペプチドと特異的抗体の結合とは容易に識別可能である。

30

【0185】

一例では、癌細胞を含有するかまたは癌細胞を含有する疑いがあるサンプルを、癌を有する対象から得る。このようなサンプルの回収は当業者によく知られている。具体的な例では、サンプルは血液サンプルである。サンプルを得る方法、このようなサンプルの処理および/または保存法も当業者によく知られている。

【0186】

具体的な例では、サンプル内のNMT1またはNMT2タンパク質の検出、分析または測定は、免疫組織化学法を使用して実施する。より具体的な例では、サンプル内のNMT2の検出、分析、または測定は、免疫組織化学法を使用して実施する。他のイムノアッセイ、定性的または定量的アッセイも本発明中で使用することができることは、当業者には明らかであろう。

40

【0187】

他の例では、免疫組織化学法(IHC)の任意の適切な方法またはシステムを使用して、免疫組織化学法を実施することができる。非制限的な例には自動システム、定量的IHC、半定量的IHC、および手動法がある。

【0188】

50

用語「定量的」免疫組織化学法は、抗原または他のタンパク質などの指定バイオマーカーの存在を同定および定量化するため、例えばNMT1および/またはNMT2を定量化するための、免疫組織化学法を施したサンプルを自動的にスキャンし記録する方法を指す。サンプルに与えられるスコアは免疫組織化学法によるサンプルの染色の強度の数値であり、サンプル中に存在する(NMT1またはNMT2などの)標的バイオマーカーの量を表す。本明細書中で使用する光学濃度(OD)は、染色の強度および染色された細胞の割合を表す数値スコアである。本明細書中で使用する半定量的免疫組織化学法は、人間の目による免疫組織化学法の結果を記録することを指し、この場合熟練オペレーターが(例えば、0[微弱または染色無し]、1または2[強烈な染色]として)数値により結果をランク付けする。

【0189】

10

免疫組織化学法と共に使用するのに適した自動サンプル処理、スキャンおよび分析システムは当技術分野で知られており、本発明と共に使用することができる。このようなシステムは、自動染色および顕微鏡スキャン、コンピュータ支援イメージ解析、(サンプルの方向およびサイズの変化に関する対照との)連続区間比較、デジタルレポート作成、ならびに(その上に組織切片が置かれたスライドなどの)サンプルの保管および追跡を含み得る。従来型光学顕微鏡とデジタルイメージ処理システムを組み合わせる免疫染色サンプルを含めた細胞および組織に関する定量分析を実施する、細胞イメージングシステムが市販されている。

【0190】

実際、患者サンプルをNMT2腫瘍染色が少ない(例えば、微弱または染色無し)と決定する例では、患者はNMT1阻害剤治療に適した候補であると考えられる。別の具体的な例では、NMT2腫瘍染色が多い(例えば強烈)と決定した患者はNMT1阻害剤治療に適していない候補であると考えられる。

20

【0191】

IHC陰性とIHC陽性に関するカットポイントの決定は半定量的決定であり、半定量的方法および光学顕微鏡を使用し熟練病理学者により行われることは理解されよう。

【0192】

例えば、IHCは以下のいずれかの形式で記録することができる。1.何らかの染色有り対染色無し、2.強烈な染色対微弱な染色、3.染色無し対微弱な染色対強烈な染色、4.式(染色無しの割合×0)+(微弱な染色の割合×100);+(適度な染色の割合×200)+(強烈な染色の割合×300)で構成されるHスコア、5.支援型定量スコアリング用のコンピュータ支援イメージ解析ソフトウェア。

30

【0193】

カットポイントはin vitroでの変動的薬剤感受性により最初に定義される。薬剤を臨床試験した後、感受性対非感受性カットポイントをさらに精練し確認する。

【0194】

一例では、多量(例えば強烈)または少量(例えば、微弱もしくは染色無し)のNMT2腫瘍染色があるかどうか決定する際に、患者サンプルを一つまたは複数の対照サンプルと比較することができる。一例では、対照サンプルは既知のおよび/または確立されたレベルのNMT2腫瘍染色を有している。一例では対照サンプルは、既知のおよび/または確立されたレベルのNMT2腫瘍染色および/または既知の臨床結果を有する患者サンプルである。一例では、対照は既知量のNMT2染色がある細胞系である。

40

【0195】

NMT1阻害剤治療に適していない候補であると考えられる患者のための持続的治療オプションは、当業者には知られている。

【0196】

幾つかの状況では、NMT1阻害剤治療に初期に応答する患者には再発の可能性があることは理解されよう。このような再発は、原発性腫瘍の再発および転移の進行だけには限られないが、これらを含めた幾つかの形式で現れる可能性がある。追加的または代替的に、別の異なる腫瘍が生じる可能性がある。

50

【0197】

本発明の一態様によれば、a)癌を有する対象または癌を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、b)サンプルとNMT2に対する抗体を接触させてサンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成するステップ、c)形成された複合体を測定してサンプル中のNMT2の量または濃度を決定するステップ、およびd)前記対象における前記癌のNMT1阻害剤治療の利点を決定するステップを含み、NMT1阻害剤治療の利点の決定が前記サンプル中のNMT2レベルにより決定される方法を提供する。

【0198】

具体的な態様では、場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2に対する量が少ないまたは存在しないとき、前記対象へのNMT1阻害剤の投与が示される。

10

【0199】

本発明の一態様によれば、対象からサンプルを得るステップ、前記サンプルを処理するステップ、処理サンプルとNMT2に対する抗体を接触させてサンプル中に存在する抗体とNMT2の間で複合体を形成するステップを含み、前記複合体を示す少なくとも1つのアッセイ結果をもたらす結合アッセイを実施するステップ、および場合によっては対照と比較して、前記サンプル中のNMT2に対する量が少ないまたは存在しないとき、前記対象にNMT1阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

【0200】

幾つかの態様では、前記サンプルにおいて抗体とNMT2の間で形成される複合体を検出するように設定した検出器を有する機器を使用してサンプル中の複合体の量を決定する。幾つかの例では、機器は分光光度計、分光蛍光計、光学デバイス、または電気化学デバイスである。幾つかの例では、NMT2に対する抗体はモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体である。

20

【0201】

NMT1またはNMT2の検出、分析または測定中使用することができる他の例には、対象からサンプルを得るための、イムノブロットィング、ELISA、間接的免疫蛍光法、多重化ビーズ技術、免疫沈降および質量分析があるが、これらだけには限られない。実際には、患者のサンプルをNMT2染色が低いまたは無いと決定する例では、対象はNMT阻害剤療法に適した候補であると考えられる。

【0202】

一例では、サンプルは、直接検査によるもしくはイメージ捕捉による光学顕微鏡法および分析によって、または直接検査を使用するもしくはイメージ捕捉による蛍光顕微鏡法および分析によって分析する。

30

【0203】

別の例では、本開示の方法は、NMT1および/またはNMT2活性の有無または量に関して、癌患者を有する対象由来の生物サンプル中のNMT1タンパク質および/またはNMT2タンパク質の活性を定性的または定量的に決定、分析または測定するステップを含む。この例では、NMT1またはNMT2の(天然または合成)基質の使用を使用して、NMT1またはNMT2活性が存在する、不在であるサンプル、またはその量を確認する。

【0204】

実際には、対象のサンプルがNMT2に欠陥があると決定する例では、対象はNMT1阻害剤に関する投与に適した候補であると考えられる。

40

【0205】

実際、対象のサンプルが少量のNMT2タンパク質レベルを有するまたはNMT2タンパク質レベルを有しないと決定する例では、対象はNMT1阻害剤を投与するのに適した候補であると考えられる。

【0206】

実際には、対象のサンプルはNMT2活性が低いまたは無いと決定する例では、対象はNMT1阻害剤に関する投与に適した候補であると考えられる。

【0207】

50

実際には、対象のサンプルはミリストイル化タンパク質の量が少ないまたは存在しないと決定する例では、対象はNMT1阻害剤に関する投与に適した候補であると考えられる。

【0208】

実際には、対象のサンプルはアシル化タンパク質の量が少ないまたは存在しないと決定する例では、対象はNMT2阻害剤に関する投与に適した候補であると考えられる。

【0209】

別の例では、本開示の方法は、癌を有するかまたは癌を有する疑いがある対象由来のサンプル中のNMT1またはNMT2遺伝子における突然変異、欠失などを確認するステップを含む。この場合、NMT1またはNMT2遺伝子における前記突然変異、欠失などは、前記サンプル内の癌細胞におけるNMT1またはNMT2タンパク質活性の消失または低下をもたらす。NMT1またはNMT2におけるこのような突然変異、欠失などを確認する方法は当業者に知られており、RFLP、RT-PCT、マイクロアレイ分析、および/または任意の適切な型のDNA配列決定を含むが、これらだけには限られない。実際には、患者のサンプルが、低いNMT2タンパク質活性をもたらす、またはそれをもたらさないNMT2における突然変異、欠失などを有すると決定する例では、対象はNMT阻害剤療法に適した候補であると考えられる。

10

【0210】

別の例では、本開示の方法は、癌を有するかまたは癌を有する疑いがある対象由来のサンプル中のNMT1またはNMT2のmRNAにおける突然変異、欠失などを確認するステップを含む。この場合、NMT1またはNMT2のmRNAにおける前記突然変異、欠失などは、前記サンプル内の癌細胞におけるNMT1またはNMT2タンパク質活性の消失または低下をもたらす。NMT1またはNMT2のmRNAにおけるこのような突然変異、欠失などを確認する方法は当業者に知られており、ノーザンブロッティング、RT-PCR、マイクロアレイ分析、および/または任意の適切な型のmRNA配列決定を含むが、これらだけには限られない。実際には、患者のサンプルが、低いNMT2タンパク質活性をもたらす、またはそれをもたらさないNMT2のmRNAにおける突然変異、欠失などを有すると決定する例では、対象はNMT阻害剤療法に適した候補であると考えられる。

20

【0211】

別の例では、本開示の方法は、NMT1またはNMT2の欠陥と関係がある癌に罹患している対象の治療するための方法であって、NMTの阻害剤を前記対象に投与するステップを含む方法を提供する。具体的な例では、癌はNMT2の欠陥と関係があり、阻害剤はNMT1阻害剤である。

30

【0212】

別の例では、NMT2に欠陥がある癌を治療するためのNMT1阻害剤の使用を提供する。

【0213】

別の例では、癌を治療するためのNMT1阻害剤の使用を提供し、前記癌はリンパ腫、B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、小児リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髄性白血病、急性転化期慢性骨髄性白血病、パーキットリンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、メラノーマ、胃腺癌、子宮内膜腺癌、または食道扁平上皮癌である。より具体的な例では、前記癌はNMT2に欠陥がある癌として決定する。

40

【0214】

阻害剤の例には、小分子、抗体、ペプチド断片、および/または核酸分子があるが、これらだけには限られない。

【0215】

小分子の具体的な例には、トリス-DBA、HMA、DDD85646、DDD86481、およびこれらの誘導体がある。本明細書中で使用する、用語「誘導体」には、塩、配位錯体、in vivo加水

50

分解性エステルなどのエステル、遊離酸または塩基、水和物、プロドラッグまたは脂質、カップリングパートナーがあるが、これらだけには限られない。

【0216】

NMT1のその活性部位を化学合成することによって、ペプチド断片を完全または部分的に調製することができる。当業者に知られている確立した、標準的な液相または固相ペプチド合成法に従い、ペプチド断片を調製することができる。

【0217】

核酸阻害剤、またはその補体は、活性ポリペプチドの生成を下方制御することによって活性または機能を阻害する。これは、当技術分野でよく知られている従来法を使用して、例えば実施例中に記載するリアルタイムPCRを使用したスクリーニングによって、モニタ

10

【0218】

核酸阻害剤の例には、遺伝子発現を下方制御するためのその使用が当技術分野で十分確立している、アンチセンスまたはRNAi技術がある。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、核酸、プレmRNAまたは成熟mRNAの相補配列とハイブリダイズして、塩基除去修復経路成分の生成に干渉し、結果としてその発現が低減されるまたは完全もしくは実質的に完全に妨げられるように設計することができる。コード配列を標的化する以外に、アンチセンス技法を使用して、例えば5'隣接配列における遺伝子の対照配列を標的化することができ、それによって、アンチセンスオリゴヌクレオチドは発現対照配列に干渉することができる。

【0219】

20

アンチセンスの代替は、標的遺伝子と同じ方向であるセンスに挿入される標的遺伝子の全部または一部のコピーを使用して、同時抑制により標的遺伝子の発現の低減を得ることである。

【0220】

追加的に、二本鎖RNA(dsRNA)サイレンシングを使用することができる。dsRNA媒介サイレンシングは遺伝子特異的であり、RNA干渉(RNAi)と呼ばれることが多い。

【0221】

別の例では、転写時にリボザイムを生成する核酸を使用し、リボザイムは特定部位で核酸を切断することができ、したがってNMTに影響を与える際にも有用である。

【0222】

30

さらに別の例では、低分子RNAを利用して遺伝子発現を制御することができる。これらは、低分子干渉RNA(siRNA)によるmRNAの標的化分解、転写後遺伝子サイレンシング(PTG)、マイクロRNA(miRNA)によるmRNAの発現段階制御配列特異的翻訳抑制および標的化転写遺伝子サイレンシングを含む。

【0223】

さらに別の例では、細胞内での低分子ヘアピン型RNA分子(shRNA)の発現を使用することができる。shRNAは、小ループ配列により隔てられた低分子逆方向反復配列からなる。一つの逆方向反復配列は遺伝子標的と相補的である。細胞内で、shRNAはDICERによってsiRNAにプロセシングされ、siRNAは標的NMT遺伝子mRNAを分解し発現を抑制する。好ましい実施形態では、ベクターからの転写によってshRNAが(細胞内で)内在的に生成される。

40

【0224】

NMT1またはNMT2の欠陥は、NMT1またはNMT2媒介経路の要素に欠陥がある可能性がある、それぞれNMT1またはNMT2に欠陥がある表現型であり、すなわち、経路の要素の活性の発現は、対照細胞と比較して、癌細胞において低減または消失する可能性がある。幾つかの実施形態では、癌細胞はNMT1またはNMT2に欠陥がある可能性がある、すなわちNMT1またはNMT2の活性の発現は、対照細胞と比較して、癌細胞において低減または消失する可能性がある。

【0225】

したがって、対象における癌の診断、予後、分類、またはモニタリングの1つまたは複数に関するマーカーとしてのNMT2の使用を提供する。幾つかの例では、免疫アッセイま

50

たは核酸検出、またはタンパク質活性から選択されるアッセイを使用してNMT2を測定する。

【0226】

本明細書中で使用する用語「予後」は、乳癌などの腫瘍疾患の、癌が原因の死または再発、転移蔓延、および薬剤耐性を含めた進行状態の可能性を予想することを指す。

【0227】

本明細書中で使用する用語「予後マーカー」は、全身療法を受けていない患者の結果を知らせる、または(そのマーカーを標的化しない)経験的全身療法にもかかわらず、そのマーカーがない患者のそれとは異なる結果を意味するマーカーを指す。

【0228】

本明細書中で使用する用語「予測マーカー」は、マーカー状態に基づき個々の療法の示差的有効性(利点)を予測するマーカーを指す。

【0229】

本明細書中で使用する用語「診断」は、乳癌、または他のタイプの癌の同定など、分子および/または病的状態、疾患もしくは状態を同定することを指す。

【0230】

対象における癌の診断、予後、分類またはモニタリングの1つまたは複数に関するマーカーとしての、タンパク質のミリストイル化の使用も提供する。

【0231】

対象における癌の診断、予後、分類またはモニタリングの1つまたは複数に関するマーカーとしての、タンパク質のアシル化の使用も提供する。

【0232】

幾つかの例では、前記癌はリンパ腫である。より具体的な例では、前記リンパ腫はB細胞リンパ腫である。より具体的な例では、前記B細胞リンパ腫は、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、B-CLL/SLL、免疫細胞腫/ヴァルデンストレーム病、MALT型/単球B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、小児リンパ腫、または未分化大細胞リンパ腫である。

【0233】

幾つかの例では、癌は急性骨髄性白血病、B細胞リンパ腫、急性転化期慢性骨髄性白血病、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、プラズマ細胞骨髄腫、腸腺癌、肺混合型扁平上皮腺癌、肺小細胞癌、肺癌、食道扁平上皮細胞癌、骨癌、乳管癌、胃びまん性腺癌、甲状腺髄様癌、尿路移行上皮癌である。

【0234】

幾つかの例では、癌はB細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型リンパ腫、急性骨髄性白血病、骨髄腫、卵巣明細胞癌、移行細胞癌(尿管および膀胱癌)、慢性骨髄性白血病(CML)、リンパ腫-CLL、肺小細胞癌、乳癌、結腸直腸腺癌、膵腺癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、骨肉腫、メラノーマ、胃腺癌、子宮内膜腺癌、食道扁平上皮癌である。

【0235】

キットの形でこのような方法において使用する化合物および/または組成物を提供することによって、本発明の方法を好都合に実施することができる。このようなキットは、組成物を含有することが好ましい。このようなキットは、その使用説明書を含有することが好ましい。

【0236】

本明細書に記載する本発明のより良い理解を得るために、以下の実施例を述べる。これらの実施例が、単なる例示目的であることは理解されるはずである。したがって、それらは如何なる形式でも本発明の範囲を制限することはないはずである。

【実施例】

【0237】

以下の実施例では、当業者によって理解されているように、標準的な方法を使用した。

【0238】

10

20

30

40

50

材料および方法

抗体および試薬

トリスジブチルベンジリデンアセトンパラジウム(トリスDBA)はDr.Arbriser(U.Alabama)の親切な提供物であった。DDD85646は[J.A.Freearson et al(2010)Nature.464.728~723頁]中に記載されたように合成し、および/またはDDD86481はDr.David Gray and Paul Wyatt、Dundee Universityから得た。

【0239】

マウス抗NMT1(クローン14;1:1000)およびマウス抗NMT2(クローン30;1:2000)抗体はBD Biosciences、San Jose、CA、USAからのものであった。ウサギ抗NMT1(ポリクローナル;1:3000)はProteintech、Chicago、IL、USAから購入した。ウサギ抗GFP(1:20,000)、抗PARP-1(1:5000)、抗GAPDH(1:5000)および抗c末端PAK2(1:2000)抗体はEusera(www.eusera.com)Edmonton、AB、Canadaからのものであった。マウス抗 α チューブリン(1:15,000)およびウサギ抗V5(1:10,000)抗体はSigma Aldrich、St.Louis、MO、USAから購入した。マウス抗His(1:2000)はQiagen、Germanyからのものであった。ウサギ抗切断型カスパーゼ-8(1:1000)および抗切断型カスパーゼ-3(1:1000)は、いずれもCell Signaling Danvers、MA、USAからのものであった。Enhanced chemiluminescence(ECL)Plus and ECL Primeウエスタンブロッティング検出キットはGE Healthcare、Pittsburgh、PA、USAから購入した。他に言及しない限り、使用した全ての化学物質はSigma-Aldrich(St.Louis、MO、USA)から購入し、最高純度で利用可能であった。

【0240】

DNA構築物。V5-およびHisタグNMT1およびNMT2構築物の操作処理。Gatewayクローニングシステム(Life Technologies、Grand Island、N.Y.、USA)と適合性があるNMT1およびNMT2エンターベクターはGenecopocia(Rockville、MD、USA)から購入した。製造者の説明書に従いLRクローナーゼ酵素(Life Technologies)を使用して、NMT1およびNMT2遺伝子をデスティーネーションベクターpcDNA3.1/nV5DEST(Life Technologies)に組み込んで、プラスミドN末端タグNMT(His-NMT1、His-NMT2、V5-NMT1およびV5-NMT2)を生成した。V5タグNMT構築物は哺乳動物細胞発現用に使用し、一方His-NMT構築物は細菌発現用に使用した。クローニング産物はDNAの配列決定によって確認した(Eurofins MWG Operon、Huntsville、AL、USA)。

【0241】

細胞培養。B細胞の源はDr.Jim Stoneからの提供物であり、またはATCCから得た。細胞培養用の全ての試薬はInvitrogenから購入した。B細胞は加湿インキュベーター中で37°Cおよび5%CO₂において培養し、10%のウシ胎児血清、100U/mlのペニシリンおよび0.1mg/mlのストレプトマイシンを補充したRPMI培地中に維持した。

【0242】

細胞溶解。細胞は冷却PBS中で洗浄し、0.1%のSDS-RIPAバッファー[50mMのトリス、150mMのNaCl、1%のIgepal CA-630、0.5%のNaDC、2mMのMgCl₂、1×完全プロテアーゼ阻害剤(Roche Diagnostics);pH8.0]中で溶解し、4°Cにおいて15分間固定した。4°Cにおいて15分間の16,000gでの遠心分離後に、細胞溶解物上清を得た。

【0243】

アポトーシスの誘導。他に言及しない限り、2.5 μ Mのスタウロスポリン(STS)(Sigma Aldrich、St.Louis、MO、USA)および5 μ g/mLのシクロヘキシミド(ICN Biochemicals Inc.Aurora、OH、USA)を使用しアポトーシスを誘導して、タンパク質の翻訳を阻害しアポトーシスの誘導を助長した。

【0244】

NMT阻害剤とのインキュベーション。トリスジブチルベンジリデンアセトンパラジウム(トリスDBA)はDr.Arbriserの親切な提供物であった。細胞は高濃度のトリスDBA(もしくは対照に関してDMSO)と共に24時間、またはDDD85646と共に24時間および48時間インキュベートした。

【0245】

B細胞トランスフェクション。製造者の説明書に従いNeon(登録商標)トランスフェクションシステム(Life technologies)、および100 μ Lチップに適合させたRamosB細胞トランスフェクション用の最適化プロトコール(パルス電圧1,300V;パルス幅20ms、2パルスおよび7.7.10⁶細胞/mL)を使用してB細胞をトランスフェクトした。古典的に、2つのトランスフェクションを施用して、生存率アッセイを実施するのに十分な生存細胞を得た。

【0246】

細胞生存率アッセイ。B細胞およびT細胞の生存率を、トリパンプルー色素排除法を使用して測定した。細胞は密集状態(2×10⁶細胞/mL、最大)で増殖させ、最小基底のアポトーシスとなることを確実にした。NMT阻害剤とのインキュベーション後、約20000個の細胞(10 μ L)を、10 μ LのTC10(商標)トリパンプルー色素(Biorad)と共に15分間インキュベートした。TC10(商標)自動セルカウンター(Biorad)を使用して、細胞生存率を定量化した。

10

【0247】

in vitroでのNMT活性のアッセイ。Raju.R.V.,and Sharma.R.K.(1999)Preparation and assay of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase.Methods Mol Biol 116、193～211頁からのN-ミリストイルトランスフェラーゼ活性のアッセイプロトコールを適合させた。 [³H]ミリストイル-CoAは、Towler,D.,and Glaser,L.(1986)Protein fatty acid acylation:enzymatic synthesis of an N-myristoyglycyl peptide.Proc Natl Acad Sci US A83、2812～2816頁によって以前に記載されたように、各実験用に新たに合成した。簡単に言うと、細胞を0.25Mのスクロースバッファー(50mMのNaH₂PO₄、pH7.4)に再懸濁し、Branson Sonicatorにおいてレベル6.0で2ラウンドの超音波処理を施した。反応混合物は、NMT活性バッファー(0.26Mのトリス-HCl、3.25mMのEGTA、2.92mMのEDTAおよび29.25mMの2-メルカプトエタノール、1%のTriton X-100、pH7.4)中でインキュベートした10 μ Lの細胞抽出物(約20 μ gのタンパク質)、および切断型Bid(0.1mM、水中に溶解)のN末端配列に対応するミリストイル化または非ミリストイル化デカペプチドで構成される。7.4 μ L(約10pMol)の新たに合成した [³H]ミリストイル-CoA(最終混合物体積=25 μ L)を加えることによって反応を開始し、30℃で15分間インキュベートした。P81ホスホセルロースペーパーディスク(Whatman、Kent、UK)における15 μ Lの反応混合物のスポットにより反応を停止させ、30秒間乾燥させる。ディスクを洗浄して(洗浄バッファー、25mMのトリスバッファー、pH7.4)残留放射能([³H]-ミリスレートおよび [³H]ミリストイル-CoA)を除去し、一方 [³H]ミリストイル-ペプチドはホスホセルロースペーパー上に保持した。液体シンチレーション計数により放射能を定量化し、ミリストイル化ペプチドのpMolに変換した(Raju.R.V.,and Sharma.R.K.(1999)Preparation and assay of myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase.Methods Mol Biol 116、193～211頁)。

20

30

【0248】

RT-PCR。内部対照として18Sプローブを使用し、TaqmanのNMT1およびNMT2プローブを用いてqRT-PCRを実施した。サイクル時間数の差(Δ ct)は、本発明者らが各細胞型に関する18S内部対照の発現の指数関数的増加を見たサイクル時間(ct)を、シグナルの指数関数的増加を再度見る地点でのNMTサイクル時間から差し引くことによって計算した。

【0249】

部位特異的突然変異誘発によるV5-NMTにおけるカスパーゼ切断部位の突然変異

40

エドマン分解配列決定(Alphalyse)により同定したNMT1とNMT2のカスパーゼ切断部位を部位特異的突然変異誘発により突然変異させた。したがって本発明者らは、事前にクローニングしたV5-NMT1およびV5-NMT2ゲートウェイベクターを使用して、同定したカスパーゼ切断部位を突然変異させた。したがって、V5-NMT1のAsp-72残基ならびにV5-NMT2のAsp-25、Asp-67および両Asp-25,67(二重突然変異)残基を、製造者の説明書に従いQuickchange(登録商標)部位特異的突然変異誘発キット(Agilent Technologies社)を使用して突然変異させた。

【0250】

簡単に言うと、部位特異的突然変異誘発は、5～50ngのdsDNA(ベクター)、5 μ Lの10×反応バッファー、無ヌクレアーゼ水に溶解した125ngのプライマーを使用して実施し、無ヌ

50

クレアーゼ水を用いて50 μ Lの最終反応体積にした。2.5UのPfuTurbo DNAポリメラーゼ(Agilent Technologies社)を反応開始前に混合物に加え、これはエッペンドルフマスターサイクラー1サーモサイクラーで18サイクル実施した。その後、10UのDpn I制限酵素を各反応物に加え1時間37°Cでインキュベートすることにより親dsDNAを消化した。さらに、(表2.6中に列挙した)PrimerXプログラム(<http://www.bioinformatics.org/primerx/>)を使用して部位特異的突然変異誘発用のプライマーを設計した。重要なことに、カスパーゼ切断部位のアスパラギン酸(D)残基をグルタミン酸(E)残基に突然変異させて、以下のベクターV5-NMT1(D72E)、V5-NMT2(D25E)、V5-NMT2(D67E)およびV5-NMT2(D25, 67E)を作製した。突然変異は自動DNA配列決定装置(Eurofins MWG Operon社)により確認した。

【0251】

Hisタグカスパーゼ切断型、切断型NMTベクターの作製

以下のカスパーゼ切断型、切断型NMT、His-73NMT1、His-26NMT2およびHis-68NMT2を分子クローニングにより作製した。切断型DNA配列を、N末端ヘキサヒスチジン(His)-タグ配列を有するpET-19b(Novagen(登録商標))ベクターにクローニングした。

【0252】

事前にクローニングしたゲートウェイベクター、GFP-NMT1およびGFP-NMT2を、これらのPCR反応用の鋳型として使用した。PCR反応はPlatinum Pfx(登録商標)DNAポリメラーゼ(Life Technologies社)を使用して実施し、PCR反応は製造者のガイドラインに従い設定した。各PCR反応は以下のように調製した。200ngのDNA鋳型、5 μ Lの10 $\times$ Pfx増幅バッファー、5 μ Lの10 $\times$ PCRエンハンサー溶液、1mMのMgSO₄、0.3mMのdNTP混合物、0.5 μ Mの各フォワードプライマーとリバースプライマー(表2.6中に列挙)、1UのPlatinum Pfx(登録商標)DNAポリメラーゼおよび最大50 μ Lの無ヌクレアーゼ水。Platinum Pfx(登録商標)DNAポリメラーゼキットに与えられたガイドラインに従いエッペンドルフマスターサイクラー1サーモサイクラーで反応を設定し、反応は30サイクル実施した。

【0253】

カスパーゼの阻害

アポトーシスの誘導前に1時間、EMD Chemicals社から購入した10 μ Mの確立されているカスパーゼ阻害剤を用いて細胞を事前処置した。使用したカスパーゼ阻害剤は一般的カスパーゼ阻害剤(z-VAD-FMK)、カスパーゼ-3(z-DEVD-FMK)、カスパーゼ-8(z-IETD-FMK)、カスパーゼ-9(z-LEHD-FMK)および陰性対照(z-FA-FMK)であった。対照細胞はDMSO(1:1000)で処置した。

【0254】

MG-132を用いた細胞の処置

IM9、KMH2、BL2およびRamos細胞を平板培養し(6ウェルディッシュ中にウェル当たり3 $\times$ 10⁶個の細胞)、5時間10 μ MのMG-132で処置した。等量のDMSOを対照サンプルに加えた。次いで細胞を溶解しSDS-PAGE/ウエスタンブロット分析を施した。

【0255】

スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)を用いた細胞の処置

IM9、BL2およびRamos細胞を6ウェルディッシュ中にウェル当たり3 $\times$ 10⁶個の細胞で平板培養し、クラスIおよびクラスIIヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の可逆的阻害剤であるスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)1 μ Mを用いて24時間処置した。等量のDMSOを対照として細胞に加えた。細胞を溶解しSDS-PAGE/ウエスタンブロット分析を施した。

【0256】

アポトーシスの誘導

150または300ng/mLのマウス抗Fas抗体を使用し外部経路を介してアポトーシスを刺激し、2.5 μ Mのスタウロスポリン(STS)を使用し内部経路を介してアポトーシスを刺激した。示した場合、シクロヘキシミド(5 μ g/mL)を使用しタンパク質翻訳を阻害し、細胞死をさらに助長した。

【0257】

NMT阻害剤、2-ヒドロキシミリスチン酸(HMA)を用いた細胞の処置

HMAを鹼化し、細胞に加える前にウシ血清アルブミン(BSA)と結合させ、以前に記載されたように(Yap et al., 2010)その細胞への取り込みを容易にした。簡単に言うと、15分間65°Cで20%モル過剰な水酸化カリウム(KOH)と共にHMAをインキュベートした。その後、37°Cで20%脂肪酸無BSAを含有する無血清RPMI培地にKOH鹼化HMAを溶解し、次に37°Cでさらに15分間インキュベートすることにより20×溶液を作製した。ミリスチン酸ナトリウムを対照として使用したので、それも細胞に加える前に、37°Cで20%脂肪酸無BSAを含有する無血清RPMI培地でインキュベートした。その後、ジャーカットT細胞(1×10^7 個の細胞)を、(FBS、サプリメントまたは抗生物質を含まない)RPMI培地中で37°Cにおいて1時間、脂肪酸無BSAと結合した1mMのHMAまたは1mMのミリスチン酸ナトリウムのいずれかとインキュベートした(細胞培養中、最終濃度1%)。インキュベーション後、シクロヘキシミド(5 µg/mL)または媒体(DMSO)のみで抗Fas(150ng/mL)またはSTS(2.5 µM)を使用して、アポトーシスを誘導した。サンプルは8時間の間2時間毎に回収し、冷却PBSで洗浄し、0.3mLの1%ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)放射性免疫沈降アッセイ(RIPA)バッファーで溶解し、Branson Sonifierにおいて5.5~6.5のアウトプットで15秒間2ラウンドの超音波処理を施し、各サイクル間は氷上に2分間置いた。

10

【0258】

NMT阻害剤、トリスDBAを用いたリンパ球性細胞系の処置

2×10^6 個の細胞(CEM、L0、BL2およびRamos)を6ウェルプレート中で増殖させ、多量(0、1、2および5 µg/mL)のトリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(トリスDBA)とインキュベートした(Bhandarkar et al., 2008)。トリスDBAで処置した細胞の生存率はトリパンブルー色素排除アッセイで測定した(Hudson, 1976)。

20

【0259】

NMT阻害剤、DDD85646およびDDD73226を用いたリンパ球性細胞系の処置

1×10^5 個の細胞[KMH2(ホジキンリンパ腫)、IM9(「正常」EBV不死化B細胞)、BL2、Ramos](100 µL/ウェル)を96ウェルプレートに平板培養し、24、48および72時間、多量のピラゾールスルホンアミド系NMT阻害剤DDD85646[分子量(MW)495.43](Frearson et al., 2010)および低効能ピラゾールスルホンアミド系アナログDDD73228(MW=362.5)で処置した。各ウェル中のDMSOの最終体積が1%になるように、薬剤をDMSOに溶解し、各試験濃度に関して100×ストック溶液を作成した。これらの阻害剤で処置した細胞の生存率はトリパンブルー色素排除アッセイで測定した(Hudson, 1976)。

30

【0260】

NMT阻害剤、DDD86481を用いたリンパ球性細胞系の処置

1×10^5 個の細胞[KMH2(ホジキンリンパ腫)、IM9(「正常」EBV不死化B細胞)、BL2、Ramos](100 µL/ウェル)を96ウェルプレートに平板培養し、多量のDDD86481[MW610.5]で処置した。各ウェル中のDMSOの最終体積が1%になるように、薬剤をDMSOに溶解し、各試験濃度に関して100×ストック溶液を作成した。MTS[(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)]アッセイを使用して薬剤の細胞毒性を測定した(Cory et al., 1991)。

【0261】

細胞の溶解

典型的に、細胞を冷却PBSで洗浄し、採取し、1×完全プロテアーゼ阻害剤を補充した0.1%のSDS-RIPAバッファーまたは0.1%のSDS-RIPA-HEPESバッファーに溶解した(このとき細胞はアルキン-脂肪酸で標識した)。細胞懸濁液は4°Cで15分固定した。次いで細胞溶解物を4°Cにおいて10分間16,000gで遠心分離し、分裂後期核の上清を回収した。タンパク質濃度はPierce™ビシンコニン酸(BCA)タンパク質アッセイキット(Thermo Fisher Scientific社、Waltham, MA)を使用して測定した。

40

【0262】

リンパ腫組織サンプルの溶解

ヒトびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)および濾胞性リンパ腫(FL)組織は、Dr. Raymond Lai(Cross Cancer Institute社、Alberta、カナダ)からの親切な進物であった。凍

50

結腫瘍組織は小片(約1~3mm)に切断し、1×完全プロテアーゼ阻害剤を含む1%SDS-RIPAと混合した。サンプルは小型ダウンス型ホモジェナイザーを使用して均質化し、次いで腫瘍組織が溶解バッファーに溶解するまで、6.0のアウトプット(Branson Sonifier450)で、(氷上において)1分間隔で2分間の間繰り返し超音波処理した。次いでサンプルは4℃において10分間16,000gで遠心分離し、ウエスタンブロッティング分析用に分裂後期核の上清を回収した。

【0263】

Odysseyスキャナーを使用したウエスタンブロッティング

この方法は提供された切断型カスパーゼ-3プロットのものに使用し、全ての他のウエスタンブロッティングは標準的な手順を使用して行った。電気泳動後、ゲルはニトロセルロース膜に移し、0.1%Tween20を含むPBS(PBS-T)中5%NFMで1時間ブロッキングした。一次抗体(ウサギ抗切断型カスパーゼ-3、Cell Signaling社)もPBS-T中5%NEMに1:2000で希釈し、膜に加え24時間インキュベートした。次に、膜には6洗浄サイクルを施し、それぞれ5分間続け、PBSで2回洗浄、PBS-Tで2回洗浄、および最後にPBSで2回洗浄した。二次抗体(Alexa Fluor680ヤギ抗ウサギ、Life Technologies社)はPBS-Tで(1:5000)希釈した後に加え、プロットはアルミホイルで覆い、二次抗体と1時間インキュベートし、前と同じPBSとPBS-Tを用いた6×洗浄サイクルを施した。(ウサギ用の)チャンネル700において84 μmのスキャン解像度(強度:5~7)で、LI-COR Inc社からのOdyssey(登録商標)蛍光イメージングシステムでプロットをスキャンした。

【0264】

細胞成分分画化

HeLa細胞を150mmプレート中で密集状態まで増殖させ、5時間の間抗Fas(300ng/mL)(外部)またはSTS(内部)でアポトーシスの過程を経るように誘導した。次いで細胞を、(以下のセクションで詳細に記載するように)(Yap et al., 2010)アルキン-C14で代謝的に標識しハイポトニック溶解を施した。

【0265】

簡単に言うと、細胞を冷却PBSバッファーで洗浄し、セルリフターを使用してプレートから掻きとり回収した。次いでサンプルは2000gで5分間遠心分離し、上清は吸引し、細胞を膨張させる600 μLのハイポトニックバッファー(Mg再懸濁バッファー)に細胞を再懸濁し、氷上で20分間インキュベートした。細胞懸濁液はダウンス型ホモジェナイザーに移し、硬い乳棒を使用して45ストロークで均質化した。結果的に、400 μLの無EDTA2.5×均質化バッファー(HB)をホモジェネートに加え、軟らかい乳棒を使用しダウンス型ホモジェナイザーにおいて15ストロークで細胞を均質化した。次いでホモジェネートを1000gで5分間遠心分離し、分裂後期核の上清(PNS)を回収した。次に、200 μLのPNSを保存し、残り(約750 μL)はBeckman TLA120.2ローターで100,000gにおいて45分間遠心分離し、これによってサイトゾル分画(S100)および軽量膜ペレット(P100)が生じた。

【0266】

P100ペレットを1×HBで1回洗浄し、P100分画は1×HBを使用して同種S100分画の体積に調節した。この後、生成した分裂後期核の上清(PNS)、サイトゾル分画(S100)および膜分画(P100)分画が、1%SDSを含有するように調節した。結果的に、同じ分画体積にウエスタンブロット分析を施し、タンパク質レベルはImage Jソフトウェア(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を使用して定量化した。

【0267】

バイオオルソゴナル(bio-orthogonal) ω-ミリスチン酸アルキニルおよびクリックケミストリーを使用した細胞の代謝標識

ω-ミリスチン酸アルキニルを使用した細胞の代謝標識

細胞を採取する前に、100~25 μMのω-ミリスチン酸アルキニルで30分間細胞を標識し、0.1%SDS-RIPA-HEPESバッファーに溶解した。生成した細胞溶解物由来のタンパク質(50~30 μg)を、クリックケミストリーを使用して100 μMのアジド-ビオチンと反応させ、以前に記載されたように(Yap et al., 2010)処理した。簡単に言うと、標識前に1時間、5%デ

キストランコーティングチャコール処置FBS(DCC-FBS)を補充した培地(RPMIまたはDMEM)でインキュベートすることにより、細胞を脂肪酸枯渇状態にした。次に、 ω -ミリスチン酸アルキニルをDMSOに溶解し25または100mMストック溶液を作製した。典型的に ω -ミリスチン酸アルキニルの細胞内取り込みは、鹼化およびBSAとの結合で典型的に改善された。したがって標識前に、 ω -ミリスチン酸アルキニルを、15分間65°Cで20%モル過剰な水酸化カリウムで鹼化した。次に、20%脂肪酸無BSAを含有する(予め温めた)無血清培養培地を鹼化 ω -ミリスチン酸アルキニルに37°Cで加え、37°Cでさらに15分間インキュベートした。

【0268】

その後、脂肪酸が枯渇した細胞を温PBSで1回洗浄し、如何なるサプリメントも含まない新たなRPMIまたはDMEMでインキュベートした。次に、適切な体積の20×脂肪酸-BSAコンジュゲート、無血清培地中に細胞を加え、それぞれ各々の実験に関してBSAの最終濃度が1%になり、 ω -ミリスチン酸アルキニルが示した濃度(25 μ Mまたは100 μ M)になることを確実にした。BSAと結合したDMSOまたは非標識脂肪酸は、実施した実験の対照として使用した。細胞は採取前に、5%CO₂加湿インキュベーター中で37°Cにおいて30分間 ω -ミリスチン酸アルキニルで標識した。1×完全プロテアーゼ阻害剤(無EDTA)を補充した0.1%SDS-RIPA-HEPESバッファ中に細胞を採取した。

【0269】

クリックケミストリー

ω -ミリスチン酸アルキニルで細胞を標識した後、生成した溶解物にアジド-ビオチンを用いたクリックケミストリーを施し、以前に記載されたような(Yap et al., 2010)ECLによるミリスチン化タンパク質の検出を可能にした。典型的に、細胞溶解物(タンパク質30~50 μ g)が1%SDSを含有するように調節し、100 μ Mのトリス-(ベンジルトリアゾリルメチル)アミン(TBTA)、1mMのCuSO₄、1mMのトリス-カルボキシエチルホスフィン(TCEP)、および100 μ Mのアジド-ビオチンと共に暗所で37°Cにおいて30分間インキュベートし、クリック反応を進行させた。次に、10体積の氷冷アセトンを加えてクリック反応を停止させ、タンパク質は一晩-20°Cで沈殿させた。その後、アセトン沈殿タンパク質は16,000gで10分間遠心分離し、20mMのDTTを含む1×SDS-PAGEサンプルバッファに再懸濁した。次いでサンプルは95°Cで5分間加熱しSDS-PAGEに施し、ウェスタンブロット分析用にPVDF膜に移した。

【0270】

中性トリス-HClまたはKOHを用いたPVDF膜の処置

KOHまたは中性トリス-HClでPVDF膜を処置した実験用に、タンパク質サンプルを二連SDS-PAGEゲルに充填した。電気泳動後、軽く振とうしながら45分間室温で、KOHで処置したPVDF膜を0.1N KOH、メタノール中100ml[1N KOH、H₂O:メタノール中1:9(v/v)]でインキュベートし、一方他の膜は0.1Nトリス-HCl、pH7.0メタノール中[1Nトリス-HCl、pH7.0:メタノール1:9(v/v)]でインキュベートした。その後、処置した膜はPBSで完全に洗浄し、ストレプトアビジン-HRPまたはNeutravidin-HRPでプロービングしECLで検出した。

【0271】

アポトーシスの過程を経る細胞における放射性NMT活性のアッセイ

Sharma研究室(King and Sharma, 1991; Raju and Sharma, 1999)により開発されたプロトコルを採用することによってNMT活性を測定した。[3H]-ミリスチル-CoAのストック溶液を、以前に記載されたように(Towler and Glaser, 1986)新たに調製し合成した。[3H]-ミリスチル-CoAの200 μ Lストック溶液を作製するため、97 μ Lのミリスチル-CoA生成バッファを、20 μ Lの50mM ATP、10 μ Lの20mM LiCoA、60 μ Lのシュードモナスアシル-CoAシンテターゼおよび13 μ Lの[9,10-3H]-ミリスチン酸と組み合わせた。溶液は軽く混合し、37°Cで30分間インキュベートした。

【0272】

このアッセイ用に、V5-NMT1およびV5-NMT2をコードするプラスミドで一過的にトランスフェクトしたCOS-7細胞を、STS(2.5 μ M)およびシクロヘキシミド(5 μ g/ml)有りまたは無しでアポトーシスの過程を経るよう誘導し、0、1、2、4および8時点で採取した。細胞はB

10

20

30

40

50

ranson sonifier450を使用して超音波処理し、(50mMのNaH₂PO₄ pH7.4、0.25Mのスクロースバッファー中に溶解した)約20 µgの溶解物をそれぞれの反応に使用した。それぞれのNMTアッセイ反応に関して、3.85 µLのNMTアッセイバッファー、1.25 µLの20%Triton X-100、および(Peptide2.0Inc社から購入した)(1mMストック、エタノール中)ct-BidのN末端配列に相当する2.5 µLの(0.1mM)ミリストイル化(BID_G:GNRSSHSRLG)または非ミリストイル化(BID_A:ANRSSHSRLG)デカペプチドをマイクロ遠心分離チューブに加え、反応開始まで氷上で保存した。反応開始時に、7.4 µL(10pMol)の新たに合成した[3H]ミリストイル-CoAを、15秒間隔でNMTアッセイ混合物を含有するそれぞれのマイクロ遠心分離チューブに加え、25 µLの反応物を15分間30°Cでインキュベートした。15 µLの反応混合物をP81ホスホセルロースペーパーディスク(Whatman社)に15秒間隔でスポットティングし、30秒間ヘアドライヤーで乾燥させることにより反応を停止させた。

10

【0273】

次に、p81ホスホセルロースペーパーディスクを洗浄ユニットに移し、NMTアッセイ洗浄バッファーで、それぞれ30分間3回、合計90分間洗浄した。その後、(ミリストイル化ペプチドに相当する)ホスホセルロースに残存した放射活性を、Beckman Coulter LS6500シンチレーションカウンターを使用して5mLの液体シンチレーション混合物で定量化した。NMT活性はfmol/分/µgタンパク質として計算した。

【0274】

精製HisタグNMTにおけるNMT活性を測定するための放射性アッセイの使用

完全長および切断型HisタグNMTのNMT活性を、前に記載したのと同じプロトコールを使用して測定した。しかしながら、このアッセイでは、わずか1 µgの精製タンパク質を使用した(体積はNMTアッセイバッファーにおいて最大10 µLにした)。

20

【0275】

in vitroでのNMT切断アッセイ

in vitroでのNMT切断アッセイを、カスパーゼ切断アッセイ用バッファー中、100 µLの反応で1時間37°Cにおいて、10 gの精製His-NMT1およびHis-NMT2と1 µgの組換えヒト活性カスパーゼ-3または-8をインキュベートすることにより実施した。10 µMの一般的カスパーゼ阻害剤z-VAD-FMKを加えて反応を停止させ、その後5×サンプルローディングバッファーを加えた。反応サンプルは10%SDS-PAGEゲル上に分離させPVDF膜に移した。バンドはクーマシーブルー染色により可視化し、切断断片は膜から切除し、エドマン分解のためAlphalyse社、Palo Alto, CAに送った。

30

【0276】

組換えHis-NMTのタンパク質精製

Lemo21(DE3)pLysSコンピテントセル(New England Biolabs社)を、製造者のプロトコールに従いHis-NMT1およびHis-NMT2ベクターで形質転換した。NMT1およびNMT2タンパク質を以下のように調製した。3mLの開始培養物をLBブロス(1%のトリプトン、0.5%の酵母エキス、0.5%のNaCl、100 µg/mLのアmpiシリンおよび34 µg/mLのクロラムフェニコール)中で、225rpmで振とうしながら37°Cにおいて4時間増殖させた。全培養物を使用して、37°Cにおいて16時間増殖させた50mL培養物を接種した。次に細菌細胞を、室温における10分間6000×gでの遠心分離によってペレット状にした。細菌ペレットは10mLのLBに再懸濁し、5mLの再懸濁液を使用して、0.5~0.6のOD₆₀₀に達するまで激しく振とうしながら(225rpm)37°Cでインキュベートした500mLのLBを接種した。

40

【0277】

次に、4時間激しく振とうしながら(225rpm)30°Cで、0.5mMのイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)を加えることによってタンパク質発現を誘導した。懸濁液は4°Cにおいて20分間6000×gで遠心分離し、細菌ペレットは一晩凍結させた。その後、解凍した細菌ペレットはRoche社からの完全プロテアーゼ阻害剤(CPI)を補充した25mLの細菌溶解バッファーに再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。次いでサンプルを、5.0のアウトプット(Branson Sonifier450)において1分間隔で1分間3回超音波処理し、4°Cにおいて1時間15,000×gで遠心分離する前に37°Cで30分間インキュベートした。

50

【0278】

一方、Ni-NTAアガロースビーズ(Thermo Fisher Scientific社からのHis-Pure Ni-NTA樹脂)を製造者の説明書に従いカラムに充填し、カラムバッファーで三回洗浄した。前の遠心分離から得た透明な上清を次いでカラムに充填し、1時間4℃において軽く振とうしながらインキュベートした。次いでサンプルを重力流によりカラムから溶出させ、カラムは5mLの洗浄バッファー(20mMイミダゾールを含むカラムバッファー、pH8.0)で2回洗浄した。次に、2×5mLの溶出バッファー1(75mMイミダゾールを含むカラムバッファー、pH8.0)を使用して最初の2分画を溶出させ、2×5mLの溶出バッファー2(150mMイミダゾールを含むカラムバッファー、pH8.0)を使用して次の2分画を溶出させた。最終分画は溶出バッファー3(250mMイミダゾールを含むカラムバッファー、pH8.0)で溶出させた。最後に、20%グリセロールをそれぞれの分画に加え、-80℃で凍結する前に回収した。タンパク質精製プロセスの各ステップ由来のサンプルを回収し、12.5%SDS-PAGEゲル上に載せ、クーマシーブルーで染色して、どの分画が最高濃度のタンパク質を有していたかを決定した。

10

【0279】

最初の4溶出からのサンプルが最高濃度のタンパク質を有していたので、それらをプールし、透析して存在した任意のイミダゾールを除去した。したがって、プールしたサンプルは、分子量カットオフ(MWCO)12~14kDaでSpectra/Por2(Spectrum Laboratories社)透析チューブに充填して、任意の小さな分解タンパク質断片を除去した。次いでタンパク質サンプルは、軽く攪拌しながら4℃において2時間4Lの冷却透析バッファーで透析し、次に4℃において同じバッファーおよび別の4Lの新たな冷却バッファーで一晩透析した。透析したタンパク質サンプルは、所望の体積を得るまで、5,000g、4℃におけるMWCO30kDaのAmicon Ultra-15遠心分離フィルター(Millipore社)での遠心によって濃縮した。

20

【0280】

B細胞リンパ腫細胞系のqRT-PCR

製造者のプロトコールに従いTRIzol(登録商標)試薬を使用してIM9、KMH2、RamosおよびBL2細胞からRNAを単離した。次に、Applied Biosciences社からのランダムプライマースキームを備える高性能cDNA逆転写キットを使用して、製造者の説明書に従い単離したRNAからcDNAを合成した。定量リアルタイムPCR(qRT PCR)反応を、TaqMan(登録商標)Universal Master Mix II、およびNMT1、NMT2、およびLife Technologies社(Carlsbad, CA)から購入した18のTaqman(登録商標)プローブを使用して設定し、三反復の各反応を供給者のガイドラインに従い設定した。qRT PCRはMastercycler(登録商標)ep realplex thermocycler(Eppendorf社)を使用して実施し、結果はRealplexソフトウェア(Eppendorf社)を使用して分析した。

30

【0281】

トリパンブルー色素排除アッセイ

トリスDBA、DDD73228、およびDDD85646で処置した細胞の生存率を、製造者の説明書に従い、TC10TMトリパンブルー色素(Biorad社)と細胞をインキュベートすることによって測定した(Hudson, 1976)。次いで細胞生存率を、TC10TM自動セルカウンター(Biorad社)を使用して定量化した。

40

【0282】

MTS[(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム)]アッセイ

DDD86481で処置した細胞の生存率を、製造者の説明書に従い、Promega社からのCellTiter96Aqueous Non-Radioactive細胞増殖アッセイ(MTS)(Cory et al., 1991)を使用して測定した。

【0283】

免疫組織化学法

B細胞リンパ腫腫瘍をホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、所望の厚さ(約5ミクロンまたはμm)までマイクロームで切断し、Superfrost(登録商標)プラス正帯電スライド(Fisher Scientific社)上に固定した。染色前に、腫瘍組織を含有するスライドを、キシレ

50

ン中にそれぞれ10分間3回の浸漬、エタノール中での一連の洗浄[100%エタノール中に20回浸漬(4回反復)、80%エタノール中に20回浸漬、および50%エタノール中に20回浸漬]および冷たい流水で10分間の最終洗浄によって脱パラフィン処理した。

【0284】

抗原検索のため、スライドをスライドホルダーに載せ、Nordicware(登録商標)マイクロ波式圧力釜に置き、800mLの10mMクエン酸バッファpH6.0をそれに加えた。圧力釜を固く閉じ、マイクロ波中に置いて20分間強くマイクロ波処理した。次に、スライドを冷たい流水で10分間洗浄した。3% H_2O_2 メタノール中に10分間スライドを浸し、PBS中で3分間洗浄する前に温かい流水で10分間洗浄することにより、ペルオキシダーゼブロッキングを実施した。

10

【0285】

次に、過剰なPBSを除去し、PAPペン(Sigma-Aldrich社)でサンプルの周りに疎水性の円線を引いた。ウサギ抗NMT1(Proteintech社)またはウサギ抗NMT2(Origene社)をDako抗体希釈バッファ(Dako, Agilent Technologies社)で1:50希釈に希釈し、パスツールピペット(スライド当たり約400 L)で加え、湿度調節チャンバーにおいて4℃で一晩インキュベートした。次に、スライドをそれぞれ5分間PBSで2回洗浄し、約4滴のDAKO EnVision+System-HRP標識ポリマー(抗ウサギ)(Dako, Agilent Technologies社)をそれぞれのスライドに加え、室温で30分間インキュベートした。再度スライドをそれぞれ5分間PBSで2回洗浄し、4滴の液状DAB(ジアミノベンジジン)+(製造者、Dako, Agilent Technologies社の説明書に従い調製した)基質クロモゲンを加え、5分間発色させ、冷たい流水の下で10分間すすいだ。

20

【0286】

次いでスライドを1% $CuSO_4$ に5分間浸し、冷たい流水で軽くすすぎ、60秒間ヘマトキシリンで対比染色し、水流が透明になるまで冷たい流水ですすいだ。次にスライドを炭酸リチウムに3回浸漬し、水道水で軽くすすいだ。次いでスライドを、一連のステップ;50%エタノール中に20回浸漬、80%エタノール中に20回浸漬、および100%エタノール中に20回浸漬(4回反復)、および最後にキシレン中(それぞれ10分間3回)で脱水させた。次いでカバーガラスをスライドに載せ、腫瘍サンプルの鏡検はNikon eclipse 80i顕微鏡を使用して実施した。イメージはQImaging scientificカメラ(Qimaging社)を使用して作製した。

【0287】

(実施例1)

30

図1は、正常細胞および様々なB細胞リンパ腫およびT細胞白血病における、NMT1およびNMT2発現の分析を示す。この図は、正常B細胞(EBV形質転換ヒトBリンパ球、L0)およびヒト白血病T細胞系(ジャーカット、MOLT-4、CEM)と比較した、NMT1のみを発現するBリンパ腫細胞系(BL-2、Ramos)における、NMT2の発現のほぼ完全な不在を示す。

【0288】

理論によって束縛されることは望まないが、ただ一つのNMTアイソザイムのみを発現する細胞、例えばNMT2のほぼ完全な不在を示すパーキットリンパ腫細胞は、改変型ミリスチル化タンパク質プロファイルを有する可能性がある。

【0289】

(場合によっては対照と比較して)サンプル中に少量のミリスチル化タンパク質を有するサンプルは、NMTに欠陥があるサンプル、またはNMTに欠陥がある癌を示す。このようなNMTに欠陥がある癌は、阻害剤またはNMT1で治療するのが適切である。

40

【0290】

(実施例2)

図2は、NMT阻害剤、トリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)に対する、様々なB細胞リンパ腫およびT細胞白血病の感受性を示す。様々なB細胞およびT細胞は、高濃度のトリスDBAと共に24時間インキュベートした。トリパンプルー色素排除法を使用して細胞生存率を測定し、対照に関しては100%に調整した。トリパンプルー色素排除によって測定した細胞生存曲線は、B細胞リンパ腫がNMT阻害剤、トリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)に対してより感受性があることを示す。

50

【0291】

(実施例3)

図3は、トリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)による、N-ミリストイルトランスフェラーゼ(NMT)の阻害を示す。

【0292】

精製組換えNMT1およびNMT2を用いたペプチドミリストイル化アッセイを使用して、NMT活性をアッセイした。NMT活性は、(King et al.1991、Anal Biochemから適合させた)ホスホセルロースペーパーで生成し検出した放射標識ミリストイルペプチドの量から計算した。

【0293】

10

この図は、精製組換えNMT酵素を使用すると、トリス-ジベンジリデンアセトン-ジパラジウム(トリス-DBA)がin vitroでNMTを阻害することを示す。

【0294】

(実施例4)

図4は、NMT1(パネルA)およびNMT2(パネルB)に対する抗体でリンパ腫細胞系をプロービングした、イムノプロットの結果を示す。図4の凡例は、以下に相当する:IM9:Bリンパ芽球;BL2:バーキットリンパ腫;CEM:T細胞白血病;Karpas299:T細胞リンパ腫;Sup-M2:ALCL;UC ONN:ALCL(ALCL:未分化大細胞リンパ腫);DAUDI:バーキットリンパ腫;Ramos:バーキットリンパ腫BJAB:バーキットリンパ腫;HD-MYZ:ホジキンリンパ腫;KM-H2:ホジキンリンパ腫;L428:ホジキンリンパ腫;ジャーカット:T細胞白血病。

20

【0295】

(実施例5)

図5は、異なる濃度で48時間後に不死化正常Bリンパ球性細胞系(IM9)と比較した、バーキットリンパ腫細胞系Ramosに対するNMT阻害剤の有効性を示す。

【0296】

(実施例6)

この実施例では、pcDNA3.1-V5-NMT2による(本明細書中で示すようにNMT1を発現する)RamosBリンパ腫細胞のトランスフェクションによって、空プラスミドベクターでトランスフェクトした対照細胞に対して、トリスDBA(5ug/ml)に対する生存が2.5倍増大した。図6では、Ramos細胞系に関して勧められるプロトコール(1,350ボルト、30ms)に従いNeonトランスフェクションシステム(Invitrogen)を使用して、 20×10^6 個のRamosBリンパ腫細胞を32 μ gのDNA(pcDNA3.1-V5空またはpcDNA3.1-V5-NMT2)でトランスフェクトした。トランスフェクト細胞は5分間1200rpmで遠心分離して、死細胞および細胞残骸を除去した。上清中の細胞は完全RPMIにおいて6時間回収した。PBSで洗浄した後、細胞を再懸濁し、トリスDBA(5ug/ml)を含有するRPMI中で24時間増殖させ、次いでトリパンブルー色素排除法を使用して計数した(パネルA)。細胞を溶かし、NMT2に対する抗体および充填対照用にGAPDHを用いて、ウエスタンブロッティング(ECL)を実施してNMT2の発現を確認した(パネルB)。

30

【0297】

(実施例7)

この実施例では、内部対照として18Sプローブを使用し、TaqmanのNMT1およびNMT2プローブを用いてqRT-PCRを実施した。サイクル時間数の差(Δct)は、本発明者らが各細胞型に関する18S内部対照の発現の指数関数的増加を見たサイクル時間(ct)を、シグナルの指数関数的増加を再度見る地点でのNMTサイクル時間から差し引くことによって計算した。以下のTable 1(表1)中に示すように、Bリンパ腫細胞系においてNMT2発現とNMT1発現の比は(最大60倍)減少する。理論によって束縛されることは望まないが、ウエスタンブロッティングにより評価して、これらの結果は、NMT2をコードするmRNAの低減は、NMT2タンパク質レベルの低減の原因であり得ることを示唆することができる。

40

【0298】

【表 1】

Table1 qRT-PCR による NMT mRNA 発現の分析

		mRNA 配列	Δ ct (ctNMT-ct18S)	18S に対して標準化した NMT mRNA 発現	NMT1/NMT2
不死化正常 B 細胞系	IM9	NMT1	1.25	0.42	3.5
		NMT2	3.12	0.12	
	L0	NMT1	4.02	0.06	0.5
		NMT2	3.06	0.12	
B 細胞リンパ腫細胞系	ラモス	NMT1	-1.21	2.31	25.6
		NMT2	3.42	0.09	
	BL2	NMT1	-0.088	1.06	53
		NMT2	5.83	0.02	

10

【0299】

(実施例8)

この実施例中、図7中では、様々なリンパ球性細胞系および固形リンパ腫腫瘍に存在したNMT2タンパク質のレベルの差を示す。(A)NMT1およびNMT2のレベルを、様々なタイプのヒト固形リンパ腫(びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)および濾胞性リンパ腫(FL)腫瘍溶解物におけるウエスタンブロッティングにより評価する。示した両パネルに関して同じ抗体濃度、ウサギ抗NMT1(1:2500)、マウスモノクローナル抗NMT2(1:2500)を使用して、ウエスタンブロッティングによりNMTを検出した。各タイプの多数の腫瘍サンプルが、平均NMT2発現レベル(0.392+/-0.30)の範囲内にあることが示される。

20

【0300】

パネルA中、バーキットリンパ腫細胞系BL-2、Daudi、RamosおよびBJABはNMT2を欠いていることを示す。

【0301】

パネルB中、5個中4個のDLBCLおよび6個中1個のFLヒト腫瘍溶解物にNMT2の顕著な低下があったことを示す。

30

【0302】

(実施例9)

この実施例中、図8のパネルAおよびパネルB中では、様々な固形リンパ腫腫瘍に存在したNMT2タンパク質のレベルの差を免疫組織化学法により決定した。

【0303】

B細胞リンパ腫腫瘍をホルマリンで固定し、パラフィン包埋し、所望の厚さ(約5ミクロンまたは μ m)までマイクロトームで切断し、Superfrost(登録商標)プラス正帯電スライド(Fisher Scientific社)上に固定した。染色前に、腫瘍組織を含有するスライドを、キシレン中にそれぞれ10分間3回の浸漬、エタノール中での一連の洗浄[100%エタノール中に20回浸漬(4回反復)、80%エタノール中に20回浸漬、および50%エタノール中に20回浸漬]および冷たい流水で10分間の最終洗浄によって脱パラフィン処理した。

40

【0304】

抗原検索のため、スライドをスライドホルダーに載せ、Nordicware(登録商標)マイクロ波式圧力釜に置き、800mLの10mMクエン酸バッファpH6.0をそれに加えた。圧力釜を固く閉じ、マイクロ波中に置いて20分間強くマイクロ波処理した。次に、スライドを冷たい流水で10分間洗浄した。3% H_2O_2 メタノール中に10分間スライドを浸し、PBS中で3分間洗浄する前に温かい流水で10分間洗浄することにより、ペルオキシダーゼブロッキングを実施した。

【0305】

次に、過剰なPBSを除去し、PAPペン(Sigma-Aldrich社)でサンプルの周りに疎水性の円

50

線を引いた。ウサギ抗NMT1(Proteintech社)またはウサギ抗NMT2(Origene社)をDako抗体希釈バッファー(Dako,Agilent Technologies社)で1:50希釈に希釈し、パスツールピペット(スライド当たり約400 μ L)で加え、湿度調節チャンバーにおいて4℃で一晩インキュベートした。次に、スライドをそれぞれ5分間PBSで2回洗浄し、約4滴のDAKO EnVision+System-HRP標識ポリマー(抗ウサギ)(Dako,Agilent Technologies社)をそれぞれのスライドに加え、室温で30分間インキュベートした。再度スライドをそれぞれ5分間PBSで2回洗浄し、4滴の液状DAB(ジアミノベンジジン)+(製造者、Dako,Agilent Technologies社の説明書に従い調製した)基質クロモゲンを加え、5分間発色させ、冷たい流水の下で10分間すすいだ。

【0306】

次いでスライドを1%CuSO₄に5分間浸し、冷たい流水で軽くすすぎ、60秒間ヘマトキシリンで対比染色し、水流が透明になるまで冷たい流水ですすいだ。次にスライドを炭酸リチウムに3回浸漬し、水道水で軽くすすいだ。次いでスライドを、一連のステップ;50%エタノール中に20回浸漬、80%エタノール中に20回浸漬、および100%エタノール中に20回浸漬(4回反復)、および最後にキシレン中(それぞれ10分間3回)で脱水させた。次いでカバーガラスをスライドに載せ、腫瘍サンプルの鏡検はNikon eclipse 80i顕微鏡を使用して実施した。イメージはQImaging scientificカメラ(Qimaging社)を使用して作製した。

【0307】

正常リンパ節、バーキットリンパ腫(BL)およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCLまたはLCL)のNMT免疫組織化学法による染色。A)NMT1の染色。両方の正常リンパ節、および未処置バーキットリンパ腫の3独立症例のそれぞれ(BL1~3)、およびDLBCL(LCL1~3)がNMT1タンパク質に関して均一かつ強い陽性染色を示す([ダークグレーとして示す]茶色のペルオキシダーゼ反応産物)。違いは観察されなかった。一次抗体を削除することにより陰性対照を得た。上列:N1、N2正常リンパ節、Neg陰性対照。中央列:3個のバーキットリンパ腫(BL1~3)症例。下列:3個のDLBCL(LCL1~3)症例。正常リンパ節とリンパ腫の両方が強い染色を示す。B)NMT2の染色。両方の正常リンパ節がNMT2タンパク質に関して均一かつ強い陽性染色を示す(ダークグレーとして示す、茶色)。非常に対照的に、未処置バーキットリンパ腫の3独立症例のそれぞれおよびDLBCLは、NMT2に関してごく非常に弱い染色を示す(ライトブルーまたはライトグレーとして示す)。一次抗体を削除することにより陰性対照を得た。上列:N1、N2正常リンパ節、Neg陰性対照。中央列:3個のバーキットリンパ腫(BL1~3)。下列:3個のDLBCL(LCL1~3)。

【0308】

図8のパネルCおよびパネルDは、NMT2の発現を欠く細胞系では、NMT1の発現が有意に増加することはないことを実証する。パネルC中では、NMT1およびNMT2に関するlog₂(マイクロアレイ蛍光強度NMT)をCCLEデータベースの全細胞系に対してプロットする。パネルD中では、NMT1およびNMT2に関するlog₂(マイクロアレイ蛍光強度NMT)を最も低いNMT2発現レベルでCCLEデータベースの100細胞系に対してプロットする。

【0309】

図8のパネルEは、光学顕微鏡コンピュータ支援型光学濃度測定を使用してNMT2の測定値を定量化した一例を示す。視覚的に、これらの数値は悪性リンパ球の染色強度と非常に関連があった。選択したカットポイントは強力および無/微弱染色を示した。

【0310】

(実施例10)

この実施例中、図9中では、72時間DDD85646で処置した様々なBリンパ球性細胞系の残存率を示す(図9A)。以下の等式を使用するGraFit解析に関するLeatherbarrow, R. J. (2009) GraFit Version6, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K中に記載された4パラメータ等式に従い、図9A中の曲線をプロットした。

【0311】

【数 1】

$$y = \frac{Range}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^s} + Background$$

【0 3 1 2】

上式でレンジは適合非阻害値-バックグラウンドであり、sは勾配性因子である。等式では、xが増加するとyは減少するものとする。AとB。組合せプロット(n=4)。

【0 3 1 3】

図9、パネルA中では、関連対照[IM9(「正常」Bリンパ球)および両方のNMTを発現するKM H2(HL細胞系)]と共に、高濃度のDDD85646を使用してBL細胞系(BL-2およびRamos)を処置した。トリパンブルーアッセイを使用して24、48および72時間でDDD85646の細胞毒性を測定した。データは24時間と48時間の時点で回収したが(データ示さず)、DDD85646の最も顕著な影響は72時間の時点で観察した。

10

【0 3 1 4】

生存率は、使用したBリンパ腫細胞系においてDDD85646濃度依存的に低下した(Ramos:DDD85646のEC₅₀=0.37+/-0.05 μMおよびBL2:DDD85646のEC₅₀=0.43+/-0.2 μM)。対照細胞系、IM-9(DDD85646のEC₅₀=7.08+/-2.32 μM)およびKMH2(DDD85646のEC₅₀=29.6+/-10.6 μM)の生存率はさらに高かった。EC₅₀のデータを以下に要約する。

【0 3 1 5】

20

【表 2】

Table 2

細胞タイプ	EC50 (μM)	NMT1	NMT2	細胞のタイプ
BL-2	0.43 +/- 0.20	有り	無し	バーキットリンパ腫
ラモス	0.37 +/- 0.05	有り	無し	バーキットリンパ腫
IM-9	7.08 +/- 2.32	有り	有り	不死化 B 細胞
KMH2	29.6 +/- 10.6	有り	有り	非ホジキンリンパ腫

【0 3 1 6】

DDD85646はBL細胞において低いEC₅₀(癌細胞の50%を殺傷する濃度)を示し、HL(KMH2)細胞では高いEC₅₀を示した。したがってDDD85646は、癌細胞に対して高い選択殺傷指数を示した。本明細書中で使用するように、本発明者らは、「正常」不死化B細胞のEC₅₀/悪性細胞のEC₅₀の割合として選択殺傷指数を定義する。DDD85646に関する選択殺傷指数は、BL-2細胞とRamos細胞に対してそれぞれ16.4と19.1であった。

30

【0 3 1 7】

図9、パネルB中では、DDD86481を使用してBL細胞および対照細胞系[IM9(「正常」Bリンパ球)および両方のNMTを発現するKMH2(HL細胞系)]を処置した。細胞生存率は48時間と72時間でMTSアッセイを使用して測定したが、本発明者らは、48時間では細胞生存率に対する有意な変化は観察せず(データ示さず)、本発明者らは、試験したBL細胞系の生存率は、DDD86481濃度依存的に72時間の時点で有意に低下したことを発見した(Ramos:DDD86481のEC₅₀=42nMおよびBL2:DDD86481のEC₅₀=58nM)。対照細胞系、IM-9(DDD86481のEC₅₀=2.2 μM)およびKMH2(DDD86481のEC₅₀=12.6 μM)の生存率はさらに高かった。DDD86481に関して計算した選択殺傷指数は、BL-2細胞とRamos細胞に対してそれぞれ37.9と52.3であった。EC₅₀のデータを以下に要約する。

40

【0 3 1 8】

【表 3】

Table 3

細胞タイプ	EC50 (μM)	NMT1	NMT2	細胞のタイプ
BL-2	0.058	有り	無し	バーキットリンパ腫
ラモス	0.042	有り	無し	バーキットリンパ腫
IM-9	2.2	有り	有り	不死化 B 細胞
KMH2	12.6	有り	有り	非ホジキンリンパ腫

【0319】

[00210][00209] 以下の表は、細胞タイプならびにDDD85646およびDDD86481に関するEC50を記載し、1種のNMT(NMT1)のみを発現するBリンパ腫細胞(BL-2およびRamos)は、両方のNMTを発現する不死化「正常」B細胞または非ホジキンリンパ腫細胞系よりDDD85646またはDDD86481に対して約15~72倍感受性がある。

【0320】

【表 4】

Table 4

細胞タイプ	DDD85646 EC50(μM)	DDD86481 EC50(μM)	NMT1	NMT2	タイプ
BL-2	0.43 +/- 0.20	0.058	有り	無し	バーキット リンパ腫
ラモス	0.37 +/- 0.05	0.042	有り	無し	バーキット リンパ腫
IM-9	7.08 +/- 2.32	2.2	有り	有り	不死化 B 細胞
KMH2	29.6 +/- 10.6	12.6	有り	有り	非ホジキン リンパ腫

【0321】

以下の表は、バーキットリンパ腫細胞系(BL-2およびRamos)ならびに「正常」不死化B細胞における、DDD86481に関する薬理的EC₅₀およびEC₉₀のデータ(図9Bから計算したデータ)の要約を与える。

【0322】

選択指数は、DDD86481が300倍を超えて癌細胞を優先的に殺傷することを示すEC₅₀とEC₉₀の割合を示す(正常B細胞系を殺傷するのに必要とされる濃度は、はるかに高いので)。

【0323】

【表 5】

Table 5

細胞系	DDD86481 EC ₅₀ (μM)	選択指数 EC ₅₀ 正常細胞/ EC ₅₀ 癌細胞	DDD86481 EC ₉₀ (μM)	選択指数 EC ₉₀ 正常細胞/ EC ₉₀ 癌細胞
IM9 「正常」不死化 B 細胞	2.2	N/A	133.5	N/A
BL-2 バーキット リンパ腫	0.058	37.9	0.21	635.7
ラモスバーキット リンパ腫	0.042	52.4	0.4	333.7

【0324】

図9C中、DDD73226を使用して、関連対照[IM9(「正常」Bリンパ球)および両方のNMTを発

現するKMH2(HL細胞系)]と共にBL細胞系(BL-2およびRamos)を処置した。72時間でトリパンブルー色素排除アッセイを使用してDDD73226の細胞毒性を測定した。24時間と48時間において、細胞生存率に対する有意な変化は観察されなかった(データ示さず)。さらに、72時間の時点において最大100 μ Mの濃度でDDD73226を用いて細胞を処置したとき、IM9、KMH2およびRamos細胞の生存率に対する有意な変化はなかった。しかしながら、他の細胞と比較したとき、72時間において100 μ MのDDD73226を用いて処置したBL2細胞で観察された、細胞生存率の若干の低下があった。理論によって縛られることは望まないが、これは著しく低下したNMT2レベルを有すること以外に、BL2はRamosおよび他の細胞系と比較すると低いNMT1レベルも有していることが原因である可能性があり、したがって低効能のNMT阻害剤の作用にさらに影響を受ける可能性がある。

10

【0325】

図9D(パネルiおよびパネルii)中では、DDD86481(0、1および10 μ M)で0、1または4時間の処置後、1時間100 μ Mの ω -アルキニル-ミリステートでIM-9細胞とBL2細胞を標識した経時的実験を表す。タンパク質サンプルはクリックケミストリーを使用してアジド-ビオチンと反応させ、NeutrAvidin(商標)-HRPを用いたウエスタンブロッティングにより可視化した。DDD86481の阻害作用は即効性があり、処置の1時間後1 μ MのDDD86481で処置した細胞(IM-9とBL2の両方)においてミリスティル化がほぼ完全に阻害された。

【0326】

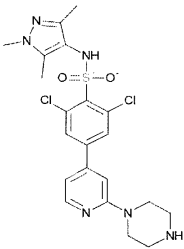
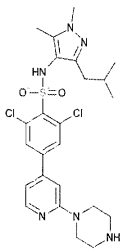
図9E中では、IM-9、BL2およびRamos細胞系でのミリスティル化を阻害するのに必要なDDD86481の最小用量を決定した。細胞は2時間0、10、50、100、500および1000nMの濃度でDDD86481を用いて処置し、処置の最後の1時間はアルキニル-ミリステートで細胞を代謝標識した。DDD86481は、試験した全ての細胞系で濃度依存的にミリスティル化を阻害した。BL-2およびRamos細胞系はDDD86481の阻害作用に対してより高い感受性があった。アルキン-ミリステート標識の組み込みが100nMの濃度で始まり減少したIM-9と比較したとき、ミリスティル化タンパク質へのアルキン-ミリステート標識の組み込みの減少が両BL細胞系に関して50nMで始まり明らかだったからである。

20

【0327】

【表 6】

Table 6 は DDD85646 または DDD86481 の予備的な症状発現前の特徴付けを示す

[] = 範囲	DDD00085646	DDD00086481
構造		
ヒト NMT	4nM	< 1 nM
Cli マウス(mL/分/g) ラット(mL/分/g) ヒト(mL/分/g) CYP450 阻害 Caco-2 Papp (A:B +{ベラパミル}) Fu 血漿 (マウス/ヒト) hERG (パッチクランプ)	0.6 0.5 1.2 2C19 (1uM で 19%) 43 [50] nm/秒 0.110 / 0.176 27.7	<0.5 1.0 0.7 ND ND 0.067 (マウス) ND
マウス IV Clb(mL/分/kg) Vss (L/kg) T _{1/2} (時間) マウス PO Cmax (ng/mL) 10mg/kg Tmax (時間) T _{1/2} (時間) F (%)	5 [3-7] 0.6 [0.4-0.7] 1.3 [1.3-1.4] 2686 [2122-3755] 0.25 [0.25-2] 1.2 [1.0-1.4] 20 [11-32]	3 [2-3] 0.4 [0.3-0.4] 1.5 [1.0-2.1] 11201 [6986-13416] 2 5.7 [2.7-8] 93 [51-100]
B:B 比 Fu 脳 Pgp	0.08 0.068 有り(流出比=5.4 Caco-2:>6 ラット)	0.04 ND ND

【0328】

(実施例11)

この実施例中、図10中では、24時間のNMT阻害剤トリスDBAに対する、様々な不死化正常LOBリンパ球(Dr.Riabowol,U.of Calgaryから入手)、悪性Bリンパ腫細胞(RamosとBL2)、およびT細胞白血病(CEM)の感受性を示す。(A)24時間トリスDBAで処置した様々な細胞系の残存率(n=9)(B)トリスDBAと24時間インキュベートしたNMT1またはNMT2を一過的に発現するCOS7細胞における、N-ミリストイルトランスフェラーゼ活性に対するトリスDBAの影響。in vitroにおいて、トリスDBAに関するIC₅₀は、NMT1に関して約2μMおよびNMT2に関して5μMである。パーキットリンパ腫細胞系RamosおよびBL-2は、NMT阻害剤トリスDBAに対する感受性がより高い。

【0329】

(実施例12)

この実施例中、図11中では、967の癌細胞系に関する専門書(CCLE)のデータベースにおけるNMT発現のレベルを決定した。パネルA)CCLEのデータベースをNMT1およびNMT2発現に

関して調べ、各NMTレベルをプロットした。NMT1(約6~9)と比較してNMT2は広範囲の発現を示す(約3~11)。パネルB)数種の癌亜型由来の癌細胞系のボックスおよびウィスカープロットをプロットし、967の癌細胞系全てのプロットと比較する。スチューデントのT検定を、全腫瘍と各群の比較により実施した。**は0.001より小さいP値を示す。パネルC)CCLEのデータベースを最も低いNMT2レベルで発現した50の細胞系に関して調べ、それを表形式で示した。様々な造血およびリンパ組織由来の腫瘍細胞系は最小NMT2発現細胞系の76%(50中38)を表し、様々な色で強調する。

【0330】

(実施例13)

この実施例中、図12中では、NMTはアポトーシス中に切断されるが依然活性状態である。パネルAおよびパネルB。抗Fasまたはスタウロスポリン媒介アポトーシスの過程を経るよう誘導したジャーカット細胞の溶解物を、ウエスタンブロッティングにより抗NMT1および抗NMT2を用いてプロービングし、両酵素の時間依存的切断を示す。ウエスタンブロッティングは、PAK2およびGAPDHに対する抗体を使用して同じサンプルで実施した。パネルCおよびパネルD。抗Fasまたはスタウロスポリン媒介アポトーシスの過程を経るよう誘導したジャーカット細胞における ω -アルキニル-ミリステートの組み込みは、細胞が死滅し始めるとミリストイル化プロファイルの変化を示し、NMTは切断されるがそれらは依然活性状態であることを示唆する。ジャーカット細胞は、抗FAS(100ng/ml)とシクロヘキシミド(5 μ g/ml)(C)またはスタウロスポリン(2.5 μ M)とシクロヘキシミド(5 μ g/ml)(D)を用いたアポトーシスの誘導後に、25 μ Mのアルキニル-ミリステートで代謝的に標識した。タンパク質サンプルはクリックケミストリーを使用してアジド-ビオチンと反応させ、NeutrAvidin(商標)-HRPを用いたウエスタンブロッティングにより可視化した。ウエスタンブロッティングによる標識組み込みの評価の前に、膜を0.1MのKOHでインキュベートした(BおよびD)。パネル(E)示した様々な時点で、ct-Bid N末端デカペプチドおよび[3 H]-ミリストイル-CoAを使用してNMT活性をアッセイした。両NMT酵素が切断され両方共に依然触媒活性状態であるが、NMT1のみが有意な活性の消失を示す。(F)in vitroでのカスパーゼ-8および-3によるNMT1切断、ならびにカスパーゼ-3によるNMT2切断の再構築(クーマシー染色ゲル)。精製His-NMT1およびHis-NMT2(それぞれ5ug)を、活性カスパーゼ3および8(それぞれ500ng)と37°Cで1時間インキュベートした。一般的カスパーゼ阻害剤(z-VAD-fmk)をインキュベーションの最後に加えて、反応がさらに進行するのを止めた。 β -メルカプトエタノールを含む5×サンプルローディングバッファーと共にサンプルをすぐに煮沸し、10%アクリルアミドゲル上に載せPVDF膜上に移した。次いで膜をクーマシーブルーで染色し、タンパク質を可視化した。エドマン分解のため送付された切断断片に箱印をつけ、D72後のNMT1ならびにD25およびD67後のNMT2におけるカスパーゼ切断部位の同定を可能にした。

【0331】

(実施例14)

この実施例中、図13中では、組換えGST-ならびにHis6-タグhNMT1およびhNMT2の精製を示す。パネル(A)グルタチオンアガロースでのGST-NMT1精製および(B)GST-NMT2精製、(C)Ni-キレートクロマトグラフィーおよびResource Sイオン交換クロマトグラフィーによるHis6-NMT1精製および(D)His6-NMT2精製。図13、パネルCおよびD中、レーンは以下の通りである。パネル(C)ゲルA:NMT1の精製:1)全てブルーマーカー、2)Ni-NTAカラムプール、3)ゲル濾過プール、4)Resource SのFT、5)分画8(f8)、6)f16、7)f18、8)f19、9)f20、10)f21、11)f22、12)f41、13)f42、14)f66、15)f67。パネル(D)ゲルB:NMT2の精製:1)全てブルーマーカー、2)Ni-NTAカラムプール、3)ゲル濾過プール、4)Resource SのFT、5)分画21(f21)、6)f28、7)f38、8)f39、9)f40、10)f41、11)f42、12)f44。

【0332】

(実施例15)

この実施例中、図14中では、精製組換え完全長His6-NMT1と組換え「カスパーゼ切断型」ct-His₆-NMT1の間の酵素活性の比較を示す。完全長His₆-NMT1(アミノ酸73~496)。King et al.1999,Anal Biochemから取り入れたペプチドミリストイル化アッセイを使用してNM

T活性をアッセイした。実験は二連。

【0333】

(実施例16)

この実施例中、図15中では、様々なNMT阻害剤および異なる細胞系のEC50とIC50の比較を示す。グラフは、生化学的酵素アッセイにおける8個のNMT阻害剤の生化学的効能(IC50)と、7個の細胞系を使用したアラマーブルー細胞生存率アッセイにおけるそれらの効能(EC50)の間の相関関係を示す。回帰分析を各細胞系で実施し0.9の平均R2値(範囲0.82~0.96)を得た。様々なIC50とEC50の間のこの高レベルの相関関係は、細胞生存率アッセイにおける分子の活性は、NMTでのそれらの阻害活性によるものであることの強力な証拠である。2対の分子は生化学的アッセイでは類似した効能があることを記す。

10

【0334】

(実施例17)

この実施例中、図16中では、BL細胞でのDDD86481によるアポトーシスの誘導を示す。

【0335】

「正常」不死化Bリンパ球(IM9)、KMH2(ホジキンリンパ腫)ならびにBL(BL2とRamos)細胞を高濃度(nM)のDDD86481とインキュベートし、72時間の時点後にポリ-ADP-リボースポリメラーゼ-1(PARP-1)およびカスパーゼ-3の切断をモニタリングした。ウエスタンブロッティングを細胞溶解物に実施して、PARP-1およびカスパーゼ-3の切断、ならびに充填対照としてのGAPDHの存在をモニタリングした(コンボジットゲル)。BL細胞系を阻害剤で処置すると、PARP-1切断とカスパーゼ-3切断の両方が用量依存的に起こり、これらの細胞がアポ

20

【0336】

(実施例18)

この実施例中、図17中では、ヒト腫瘍におけるNMT2の消失に関する閾値の推定値を与える。Table 7(表7)中では、利用可能な場合CCLEデータセットの表示細胞系に関するlog₂(マイクロアレイ蛍光強度NMT2)としてNMT2 mRNAの発現レベルを示す。

30

【0337】

【表 7】

Table 7

細胞系	NMT2 mRNA の発現レベル*
IM-9 (不死化 B リンパ球)	N/A
KMH2 (ホジキンリンパ腫)	N/A
BL-2 (バーキットリンパ腫)	3.96
Daudi (バーキットリンパ腫)	N/A
ラモス (バーキットリンパ腫)	N/A
DB (DLBCL)	3.94
Pfeiffer (DLBCL)	4.78
Toledo (DLBCL)	5.64

【0338】

図17、パネルA中では、示したリンパ球様細胞系をウエスタンブロッティングによりNMT2の存在に関して調べた。図17、パネルB中では、パネルAとTable 7(表7)を比較することにより、本発明者らは、Toledo細胞で観察した $\log_2$ (マイクロアレイ蛍光強度NMT2)=5.64において、ウエスタンブロッティングによりNMT2は検出不能であることを実証する。NMT2発現の消失に関する実際の閾値は5.64より高い可能性はあるが、本発明者らは、この実施例では、ヒト集団におけるNMT2消失の大まかな広がり確立するための閾値としてこの数値を使用している(パネルB)。データは、NMT2の消失はバーキットリンパ腫とびまん性大細胞型B細胞リンパ腫だけでなく、非常に様々な他の腫瘍タイプでも広がることを示す(少なくともNMT2を発現する50の細胞系の一覧に関する図11C、および様々な癌タイプにおけるNMT2消失の広がりに関する表も参照)。

【0339】

したがって本明細書では、1つまたは複数のNMT1阻害剤で治療するのに適したNMT2欠損癌を同定する方法を提供する。一例では、ほぼ閾値未満のmRNAレベルまたは濃度を有する患者サンプルは、前記患者がNMT1阻害剤で治療するのに適した候補であることを示す。幾つかの例では、ほぼ閾値未満のmRNAレベルを低発現と呼ぶ。一例では、ほぼ閾値を超えるmRNAレベルまたは濃度を有する患者サンプルは、前記患者がNMT1阻害剤で治療するのに適していない候補であることを示す。幾つかの例では、ほぼ閾値を超えるmRNAレベルを高発現と呼ぶ。

【0340】

Toledo細胞に関して確立した閾値に加えて、またはその代わりに、適切な閾値として別の供給源を使用することができることは理解されよう。幾つかの例では、閾値を得るために使用する供給源または対照は、試験対象の癌と同じ細胞タイプである。幾つかの例では、供給源または対照の閾値はデータベースにおいて保存または発見される。

【0341】

(実施例19)

この実施例中、図18中では、ストレプトアビジン-セファロースビーズを使用し白血病ジャーカーカットT細胞において、翻訳後 ω -アルキニル-ミリストイル化タンパク質をプルダ

ウンするためのデスチオビオチン-PEG-アジドプローブの使用を示す。

【0342】

(I中に示す)デスチオビオチンは、アビジンおよびアビジン様タンパク質と可逆的に結合するビオチンのアナログである。本発明者らは、デスチオビオチン-PEG-アジド(I.)およびビオチン-PEG-アジド(II.)の合成を設計し整理した。

【0343】

(B)では、ジャーカットT細胞を ω -アルキニル-ミリステートの存在下で増殖させ、シクロヘキシミドの存在下で抗Fas媒介アポトーシスの過程を経るよう誘導した。細胞溶解後、溶解物を、クリックケミストリーの使用有りまたは無しでデスチオビオチン-PEG-アジドと反応させ、ニュートラビジン-セファロースビーズと混合し、洗浄し10mMのビオチンで溶出した。パネルB(i)は、デスチオビオチン-PEG-アジドと反応させたタンパク質をプルダウンし、ニュートラビジンビーズレーン5、6、7およびB(iii)から効率よく回収することができることを示す。パネルB(ii)中では、デスチオビオチン-PEG-アジドをクリック反応から削除した対照を示す。その場合、ニュートラビジン-ビーズと結合した非常に少量のタンパク質を溶出させた(薄いバンドのみを75kDaで見ることができる)。これらの結果はプロテオーム解析を可能にする方法の進展を示し、共翻訳および翻訳後ミリスティル化タンパク質またはミリスティロームの細胞内含有量を評価する。

【0344】

(実施例20)

この実施例中、図19中では、ストレプトアビジン-磁気ビーズを使用し白血病ジャーカットT細胞において、翻訳後 ω -アルキニル-ミリスティル化タンパク質をプルダウンするためのデスチオビオチン-PEG-アジドプローブの拡大使用を示す。ジャーカットT細胞を、3時間2.5 μ Mのスタウロスポリンでアポトーシスの過程を経るよう誘導し、次いで37°Cで1時間いずれもBSAと結合した100 μ Mのミリステート(C14)(パネルA)またはアルキニル-ミリステート(Alk C14)(パネルB)で標識した。細胞を回収し、溶解しクリックケミストリーを使用してアジド-デスチオビオチンと反応させた。デスチオビオチン-アルキニル-ミリスティル化タンパク質をストレプトアビジン磁気ビーズと結合させ、洗浄し50mMビオチンおよび2%SDSで15分間37°Cで溶出した。溶出液1(パネルB)は多量のデスチオビオチン-ミリスティル化タンパク質を含有する一方で、ミリステートで標識した細胞由来の溶出液1ではほとんど見られない(パネルA)。露出時間:5秒間。

【0345】

(実施例21)

この実施例中、図20中では、アルキニル-ミリステートで標識した「正常」不死化B細胞(IM9)およびBL細胞(BL2とRamos)のミリスティル化プロファイルを示す。採取前に1時間、100 μ Mのアルキニル-ミリステートで細胞を代謝的に標識した。クリックケミストリーを使用してアジド-ビオチンとタンパク質サンプルを反応させ、各細胞溶解物由来のタンパク質25 μ gをSDS-PAGEにより分離し、NeutrAvidin(商標)-HRPを使用したウェスタンブロッティングにより可視化した。矢印は、「正常」不死化Bリンパ球IM9には存在したがBL細胞(BL2とRamos)では見られなかった、ビオチニル化-アルキニル-ミリスティル化タンパク質を示す。

【0346】

(実施例22)

この実施例中、図21中では、DDD86481とドキシソルビシンの組合せからの時間および用量依存的細胞毒性グラフを示す。Bリンパ球性細胞系IM-9(A)およびBL-2(B)を、24、48または72時間(上部～底部)、0(青色)、17(赤色)および86nM(緑色)のヒドロキシドキシソルビシンで高濃度のDDD86481(0、0.001、0.01、0.1、1.0、10および100 μ M)と共に処置した。MTSアッセイは、個別では非常に毒性が低い濃度のドキシソルビシンとDDD86481により誘導された細胞殺傷を実証し、この影響は相乗的相互作用と一致する。これは、24時間と48時間の時点におけるDDD86481の単独使用に関するEC₅₀と比較して、両化合物を一緒に使用したときのEC₅₀の6倍の低下によって特徴付けられる。

【0347】

(実施例23)

この実施例中、以下のTable 8(表8)中では、北アメリカでの多種のヒトの癌におけるNMT2消失の大きな広がりを評価する。本発明者らは、NMT2がない細胞(Toledo細胞、実施例18参照)に相当する $\log_2$ (マイクロアレイ蛍光強度)に関する5.64の最小カットオフ値を確立し、967細胞系の114(約12%)がこの閾値より下の範囲にあることを発見した。北アメリカでの各腫瘍タイプの発生率、NMT阻害療法からの利点を示す患者の数(閾値未満の発生率X%)、および選択した癌のメディカルニーズに関する根拠も示す。

【0348】

【表8】

10

TABLE 8

癌のタイプ	NMT2 閾値未満の細胞系の割合	カナダでの発生率	米国での発生率	北アメリカ市場で療法適用可能	優先的調査の根拠
B細胞リンパ腫	88%	6,630	59,280	58,000	多大な後遺症、アンメットメディカルニーズ
バーキットリンパ腫	82%	130	1,050	970	多大な後遺症、アンメットメディカルニーズ
びまん性大細胞型B細胞リンパ腫	70%	2,730	24,400	18,990	多大な後遺症、アンメットメディカルニーズ
急性骨髄性白血病	41%	1,130	14,590	6,450	多大な後遺症、アンメットメディカルニーズ
骨髄腫	36%	2,500	22,350	8,950	多大な発生率、後遺症、アンメットメディカルニーズ
卵巣明細胞癌	29%	550	22,240	6,610	
移行細胞癌(尿管および膀胱癌)	21%	7,090	67,960	15,760	分子標的薬治療が利用不能
慢性骨髄性白血病(CML)	20%	537	5,920	1,290	
リンパ腫-CLL	20%	2,090	15,680	3,550	
肺小細胞癌	13%	3,830	34,270	4,950	分子標的薬治療が利用不能
乳癌	12%	2,400	234,580	28,440	多大な発生率
結腸直腸腺癌	12%	22,700	142,700	19,850	多大な発生率
膵腺癌	9%	4,700	45,220	4,490	非常に高いアンメットメディカルニーズ、および分子標的薬治療がないこと
卵巣癌	9%	2,600	22,240	2,240	
非小細胞肺癌	8%	21,670	193,900	17,250	多大な後遺症、アンメットメディカルニーズと共通
骨肉腫	8%	350	800	90	
メラノーマ	7%	6,000	76,690	5,790	
胃腺癌	5%	3,300	21,600	1,250	
子宮内膜腺癌	5%	5,600	49,560	2,760	
食道扁平上皮癌	5%	2,000	16,190	910	
合計		98,537	1,071,220	208,590	

20

30

40

【0349】

(実施例24)

この実施例中、図22中では、DMSO、スタウロスポリン、 α FAS、または担体のみとインキュベートした細胞でイムノブロットングを実施した。生成したイムノブロットは、抗NMT1抗体、抗NMT2抗体、抗PARP-1抗体、および抗GAPDH抗体でプロービングした。これら

50

のデータは、NMTがアポトーシスの誘導により切断されることを示す。

【0350】

特にこの実施例中、図22A中では、生存細胞と死滅細胞におけるNMTの役割を調べた。抗FasまたはSTSでプログラムされた細胞死を経るよう誘導したジャーカットT細胞を、それらのNMT含有量に関して分析した。ジャーカットT細胞はDMSO、スタウロスポリン(2.5 μ M)または抗Fas(300ng/ml)およびシクロヘキシミド(5 μ g/mL)で処置し、サンプルは0、2、4、6および8時間の時点で回収した。細胞を溶解し、NMT1、NMT2、PARP-1、およびGAPDHの存在を、ECLを使用したウエスタンブロッティングにより評価した。抗FasまたはSTSのいずれかをを用いたジャーカットT細胞の処置は、NMT1とNMT2の両方の時間依存的切断をもたらした(図22A)。NMT1の切断は細胞死の誘導後2時間で始まり、一方NMT2の切断はアポトーシスの4時間後のみで検出可能であった。

10

【0351】

みかけ67kDaのタンパク質(予想分子量=56.8kDa)で移動したNMT1の切断によって、みかけ約46kDaの断片が生じた(図3.1)。みかけ65kDaのタンパク質(予想分子量=56.9)で移動したNMT2の切断によって初期の時点でみかけ約55kDaの断片が生じ、これは後期の時点(4時間と8時間)において約46kDa以下で移動しより短い断片に転換された。この短いNMT2断片は、非特異的タンパク質バンドと重複して見られた。しかしながら、図3.2(8時間)および図3.4A(4時間と8時間)において、それはFas処置ジャーカットT細胞溶解物でさらによく見えた。したがって、NMT1とNMT2の切断は、それぞれ約11kDa断片と約10kDa断片の消失を主として初期にもたらす。NMTのみかけの移動と予想分子量の間の不一致の理由は知られていない。NMTの切断のタイミングはアポトーシスマーカーPARP-1のそれと近似し、それがカスパーゼの作用によるものであることが示唆される。

20

【0352】

NMT1はカスパーゼ-3または-8の基質であり、NMT2はカスパーゼ-3の基質である。

【0353】

図22パネルBの実験中、カスパーゼがNMTの切断に関与するかどうか調べるため、本発明者らは、一般的カスパーゼ阻害剤と共に充分特徴付けられたカスパーゼ-3、-8および-9不可逆的阻害剤の存在下または非存在下で、ジャーカットT細胞において抗Fas媒介アポトーシスを誘導し、両NMTの細胞内含有量を分析した。ジャーカットT細胞は10 μ Mのカスパーゼ阻害剤で1時間処置し、次いで抗Fas(300ng/mL)およびシクロヘキシミド(5 μ g/mL)で処置してアポトーシスを誘導した。サンプルは0、4、および8時間の時点で回収した。細胞を溶解し、NMT1、NMT2、およびPARP-1の存在を、ECLを使用したウエスタンブロッティングにより評価した。次いでプロットを剥離し、抗チューブリン(充填対照)(コンボジットゲル)で再度プロービングした。

30

【0354】

NMT1の切断は一般的小およびカスパーゼ-8特異的阻害剤により無効となったが、一方それはカスパーゼ-3特異的阻害剤によりごく部分的に遮断され(図22B)、NMT1がカスパーゼ-3または-8の基質であることが示唆される。対照的に、NMT2の切断は使用した全てのカスパーゼ阻害剤により顕著に阻害された(図22B)。これは、NMT2はおそらくカスパーゼ-3の基質であることを示唆する。イニシエーターカスパーゼ-8または-9の阻害は、エフェクターカスパーゼ-3の切断と活性化を順に阻害するからである。抗Fasによって誘導したアポトーシスの進行は、抗PARP-1抗体を用いたウエスタンブロッティングによって確認した(図22B)。PARP-1切断の程度はNMT1およびNMT2のそれに付随し釣り合った。

40

【0355】

(実施例25)

この実施例中、図23中では、カスパーゼ切断型NMT2が完全長NMT2より3~4倍活性があることを示す。精製完全長およびカスパーゼ切断型ヘキサヒスチジン(His)-NMTのNMT活性は、ペプチドミリスチル化アッセイを使用してアッセイした。N-ミリスチルトランスフェラーゼ活性は生成した放射標識ミリスチルペプチドの量から計算し、(King et al.1991, Anal Biochem. から取り入れた)ホスホセルロースペーパーで検出した。それぞれのNMT

50

アッセイは三連で実施した。使用した対照はHis-NMT1精製からの溶出液5である。カスパーゼ切断型NMT2は完全長NMT2より3~4倍活性がある。

【0356】

(実施例26)

この実施例中、図24中では、BL細胞におけるNMT2レベルの低下はヒストンデアセチラーゼの作用と関係があることを示す。

【0357】

図24の実験中、本発明者らは、NMT2遺伝子座における遺伝子サイレンシングの考えられる関与を評価するよう努めた。ヒストンアセチラーゼ(HAT)によるヒストン上のリシン残基のε-アミノ基のアセチル化はヒストンの正電荷の減少をもたらし、これによってクロマチン構造が弛緩し転写機構がDNAによりアクセスし易くなる(Barneda-Zahonero, B., and M. Parra. 2012. Histone deacetylases and cancer. Mol Oncol. 6:579~589頁.)。したがって、ヒストンアセチル化は遺伝子活性化と典型的には関係がある。逆に、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)によるヒストンからのアセチル基の除去はクロマチン凝縮を誘導し、転写抑制または遺伝子サイレンシングをもたらす。

【0358】

mRNA NMT2の減少がクロマチンサイレンシングによるものであったかどうか試験するため、本発明者らは、24時間(ポリノスタットとも呼ばれる)スベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)、クラスIおよびクラスIIヒストンデアセチラーゼ阻害剤で「正常」B細胞(IM9)および悪性BL細胞を処置し、ウエスタンブロットによりNMT1とNMT2のレベルをモニタリングした。詳細には、「正常」B細胞(IM9)および悪性BL細胞(Ramos, BL2)を24時間1μMのSAHA(HDACクラスI/II阻害剤)で処置した。次いで細胞を溶解し、SDS-PAGEに施し、NMT1、NMT2、p21/WAF1およびGAPDH抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施した。

【0359】

本発明者らは、SAHAの使用によりBL細胞におけるNMT2レベルが上昇し、NMT2レベルは典型的には枯渇状態であり、一方NMT1レベルは比較的不変状態であったことを発見した。サイクリン依存性キナーゼ1(CDK1)またはCDK2複合体と結合しその活性を阻害するタンパク質、p21/WAF1を対照として使用し、細胞におけるp21/WAF1遺伝子発現を増加させることが知られているSAHAの有効性を確認した。SAHAで処置した全ての細胞が高レベルのp21/WAF1を含有していた。理論によって縛られることは望まないが、これらのデータは、ヒストンデアセチル化、およびそれによってBL細胞におけるNMT2遺伝子座をコンパクトにすることにより、クラスIまたはクラスII HDACがNMT2遺伝子を発現抑制することを示唆する。

【0360】

一例では、HDAC阻害剤を使用してNMT2欠陥癌を治療する。

【0361】

(実施例27)

この実施例中、図25中では、様々なBL細胞系においてNMT2タンパク質レベルが低下することを示す。様々なリンパ球性細胞系由来の溶解物を地方の研究者から集め、それらのNMT含有量を分析した。結果は、「正常」不死化リンパ芽球B細胞系、IM9、L0およびVDSと比較したとき、試験した全てのバーキットリンパ腫(BL2、Daudi、RamosおよびBJAB)細胞系においてNMT2タンパク質レベルが低下したことを実証する。

【0362】

(実施例28)

この実施例中、図26中では、プロテオソームによる分解がBL細胞におけるNMT2枯渇の原因ではないことを示す。これらの実験では、「正常」不死化Bリンパ球(IM9)および悪性Bリンパ腫細胞[ホジキンリンパ腫(KMH2)およびBL(Ramos, BL2)]を、5時間10μMのプロテオソーム阻害剤(MG-132)で処置した。ウエスタンブロッティングを細胞溶解物で実施して、NMT1、NMT2、Mc1-1、およびGAPDHのレベルをモニタリングした。

【0363】

突然変異の不安定化または癌細胞においてNMT2を不安定状態にし得る未知の因子の存在

の結果として、NMT2の分解が増大したかどうか調べるため、本発明者らは、正常および悪性リンパ球をプロテオソーム分解阻害剤MG-132で5時間処置した。細胞溶解物にウェスタンブロッティングを施しNMT1、NMT2および骨髄性白血病細胞1タンパク質(Mcl-1)の存在を分析して、それを対照として使用しMG-132の有効性を調べた。それはプロテオソーム分解の影響を受けるからである。結果は、MG-132を用いた処置によりBL細胞ではNMT2レベルは増大しなかったことを示し、悪性リンパ球に存在しNMT2の分解をもたらす不安定突然変異または不安定因子は存在しないことを示唆する。MG-132を用いた細胞の処置は、全ての細胞タイプでMcl-1のレベルの増大をもたらした。

【0364】

(実施例29)

10

この実施例中、図27中では、NMT2ではなくNMT1がカスパーゼ-8により切断されることが示される。ジャーカットT細胞(A)およびカスパーゼ-8ドミナントネガティブ突然変異体発現ジャーカットT細胞(B)をDMSOまたは抗Fas(150ng/mL)で処置し、サンプルは0、4、および8時間の時点で回収した。細胞を溶解し、NMT1、PARP-1および切断型カスパーゼ-8の存在を、ECLを使用したウェスタンブロッティングにより評価した。*は非特異的バンドを示す。

【0365】

NMT1の切断は、野生型ジャーカットT細胞およびカスパーゼ-8ドミナントネガティブ突然変異体発現ジャーカットT細胞(C8DN)において調べた(Juo et al., 1998)。野生型ジャーカットT細胞において見られたレベルと比較すると、アポトーシス状態のジャーカットT細胞におけるC8DNの発現はNMT1の切断を無効にした(図27Aおよび図27B)。最小量のNMT2切断を、アポトーシス誘導の8時間後ジャーカットT-C8DN細胞において観察した(図27B)。PARP-1およびカスパーゼ-8の切断もジャーカットT-C8DN細胞において阻害された。

20

【0366】

(実施例30)

この実施例中、図28中では、NMT1とNMT2の両方がカスパーゼ-3により切断された。MCF7(A)およびカスパーゼ3発現MCF7(MCF7/カスパーゼ3)(B)を、DMSOまたはSTS(2.5 μM)およびシクロヘキシミド(5 μg/mL)で処置し、サンプルは0、4、および8時間の時点で回収した。細胞を溶解し、NMT2、PARP-1および切断型カスパーゼ3の存在を、ECLを使用したウェスタンブロッティングにより評価した。

30

【0367】

NMT1とNMT2の両方が、8時間の時点ではアポトーシス状態のMCF-7細胞において切断されなかったことが分かった(図28A)。対照的に、カスパーゼ-3を安定的に発現するアポトーシス状態のMCF-7細胞において両酵素は容易に切断された(Kagawa et al., 2001)(図28B)。アポトーシスを誘導したとき、両MCF-7細胞系において既知のカスパーゼ-3/-7基質PARP-1の切断も確認した(図27Aおよび図27B)(Walsh et al., 2008)。したがって、両方のNMTがカスパーゼ-3の基質であると思われる。

【0368】

(実施例31)

この実施例中、図29中では、エドマン分解により同定したNMT1とNMT2のカスパーゼ切断部位を太字で示し、正に帯電したリシン(K)ボックスをNMT1およびNMT2アミノ酸配列(アミノ酸1~80)で強調する。

40

【0369】

N末端配列決定により、NMT2がD-25部位とD-67部位の両方で切断されたことが明らかになった(図29)。NMT1とNMT2の両方に関する切断部位がC-末端触媒ドメインではなく酵素のN末端に位置し、これは切断酵素がアポトーシス中依然活性状態であり得ることを示唆する。

【0370】

(実施例32)

この実施例中、図30中では、部位特異的突然変異誘発によるNMT切断部位の確認を示す

50

。野生型および突然変異V5-NMT構築物を一過的に発現したHeLa細胞をSTS(2.5 μ M)とインキュベートした。V5-NMT1またはV5-NMT2構築物でトランスフェクトした細胞は、それぞれ4時間と5時間の時点で溶解した。ウエスタンブロッティングは、V5および α -チューブリン(充填対照)抗体を使用してこれらのサンプルで実施した。

【0371】

N末端配列決定により明らかとなったNMT切断部位を確認するため、本発明者らはN末端タグV5-NMTベクターを構築し、Quickchange(登録商標)部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene社)を使用してNMT切断部位に点突然変異を作製した。V5-NMT1における操作型D72E突然変異は、4時間STSでアポトーシスの過程を経るよう誘導し適切にトランスフェクトしたHeLa細胞においてV5-NMT1のカスパーゼ切断を無効にしたが、一方で野生型のV5-NMT1

10

【0372】

N末端配列決定によりNMT2に関する2つのカスパーゼ切断部位(D25およびD67)を明らかにしたので(図30)、本発明者らは、D25残基とD67残基の両方を個別[V5-NMT2(D25E)、V5-NMT2(D67E)]および一緒に[V5-NMT2(D25,67E)]グルタミン酸(E)残基に突然変異させた。本発明者らは、V5-NMT2(D25,67E)二重突然変異の切断は適切にトランスフェクトしたアポトーシス状態のHeLa細胞において著しく効力を失ったが、一方で単一突然変異[V5-NMT2(D25E)、V5-NMT2(D67E)]には様々な影響があり(図30)、野生型V5-NMT2はアポトーシス誘導後5時間後に大部分が切断されたことを観察した(図3.8)。アポトーシス中の単一突然変異の完全性を比較したとき、本発明者らは、V5-NMT2(D25E)は再現的にV5-NMT2(D67E)より若干切断されなかったことを観察し(図30)、D25はNMT2の一次切断部位である可能性があり、一方D67は二次切断部位である可能性があることが示唆される。

20

【0373】

(実施例33)

この実施例中、図31中では、細胞がアポトーシスの過程を経るときのミリスチル化プロファイルに対する変化を示す。抗Fas(150ng/mL)およびシクロヘキシミド(5 μ g/mL)を用いたアポトーシスの誘導後、25 μ Mのアルキニル-ミリスチレートでジャーカット細胞を代謝的に標識した。クリックケミストリーを使用してアジド-ビオチンとタンパク質サンプルを反応させ、NeutrAvidin(商標)-HRPを用いたウエスタンブロッティングにより可視化した。ウエスタンブロッティングにより標識の組み込みを評価する前に、膜を0.1Mのトリス-HClまたは0.1MのKOHでインキュベートした。

30

【0374】

抗Fasを使用してジャーカットT細胞がアポトーシスの過程を経るよう誘導し、様々な時点(0、1、2、4および8時間)で細胞を採取する前に ω -アルキニル-ミリスチン酸で30分間代謝的に標識した。シクロヘキシミドも細胞に加え、アポトーシス刺激の一部としてのタンパク質翻訳を阻害し、それによってアポトーシス中の共翻訳ミリスチル化をブロックした。クリックケミストリーを使用してアジド-ビオチンと細胞溶解物を反応させ、ビオチニル化-ミリスチル化タンパク質は、以前に記載されたように(Yap et al.,2010)、NeutrAvidin(商標)-HRPを使用したウエスタンブロット分析により可視化した。

40

【0375】

時間0時間におけるミリスチル化プロファイルは、非アポトーシス細胞で以前に観察された共翻訳ミリスチル化パターンと相関関係があった(図31)(Martin et al.,2008;Yap et al.,2010)。故意に低い露出は、細胞溶解物中のごく少量のミリスチル化タンパク質を示す。0.1MのKOHを用いた膜の処置によって、 ω -アルキニル-ミリスチン酸がアルカリ耐性アミド結合を介してタンパク質に組み込まれることを確認した。アルカリ処置は、ごく少量のタンパク質バンドから標識を除去したからである。このアルカリ処置は、パルミトイル化タンパク質において見られるチオエステル結合を加水分解する(Armah and Mensa-Wilmot,1999;Zhao et al.,2000;Vilas et al.,2006)。抗Fasおよびシクロヘキシミドを用いて1時間アポトーシスを誘導した後、おそらくシクロヘキシミドによりタンパク質

50

翻訳が阻害されたため、共翻訳ミリストイル化は減少した。これは、アポトーシス誘導後2時間で始まり実験の時間中続く電気泳動でのミリストイル化タンパク質プロファイルの大きな違いにより例示される、細胞のミリストイル化タンパク質含有量の変化を伴った(図31)。

【0376】

(実施例34)

この実施例中、図32中では、細胞がアポトーシスの過程を経るときのNMTレベルに対する変化を示す。抗Fas(150ng/mL)およびシクロヘキシミド(5 µg/mL)を用いたアポトーシスの誘導後、25 µMのアルキニル-ミリスレートでジャーカット細胞を代謝的に標識した。ウエスタンブロッティングは、NMT1、NMT2およびGAPDHに対する抗体を使用して図31中と同じサンプルで実施した。(*)は非特異的バンドを示す。

10

【0377】

これらの結果は、アポトーシス中NMTは様々な程度に切断されるが、ミリストイル化活性はアポトーシス誘導後8時間まで細胞において維持され得ることを示す。

【0378】

(実施例35)

この実施例中、図33中では、スタウロsporinおよびシクロヘキシミドを用いてアポトーシスの過程を経るための、V5-NMT1およびV5-NMT2を一過的に発現するCOS7細胞の誘導を示す。NMT活性はペプチドミリストイル化アッセイを使用してアッセイし、ウエスタンブロッティングは、v5およびα-チューブリンに対する抗体(充填対照)を使用してこのサンプルで実施した。

20

【0379】

図34は、一過的にトランスフェクトしたCOS7細胞の溶解物における初期NMT活性を示す。V5-NMT1およびV5-NMT2を一過的に発現したCOS7細胞を、STS(2.5 µM)およびシクロヘキシミド(5 µg/mL)とインキュベートした。材料および方法中に記載したように、ペプチドミリストイル化アッセイを使用してNMT活性をアッセイした。N-ミリストイルトランスフェラーゼ活性は生成した放射標識ミリストイルペプチドの量から計算し、(King et al., 1991, Anal Biochem.から取り入れた)ホスホセルロースペーパーで検出した。活性レベルはt=0時間でNMT1活性に標準化した。NMT1は二連で実施した3回の独立実験の平均を表す。NMT2は二連で実施した4回の独立実験の平均を表す。

30

【0380】

図35は、スタウロsporin(2.5 µM)およびシクロヘキシミド(5 µg/mL)とインキュベートしたV5-NMT1およびV5-NMT2を一過的に発現するCOS7細胞におけるNMT活性を示す。材料および方法の下に記載したように、ペプチドミリストイル化アッセイを使用してNMT活性をアッセイした。N-ミリストイルトランスフェラーゼ活性は生成した放射標識ミリストイルペプチドの量から計算し、(King et al., 1991, Anal Biochem.から取り入れた)ホスホセルロースペーパーで検出した。NMT活性は、それぞれのNMTに関してt=0時間で100%に標準化した。NMT1は二連で実施した3回の独立実験の平均を表す。NMT2は二連で実施した4回の独立実験の平均を表す。差は(*)によって示し、両NMTに関して0時間の時点で比較したときの統計学的有意を示す(*<p=0.05, **<p=0.005)。

40

【0381】

切断型NMTに依然触媒活性があるかどうか評価するため、本発明者らは、アポトーシスの発生中フィルターベースペプチドアッセイ(King and Sharma,1991;Raju and Sharma,1999)を使用して、いずれかのV5-NMTを発現する一過的トランスフェクト細胞のV5-NMT酵素活性を測定した。V5-NMT1、V5-NMT2または空ベクターで一過的にトランスフェクトしたCOS-7細胞はSTS/シクロヘキシミド媒介アポトーシスの過程を経るよう誘導し、酵素の供給源として使用した。NMT活性は[3H]-ミリストイル-CoAを使用しアポトーシスの異なる時期で測定し、ミリストイル化または非ミリストイル化(G->A)切断型Bidデカペプチドを基質として使用した(King and Sharma,1991;Raju and Sharma,1999)。NMT活性は、ホスホセルロースペーパーと結合状態であった放射標識ペプチドの量から計算し、シンチレーション

50

計数法により検出した。

【0382】

トランスフェクトCOS-7細胞は類似したレベルのキメラNMTを発現したが(図32)、V5-NMT1を発現した細胞は、t=0時間でV5-NMT2を発現した細胞よりほぼ5倍高いNMT活性を示した(図34)。細胞溶解物において見られた完全V5-NMTの量はアポトーシス誘導の時間にわたり減少し(図33)、内在性NMTと類似した傾向を伴ったが(図32)、ほぼ全ての過剰発現NMT1がアポトーシスの4時間と8時間後に切断され、全ての過剰発現NMT2が8時間後に切断された(図3.33)。90%を超えるV5-NMT1がアポトーシス誘導後4時間で切断されたが(図3.33)、これらの細胞におけるNMT活性は、細胞死が始まった後8時間まで比較的不変状態であった。t=0時間での活性と比較したとき、NMT1を過剰発現したCOS-7細胞の溶解物においてt=2時間と4時間で(有意ではなかったが)NMT触媒活性が増大する若干の傾向があった(図3.35)。これは切断型V5-NMT1が、アポトーシス中、翻訳後ミリスチル化開始時に触媒活性があることを示唆する。しかしながら本発明者らは、V5-NMT1でトランスフェクトした細胞における0時間の時点と比較したとき、アポトーシス誘導後8時間でNMT活性の有意な低下を観察した(20%、 $p<0.05$)(図35)。

10

【0383】

V5-NMT2発現細胞のNMT活性は、カスパーゼによるV5-NMT2の切断が、アポトーシス誘導の8時間後に酵素活性の統計学的に有意な低下(t=0時間での活性と比較したとき33%低下)($p<0.005$)をもたらすまで、0時間から4時間までに有意に影響を受けることはなかった(図35)。興味深いことに、アポトーシス中のカスパーゼによる切断のためNMT2レベルは大幅に低下するが(図33)、NMT2活性の66%はアポトーシス誘導の8時間後に依然として保たれ(図33)、NMT2はアポトーシス中のタンパク質の翻訳後ミリスチル化においても役割を果たすことを示す。

20

【0384】

(実施例36)

この実施例中、図36中では、組換えヘキサヒスチジン(His)-タグ完全長およびカスパーゼ切断型hNMT1の精製を示す。精製はNi-NTAクロマトグラフィーを使用して実施した(材料および方法参照)。精製タンパク質は、クーマシーブルーゲル染色液でゲルを染色することにより可視化した。(FT: フロースルー、W: 洗浄物およびE: 溶出分画)。

【0385】

図37は、組換えヘキサヒスチジン(His)-タグ完全長およびカスパーゼ切断型hNMT2の精製を示す。精製はNi-NTAクロマトグラフィーを使用して実施した(材料および方法参照)。精製タンパク質は、クーマシーブルーゲル染色液でゲルを染色することにより可視化した。(FT: フロースルー、W: 洗浄物およびE: 溶出分画)。

30

【0386】

図38は、ペプチドミリスチル化アッセイを使用してアッセイした、精製完全長およびカスパーゼ切断型ヘキサヒスチジン(His)-NMTのNMT活性を示す。N-ミリスチルトランスフェラーゼ活性は生成した放射標識ミリスチルペプチドの量から計算し、(King et al. 1991, Anal Biochem. から取り入れた)ホスホセルロースペーパーで検出した。それぞれのNMTアッセイは三連で実施した。使用した対照はHis-NMT1精製からの溶出液5である。

40

【0387】

本発明者らは、His-タグ完全長(His-NMT1およびHis-NMT2)ならびにカスパーゼ切断型(His-73NMT1、His-26NMT2およびHis-68NMT2)ヒトNMTベクターを作製し、細菌発現用およびタンパク質精製用にこれらのベクターを使用した(図36および図337)。本発明者らは、フィルターベースペプチドNMTアッセイ(King and Sharma, 1991; Raju and Sharma, 1999)を使用して、完全長とカスパーゼ切断型の切断型NMT1とNMT2の両方が、in vitro設定で対照と比較したとき、触媒活性があったことを発見した(図37)。NMT2の切断はその活性を高めるようである。カスパーゼ切断型の切断型NMT2は、完全長NMT2と比較したとき、約3倍(His-26NMT2)および約4倍(His-68NMT2)高い活性を有していた可能性があるからである(図38)。

【0388】

50

(実施例37)

この実施例中、図39中では、アポトーシス中のHeLa細胞における内在性NMTの細胞成分分画化を示す。HeLa細胞はDMSO、STS(2.5 μ M)または抗Fas(300ng/mL)およびシクロヘキシミド(5 μ g/mL)で処置し、サンプルは5時間の時点で回収し、材料および方法中に記載したように細胞成分分画化を施した。同体積のP100分画とS100分画を、NMT1およびNMT2抗体を使用したウエスタンブロッティングに施した。

【0389】

図40は、アポトーシス中のHeLa細胞における内在性NMTの細胞成分分画化後の、異なる分画中のNMTの量の定量化を示す。HeLa細胞はDMSO、STS(2.5 μ M)または抗Fas(300ng/mL)およびシクロヘキシミド(5 μ g/mL)で処置し、サンプルは5時間の時点で回収し細胞成分分画化を施した(図39)。P100(P)分画とS100(S)分画の間の完全長(Full)ならびに切断型NMT1(A)およびNMT2(B)のレベルを、Image J(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を使用して定量化した。示した割合は、2分画(P100+S100)全体にわたる各バンドのレベルとして計算した。グラフは3回の独立実験の平均を表す。

【0390】

図41は、アルキニル-ミリステートで標識しアポトーシスの過程を経たHeLa細胞の細胞成分分画化を示す。細胞成分分画化(図39および図40)の前、アポトーシスの誘導後に、25 μ Mのアルキニル-ミリステートでHeLa細胞を代謝的に標識した。分画化後、クリックケミストリーを使用してアジド-ビオチンとタンパク質サンプルを反応させ、NeutrAvidin(商標)-HRPを用いたウエスタンブロッティングにより可視化した。ウエスタンブロッティングにより標識の組み込みを評価する前に、膜を0.1Mの中性トリス-HCl(A)または0.1MのKOH(B)でインキュベートした。

【0391】

カスパーゼによる多くのタンパク質の切断は、細胞内局在の変化をもたらすことが多い(Enari et al.,1998;Zha et al.,2000;Jakobi,2004;Vilas et al.,2006);したがって、アポトーシス中の切断型NMTの局在を表すため、本発明者らは、正常細胞とアポトーシス細胞で細胞成分分画化実験(図39)を実施した。本発明者らは、未処置HeLa細胞において、NMT1は主にリボソーム/膜分画に局在して見られたことを発見した(ペレット中63.9%)(図40)。STSまたは抗Fasおよびシクロヘキシミドでアポトーシスの過程を経るよう誘導したHeLa細胞のサイトゾル分画において切断カスパーゼ切断型NMT1の増大が認められた(抗Fas処置細胞におけるサイトゾルで54%およびSTS処置細胞におけるサイトゾルで60%)(図39および図40)。逆に、大部分のNMT2(61.7%)はアポトーシス誘導前にサイトゾルに局在した(図39および図40)。しかしながら、大型カスパーゼ切断型NMT2断片(約55kDa)は、アポトーシス細胞では主に膜ペレットに局在した(Fas処置において94.7%およびSTS処置において80%)(図39および図40)。本発明者らは、おそらく最大5時間アポトーシスの過程を経るよう細胞を誘導したため、本発明者らによる分画化中、小型切断型NMT2断片(約46kDa)の存在は観察しなかった。

【0392】

アポトーシスの誘導有りまたは無しの前にアルキニル-ミリステートで細胞を代謝的に標識し細胞成分分画化を施すと、本発明者らは、図31中で見られるようにアポトーシス誘導後にミリスチル化プロファイルの変化を観察し、翻訳後ミリスチル化タンパク質は、サイトゾル(S100)と比較して主に膜(P100)に局在したことを発見した(図40)。これは、これらの翻訳後ミリスチル化タンパク質へのミリスチル部分の添加は、安定した膜固定をもたらすのに充分であり得ることを示唆する。

【0393】

(実施例38)

この実施例中、図42は、アポトーシスの誘導に対する2-ヒドロキシミリスチン酸(HMA)の影響を示す。ジャーカットT細胞はHMA(1mM)有りまたは無しで処置し、アポトーシスは抗Fas(150ng/ml)およびシクロヘキシミド(5 μ g/ml)で誘導した。対照細胞はDMSOで処置した。サンプルは0、2、4、6および8時間の時点で回収した。細胞は溶解し、サンプルはSDS

-PAGEにより分離して、PARP-1、PAK2、NMT1およびNMT2に対する抗体でイムノブロッティングした(コンポジットゲル)。

【0394】

PARP-1の切断は、1mMのミリスチン酸ナトリウムと抗Fasで処置した細胞と比較して、1mMのHMAと抗Fasで処置した細胞では2時間ですぐに起こった。アポトーシスのインキュベーション後2時間でSTSと1mMのミリスチン酸ナトリウムを用いて処置した細胞よりPARP-1およびPAK2切断を示したHMA/STS細胞の存在下において、抗Fasで見られたより低い程度ではあったが、HMA/STSに曝した細胞でも類似した傾向が見られた(図42)。NMT1とNMT2の類似した切断の刺激も観察した。これは、NMTの阻害が細胞におけるアポトーシスの誘導を加速することを示す。NMTの阻害はアポトーシスの発生を増大させるので、NMTは細胞において全体的な、生存促進的役割を果たすと思われる。

10

【0395】

本明細書中で言及する全ての刊行物、特許および特許出願は、本発明と関係がある当業者のレベルを示し、それぞれ個々の刊行物、特許または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示された場合と同じ程度で、参照により本明細書に組み込まれる。

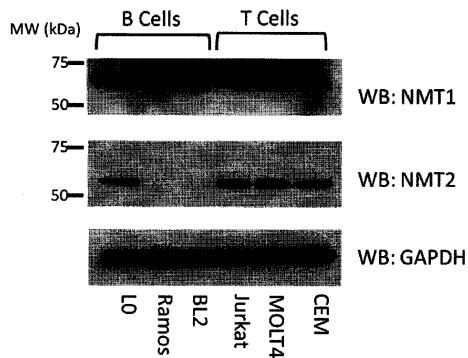
【0396】

このように本発明を記載してきたが、多くの方法で本発明を変更することができることは明白であろう。このような変更は本発明の精神および範囲から逸脱するとみなすべきではなく、全てのこのような修正は、当業者には明白であるように、以下の特許請求の範囲内に含まれるものとする。

20

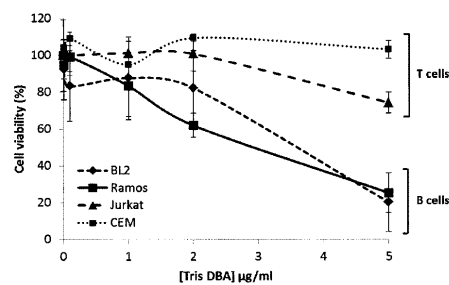
【図1】

Figure 1



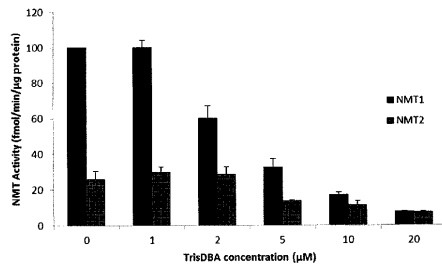
【図2】

Figure 2



【図 3】

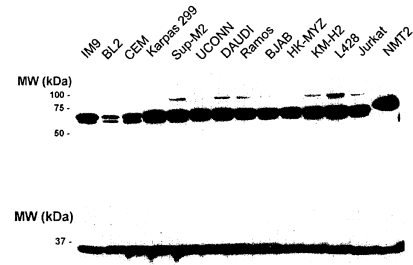
Figure 3



【図 4 A】

Figure 4

A



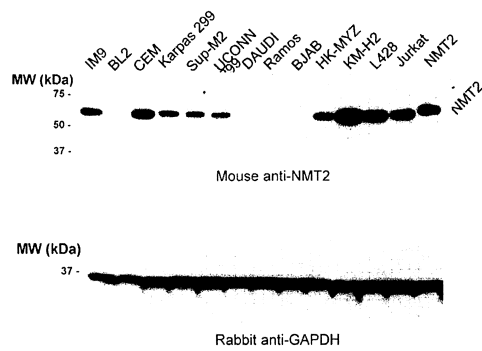
IM9: Bリン芽球
BL2: パーキットリンパ腫
CEM: T細胞白血病
Karpas299: T細胞リンパ腫
Sup-M2: ALCL
UCONN: ALCL
(ALCL:未分化大細胞リンパ腫)

DAUDI: パーキットリンパ腫
Ramos: パーキットリンパ腫
BJAB: パーキットリンパ腫
HK-MY2: ホジキンリンパ腫
KM-H2: ホジキンリンパ腫
L428: ホジキンリンパ腫
Jurkat: T細胞白血病

【図 4 B】

Figure 4

B



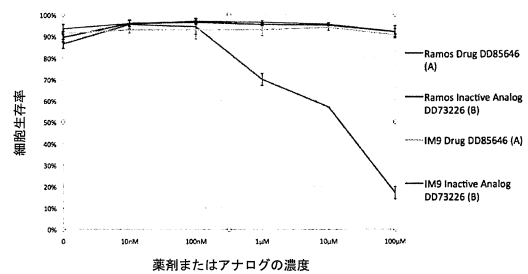
IM9: Bリン芽球
BL2: パーキットリンパ腫
CEM: T細胞白血病
Karpas299: T細胞リンパ腫
Sup-M2: ALCL
UCONN: ALCL
(ALCL:未分化大細胞リンパ腫)

DAUDI: パーキットリンパ腫
Ramos: パーキットリンパ腫
BJAB: パーキットリンパ腫
HK-MY2: ホジキンリンパ腫
KM-H2: ホジキンリンパ腫
L428: ホジキンリンパ腫
Jurkat: T細胞白血病

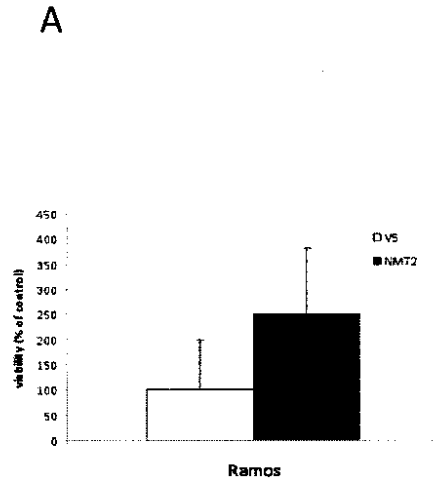
【図 5】

Figure 5

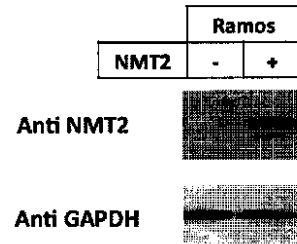
異なる濃度において48時間後に不死化正常Bリン芽球性細胞系 (IM9) と比較したパーキットリンパ腫細胞系Ramosに対するNMT阻害剤の有効性



【図 6 A】

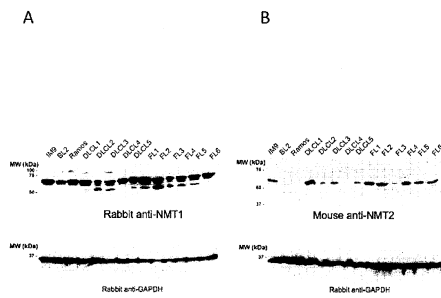


【図 6 B】



【図 7】

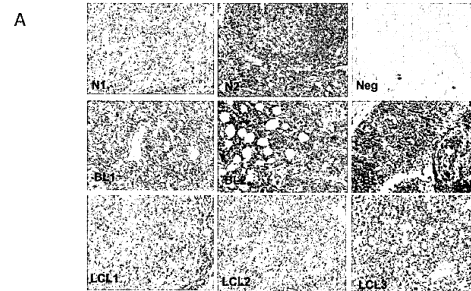
Figure 7



IM9: Bリンパ芽球
 BL2: パーキットリンパ腫
 Ramos: パーキットリンパ腫
 DLCL: びまん性大細胞型B細胞リンパ腫
 FL: 濾胞性リンパ腫

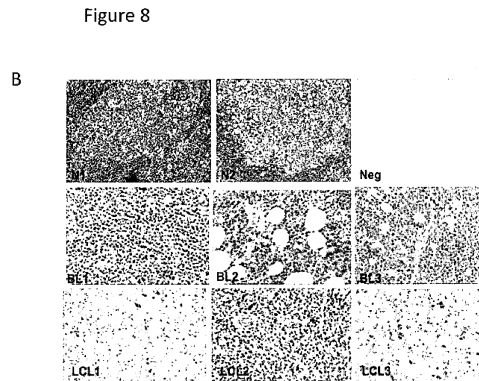
【図 8 A】

Figure 8



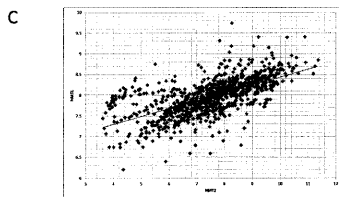
NMT-1染色。上列:N1、N2正常リンパ節、Neg陰性対照。中央列:3個のパーキットリンパ腫症例 (BL1~3)。下列:3個のDLBCL (LCL1~3) 症例。正常リンパ節とリンパ腫の両方が強い染色を示す。違いは観察されなかった。

【図 8 B】

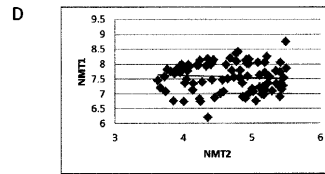


NMT-2染色。上列:N1、N2正常リンパ節、Neg陰性対照。中央列:3個のパーキットリンパ腫症例(BL1~3)。下列:3個のDLBCL(LCL1~3)。正常リンパ節は強い染色を示し、一方パーキットリンパ腫(BL)とびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(LCL)は弱い染色を示す。

【図 8 C】

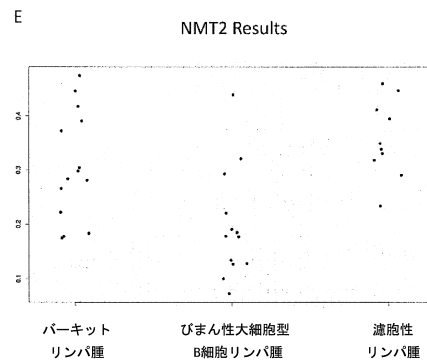


【図 8 D】



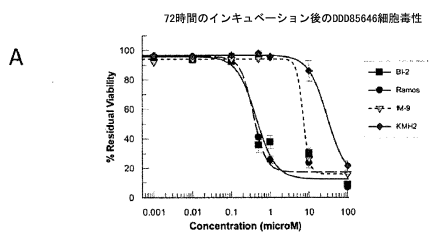
【図 8 E】

Figure 8

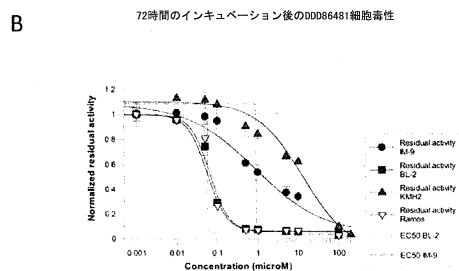


【図 9 A】

Figure 9

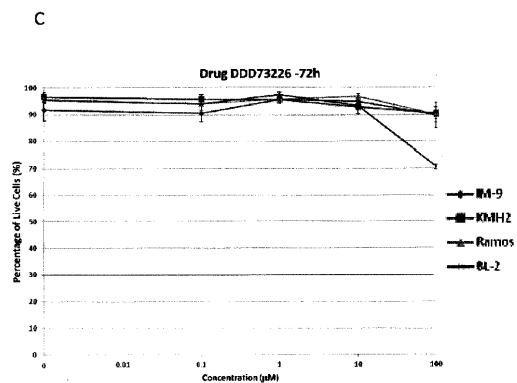


【図 9 B】



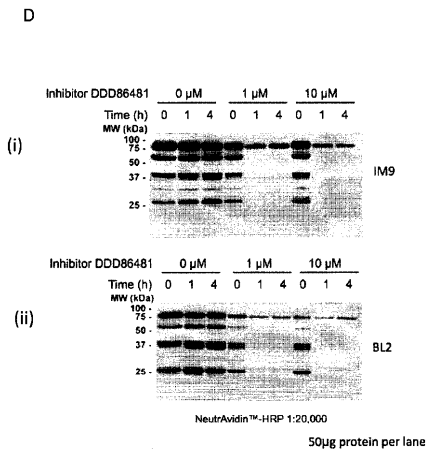
【図 9 C】

Figure 9



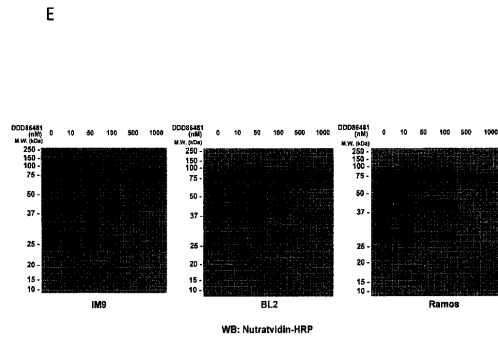
【図 9 D】

Figure 9

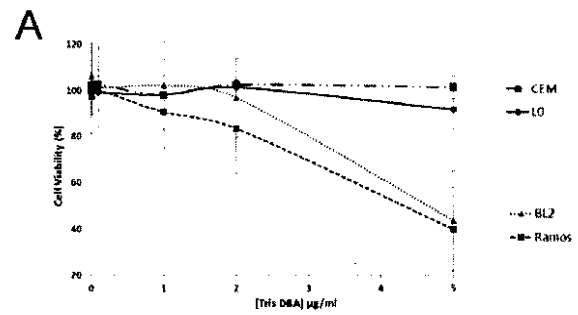


【図 9 E】

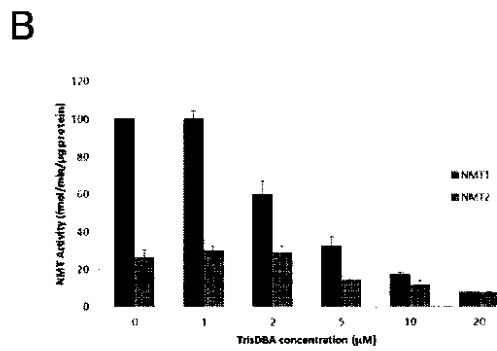
Figure 9



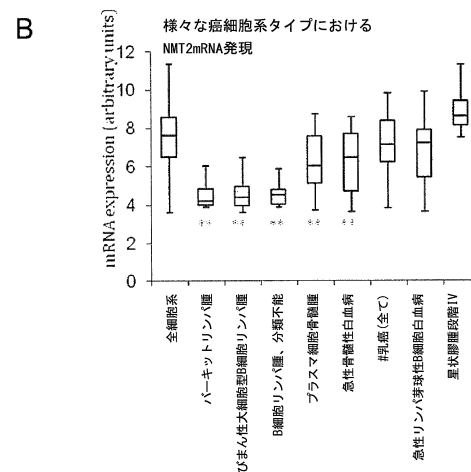
【図 10 A】



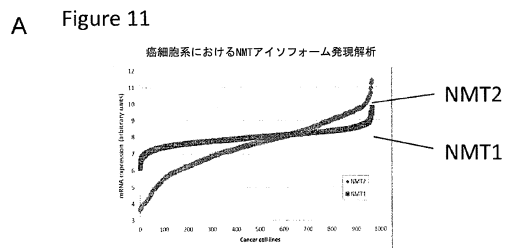
【図 10 B】



【図 11 B】



【図 11 A】



【図 1 1 C】

Figure 11

C

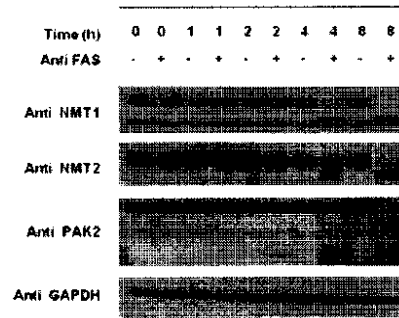
Histological Subtype	Cell line	NMT2 Expression	Source
Acute Myeloid Leukemia	EO1-1	3.6642	DSMZ
Acute Myeloid Leukemia	GDM-1	3.7673	ATCC
Acute Myeloid Leukemia	Pu-21	4.0117	ATCC
Acute Myeloid Leukemia	Kasumi-6	4.0205	ATCC
Acute Myeloid Leukemia	MY-4-11	4.0953	HKRI
Acute Myeloid Leukemia	NL-60	4.3383	ATCC
Acute Myeloid Leukemia	MO1M-13	4.3432	ATCC
Acute Myeloid Leukemia	KO52	4.4048	DSMZ
Acute Myeloid Leukemia	OCI-AML2	4.4291	DSMZ
B Cell Lymphoma Unspecified	MC116	3.9043	ATCC
B Cell Lymphoma Unspecified	BL	3.9759	ATCC
B Cell Lymphoma Unspecified	JMI-1	4.0773	DSMZ
B Cell Lymphoma Unspecified	RU-DUL-1	4.3573	DSMZ
B Cell Lymphoma Unspecified	RP-1	4.6862	ATCC
Blast Phase Chronic Myeloid Leukemia	EM-2	4.1421	DSMZ
Burkitt's Lymphoma	NAMALWA	3.8721	DSMZ
Burkitt's Lymphoma	Daudi	3.9571	DSMZ
Burkitt's Lymphoma	FB1	3.9797	ATCC
Burkitt's Lymphoma	SU-DHL-10	3.9798	ATCC
Burkitt's Lymphoma	BL-41	4.0588	ATCC
Burkitt's Lymphoma	FB2	4.2023	ATCC
Burkitt's Lymphoma	GA-10	4.2231	ATCC
Burkitt's Lymphoma	PJHR-1	4.2434	ATCC
Burkitt's Lymphoma	BL-70	4.4422	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	OCI-LY-19	3.4244	ATCC
Diffuse Large B Cell Lymphoma	DCH4-2	3.9735	ATCC
Diffuse Large B Cell Lymphoma	WOL-DLCL2	3.8199	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	SU-DHL-5	3.8819	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	DB	3.9479	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	SU-DHL-8	3.9527	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	SU-DHL-6	3.9715	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	KARPAS-422	4.4100	DSMZ
Diffuse Large B Cell Lymphoma	SU-DHL-4	4.4221	DSMZ
Plasma Cell Myeloma	PCMB-1	3.7293	ATCC
Plasma Cell Myeloma	CHM-1B	4.0262	HKRI
Plasma Cell Myeloma	HuNS1	4.2789	DSMZ
Plasma Cell Myeloma	L363	4.4213	ATCC
Plasma Cell Myeloma	RPMI 8226	4.6937	ATCC
Infestinal Adenocarcinoma	COLO-205	4.2847	ATCC
Lung Metastatic Adenocarcinoma	HCC-2219	4.3572	HKRI
Lung Metastatic Adenocarcinoma	NCI-H2027	4.2194	ATCC
Lung Metastatic Adenocarcinoma	BEAS	4.5429	DSMZ
Uteral Cervix Squamous Cell Carcinoma	TE-4	4.0031	ATCC
Bone Unspecified	SA-N-107	4.2437	ATCC
Breast Ductal Carcinoma	UACC-393	3.8995	ATCC
Breast Ductal Carcinoma	HCC202	4.4947	ATCC
Stomach Diffuse Adenocarcinoma	FOLOM-1	4.9727	HKRI
Stomach Ductal Carcinoma	HCC2596	4.4512	ATCC
Thyroid Medullary Carcinoma	TT	4.5649	ATCC
Primary Tract Transitional Cell Carcinoma	HT-2976	4.4516	ATCC

造血系またはリンパ系細胞系

19/54

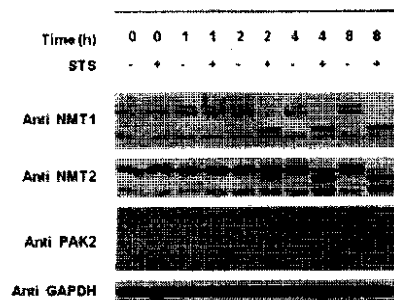
【図 1 2 A】

A



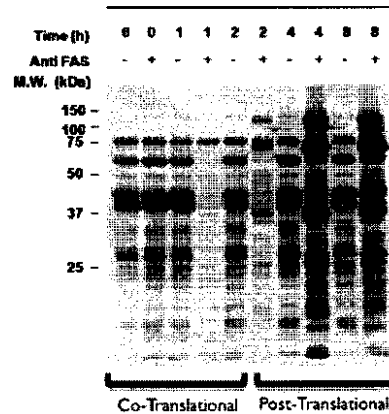
【図 1 2 B】

B

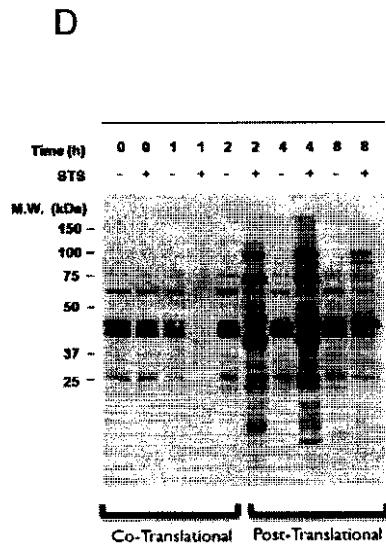


【図 1 2 C】

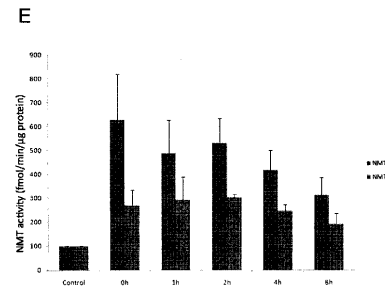
C



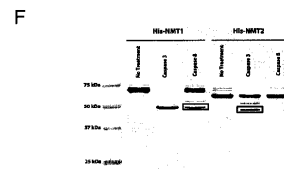
【図 1 2 D】



【図 1 2 E】



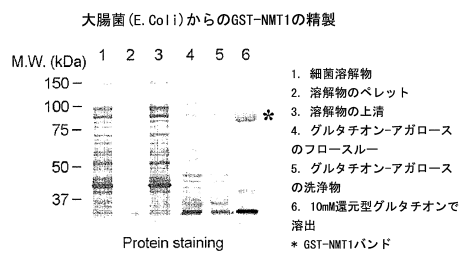
【図 1 2 F】



【図 1 3 A】

Figure 13

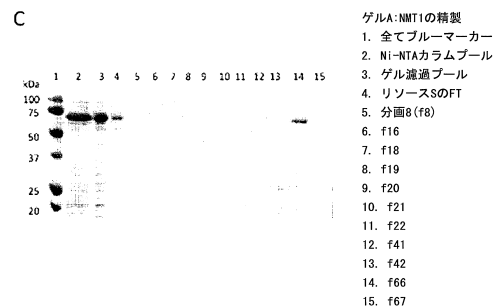
A



【図 1 3 C】

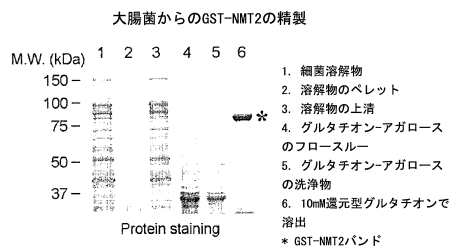
Figure 13

C



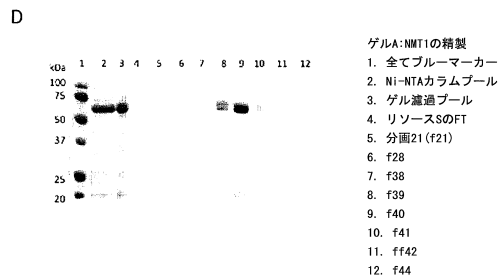
【図 1 3 B】

B



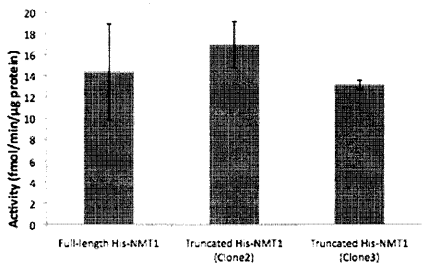
【図 1 3 D】

Figure 13



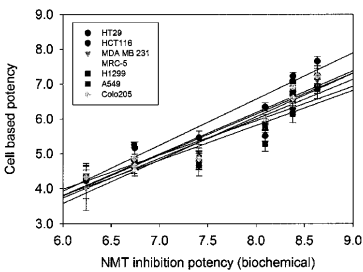
【図 1 4】

Figure 14



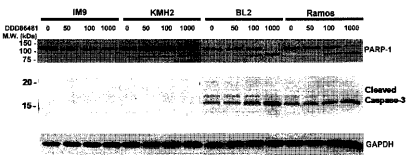
【図 1 5】

Figure 15



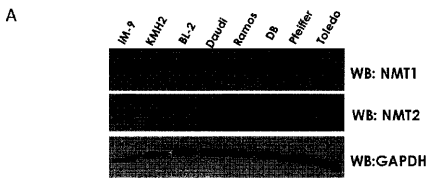
【図 1 6】

Figure 16



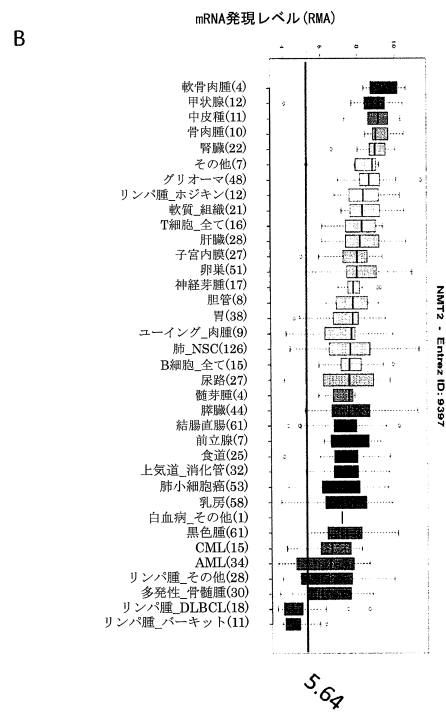
【図 1 7 A】

Figure 17



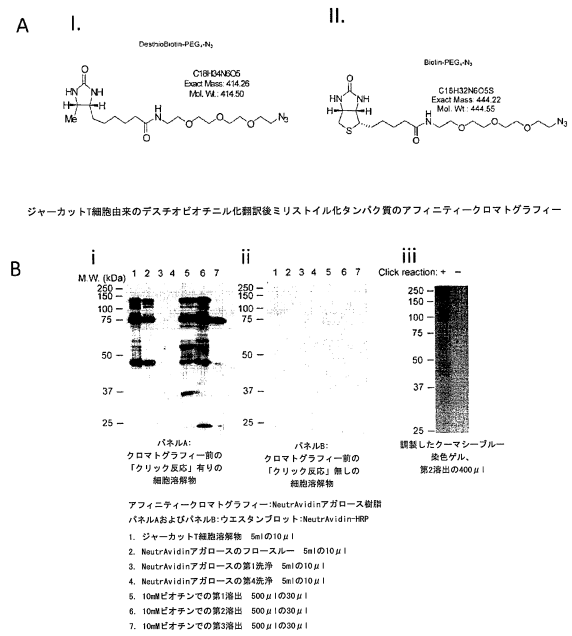
【図 17 B】

Figure 17



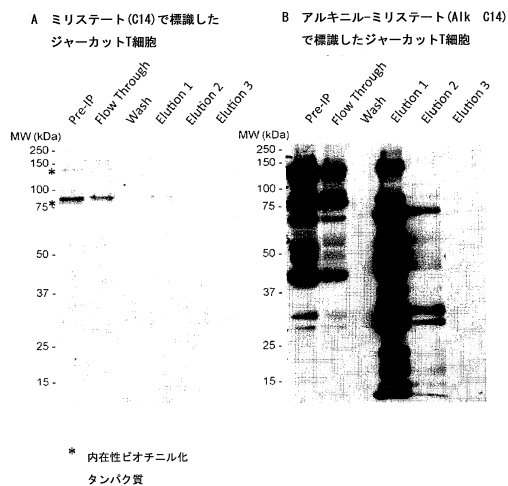
【図 18】

Figure 18



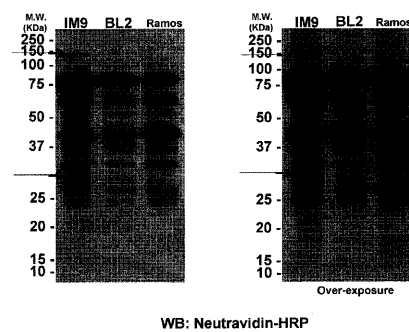
【図 19】

Figure 19

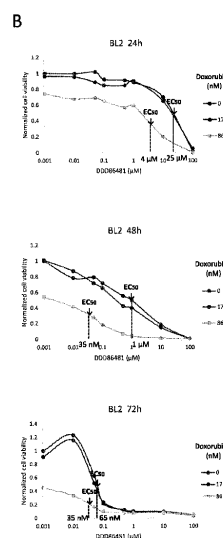


【図 20】

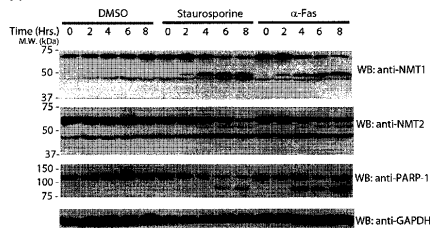
Figure 20



【図 2 1 B】



A



【図 24】

B

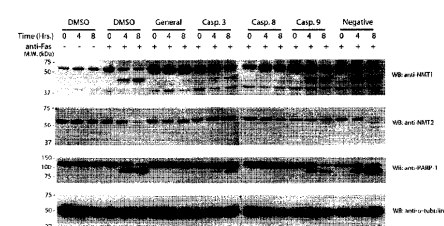
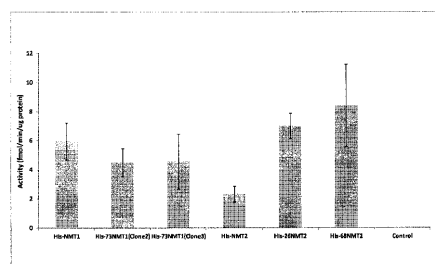


Figure 24

Western blot analysis showing the effect of SAHA treatment on NMT1, NMT2, and p21/WAF1 expression in IM9, BL2, and Ramos cells. The blots are probed for NMT1, NMT2, p21/WAF1, and GAPDH. Molecular weight markers (MW, kDa) are indicated on the left. SAHA treatment is indicated by '-' (no treatment) and '+' (treatment). Exposure times for NMT2 are 1 min and 30 min.

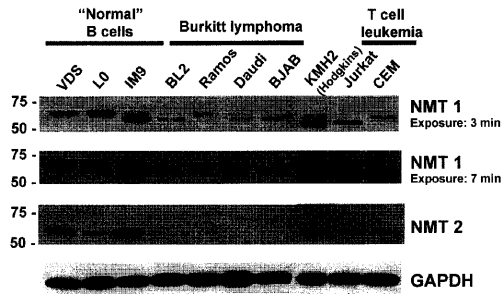
Cell Line	SAHA	NMT1 (kDa)	NMT2 (kDa)	p21/WAF1 (kDa)	GAPDH (kDa)
IM9	-	~75	~50	~25	~37
	+	~75	~50	~25	~37
BL2	-	~75	~50	~25	~37
	+	~75	~50	~25	~37
Ramos	-	~75	~50	~25	~37
	+	~75	~50	~25	~37

Figure 23



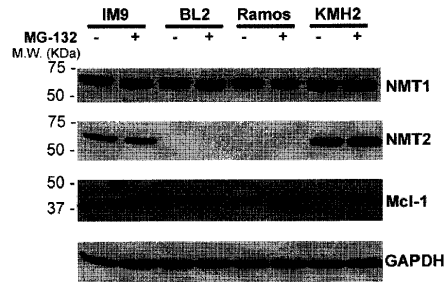
【図 2 5】

Figure 25

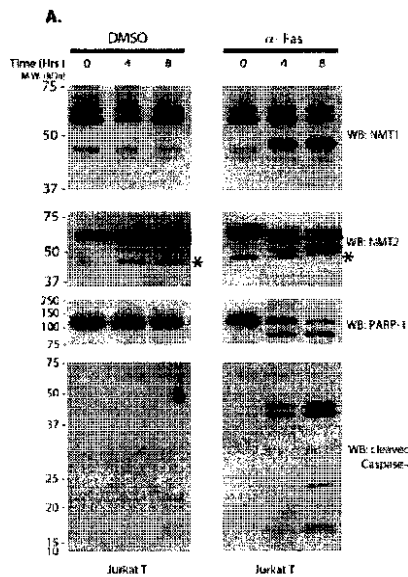


【図 2 6】

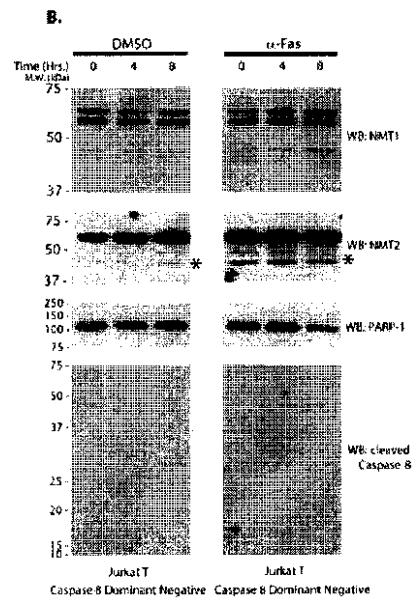
Figure 26



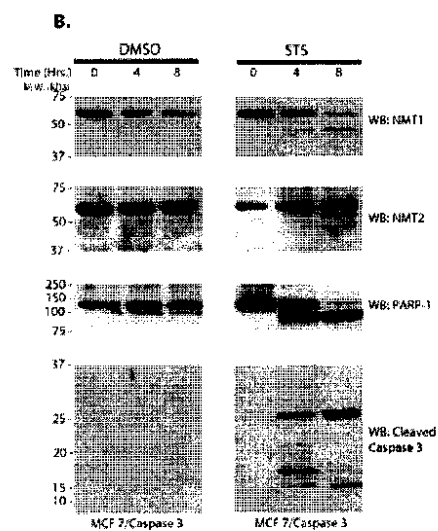
【図 2 7 A】



【図 2 7 B】



【図 28 B】



【図 3 1】

Figure 31

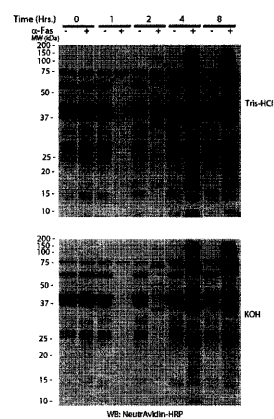
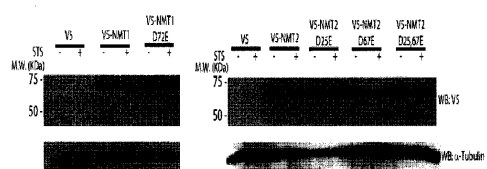
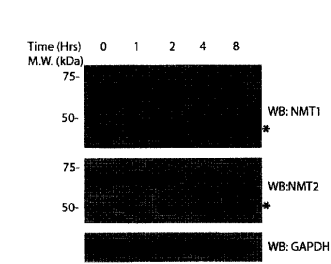


Figure 30



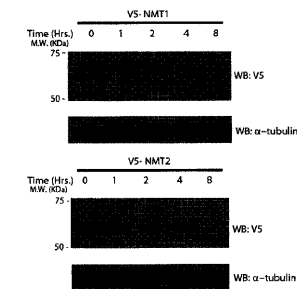
【図 3 2】

Figure 32



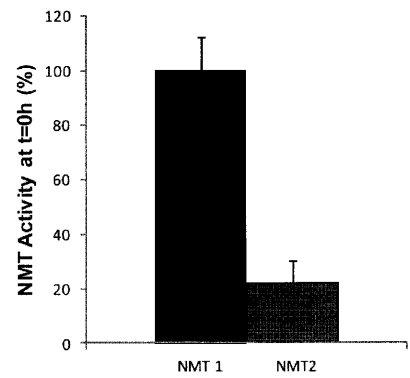
【図 3 3】

Figure 33



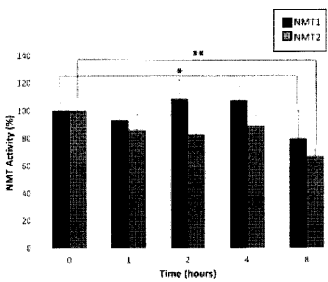
【図 3 4】

Figure 34



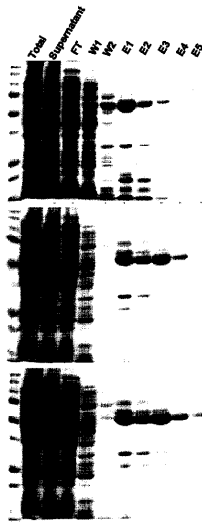
【図 3 5】

Figure 35



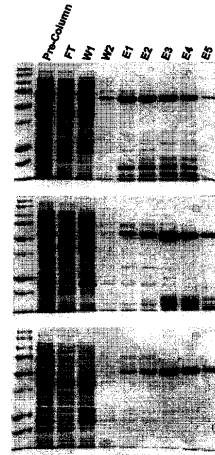
【図 3 6】

Figure 36



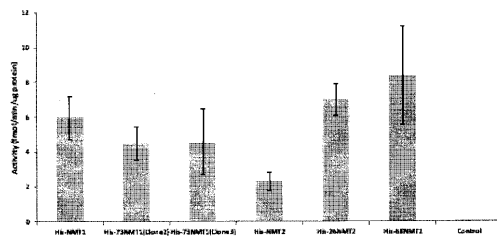
【図 3 7】

Figure 37



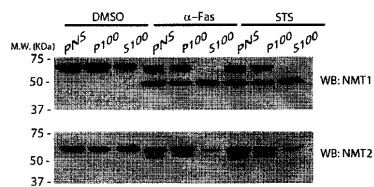
【図 3 8】

Figure 38



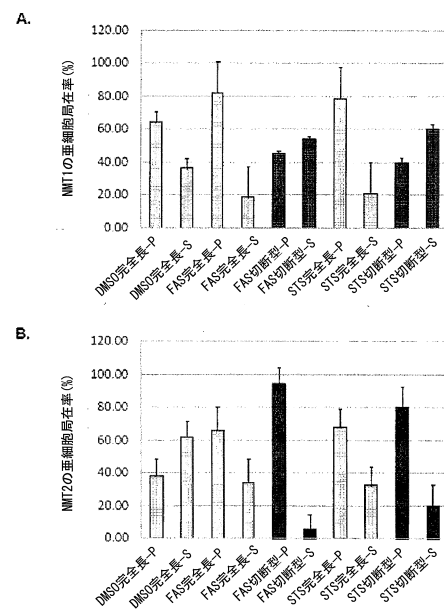
【図 3 9】

Figure 39

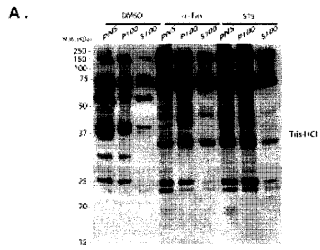


【図 4 0】

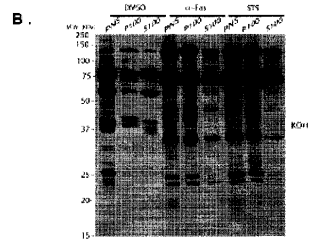
Figure 40



【図 4 1 A】

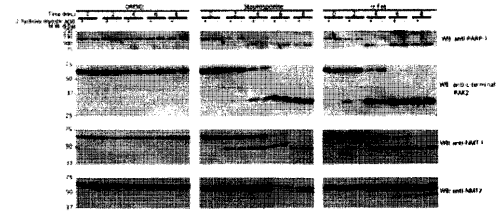


【図 4 1 B】



【図 4 2】

Figure 42



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/68	(2018.01)	C 1 2 Q 1/68
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N 33/574 A
G 0 1 N	37/00	(2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 2
			G 0 1 N 33/574 D

(31)優先権主張番号 61/870,435

(32)優先日 平成25年8月27日(2013.8.27)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 リュク・ジー・ベルティオーム

カナダ・アルバータ・T 6 E・4 X 2・エドモントン・9 0 アヴェニュー・1 0 0 6 1

(72)発明者 コンガニージュ・マニカ・アン・ペリンパナヤガム

カナダ・アルバータ・T 3 H・1 B 7・カルガリー・コーチ・ヒル・ロード・サウスウェスト・6
7 1 5

(72)発明者 チュイイ・ヤップ

カナダ・アルバータ・T 5 Y・0 C 1・エドモントン・1 5 5 アヴェニュー・4 8 3 6

(72)発明者 エルワン・ボーシャン

カナダ・アルバータ・T 6 E・2 S 7・エドモントン・8 9 アヴェニュー・1 0 0 3 3・# 3 0 2

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 0 7 6 9 6 5 (WO, A 1)

国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 6 3 6 5 (WO, A 1)

特開平 0 4 - 2 1 0 9 1 6 (JP, A)

特表 2 0 1 4 - 5 2 3 4 4 0 (JP, A)

Ducker CE, et al., Two N-myristoyltransferase isozymes play unique roles in protein myristoylation, proliferation, and, Molecular Cancer Research, 2 0 0 5 年 8 月, Vol.3, No.8, p.463-476

Bhandarkar SS, et al., Tris (dibenzylideneacetone) dipalladium, a N-myristoyltransferase-1 inhibitor, is effective against, Clinical Cancer Research, 2 0 0 8 年 9 月 1 5 日, Vol.14, No.18, p.5743-5748

KAY Neil, et al., TRIS(DIBENZYLIDENEACETONE) Dipalladium a Small-Molecule Palladium Complex Is Effective in the Induction of Apoptosis for B-Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells, 53rd ASH Annual Meeting and Exposition, 2 0 1 1 年, Retrieved from the Internet : URL: <http://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper37660.html> [retrieved on 2017-05-22]

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 1 / 7 0 4

A 6 1 K 3 1 / 4 9 6

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 2

A 6 1 P 4 3 / 0 0

C 1 2 Q 1 / 6 8

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

G 0 1 N 3 7 / 0 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)