(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2023-519931
(P2023-519931A)
(43)公表日　令和5年5月15日(2023.5.15)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00	４Ｂ０５０
Ａ６１Ｋ	*48/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00	４Ｂ０６３
Ａ６１Ｋ	*38/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/02	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｋ	*31/506(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/506	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*31/5377(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/5377	

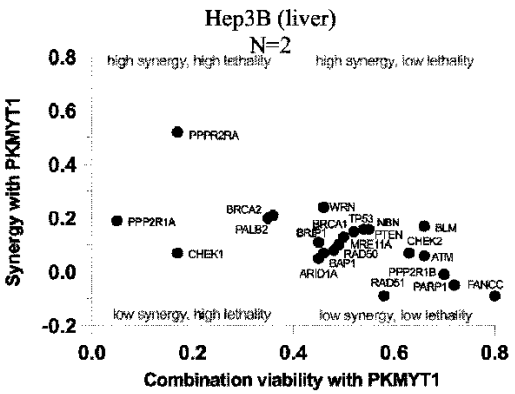
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全45頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-559338(P2022-559338)
(86)(22)出願日　令和3年3月31日(2021.3.31)
(85)翻訳文提出日　令和4年11月25日(2022.11.25)
(86)国際出願番号　PCT/US2021/025230
(87)国際公開番号　WO2021/202780
(87)国際公開日　令和3年10月7日(2021.10.7)
(31)優先権主張番号　63/003,736
(32)優先日　令和2年4月1日(2020.4.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　522244676
エンジン バイオサイエンシズ プライベート リミテッド
シンガポール共和国，シンガポール ０６８９１４ ロビンソン ロード １６０ エスビーエフ センター ２３－０２
(74)代理人　100079108
弁理士　稲葉 良幸
(74)代理人　100109346
弁理士　大貫 敏史
(74)代理人　100117189
弁理士　江口 昭彦
(74)代理人　100134120
弁理士　内藤 和彦
(72)発明者　ハリソン，スティーブン
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　癌を治療するための方法及び組成物

(57)【要約】
癌を治療するための方法及び組成物が本明細書に開示される。本方法は、プロテインホスファターゼ２調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）が欠損している癌細胞におけるプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性の差異を生じさせるための治療有効量の１つ以上の治療用薬剤の使用を含み得る。



GeneA-PKMYT1 Results in Hep3B cell line. Synergy was measured by calculation of Excess Over Bliss (EOB); Lethality was measured and expressed as Fractional Viability (FV) based on the fraction of cells in culture compared to control cell lines.

FIG. 11

【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌を有する又は有する疑いがある対象の治療方法であって、前記対象におけるプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）の発現又は活性の差異を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を前記対象に投与することを含み、それによって前記対象を前記癌に関して治療する方法において、前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連しているか、又は前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、方法。
【請求項２】
前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記発現又は活性レベルの差異が、発現又は活性レベルの低下である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在が、前記対象から入手された組織に由来する細胞のアッセイによって同定される、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記アッセイが、次世代シーケンシングベースのアッセイである、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記１つ以上の治療用薬剤が、小分子、タンパク質、イントラボディ、ペプチド、リボ核酸（ＲＮＡ）分子、並びに、エンドヌクレアーゼ複合体及びデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）コンストラクトからなる群から選択される１つ以上のメンバーを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記ＤＮＡコンストラクトがエンドヌクレアーゼ遺伝子を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記エンドヌクレアーゼ遺伝子が、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記Ｃａｓが、Ｃａｓ９である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＤＮＡコンストラクトが、ＰＫＭＹＴ１遺伝子を標的とするガイドＲＮＡを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１２】
前記エンドヌクレアーゼ複合体がエンドヌクレアーゼを含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１３】
前記エンドヌクレアーゼが、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】

前記小分子がＰＫＭＹＴ１阻害薬を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＰＫＭＹＴ１阻害薬が、５－（（５－メトキシ－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリミジン－４－イル）アミノ）－２－メチルフェノール、Ｎ－（２－クロロ－６－メチルフェニル）－２－（（６－（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル）－２－メチルピリミジン－４－イル）アミノ）チアゾール－５－カルボキサミド（ダサチニブ）、４－（（２，４－ジクロロ－５－メトキシフェニル）アミノ）－６－メトキシ－７－（３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロポキシ）キノリン－３－カルボニトリル（ボスチニブ）、Ｎ－（５－クロロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－４－イル）－７－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エトキシ）－５－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）オキシ）キナゾリン－４－アミン（サラカチニブ）、（Ｅ）－Ｎ－（４－（（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ）－３－シアノ－７－エトキシキノリン－６－イル）－４－（ジメチルアミノ）ブタ－２－エンアミド（ペリチニブ）、Ｎ－（３－クロロフェニル）－６，７－ジメトキシキナゾリン－４－アミン（チルホスチンＡＧ　１４７８）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５２）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（３－（メチルチオ）フェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５５）、又は６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－フルオロ－３－メチルフェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１８０９７０）を含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記小分子がＷＥＥ１阻害薬を含む、請求項７に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＷＥＥ１阻害薬が、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、２－アリル－１－（６－（２－ヒドロキシプロパン－２－イル）ピリジン－２－イル）－６－（（４－（４－メチルピペラジン－１－イル）フェニル）アミノ）－１，２－ジヒドロ－３Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－３－オン（ＭＫ－１７７５）、９－ヒドロキシ－４－フェニルピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン（ＰＤ－４０７８２４）、６－ブチル－４－（２－クロロフェニル）－９－ヒドロキシピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン、又は６－（２－クロロ－６－フルオロフェニル）－２－（（２，４，４－トリメチル－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－７－イル）アミノ）イミダゾ［１，２－ａ］ピリミド［５，４－ｅ］ピリミジン－５（６Ｈ）－オンを含む、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＰＰ２Ａサブユニットが、６５ｋＤａ調節サブユニットＡα（ＰＰＰ２Ｒ１Ａ）、６５ｋＤａ調節サブユニットＡβ（ＰＰＰ２Ｒ１Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢβ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢγ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｃ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢδ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｄ）、７２／１３０ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ａ）、４８ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｂ）、調節サブユニットＢ”サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｃ）、調節サブユニットＢ’（ＰＰＰ２Ｒ４）、５６ｋＤａ調節サブユニットα（ＰＰＰ２Ｒ５Ａ）、５６ｋＤａ調節サブユニットβ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｂ）、５６ｋＤａ調節サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｃ）、５６ｋＤａ調節サブユニットδ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｄ）、５６ｋＤａ調節サブユニットε（ＰＰＰ２Ｒ５Ｅ）、触媒サブユニットα（ＰＰＰ２ＣＡ）

、及び触媒サブユニットβ（ＰＰＰ２ＣＢ）からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項１９】
前記ＰＰ２Ａサブユニットが、ＰＰＰ２Ｒ２Ａである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現又は活性の低下を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を前記対象に投与することを更に含む、請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
前記健常対照が、前記癌を呈しない１個体以上の対象からのものである、請求項１に記載の方法。
【請求項２２】
前記癌性組織が、乳房組織、膵臓組織、子宮組織、膀胱組織、結腸直腸組織、前立腺組織、肝組織、又は卵巣組織である、請求項１に記載の方法。
【請求項２３】
前記癌性組織が、肝組織である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２４】
前記癌性組織が、卵巣組織である、請求項２２に記載の方法。
【請求項２５】
少なくとも１つの治療用薬剤を含む製剤を含む、癌を有する又は有する疑いがある対象を治療するための組成物であって、前記少なくとも１つの治療用薬剤が、前記対象への投与後にプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）の発現又は活性の差異を生じさせるのに有効な量で存在し、及び前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連しているか、又は前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、組成物。
【請求項２６】
前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連している、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２７】
前記発現又は活性レベルの差異が、発現又は活性レベルの低下である、請求項２６に記載の組成物。
【請求項２８】
前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、請求項２５に記載の組成物。
【請求項２９】
前記突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在が、前記対象から入手された組織に由来する細胞のアッセイによって同定される、請求項２８に記載の組成物。
【請求項３０】
前記アッセイが、次世代シーケンシングベースのアッセイである、請求項２９に記載の組成物。
【請求項３１】
前記少なくとも１つの治療用薬剤が、小分子、タンパク質、イントラボディ、ペプチド、リボ核酸（ＲＮＡ）分子、並びに、エンドヌクレアーゼ複合体及びデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）コンストラクトからなる群から選択される１つ以上のメンバーを含む、請求項２５に記載の組成物。
【請求項３２】

前記ＤＮＡコンストラクトがエンドヌクレアーゼ遺伝子を含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３３】
前記エンドヌクレアーゼ遺伝子が、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする、請求項３２に記載の組成物。
【請求項３４】
前記Ｃａｓが、Ｃａｓ９である、請求項３３に記載の組成物。
【請求項３５】
前記ＤＮＡコンストラクトが、ＰＫＭＹＴ１遺伝子に向けられるガイドＲＮＡを含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３６】
前記エンドヌクレアーゼ複合体がエンドヌクレアーゼを含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３７】
前記エンドヌクレアーゼが、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質である、請求項３６に記載の組成物。
【請求項３８】
前記小分子がＰＫＭＹＴ１阻害薬を含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項３９】
前記ＰＫＭＹＴ１阻害薬が、５－（（５－メトキシ－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリミジン－４－イル）アミノ）－２－メチルフェノール、Ｎ－（２－クロロ－６－メチルフェニル）－２－（（６－（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル）－２－メチルピリミジン－４－イル）アミノ）チアゾール－５－カルボキサミド（ダサチニブ）、４－（（２，４－ジクロロ－５－メトキシフェニル）アミノ）－６－メトキシ－７－（３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロポキシ）キノリン－３－カルボニトリル（ボスチニブ）、Ｎ－（５－クロロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－４－イル）－７－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エトキシ）－５－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）オキシ）キナゾリン－４－アミン（サラカチニブ）、（Ｅ）－Ｎ－（４－（（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ）－３－シアノ－７－エトキシキノリン－６－イル）－４－（ジメチルアミノ）ブタ－２－エンアミド（ペリチニブ）、Ｎ－（３－クロロフェニル）－６，７－ジメトキシキナゾリン－４－アミン（チルホスチンＡＧ　１４７８）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５２）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（３－（メチルチオ）フェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５５）、又は６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－フルオロ－３－メチルフェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１８０９７０）を含む、請求項３８に記載の組成物。
【請求項４０】
前記小分子がＷＥＥ１阻害薬を含む、請求項３１に記載の組成物。
【請求項４１】
前記ＷＥＥ１阻害薬が、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、２－アリル－１－（６－（２－ヒドロキシプロパン－２－イル）ピリジン－２－イル）－６－（（４－（４－メチルピペラジン－１－イル）フェニル）アミノ）－１，２－ジヒドロ－３Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－３－オン（ＭＫ－１７７５）、９－ヒドロキシ－４－フェニルピロロ［３，

４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン（ＰＤ－４０７８２４）、６－ブチル－４－（２－クロロフェニル）－９－ヒドロキシピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン、又は６－（２－クロロ－６－フルオロフェニル）－２－（（２，４，４－トリメチル－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－７－イル）アミノ）イミダゾ［１，２－ａ］ピリミド［５，４－ｅ］ピリミジン－５（６Ｈ）－オンを含む、請求項４０に記載の組成物。

【請求項４２】

前記ＰＰ２Ａサブユニットが、６５ｋＤａ調節サブユニットＡα（ＰＰＰ２Ｒ１Ａ）、６５ｋＤａ調節サブユニットＡβ（ＰＰＰ２Ｒ１Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢβ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢγ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｃ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢδ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｄ）、７２／１３０ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ａ）、４８ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｂ）、調節サブユニットＢ”サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｃ）、調節サブユニットＢ’（ＰＰＰ２Ｒ４）、５６ｋＤａ調節サブユニットα（ＰＰＰ２Ｒ５Ａ）、５６ｋＤａ調節サブユニットβ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｂ）、５６ｋＤａ調節サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｃ）、５６ｋＤａ調節サブユニットδ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｄ）、５６ｋＤａ調節サブユニットε（ＰＰＰ２Ｒ５Ｅ）、触媒サブユニットα（ＰＰＰ２ＣＡ）、及び触媒サブユニットβ（ＰＰＰ２ＣＢ）からなる群から選択される、請求項２５に記載の組成物。

【請求項４３】

前記ＰＰ２Ａサブユニットが、ＰＰＰ２Ｒ２Ａである、請求項４２に記載の組成物。

【請求項４４】

前記組成物が、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現又は活性の低下を生じさせるのに有効な量で存在する少なくとも１つの治療用薬剤を含む製剤を更に含む、請求項２５に記載の組成物。

【請求項４５】

前記健常対照が、前記癌を呈しない１個体以上の対象からのものである、請求項２５に記載の組成物。

【請求項４６】

前記癌性組織が、乳房組織である、請求項２５に記載の組成物。

【請求項４７】

前記癌性組織が、肝組織である、請求項２５に記載の組成物。

【請求項４８】

前記癌性組織が、卵巣組織である、請求項２５に記載の組成物。

【請求項４９】

前記製剤が賦形剤を更に含む、請求項２５に記載の組成物。

【請求項５０】

前記賦形剤が、前記賦形剤の存在なしに前記少なくとも１つの治療用薬剤が前記対象に投与されるのと比較したとき、前記対象への投与後に前記少なくとも１つの治療用薬剤を安定化させるか、又は前記少なくとも１つの治療用薬剤の治療増強を提供する、請求項４９に記載の組成物。

【請求項５１】

癌を有する又は有する疑いがある対象を治療するためのキットであって、

少なくとも１つの治療用薬剤を含む製剤を含む組成物であって、前記少なくとも１つの治療用薬剤が、前記対象への投与後にプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）の発現又は活性の差異を生じさせるのに有効な量で存在し、及び前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連しているか、又は前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、組成物；及び

前記対象への前記組成物の投与に関する１つ以上の説明書
を含むキット。
【請求項５２】
前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連している、請求項５１に記載のキット。
【請求項５３】
前記発現又は活性レベルの差異が、発現又は活性レベルの低下である、請求項５２に記載のキット。
【請求項５４】
前記癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、請求項５１に記載のキット。
【請求項５５】
前記突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在が、前記対象から入手された組織に由来する細胞のアッセイによって同定される、請求項５４に記載のキット。
【請求項５６】
前記アッセイが、次世代シーケンシングベースのアッセイである、請求項５５に記載のキット。
【請求項５７】
対象の疾患を同定するための方法であって、対象から入手された組織に由来する細胞をアッセイして、健常対照と比較したときのプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子における突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在を同定すること、及び健常対照と比較したときのプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子における突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在を指示する報告を出力することを含む方法。
【請求項５８】
次世代シーケンシングベースのアッセイを含む、請求項５７に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
［0001］ 本願は、２０２０年４月１日に出願された米国仮特許出願第６３／００３，７３６号の利益を主張するものであり、この仮特許出願は、参照により本明細書に援用される。
【背景技術】
【０００２】
背景
［0002］ 癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）の治療は、進歩にもかかわらず、依然として比較的難しい。化学療法などの全身的治療は毒性の恐れがあり、患者に負の副作用を及ぼし得る。更に、特異的バイオマーカーがないことにより、標的化治療の開発又は使用は複雑化し得る。
【０００３】
［0003］ 癌細胞の治療手法の一つには、標的遺伝子及びバイオマーカーを同定して、そうした標的遺伝子の活性の変化に対して感受性があり得るのはどの癌細胞かを同定することが含まれる。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
概要

［0004］ 合成致死性遺伝子対とは、両方の遺伝子の阻害又は第２の遺伝子の突然変異若しくは欠失の存在下における一方の遺伝子の阻害が細胞死につながり得るものであり、本明細書において認識されるとおり、これを同定することは、非癌細胞の生存能力を維持しつつ癌細胞を死滅させるのに治療上有用であり得る。

【０００５】

［0005］ 本明細書においては、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する又は有する疑いがある対象を治療するための標的化した治療及び療法用の治療用薬剤の必要性が認識される。癌を有する又は有する疑いがある対象は、健常又は非癌対照と比較して、癌の１つ以上の癌細胞に、第１の遺伝子の突然変異、その欠失、その発現の差異（例えば、低下又は増加）、又はその活性レベルの差異（例えば、低下、増加又は変化）を有し得る。本明細書には、第１の遺伝子の発現のかかる差異（例えば、その低下又は増加）又はその活性レベルの差異（例えば、低下、増加又は変化）を有する癌又は癌細胞若しくは組織を、その癌又は癌細胞における第２の遺伝子の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせることによって治療するための、それによって対象を治療する方法及び組成物が開示される。第１の遺伝子と第２の遺伝子とは、合成致死性対を形成し得る。第１の遺伝子は調節タンパク質（例えば細胞周期を調節するもの）をコードしてもよく、第２の遺伝子は治療上修飾可能なタンパク質（例えばキナーゼ）をコードしてもよい。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

［0006］ ある態様において、本明細書には、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する又は有する疑いがある対象を治療するための方法であって、対象におけるプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を対象に投与することを含み、それによって対象を癌に関して治療する方法が開示され、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連しているか、又は癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している。

【０００７】

［0007］ 一部の実施形態において、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連している。

【０００８】

［0008］ 一部の実施形態において、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している。一部の実施形態において、突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在は、対象から入手された組織に由来する細胞のアッセイによって同定される。一部の実施形態において、アッセイは、次世代シーケンシングベースのアッセイである。

【０００９】

［0009］ 一部の実施形態において、１つ以上の治療用薬剤は、小分子（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）、タンパク質、イントラボディ、ペプチド、リボ核酸（ＲＮＡ）分子、並びに、エンドヌクレアーゼ複合体及びデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）コンストラクトからなる群から選択される１つ以上のメンバーを含む。

【００１０】

［0010］ 一部の実施形態において、ＤＮＡコンストラクトはエンドヌクレアーゼ遺伝子を含む。一部の実施形態において、エンドヌクレアーゼ遺伝子は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする。一部の実施形態において、Ｃａｓは、Ｃａｓ９である。

【００１１】
［0011］一部の実施形態において、ＤＮＡコンストラクトは、ＰＫＭＹＴ１遺伝子を標的とするガイドＲＮＡを含む。
【００１２】
［0012］一部の実施形態において、エンドヌクレアーゼ複合体はエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態において、エンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質である。
【００１３】
［0013］一部の実施形態において、小分子はＰＫＭＹＴ１阻害薬を含む。一部の実施形態において、ＰＫＭＹＴ１阻害薬は、５－（（５－メトキシ－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリミジン－４－イル）アミノ）－２－メチルフェノール、Ｎ－（２－クロロ－６－メチルフェニル）－２－（（６－（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル）－２－メチルピリミジン－４－イル）アミノ）チアゾール－５－カルボキサミド（ダサチニブ）、４－（（２，４－ジクロロ－５－メトキシフェニル）アミノ）－６－メトキシ－７－（３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロポキシ）キノリン－３－カルボニトリル（ボスチニブ）、Ｎ－（５－クロロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－４－イル）－７－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エトキシ）－５－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）オキシ）キナゾリン－４－アミン（サラカチニブ）、（Ｅ）－Ｎ－（４－（（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ）－３－シアノ－７－エトキシキノリン－６－イル）－４－（ジメチルアミノ）ブタ－２－エンアミド（ペリチニブ）、Ｎ－（３－クロロフェニル）－６，７－ジメトキシキナゾリン－４－アミン（チルホスチンＡＧ　１４７８）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５２）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（３－（メチルチオ）フェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５５）、又は６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－フルオロ－３－メチルフェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１８０９７０）を含む。
【００１４】
［0014］一部の実施形態において、小分子はＷＥＥ１阻害薬を含む。一部の実施形態において、ＷＥＥ１阻害薬は、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、２－アリル－１－（６－（２－ヒドロキシプロパン－２－イル）ピリジン－２－イル）－６－（（４－（４－メチルピペラジン－１－イル）フェニル）アミノ）－１，２－ジヒドロ－３Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－３－オン（ＭＫ－１７７５）、９－ヒドロキシ－４－フェニルピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン（ＰＤ－４０７８２４）、６－ブチル－４－（２－クロロフェニル）－９－ヒドロキシピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン、又は６－（２－クロロ－６－フルオロフェニル）－２－（（２，４，４－トリメチル－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－７－イル）アミノ）イミダゾ［１，２－ａ］ピリミド［５，４－ｅ］ピリミジン－５（６Ｈ）－オンを含む。
【００１５】
［0015］一部の実施形態において、ＰＰ２Ａサブユニットは、６５ｋＤａ調節サブユニットＡα（ＰＰＰ２Ｒ１Ａ）、６５ｋＤａ調節サブユニットＡβ（ＰＰＰ２Ｒ１Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢβ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢγ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｃ）、５５ｋＤａ

調節サブユニットＢδ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｄ）、７２／１３０ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ａ）、４８ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｂ）、調節サブユニットＢ”サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｃ）、調節サブユニットＢ’（ＰＰＰ２Ｒ４）、５６ｋＤａ調節サブユニットα（ＰＰＰ２Ｒ５Ａ）、５６ｋＤａ調節サブユニットβ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｂ）、５６ｋＤａ調節サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｃ）、５６ｋＤａ調節サブユニットδ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｄ）、５６ｋＤａ調節サブユニットε（ＰＰＰ２Ｒ５Ｅ）、触媒サブユニットα（ＰＰＰ２ＣＡ）、及び触媒サブユニットβ（ＰＰＰ２ＣＢ）からなる群から選択される。一部の実施形態において、ＰＰ２Ａサブユニットは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａである。

【００１６】

［0016］ 一部の実施形態において、本明細書に開示される方法は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現又は活性の差異（例えば、その低下）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を対象に投与することを更に含む。

【００１７】

［0017］ 一部の実施形態において、健常対照は、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を呈しない１個体以上の対象からのものである。

【００１８】

［0018］ 一部の実施形態において、癌性組織は、乳房組織、膵臓組織、子宮組織、膀胱組織、結腸直腸組織、前立腺組織、肝組織、又は卵巣組織である。一部の実施形態において、癌性組織は、肝組織である。一部の実施形態において、癌性組織は、卵巣組織である。

【００１９】

［0019］ 別の態様において、本明細書には、少なくとも１つの治療用薬剤を含む製剤を含む、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する又は有する疑いがある対象を治療するための組成物が開示され、ここで少なくとも１つの治療用薬剤は、対象への投与後にプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるのに有効な量で存在し、及び癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連しているか、又は癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している。

【００２０】

［0020］ 一部の実施形態において、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連している。

【００２１】

［0021］ 一部の実施形態において、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している。一部の実施形態において、突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在は、対象から入手された組織に由来する細胞のアッセイによって同定される。一部の実施形態において、アッセイは、次世代シーケンシングベースのアッセイである。

【００２２】

［0022］ 一部の実施形態において、少なくとも１つの治療用薬剤は、小分子（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）、タンパク質、イントラボディ、ペプチド、リボ核酸（ＲＮＡ）分子、並びに、エンドヌクレアーゼ複合体及びデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）コンストラクトからなる群から選択される１つ以上のメンバーを含む。

【００２３】

［0023］ 一部の実施形態において、ＤＮＡコンストラクトはエンドヌクレアーゼ遺伝

子を含む。一部の実施形態において、エンドヌクレアーゼ遺伝子は、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質をコードする。一部の実施形態において、Ｃａｓは、Ｃａｓ９である。

【００２４】

［0024］ 一部の実施形態において、ＤＮＡコンストラクトは、ＰＫＭＹＴ１遺伝子に向けられるガイドＲＮＡを含む。

【００２５】

［0025］ 一部の実施形態において、エンドヌクレアーゼ複合体はエンドヌクレアーゼを含む。一部の実施形態において、エンドヌクレアーゼは、ＣＲＩＳＰＲ関連（Ｃａｓ）タンパク質である。

【００２６】

［0026］ 一部の実施形態において、小分子はＰＫＭＹＴ１阻害薬を含む。一部の実施形態において、ＰＫＭＹＴ１阻害薬は、５－（（５－メトキシ－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリミジン－４－イル）アミノ）－２－メチルフェノール、Ｎ－（２－クロロ－６－メチルフェニル）－２－（（６－（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル）－２－メチルピリミジン－４－イル）アミノ）チアゾール－５－カルボキサミド（ダサチニブ）、４－（（２，４－ジクロロ－５－メトキシフェニル）アミノ）－６－メトキシ－７－（３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロポキシ）キノリン－３－カルボニトリル（ボスチニブ）、Ｎ－（５－クロロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－４－イル）－７－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エトキシ）－５－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）オキシ）キナゾリン－４－アミン（サラカチニブ）、（Ｅ）－Ｎ－（４－（（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ）－３－シアノ－７－エトキシキノリン－６－イル）－４－（ジメチルアミノ）ブタ－２－エンアミド（ペリチニブ）、Ｎ－（３－クロロフェニル）－６，７－ジメトキシキナゾリン－４－アミン（チルホスチンＡＧ　１４７８）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５２）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（３－（メチルチオ）フェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５５）、又は６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－フルオロ－３－メチルフェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１８０９７０）を含む。

【００２７】

［0027］ 一部の実施形態において、小分子はＷＥＥ１阻害薬を含む。一部の実施形態において、ＷＥＥ１阻害薬は、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、２－アリル－１－（６－（２－ヒドロキシプロパン－２－イル）ピリジン－２－イル）－６－（（４－（４－メチルピペラジン－１－イル）フェニル）アミノ）－１，２－ジヒドロ－３Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－３－オン（ＭＫ－１７７５）、９－ヒドロキシ－４－フェニルピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン（ＰＤ－４０７８２４）、６－ブチル－４－（２－クロロフェニル）－９－ヒドロキシピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン、又は６－（２－クロロ－６－フルオロフェニル）－２－（（２，４，４－トリメチル－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－７－イル）アミノ）イミダゾ［１，２－ａ］ピリミド［５，４－ｅ］ピリミジン－５（６Ｈ）－オンを含む。

【００２８】

［0028］ 一部の実施形態において、ＰＰ２Ａサブユニットは、６５ｋＤａ調節サブユ

ニットＡα（ＰＰＰ２Ｒ１Ａ）、６５ｋＤａ調節サブユニットＡβ（ＰＰＰ２Ｒ１Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢβ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢγ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｃ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢδ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｄ）、７２／１３０ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ａ）、４８ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｂ）、調節サブユニットＢ”サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｃ）、調節サブユニットＢ’（ＰＰＰ２Ｒ４）、５６ｋＤａ調節サブユニットα（ＰＰＰ２Ｒ５Ａ）、５６ｋＤａ調節サブユニットβ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｂ）、５６ｋＤａ調節サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｃ）、５６ｋＤａ調節サブユニットδ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｄ）、５６ｋＤａ調節サブユニットε（ＰＰＰ２Ｒ５Ｅ）、触媒サブユニットα（ＰＰＰ２ＣＡ）、及び触媒サブユニットβ（ＰＰＰ２ＣＢ）からなる群から選択される。一部の実施形態において、ＰＰ２Ａサブユニットは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａである。

【００２９】

［0029］ 一部の実施形態において、組成物は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるのに有効な量で存在する少なくとも１つの治療用薬剤を含む製剤を更に含む。

【００３０】

［0030］ 一部の実施形態において、健常対照は、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を呈しない１個体以上の対象からのものである。

【００３１】

［0031］ 一部の実施形態において、癌性組織は、乳房組織である。一部の実施形態において、癌性組織は、肝組織である。一部の実施形態において、癌性組織は、卵巣組織である。

【００３２】

［0032］ 一部の実施形態において、製剤は賦形剤を更に含む。一部の実施形態において、賦形剤は、少なくとも１つの治療用薬剤が賦形剤の存在なしに対象に投与されるのと比較したとき、対象への投与後に少なくとも１つの治療用薬剤を安定化させるか、又は少なくとも１つの治療用薬剤の治療増強を提供する。

【００３３】

［0033］ 別の態様において、本明細書には、癌を有する又は有する疑いがある対象を治療するためのキットであって、

少なくとも１つの治療用薬剤を含む製剤を含む組成物であって、少なくとも１つの治療用薬剤が、対象への投与後にプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）の発現又は活性の差異を生じさせるのに有効な量で存在し、及び癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連しているか、又は癌が、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を示す細胞を含む癌性組織に関連している、組成物；及び

対象への組成物の投与に関する１つ以上の説明書

を含むキットが開示される。一部の実施形態において、発現又は活性レベルの差異は、発現又は活性レベルの低下である。

【００３４】

［0034］ 一部の実施形態において、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現又は活性レベルの差異を有する細胞を含む癌性組織に関連している。一部の実施形態において、発現又は活性レベルの差異は、発現又は活性レベルの低下である。

【００３５】

［0035］ 一部の実施形態において、癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子の突然変異及び／又は欠失を

示す細胞を含む癌性組織に関連している。一部の実施形態において、突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在は、対象から入手された組織に由来する細胞のアッセイによって同定される。一部の実施形態において、アッセイは、次世代シーケンシングベースのアッセイである。

【００３６】

［0036］ 別の態様において、本明細書には、対象の疾患を同定するための方法であって、対象から入手された組織に由来する細胞をアッセイして、健常対照と比較したときのプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子における突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在を同定すること、及び健常対照と比較したときのプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）のサブユニットをコードする遺伝子における突然変異及び／又は欠失の存在又は非存在を指示する報告を出力することを含む方法が開示される。一部の実施形態において、この方法は、次世代シーケンシングベースのアッセイを含む。

【００３７】

［0037］ 当業者には、あくまでも本開示の例示的実施形態が図示及び説明されるに過ぎない以下の詳細な説明から、本開示の更なる態様及び利点が容易に明らかになるであろう。認識されるであろうとおり、本開示は他の異なる実施形態が可能であり、その幾つかの詳細は、いずれも本開示から逸脱することなく、様々な自明の点で変更が可能である。従って、図面及び説明は、限定的ではなく、例示的な性質のものと見なされるべきである。

【００３８】

参照による援用

［0038］ 本明細書で言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、各個別の刊行物、特許、又は特許出願が参照によって援用されることが具体的且つ個別に示されたものとするのと同程度に本明細書において参照により援用される。参照によって援用される刊行物及び特許又は特許出願が、本明細書に含まれる本開示と矛盾する限りにおいて、いかなるかかる矛盾する資料に対しても本明細書が優先し、及び／又は上位に立つことが意図される。

【００３９】

図面の簡単な説明

［0039］ 添付の特許請求の範囲には、本発明の新規の特徴が詳細に示される。本発明の原理が利用される例示的実施形態を示す以下の詳細な説明、及び添付の図面（本明細書ではまた「図（Figure）」及び「図（FIG.）」）を参照することにより、本発明の特徴及び利点の更なる理解が得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００４０】

【図１Ａ－Ｂ】[0040]プロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１、ＭＹＴ１）、Ｗｅｅ１、及びプロテインホスファターゼ２　５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）のシグナル伝達経路を概略的に示す。

【図２】[0041]異なる癌種のＰＰＰ２Ｒ２Ａ不活性化又は欠損の頻度のプロットを示す。

【図３】[0042]核酸分子による培養癌細胞集団の治療効果を決定するための例示的ワークフローを概略的に示す。

【図４】[0043]特異的遺伝子に突然変異を誘導することのできるシングルガイドＲＮＡを使用した、遺伝子が欠損している培養癌細胞の治療効果を決定するための別の例示的ワークフローを概略的に示す。

【図５】[0044]様々な癌種における正常細胞と比べた癌細胞のＰＫＭＹＴ１発現レベルのプロットを示す。

【図６】[0045]正常細胞と比較した癌（腫瘍）細胞のＰＫＭＹＴ１発現レベルの散布図を示す。

【図７Ａ－Ｂ】[0046]２つの異なるデータベース（Achilles、Demeter）における不活性ＰＰＰ２Ｒ２Ａを有する細胞又は野生型ＰＰＰ２Ｒ２Ａを有する細胞のＰＫＭＹＴ１必須性の散布図を示す。
【図８Ａ－Ｂ】[0047]２つの癌種からの細胞におけるＣＲＩＳＰＲベースのＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａノックアウト手法の例示的データを示す。
【図９】[0048]ＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの二重ノックアウトに関するＨＥＰ３Ｂコロニー形成データを示す。
【図１０】[0049]ＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子座の内因性欠失を有するＨｕｈ１細胞におけるＰＫＭＹＴ１ノックアウトの結果を示す。
【図１１】[0050]ＰＫＭＹＴ１との合成致死性を決定するための２１個の異なる遺伝子のスクリーニング結果を示す。
【図１２】[0051]ＰＰＰ２Ｒ２Ａノックアウトを有する同質遺伝子細胞株における小分子阻害薬によるＰＫＭＹＴ１阻害結果を示す。
【発明を実施するための形態】
【００４１】
詳細な説明
[0052] 本明細書には、本発明の様々な実施形態が示され、及び説明されるが、当業者には、かかる実施形態が単に例として提供されるに過ぎないことは明らかであろう。当業者には、本発明から逸脱することなく、多数の変形例、変更例、及び置換例が想起され得る。本明細書に記載される発明の実施形態についての様々な選択肢を用い得ることは理解されるであろう。
【００４２】
[0053] ２つ以上の一連の数値において最初の数値の前に用語「少なくとも～」、「～より大きい」、又は「～以上」が付くときは常に、その一連の数値の中にある各々の数値に用語「少なくとも～」、「～より大きい」、又は「～以上」が適用される。例えば、１、２、又は３以上とは、１以上、２以上、又は３以上に等しい。
【００４３】
[0054] ２つ以上の一連の数値において最初の数値の前に用語「～を超えない」、「～未満」、又は「～以下」が付くときは常に、その一連の数値の中にある各々の数値に用語「～を超えない」、「～未満」、又は「～以下」が適用される。例えば、３、２、又は１以下とは、３以下、２以下、又は１以下に等しい。
【００４４】
[0055] 用語「対象」は、本明細書で使用されるとき、概して、哺乳類（例えば、ヒト）、爬虫類、又は鳥類（例えば、トリ）などの動物、又はその他、植物などの生物を指す。例えば、対象は、脊椎動物、哺乳類、げっ歯類（例えば、マウス）、霊長類、サル又はヒトであり得る。対象は、健常個体、疾患（例えば、肝癌又は卵巣癌）に関して無症候の個体、疾患（例えば、肝癌又は卵巣癌）又は疾患に罹り易い素因を有する又は有する疑いがある個体、又は疾患に関して症候がある個体であり得る。対象は治療法を必要としている者であってもよい。対象は、治療担当医師など、医療提供者によるモニタリング又は治療を受けている患者であり得る。
【００４５】
[0056] 用語「ゲノム」は、本明細書で使用されるとき、概して、対象からのゲノム情報を指し、これは、例えば、対象の遺伝情報の少なくとも一部又は全てであってもよい。ゲノムは、１つ又は複数のデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）分子にコードされることができ、１つ又は複数のリボ核酸（ＲＮＡ）分子に発現し得る。ゲノムは、コード領域（例えば、タンパク質をコードするもの）並びに非コード領域を含み得る。ゲノムは、生物における全染色体配列をまとめて含み得る。例えば、ヒトゲノムは通常、合計４６個の染色体を有する。これら全ての配列がまとまってヒトゲノムを成し得る。
【００４６】
[0057] 本明細書において遺伝子が言及されるときは常に、単一の遺伝子が異なる名

称によって言及され得ることが理解されるであろう。例えば、「プロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１」及び「膜結合性チロシン特異的及びトレオニン特異的ｃｄｃ２阻害性キナーゼ」は、両方とも同じ遺伝子、ＰＫＭＹＴ１を指す。別の例として、「プロテインホスファターゼ２調節サブユニットＢα」及び「セリン／トレオニン－プロテインホスファターゼ２Ａ　５５ｋＤａ調節サブユニットＢαアイソフォーム」は、両方とも同じ遺伝子、ＰＰＰ２Ｒ２Ａを指す。

【００４７】

癌の治療方法

［0058］ある態様において、本明細書には、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を治療するための方法及び組成物が提供される。癌を有する又は有する疑いがある対象の治療方法は、１つ以上の遺伝子の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を対象に投与することを含んでもよく、それによって対象を癌に関して治療する。癌は、第１の遺伝子の発現の差異（例えば、その低下又は増加）又は活性レベルの差異（例えば、低下、増加又は変化）を有する細胞を含んでもよく、第２の遺伝子の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤を投与すると、又はそれに曝露すると、細胞の阻害又は死滅が起こり得る。一部の例では、第１の遺伝子と第２の遺伝子とは合成致死性遺伝子対を形成する。ある場合には、第１の遺伝子はプロテインホスファターゼ２　５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）であり、第２の遺伝子は、キナーゼ、例えば、プロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１）をコードする。

【００４８】

［0059］一部の例では、第１の遺伝子は、癌細胞において欠損している（例えば、過小発現している、突然変異している、過剰発現している）バイオマーカーをコードし、第２の遺伝子は、ノックダウン又はノックアウトしようとする遺伝子標的を含み、それによって第２の遺伝子の発現又は活性レベルを低下させる。一部の例では、第１の遺伝子は、癌細胞において発現の差異（例えば、その低下又は増加）又は活性レベルの差異（例えば、低下、増加又は変化）を有し、癌又は癌細胞において第２の遺伝子の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を投与すると、又はそれに曝露すると、細胞の阻害又は死滅が生じる。一部の例では、第１の遺伝子は、細胞周期を調節するタンパク質、例えばＰＰＰ２Ｒ２Ａをコードし、第２の遺伝子は、キナーゼ、例えばＰＫＭＹＴ１をコードする。

【００４９】

［0060］一部の例では、第１の遺伝子は、健常対照と比較したとき突然変異及び／又は欠失を示す。かかる突然変異の存在又は非存在は、対象から入手された組織由来細胞をアッセイすることによって同定し得る。適切なアッセイとしては、ゲノムＤＮＡ、ｍＲＮＡ、又はｃＤＮＡが関わるものを挙げることができる。例として、核酸ベースの検出方法については、初めに、検査しようとする対象の細胞（例えば、卵巣細胞）から（任意の標準技法を用いて）ゲノムＤＮＡが入手される。適切であるならば、ｃＤＮＡが調製されてもよく、又はｍＲＮＡが入手されてもよい。一部の例では、核酸が任意の公知の核酸増幅技法（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応）によって十分な分量及び純度に増幅され、更に分析されることにより、突然変異が検出され得る。例えば、試料からゲノムＤＮＡを単離することができ、全てのエクソン配列、及びエクソン／イントロンスプライシングに必要な領域を含むイントロン／エクソン接合領域を１つ以上のアンプリコンへと増幅し、突然変異の存在又は非存在に関して更に分析することができる。一部の例では、アッセイは、ＦｏｕｎｄａｔｉｏｎＯｎｅ（登録商標）ＣＤｘ（商標）又はＴｅｍｐｕｓ ｘＴ（商標）などの次世代シーケンシングベースのアッセイである。

【００５０】

［0061］第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）と第２の遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）とは合成致死性対を形成してもよく、つまり、第１の遺伝子及び第２の遺伝子の

両方の発現又は活性レベルの阻害又は低下は細胞に致死性となる（例えば、アポトーシス、壊死、増殖阻害等を引き起こす）が、第１の遺伝子単独又は第２の遺伝子単独の活性の阻害又は低下は、細胞を死滅させるには十分ではないことになる。ある場合には、第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）又は第２の遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）単独の発現又は活性の阻害又は低下は、細胞又は細胞集団の生存能力の減少を引き起こすが、両方の遺伝子の発現又は活性の低下（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１のノックダウン又はノックアウト）は、細胞又は細胞集団の生存能力の更に大きい減少を引き起こす。例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１の発現又は活性の低下は相乗的に作用してもよく、この遺伝子対の各メンバーの発現又は活性の低下による生存能力の減少の和よりも生存能力の減少が大きくなる。

【００５１】

［0062］ 細胞（例えば、癌性細胞）が第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）の欠損を有する場合、第２の遺伝子（本明細書ではまた「標的遺伝子」、例えばＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性レベルを（例えば、ノックダウン又はノックアウトによって）強制的に低下させることは、第１の遺伝子の欠損を有する細胞にとっては致死的となり得るが、第１の遺伝子の欠損を有しない細胞では非毒性又は非致死性であり得る。第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）の欠損を有する細胞を含む癌性組織に関連している癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する対象を、単一の阻害薬（例えば、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性の低下を生じさせる治療用薬剤の治療有効量）を使用して治療するかかる方法は、対象の正常細胞における毒性を減少させて、それによって癌治療の毒性又は副作用を減少させるのに有益であり得る。

【００５２】

［0063］ ある場合には、第１の遺伝子は、第２の遺伝子の上流アゴニスト若しくはアンタゴニストであるタンパク質であってもよく、又はそれをコードしてもよく、又は第２の遺伝子が、第１の遺伝子の上流アゴニスト若しくはアンタゴニストであるタンパク質であってもよく、又はそれをコードしてもよい。例として、第１の遺伝子はＰＰＰ２Ｒ２Ａであってもよく、第２の遺伝子はＰＫＭＹＴ１であってもよい。ＰＰＰ２Ｒ２Ａは、正常な（例えば、突然変異していない）細胞で発現するとき、ＰＫＭＹＴ１の間接的な正の調節因子として作用することができ、これはタンパク質シグナル伝達カスケード又はシグナル伝達経路の中で様々なタンパク質の上流調節因子であるキナーゼである（図１Ａ～図１Ｂを参照）。例えば、ＰＫＭＹＴ１はＣＤＫ１と相互作用し、又はそれを調節し、それによって細胞周期進行に影響を及ぼすことができる。正常な又は非癌性の細胞では、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現はＰＫＭＹＴ１を正に調節し、ひいてはＣＤＫ１を間接的に阻害し、無制御な細胞周期進行を防ぐことができる。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ発現はまた、ＤＮＡ修復を促進することも公知である(Cancer Res.2012 Dec 15;72(24):6414-24.)。それ故、ＰＰＰ２Ｒ２Ａが欠損している細胞（例えば、突然変異したＰＰＰ２Ｒ２Ａを有する細胞）では、損傷したＤＮＡが修復されないままになり得るとともに、ＰＫＭＹＴ１は阻害されないことになり得るため、下流タンパク質ＣＤＫ１の発現の増加が生じる。従って、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損細胞におけるＰＫＭＹＴ１阻害は、損傷したＤＮＡを有する細胞の無制御な細胞周期進行につながり、ひいては細胞死を誘導し得る。

【００５３】

［0064］ ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１が例として示されるが、他の遺伝子相互作用も可能であり得る。かかる例の一つでは、第１の遺伝子が、第２の遺伝子を調節する別の遺伝子（又はコードされるタンパク質）のアゴニスト若しくはアンタゴニストであってもよく、又は第２の遺伝子が、第１の遺伝子を調節する別の遺伝子又はコードされるタンパク質のアゴニスト若しくはアンタゴニストであってもよい。同様に、第１の遺伝子が、第２の遺伝子を調節し得る更に別の遺伝子（又はコードされるタンパク質）を調節する別の遺伝子（又はコードされるタンパク質）のアゴニスト又はアンタゴニストであってもよく、又は第２の遺伝子が、第１の遺伝子を調節し得る更に別の遺伝子（又はコードされるタンパク質）を調節する別の遺伝子（又はコードされるタンパク質）のアゴニスト又はア

ンタゴニストであってもよい。ある場合には、第１又は第２の遺伝子は、それぞれ第２又は第１の遺伝子の少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８個、又はそれ以上上流にある成分（例えば、ノード又は他の遺伝子、タンパク質、又はシグナル伝達因子）である別の遺伝子又はタンパク質を調節し得る。

【００５４】

［0065］ 一部の例では、第１の遺伝子及び第２の遺伝子は、同じ遺伝子の下流にあるサブセットを調節し得る。例えば、第１の遺伝子が複数の下流遺伝子を調節し、その下流遺伝子のサブセットがまた、第２の遺伝子によっても調節されるものであってもよい。癌細胞では、下流遺伝子は、例えば、ＨＩＰＰＯ経路、上皮間葉転換、Ｐ１３Ｋ経路、ＤＮＡ複製、細胞遊走、細胞転移等の癌関連過程において重要な遺伝子を含み得る。或いは、又はそれに加えて、第１の遺伝子及び第２の遺伝子は、同じ遺伝子のサブセットによって調節されてもよい。

【００５５】

［0066］ ある場合には、第１の遺伝子又は第２の遺伝子はまた、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）のバイオマーカーであってもよい。例えば、第１の遺伝子はＰＰＰ２Ｒ２Ａであってもよい。ある場合には、癌細胞において、ＰＰＰ２Ｒ２Ａは、対照細胞又は細胞集団と比較したとき癌細胞で低発現であるか、突然変異しているか、又は他に何らか欠損しているものであり得る。例えば、図２は、異なる癌種（Ｘ軸）におけるＰＰＰ２Ｒ２Ａ不活性化又は欠損の頻度（Ｙ軸）のプロットを示す。ある種の癌では（例えば、ホルモン不応性前立腺腺癌）、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの突然変異頻度は約１５％もの高さに上り得る。他のある癌種では（例えば、卵巣漿液性嚢胞腺癌、直腸腺癌）、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの突然変異頻度は１０％を上回り得る。様々な癌種において、不活性化につながるＰＰＰ２Ｒ２Ａの欠損には、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子における同じ遺伝子の複数のコピー、過剰メチル化、深い欠失、又は突然変異が含まれ得る。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ突然変異を含む癌では、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性の低下を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を投与すると、又はそれに曝露すると、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ突然変異細胞の合成致死が起こり得る。

【００５６】

［0067］ ある場合には、第２の遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、小分子（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）、タンパク質、イントラボディ、ペプチド、リボ核酸（ＲＮＡ）分子、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）コンストラクト、又はこれらの組み合わせ（例えば、タンパク質－核酸複合体）を含み得る。ある例では、１つ以上の治療用薬剤は、タンパク質－核酸複合体、例えば、エンドヌクレアーゼ複合体及びＤＮＡコンストラクトを含み得る。ある場合には、エンドヌクレアーゼ複合体は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質又はその変異体（例えば、改変された変異体）を含む。そのような場合、ＤＮＡコンストラクトはエンドヌクレアーゼ複合体と共投与されてもよい。或いは、又はそれに加えて、ＤＮＡコンストラクトはエンドヌクレアーゼ遺伝子を含んでもよい。そのような場合、ＤＮＡコンストラクトは、Ｃａｓタンパク質又はその変異体（例えば、改変された変異体）をコードする遺伝子を含み得る。細胞（例えば、癌細胞）へのＤＮＡコンストラクトの導入又は送達後、ＤＮＡコンストラクトは細胞により、細胞自らの機構（例えば、ポリメラーゼ、リボソーム等）を用いて転写され、翻訳されてもよい。

【００５７】

［0068］ 一部の例では、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、小分子阻害薬（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）を含む。小分子は、標的遺伝子単独の発現レベル又は活性レベルを低下させるように構成されてもよく、又は小分子は、欠損している又は突然変異している遺伝子（例えば、癌細胞のＰＰＰ２Ｒ２Ａ）との組み合わせで標的遺伝子の発現レベル又は活性レベルを低下させるように構成されてもよい。ある場合には、小分子は、第１の遺伝子及び第２の遺伝子の両方と直接相互作用し得

る。例えば、小分子は、それぞれ第１の遺伝子及び第２の遺伝子の一方又は両方によってコードされるタンパク質又は１つ若しくは複数のタンパク質を阻害し得る。或いは、又はそれに加えて、小分子は、それらの遺伝子の一方又は両方が相互作用するシグナル伝達経路内の上流エフェクター又は下流タンパク質を阻害し得る。

【００５８】

［0069］ ある場合には、小分子阻害薬は、ＰＫＭＹＴ１阻害薬を含み得る。ＰＫＭＹＴ１阻害薬は、例えば、５－（（５－メトキシ－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリミジン－４－イル）アミノ）－２－メチルフェノール、Ｎ－（２－クロロ－６－メチルフェニル）－２－（（６－（４－（２－ヒドロキシエチル）ピペラジン－１－イル）－２－メチルピリミジン－４－イル）アミノ）チアゾール－５－カルボキサミド（ダサチニブ）、４－（（２，４－ジクロロ－５－メトキシフェニル）アミノ）－６－メトキシ－７－（３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロポキシ）キノリン－３－カルボニトリル（ボスチニブ）、Ｎ－（５－クロロベンゾ［ｄ］［１，３］ジオキソール－４－イル）－７－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エトキシ）－５－（（テトラヒドロ－２Ｈ－ピラン－４－イル）オキシ）キナゾリン－４－アミン（サラカチニブ）、（Ｅ）－Ｎ－（４－（（３－クロロ－４－フルオロフェニル）アミノ）－３－シアノ－７－エトキシキノリン－６－イル）－４－（ジメチルアミノ）ブタ－２－エンアミド（ペリチニブ）、Ｎ－（３－クロロフェニル）－６，７－ジメトキシキナゾリン－４－アミン（チルホスチンＡＧ　１４７８）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（４－モルホリノフェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５２）、６－（２，６－ジクロロフェニル）－８－メチル－２－（（３－（メチルチオ）フェニル）アミノ）ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１７３９５５）、又は６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－フルオロ－３－メチルフェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－１８０９７０）であり得る。小分子阻害薬は、ＰＫＭＹＴ１（遺伝子）の発現又はプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１遺伝子に由来するタンパク質）の活性を、直接、又は間接的のいずれかで阻害し、又は低下させるように構成されてもよい。例えば、小分子阻害薬は、プロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１タンパク質、又は限定はされないが、図１Ａ～図１Ｂに示されるものなど、シグナル伝達経路においてプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１の上流又は下流にあり得る別のタンパク質を阻害し得る。例えば、小分子阻害薬は、ＷＥＥ１、ＣＨＫ１、ＣＤＫ１、ＣＤＫ２、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ、ＦＯＸＭ１、ＰＬＫ１、ＥＺＨ２等の発現又は活性レベルを阻害し、又は他に何らか低下させるものであり得る。

【００５９】

［0070］ ある場合には、小分子阻害薬は、ＷＥＥ１阻害薬を含み得る。ＷＥＥ１阻害薬は、例えば、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、２－アリル－１－（６－（２－ヒドロキシプロパン－２－イル）ピリジン－２－イル）－６－（（４－（４－メチルピペラジン－１－イル）フェニル）アミノ）－１，２－ジヒドロ－３Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－３－オン（ＭＫ－１７７５）、９－ヒドロキシ－４－フェニルピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン（ＰＤ－４０７８２４）、６－ブチル－４－（２－クロロフェニル）－９－ヒドロキシピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン、又は６－（２－クロロ－６－フルオロフェニル）－２－（（２，４，４－トリメチル－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－７－イル）アミノ）イミダゾ［１，２－ａ］ピリミド［５，４－ｅ］ピリミジン－５（６Ｈ）－オンであり得る。小分子阻害薬は、ＷＥＥ１（遺伝子）の発現又はＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキ

ナーゼ（ＷＥＥ１遺伝子に由来するタンパク質）の活性を、直接、又は間接的のいずれかで阻害し、又は低下させるように構成されてもよい。例えば、小分子阻害薬は、ＷＥＥ１Ｇ２チェックポイントキナーゼタンパク質、又は限定はされないが、図１Ａに示されるものなど、シグナル伝達経路においてＷＥＥ１　Ｇ２チェックポイントキナーゼの上流又は下流にあり得る別のタンパク質を阻害し得る。例えば、小分子阻害薬は、ＣＤＫ１、ＣＤＫ２等の発現又は活性レベルを阻害し、又は他に何らか低下させるものであり得る。

【００６０】

［0071］ ある場合には、小分子阻害薬は、小分子阻害薬又はその誘導体の組み合わせを含み得る。例えば、小分子阻害薬は、二重特異性となるように改変され、又は修飾されてもよく、第１の遺伝子及び第２の遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ）の両方の発現又は活性を低下させてもよい。或いは、又はそれに加えて、小分子阻害薬の組み合わせ（例えば、小分子「カクテル」）を使用して、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）単独又は第１の遺伝子及び第２の遺伝子の両方の発現又は活性を低下させてもよい。ある場合には、小分子阻害薬は、別の薬剤種（例えば、タンパク質、ＲＮＡ分子、ＤＮＡ分子等）と共に投与されてもよい。

【００６１】

［0072］ 小分子阻害薬は、任意の有用な濃度で投与されてもよい。例えば、小分子は、約０．５ナノモル（ｎＭ）、約１ｎＭ、約１０ｎＭ、約２０ｎＭ、約３０ｎＭ、約４０ｎＭ、約５０ｎＭ、約６０ｎＭ、約７０ｎＭ、約８０ｎＭ、約９０ｎＭ、約１００ｎＭ、約２００ｎＭ、約３００ｎＭ、約４００ｎＭ、約５００ｎＭ、約６００ｎＭ、約７００ｎＭ、約８００ｎＭ、約９００ｎＭ、約１マイクロモル（μＭ）、約２μＭ、約３μＭ、約４μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭの濃度で投与されてもよい。小分子は、少なくとも約０．５ナノモル（ｎＭ）、少なくとも約１ｎＭ、少なくとも約１０ｎＭ、少なくとも約２０ｎＭ、少なくとも約３０ｎＭ、少なくとも約４０ｎＭ、少なくとも約５０ｎＭ、少なくとも約６０ｎＭ、少なくとも約７０ｎＭ、少なくとも約８０ｎＭ、少なくとも約９０ｎＭ、少なくとも約１００ｎＭ、少なくとも約２００ｎＭ、少なくとも約３００ｎＭ、少なくとも約４００ｎＭ、少なくとも約５００ｎＭ、少なくとも約６００ｎＭ、少なくとも約７００ｎＭ、少なくとも約８００ｎＭ、少なくとも約９００ｎＭ、少なくとも約１マイクロモル（μＭ）、少なくとも約２μＭ、少なくとも約３μＭ、少なくとも約４μＭ、少なくとも約５μＭ、少なくとも約６μＭ、少なくとも約７μＭ、少なくとも約８μＭ、少なくとも約９μＭ、少なくとも約１０μＭの濃度で投与されてもよい。小分子は、多くても約１０μＭ、多くても約９μＭ、多くても約８μＭ、多くても約７μＭ、多くても約６μＭ、多くても約５μＭ、多くても約４μＭ、多くても約３μＭ、多くても約２μＭ、多くても約１μＭ、多くても約９００ｎＭ、多くても約８００ｎＭ、多くても約７００ｎＭ、多くても約６００ｎＭ、多くても約５００ｎＭ、多くても約４００ｎＭ、多くても約３００ｎＭ、多くても約２００ｎＭ、多くても約１００ｎＭ、多くても約９０ｎＭ、多くても約８０ｎＭ、多くても約７０ｎＭ、多くても約６０ｎＭ、多くても約５０ｎＭ、多くても約４０ｎＭ、多くても約３０ｎＭ、多くても約２０ｎＭ、多くても約１０ｎＭ、多くても約１ｎＭ、多くても約０．５ｎＭ等の濃度で投与されてもよい。ある範囲の濃度、例えば２２ｎＭ～１μＭが用いられてもよい。１つ以上の小分子が使用されるとき、それらの濃度は同じであっても、又は使用される小分子毎に異なってもよい。

【００６２】

［0073］ ある場合には、小分子阻害薬は、類似の遺伝子（例えば、ＷＥＥ１等）と比べてＰＫＭＹＴ１に対してより高い選択性を有するように構成されてもよい。小分子阻害薬は、類似の遺伝子と比べてＰＫＭＹＴ１に対して約１倍、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、２０倍、３０倍、４０倍、５０倍、６０倍、７０倍、８０倍、９０倍、１００倍、２００倍、３００倍、４００倍、５００倍、又はそれ以上の高い選択性を有し得る。小分子阻害薬は、類似の遺伝子と比べてＰＫＭＹＴ１に対して少なくとも１倍、少なくとも２倍、少なくとも３倍、少なくとも４倍、少なくとも５倍、少な

くとも６倍、少なくとも７倍、少なくとも８倍、少なくとも９倍、少なくとも１０倍、少なくとも２０倍、少なくとも３０倍、少なくとも４０倍、少なくとも５０倍、少なくとも６０倍、少なくとも７０倍、少なくとも８０倍、少なくとも９０倍、少なくとも１００倍、少なくとも２００倍、少なくとも３００倍、少なくとも４００倍、少なくとも５００倍、又はそれ以上の高い選択性を有し得る。

【００６３】

［0074］ 第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）の欠損を含む癌では、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、治療有効性を得るために対象に送達する必要のある濃度又は投薬量が低くなり得る。例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１は合成致死性であってもよく、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの欠損を有する癌細胞を有する対象へのＰＫＭＹＴ１阻害薬の投与が治療上有効であり得る。このような例では、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損を有しない細胞（例えば、非癌細胞）と比較して、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損癌細胞を死滅させるために、より低い投薬量のＰＫＭＹＴ１阻害薬が十分であり得る。対象におけるＰＫＭＹＴ１阻害の投薬量又は濃度が高くなると、毒性が増加し得るため、選択した又は予めスクリーニングした癌種（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ突然変異を含む癌）においてより低い濃度又は投薬量のＰＫＭＹＴ１阻害薬を投与することは、対象への毒性及び副作用を減少させるのに有利であり得る。

【００６４】

［0075］ ある場合には、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する対象の治療方法は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を対象に投与することを更に含む。ある場合には、癌を有する対象の治療方法は、ＣＤＫ１の発現又は活性の低下を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を対象に投与することを更に含む。

【００６５】

［0076］ ある場合には、標的遺伝子の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、ＤＮＡコンストラクトを含む。例として、標的遺伝子はＰＫＭＹＴ１であってもよい。ＤＮＡコンストラクトはガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列を含んでもよく、これは、タンパク質（例えば、Ｃａｓタンパク質）を標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）に向かわせるために用いられるものであり得る。ＤＮＡコンストラクトはｇＲＮＡ配列を含んでもよく、これは、タンパク質（例えば、Ｃａｓタンパク質）を標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）に向かわせるものであってよい。ＤＮＡコンストラクトは、ＲＮＡ配列、ＤＮＡ配列、又はこれらの組み合わせを含み得る。ある場合には、ＤＮＡコンストラクトは、（ｉ）第１のｇＲＮＡ配列（これは、エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓタンパク質）を標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）についての標的となる位置又は遺伝子座に向かわせるために用いられるものであり得る）と、（ｉｉ）遺伝子に対応する第１の配列（例えば、ＤＮＡ配列）（例えば、ＰＫＭＹＴ１の遺伝子置換体）とを含む。ＤＮＡコンストラクトにおいては、異なる組み合わせのＲＮＡ配列及びＤＮＡ配列が使用されてもよいことは理解されるであろう。更に、限定はされないが、バーコード配列、タグ、又は他の識別用配列、プライマー配列、制限部位、転位部位等を含め、他の機能配列がＤＮＡ配列に含まれてもよい。

【００６６】

［0077］ エンドヌクレアーゼ複合体は、エンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓタンパク質、又は他の核酸相互作用酵素（例えば、リガーゼ、ヘリカーゼ、逆転写酵素、転写酵素、ポリメラーゼ等）を含み得る。Ｃａｓタンパク質は、任意のＣａｓ型（例えば、Ｃａｓ Ｉ、Ｃａｓ ＩＡ、Ｃａｓ ＩＢ、Ｃａｓ ＩＣ、Ｃａｓ ＩＤ、Ｃａｓ ＩＥ、Ｃａｓ ＩＦ、Ｃａｓ ＩＵ、Ｃａｓ ＩＩＩ、Ｃａｓ ＩＩＩＡ、Ｃａｓ ＩＩＩＢ、Ｃａｓ ＩＩＩＣ、Ｃａｓ ＩＩＩＤ、Ｃａｓ ＩＶ、Ｃａｓ ＩＶＡ、Ｃａｓ ＩＶＢ、Ｃａｓ ＩＩ、Ｃａｓ ＩＩＡ、Ｃａｓ ＩＩＢ、Ｃａｓ ＩＩＣ、Ｃａｓ Ｖ、Ｃａｓ ＶＩ）を含み得る。一部の例では、Ｃａｓタンパク質は、他のタンパク質（例えば、融合

タンパク質）を含んでもよく、核酸分子に関連したものであり得る追加の酵素（例えば、リガーゼ、転写酵素、トランスポザーゼ、ヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、逆転写酵素、ポリメラーゼ、ヘリカーゼ等）を含んでもよい。エンドヌクレアーゼ複合体は、外因的に送達されてもよく、又は細胞内での転写及び翻訳用にＤＮＡコンストラクトにコードされてもよい。

【００６７】

［0078］ある場合には、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、タンパク質又はペプチドを含み得る。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、抗体、抗体断片、ホルモン、リガンド、又は免疫グロブリンを含み得る。タンパク質又はペプチドは、天然に存在するものであってもよく、又は合成であってもよい。タンパク質は、タンパク質の改変された変異体（例えば、組換えタンパク質）、又はその断片であってもよい。タンパク質は、限定はされないが、グリコシル化、アシル化、プレニル化、リポイル化、アルキル化、アミド化、アセチル化、メチル化、ホルミル化、ブチリル化、カルボキシル化、リン酸化、マロニル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、プロピオニル化、Ｓ－ニトロシル化、Ｓ－グルタチオン化、スクシニル化、硫酸化、糖化、カルバミル化、カルボニル化、ビオチン化、カルバミル化、酸化、ペグ化、ＳＵＭＯ化、ユビキチン化、ユビキチン化、ラセミ化等を含めた他の修飾、例えば翻訳後修飾に供されてもよい。タンパク質又はペプチドに１つ以上の修飾が行われてもよい。

【００６８】

［0079］ある場合には、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、核酸分子、例えばＲＮＡ分子を含み得る。ＲＮＡ分子は、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現レベル又は活性を低下させるのに十分な任意の好適なＲＮＡ分子及びサイズを含み得る。ＲＮＡ分子は、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、又は他の有用なＲＮＡ分子を含み得る。一部の例において、ＲＮＡ分子は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、ｐｉｗｉ相互作用性（ｐｉＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長鎖非コードＲＮＡ、（ｌｎｃＲＮＡ）、及び前述のうちのいずれかの断片を含み得る。ＲＮＡ分子は、一本鎖、二本鎖、又は部分的一本鎖若しくは二本鎖であってもよい。

【００６９】

［0080］１つ以上の治療用薬剤（例えば、ペプチド、ＲＮＡ分子、タンパク質－核酸複合体）は例として挙げられること、及び治療用薬剤各種の組み合わせを用いて対象を治療し得ることは理解されるであろう。例えば、１つ以上の異なる種類の治療用薬剤の投与を用いて標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性を低下させてもよい。例えば、タンパク質又はペプチドは、小分子（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）、ＲＮＡ分子、ＤＮＡ分子、又は複合体化した分子（例えば、タンパク質－核酸分子）と共投与されてもよい。同様に、ＲＮＡ分子は、小分子、ＤＮＡ分子、又は複合体化した分子と共に投与されてもよい。別の例において、小分子は、ＤＮＡ分子又は複合体化した分子と共投与されてもよい。これらの組み合わせのいずれかを用いて、第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）に突然変異を含む細胞において標的遺伝子（ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性を低下させてもよい。これらの組み合わせは、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する又は有する疑いがある対象の治療に使用し得る薬剤の異なる組み合わせの非限定的な例である。

【００７０】

［0081］例えば、図３は、２つの異なる遺伝子を標的とする一対のガイドＲＮＡによる培養癌細胞集団の治療効果を決定するための例示的ワークフローを概略的に図解する。このような例では、治療は、第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）及び第２の遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の活性又は発現を低下させるための核酸分子の投与を含み得る

。この核酸分子は、第１のｇＲＮＡ配列（ｓｇＲＮＡ－Ａ）と、第２のｇＲＮＡ配列（ｓｇＲＮＡ－Ｂ）と、第１のＤＮＡ配列（ＢＣ－Ｂ）と、第２のＤＮＡ配列（ＢＣ－Ａ）とを含み得るＤＮＡコンストラクトを含むことができる。第１のＤＮＡ配列又は第２のＤＮＡ配列、又は第１及び第２の両方のＤＮＡ配列は、バーコード配列を含み得る。第１のガイド配列は、第１の遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）との配列相同性を有してもよく、ひいては第１の遺伝子がタンパク質（例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９）による突然変異誘発の標的となってもよく、第２のガイド配列は、第２の遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）との配列相同性を有してもよく、ひいては第２の遺伝子がタンパク質（例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９）による突然変異誘発の標的となってもよい。細胞（例えば、癌細胞）は、治療有効量のＤＮＡコンストラクト及びタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）で治療され得る。ある場合には、ＤＮＡコンストラクトは、トランスフェクション（例えば、リポソーム又は他のナノ粒子を用いる）又は形質導入（例えば、ウイルスを用いる）によって導入されてもよい。タンパク質は、ナノ粒子又は他の小胞を用いるか、又はタンパク質を細胞培養培地に加えることにより投与されてもよい。タンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、ｓｇＲＮＡ－Ａ及びｓｇＲＮＡ－Ｂを使用して、タンパク質を細胞ゲノム中の特異的遺伝子座又は位置（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１の遺伝子座）に向かわせ得る。次に、タンパク質は、内因性遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１）を切り出し、及び／又は置き換え得る。内因性遺伝子を置き換える場合、タンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、内因性遺伝子を第１のＤＮＡ配列（ＢＣ－Ｂ）及び第２のＤＮＡ配列（ＢＣ－Ａ）に置き換え得る。次に細胞が、ある継続期間（例えば、７日、１４日、２０日等）にわたって培養されてもよい。培養された細胞集団からのＤＮＡをシーケンシングすると、存在する可能性のあるガイドＲＮＡ対の各々の存在量を確定することができる。特定のガイド対の存在量が実質的に減少していれば、当該の遺伝子ノックダウンの組み合わせがそれらの細胞の増殖能力に有害な効果を及ぼすことが示唆され得る。

【００７１】

［0082］ ある場合には、細胞又は細胞集団中で標的遺伝子のみがノックアウトされてもよく、この細胞は、標的遺伝子と合成致死性を持つ欠損遺伝子を含む。図４は、遺伝子（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）が欠損している培養癌細胞集団の治療効果を決定するための例示的ワークフローを概略的に図解する。このような例では、治療は、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）の活性又は発現を低下させるための核酸分子の投与を含み得る。核酸分子は、ｇＲＮＡ配列（ｓｇＲＮＡ－Ａ）及びＤＮＡ配列（ＢＣ－Ａ）を含み得るＤＮＡコンストラクトを含むことができる。ＤＮＡ配列はバーコード配列を含んでもよく、ガイド配列は、標的遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）との配列相同性を有してもよく、ひいては標的遺伝子がタンパク質（例えば、エンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓ９）による突然変異誘発の標的となり得る。突然変異（例えば、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ突然変異）を含む細胞（例えば、癌細胞）の集団は、治療有効量のＤＮＡコンストラクト及びタンパク質（例えば、Ｃａｓ９）で治療され得る。ある場合には、ＤＮＡコンストラクトは、トランスフェクション（例えば、リポソーム又は他のナノ粒子を用いる）又は形質導入（例えば、ウイルスを用いる）によって導入されてもよい。タンパク質は、ナノ粒子又は他の小胞を用いるか、又はタンパク質を細胞培養培地に加えることにより投与されてもよい。タンパク質（例えば、Ｃａｓ９）はｓｇＲＮＡ－Ａを使用してタンパク質を細胞ゲノム中の特異的遺伝子座又は位置（例えば、ＰＫＭＹＴ１の遺伝子座）に向かわせ得る。次に、タンパク質は、内因性遺伝子（例えば、ＰＫＭＹＴ１）を切り出し、及び／又は置き換え得る。内因性遺伝子を置き換える場合、タンパク質（例えば、Ｃａｓ９）は、内因性遺伝子をＤＮＡ配列（ＢＣ－Ａ）に置き換え得る。次に細胞が、ある継続期間（例えば、７日、１４日、２０日等）にわたって培養されてもよい。細胞の増殖又は生存能力が測定され、一部の例では、細胞（例えば、非突然変異体ＰＰＰ２Ｒ２Ａ細胞）の対照集団と比較されてもよい。培養された細胞集団からのＤＮＡをシーケンシングすると、存在する可能性のあるガイドＲＮＡの各々の存在量を確定することができる。特定のガイドの存在量が実質的に減少

していれば、当該の遺伝子ノックダウンがそれらの細胞の増殖能力に有害な効果を及ぼすことが示唆され得る。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ突然変異細胞の増殖を減少させるが、野生型細胞については減少させないガイドＲＮＡは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａとの合成致死性を有すると見なし得る。

【００７２】

［0083］ ある場合には、標的遺伝子との合成致死性のある欠損遺伝子は、ＰＰ２Ａのサブユニットのうちの１つをコードする遺伝子である。ある場合には、ＰＰ２Ａサブユニットは、６５ｋＤａ調節サブユニットＡα（ＰＰＰ２Ｒ１Ａ）、６５ｋＤａ調節サブユニットＡβ（ＰＰＰ２Ｒ１Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢα（ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢβ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｂ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢγ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｃ）、５５ｋＤａ調節サブユニットＢδ（ＰＰＰ２Ｒ２Ｄ）、７２／１３０ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ａ）、４８ｋＤａ調節サブユニットＢ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｂ）、調節サブユニットＢ”サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ３Ｃ）、調節サブユニットＢ’（ＰＰＰ２Ｒ４）、５６ｋＤａ調節サブユニットα（ＰＰＰ２Ｒ５Ａ）、５６ｋＤａ調節サブユニットβ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｂ）、５６ｋＤａ調節サブユニットγ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｃ）、５６ｋＤａ調節サブユニットδ（ＰＰＰ２Ｒ５Ｄ）、５６ｋＤａ調節サブユニットε（ＰＰＰ２Ｒ５Ｅ）、触媒サブユニットα（ＰＰＰ２ＣＡ）、及び触媒サブユニットβ（ＰＰＰ２ＣＢ）からなる群から選択される。ある場合には、サブユニットは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａである。

【００７３】

［0084］ 別の態様において、本明細書には、（ｉ）少なくとも１つの治療用薬剤と（ｉｉ）賦形剤とを含む製剤を含む、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を治療するための組成物が開示され、ここで少なくとも１つの治療用薬剤は、対象への投与後又は曝露後にプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１）の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるのに有効な量で存在し、賦形剤は、少なくとも１つの治療用薬剤が賦形剤の存在なしに対象に投与されるのと比較したとき、対象への投与後又は曝露後に少なくとも１つの治療用薬剤を安定化させるか、又は少なくとも１つの治療用薬剤の治療増強を提供し、及び癌は、健常対照と比較したときプロテインホスファターゼ２（ＰＰ２Ａ）又はそのサブユニットの発現の差異（例えば、その低下又は増加）又は活性レベルの差異（例えば、低下、増加又は変化）を有する細胞を含む癌性組織に関連している。

【００７４】

［0085］ ある場合には、癌性組織は、乳房組織、膵臓組織、子宮組織、膀胱組織、結腸直腸組織、前立腺組織、肝組織、又は卵巣組織である。ある場合には、癌性組織は、肝組織である。ある場合には、癌性組織は、卵巣組織である。

【００７５】

［0086］ ある場合には、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される少なくとも１つの治療用薬剤は、小分子（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）、タンパク質、ペプチド、リボ核酸（ＲＮＡ）分子、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）コンストラクト、又はこれらの組み合わせ（例えば、タンパク質－核酸複合体）を含み得る。ある例では、少なくとも１つの治療用薬剤は、タンパク質－核酸複合体、例えば、エンドヌクレアーゼ複合体及びＤＮＡコンストラクトを含み得る。ある場合には、エンドヌクレアーゼ複合体は、クラスター化して規則的な配置の短い回文配列リピート（ＣＲＩＳＰＲ）関連（Ｃａｓ）タンパク質又はその変異体（例えば、改変された変異体）を含む。そのような場合、ＤＮＡコンストラクトはエンドヌクレアーゼ複合体と共投与されてもよい。或いは、又はそれに加えて、ＤＮＡコンストラクトはエンドヌクレアーゼ遺伝子を含んでもよい。そのような場合、ＤＮＡコンストラクトは、Ｃａｓタンパク質又はその変異体（例えば、改変された変異体）をコードする遺伝子を含み得る。細胞（例えば、癌細胞）へのＤＮＡコンストラクトの導入又は送達後、ＤＮＡコンストラクトは細胞により、細胞自らの機構（例えば、ポリメラーゼ、リボソーム等）を

用いて転写され、翻訳されてもよい。
【００７６】
［0087］ 一部の例では、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される少なくとも１つの治療用薬剤は、小分子阻害薬（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）を含む。小分子は、標的遺伝子単独の発現レベル又は活性レベルを低下させるように構成されてもよく、又は小分子は、ＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現レベル又は活性レベルを低下させるように構成されてもよい。ある場合には、小分子は、ＰＫＭＹＴ１、又はＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａと直接相互作用し得る。例えば、小分子は、それぞれ、ＰＫＭＹＴ１単独、又はＰＫＭＹＴ１とＰＰＰ２Ｒ２Ａとの組み合わせによってコードされる１つ又は複数のタンパク質を阻害し得る。或いは、又はそれに加えて、小分子は、ＰＫＭＹＴ１又はＰＰＰ２Ｒ２Ａが相互作用するシグナル伝達経路における上流エフェクター又は下流タンパク質を阻害し得る。
【００７７】
［0088］ ある場合には、小分子阻害薬は、ＰＫＭＹＴ１阻害薬を含み得る。ＰＫＭＹＴ１阻害薬は、例えば、ダサチニブ、サラカチニブ、ペリチニブ、チルホスチンＡＧ １４７８、ＰＤ－０１６６２８５、ＰＤ－１７３９５２、ＰＤ－１７３９５５、又はＰＤ－１８０９７０であり得る。小分子阻害薬は、ＰＫＭＹＴ１（遺伝子）の発現又はプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１（ＰＫＭＹＴ１遺伝子に由来するタンパク質）の活性を直接、又は間接的に阻害し、又は低下させるように構成されてもよい。例えば、小分子阻害薬は、プロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１タンパク質、又は限定はされないが、図１Ａ～図１Ｂに示されるものなど、シグナル伝達経路においてプロテインキナーゼ、膜結合性チロシン／トレオニン１の上流又は下流にあり得る別のタンパク質を阻害し得る。
【００７８】
［0089］ ある場合には、小分子阻害薬は、ＷＥＥ１阻害薬を含み得る。ＷＥＥ１阻害薬は、例えば、６－（２，６－ジクロロフェニル）－２－（（４－（２－（ジエチルアミノ）エトキシ）フェニル）アミノ）－８－メチルピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－７（８Ｈ）－オン（ＰＤ－０１６６２８５）、２－アリル－１－（６－（２－ヒドロキシプロパン－２－イル）ピリジン－２－イル）－６－（（４－（４－メチルピペラジン－１－イル）フェニル）アミノ）－１，２－ジヒドロ－３Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－３－オン（ＭＫ－１７７５）、９－ヒドロキシ－４－フェニルピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン（ＰＤ－４０７８２４）、６－ブチル－４－（２－クロロフェニル）－９－ヒドロキシピロロ［３，４－ｃ］カルバゾール－１，３（２Ｈ，６Ｈ）－ジオン、又は６－（２－クロロ－６－フルオロフェニル）－２－（（２，４，４－トリメチル－１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－７－イル）アミノ）イミダゾ［１，２－ａ］ピリミド［５，４－ｅ］ピリミジン－５（６Ｈ）－オンであり得る。小分子阻害薬は、ＷＥＥ１（遺伝子）の発現又はＷＥＥ１ Ｇ２チェックポイントキナーゼ（ＷＥＥ１遺伝子に由来するタンパク質）の活性を、直接、又は間接的のいずれかで阻害し、又は低下させるように構成されてもよい。例えば、小分子阻害薬は、ＷＥＥ１Ｇ２チェックポイントキナーゼタンパク質、又は限定はされないが、図１Ａに示されるものなど、シグナル伝達経路においてＷＥＥ１ Ｇ２チェックポイントキナーゼの上流又は下流にあり得る別のタンパク質を阻害し得る。例えば、小分子阻害薬は、ＣＤＫ１、ＣＤＫ２等の発現又は活性レベルを阻害し、又は他に何らか低下させるものであり得る。
【００７９】
［0090］ ある場合には、小分子阻害薬は、小分子阻害薬又はその誘導体の組み合わせを含み得る。例えば、小分子阻害薬は、二重特異性となるように改変され、又は修飾されてもよく、ＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの両方の発現又は活性を低下させてもよい。或いは、又はそれに加えて、小分子阻害薬の組み合わせ（例えば、小分子「カクテル」）を使用して、ＰＫＭＹＴ１、又はＰＫＭＹＴ１とＰＰＰ２Ｒ２Ａとの組み合わせの発現を低下させてもよい。ある場合には、小分子阻害薬は、別種の治療用薬剤（例えば、タンパ

ク質、ＲＮＡ分子、ＤＮＡ分子等）と共に投与されてもよい。
【００８０】
［0091］ 小分子阻害薬は、任意の有用な濃度で投与されてもよい。例えば、小分子は、約０．５ナノモル（ｎＭ）、約１ｎＭ、約１０ｎＭ、約２０ｎＭ、約３０ｎＭ、約４０ｎＭ、約５０ｎＭ、約６０ｎＭ、約７０ｎＭ、約８０ｎＭ、約９０ｎＭ、約１００ｎＭ、約２００ｎＭ、約３００ｎＭ、約４００ｎＭ、約５００ｎＭ、約６００ｎＭ、約７００ｎＭ、約８００ｎＭ、約９００ｎＭ、約１マイクロモル（μＭ）、約２μＭ、約３μＭ、約４μＭ、約５μＭ、約６μＭ、約７μＭ、約８μＭ、約９μＭ、約１０μＭの濃度で投与されてもよい。小分子は、少なくとも約０．５ナノモル（ｎＭ）、少なくとも約１ｎＭ、少なくとも約１０ｎＭ、少なくとも約２０ｎＭ、少なくとも約３０ｎＭ、少なくとも約４０ｎＭ、少なくとも約５０ｎＭ、少なくとも約６０ｎＭ、少なくとも約７０ｎＭ、少なくとも約８０ｎＭ、少なくとも約９０ｎＭ、少なくとも約１００ｎＭ、少なくとも約２００ｎＭ、少なくとも約３００ｎＭ、少なくとも約４００ｎＭ、少なくとも約５００ｎＭ、少なくとも約６００ｎＭ、少なくとも約７００ｎＭ、少なくとも約８００ｎＭ、少なくとも約９００ｎＭ、少なくとも約１マイクロモル（μＭ）、少なくとも約２μＭ、少なくとも約３μＭ、少なくとも約４μＭ、少なくとも約５μＭ、少なくとも約６μＭ、少なくとも約７μＭ、少なくとも約８μＭ、少なくとも約９μＭ、少なくとも約１０μＭの濃度で投与されてもよい。小分子は、多くても約１０μＭ、多くても約９μＭ、多くても約８μＭ、多くても約７μＭ、多くても約６μＭ、多くても約５μＭ、多くても約４μＭ、多くても約３μＭ、多くても約２μＭ、多くても約１μＭ、多くても約９００ｎＭ、多くても約８００ｎＭ、多くても約７００ｎＭ、多くても約６００ｎＭ、多くても約５００ｎＭ、多くても約４００ｎＭ、多くても約３００ｎＭ、多くても約２００ｎＭ、多くても約１００ｎＭ、多くても約９０ｎＭ、多くても約８０ｎＭ、多くても約７０ｎＭ、多くても約６０ｎＭ、多くても約５０ｎＭ、多くても約４０ｎＭ、多くても約３０ｎＭ、多くても約２０ｎＭ、多くても約１０ｎＭ、多くても約１ｎＭ、多くても約０．５ｎＭ等の濃度で投与されてもよい。ある範囲の濃度、例えば２２ｎＭ～１μＭが用いられてもよい。１つ以上の小分子が使用されるとき、それらの濃度は同じであっても、又は使用される小分子毎に異なってもよい。本明細書の他の部分に記載されるとおり、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損を有する細胞を含む癌においては、非欠損癌細胞と比較すると、ＰＫＭＹＴ１の阻害に１つ以上の治療用薬剤のより低い濃度又は投薬量が治療上有効であり得る。
【００８１】
［0092］ ある場合には、組成物は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるのに有効な量で存在する少なくとも１つの治療用薬剤を更に含み得る。ある場合には、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する対象の治療方法は、ＣＤＫ１の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量を対象に投与することを更に含む。
【００８２】
［0093］ ある場合には、発現ＰＫＭＹＴ１の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される１つ以上の治療用薬剤は、ＤＮＡコンストラクトを含む。ＤＮＡコンストラクトはガイドＲＮＡ（ｇＲＮＡ）配列を含んでもよく、これは、タンパク質（例えば、Ｃａｓタンパク質）をＰＫＭＹＴ１に向かわせるために用いられるものであり得る。ＤＮＡコンストラクトはｇＲＮＡ配列を含んでもよく、これは、タンパク質（例えば、Ｃａｓタンパク質）をＰＫＭＹＴ１に向かわせるものであり得る。ＤＮＡコンストラクトは、ＲＮＡ配列、ＤＮＡ配列、又はこれらの組み合わせを含み得る。ある場合には、ＤＮＡコンストラクトは、（ｉ）第１のｇＲＮＡ配列（これは、エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓタンパク質）をＰＫＭＹＴ１についての標的となる位置又は遺伝子座に向かわせるために用いられるものであり得る）と、（ｉｉ）ＰＫＭＹＴ１遺伝子に対応する配列（例えば、ＤＮＡ配列）（例えば、ＰＫＭＹＴ１の遺伝子置換体）とを含む。ＤＮＡコンストラクトにおいては、異なる組み合わせのＲＮＡ配列及びＤＮＡ配列が使用されてもよいことは理解されるであろう。更に、限定はされないが、バーコード配列、タグ、又は

他の識別用配列、プライマー配列、制限部位、転位部位等を含め、他の機能配列がＤＮＡ配列に含まれてもよい。

【００８３】

［0094］ エンドヌクレアーゼ複合体は、エンドヌクレアーゼ、例えば、Ｃａｓタンパク質、又は他の核酸相互作用酵素（例えば、リガーゼ、ヘリカーゼ、逆転写酵素、転写酵素、ポリメラーゼ等）を含み得る。Ｃａｓタンパク質は、任意のＣａｓ型（例えば、Ｃａｓ Ｉ、Ｃａｓ ＩＡ、Ｃａｓ ＩＢ、Ｃａｓ ＩＣ、Ｃａｓ ＩＤ、Ｃａｓ ＩＥ、Ｃａｓ ＩＦ、Ｃａｓ ＩＵ、Ｃａｓ ＩＩＩ、Ｃａｓ ＩＩＩＡ、Ｃａｓ ＩＩＩＢ、Ｃａｓ ＩＩＩＣ、Ｃａｓ ＩＩＩＤ、Ｃａｓ ＩＶ、Ｃａｓ ＩＶＡ、Ｃａｓ ＩＶＢ、Ｃａｓ ＩＩ、Ｃａｓ ＩＩＡ、Ｃａｓ ＩＩＢ、Ｃａｓ ＩＩＣ、Ｃａｓ Ｖ、Ｃａｓ ＶＩ）を含み得る。一部の例では、Ｃａｓタンパク質は、他のタンパク質（例えば、融合タンパク質）を含んでもよく、核酸分子に関連したものであり得る追加の酵素（例えば、リガーゼ、転写酵素、トランスポザーゼ、ヌクレアーゼ、エンドヌクレアーゼ、逆転写酵素、ポリメラーゼ、ヘリカーゼ等）を含んでもよい。エンドヌクレアーゼ複合体は、外因的に送達されてもよく、又は細胞内での転写及び翻訳用にＤＮＡコンストラクトにコードされてもよい。

【００８４】

［0095］ ある場合には、ＰＫＭＹＴ１の発現の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される少なくとも１つの治療用薬剤は、タンパク質又はペプチドを含み得る。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、抗体、抗体断片、ホルモン、リガンド、又は免疫グロブリンを含み得る。タンパク質又はペプチドは、天然に存在するものであってもよく、又は合成であってもよい。タンパク質は、タンパク質の改変された変異体（例えば、組換えタンパク質）、又はその断片であってもよい。タンパク質は、限定はされないが、グリコシル化、アシル化、プレニル化、リポイル化、アルキル化、アミド化、アセチル化、メチル化、ホルミル化、ブチリル化、カルボキシル化、リン酸化、マロニル化、ヒドロキシル化、ヨウ素化、プロピオニル化、Ｓ－ニトロシル化、Ｓ－グルタチオン化、スクシニル化、硫酸化、糖化、カルバミル化、カルボニル化、ビオチン化、カルバミル化、酸化、ペグ化、ＳＵＭＯ化、ユビキチン化、ユビキチン化、ラセミ化等を含めた他の修飾、例えば翻訳後修飾に供されてもよい。タンパク質又はペプチドに１つ以上の修飾が行われてもよい。

【００８５】

［0096］ ある場合には、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性の差異（例えば、その低下又は増加）を生じさせるために使用される少なくとも１つの治療用薬剤は、核酸分子、例えばＲＮＡ分子を含み得る。ＲＮＡ分子は、ＰＫＭＹＴ１、及び、一部の例ではＰＰＰ２Ｒ２Ａの発現レベル又は活性を低下させるのに十分な任意の好適なＲＮＡ分子及びサイズを含み得る。ＲＮＡ分子は、低分子ヘアピンＲＮＡ（ｓｈＲＮＡ）分子、低分子干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）、マイクロＲＮＡ（ｍｉＲＮＡ）、又は他の有用なＲＮＡ分子を含み得る。一部の例において、ＲＮＡ分子は、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、トランスファーＲＮＡ（ｔＲＮＡ）、リボソームＲＮＡ（ｒＲＮＡ）、核内低分子ＲＮＡ（ｓｎＲＮＡ）、ｐｉｗｉ相互作用性（ｐｉＲＮＡ）、非コードＲＮＡ（ｎｃＲＮＡ）、長鎖非コードＲＮＡ、（ｌｎｃＲＮＡ）、及び前述のうちのいずれかの断片を含み得る。ＲＮＡ分子は、一本鎖、二本鎖、又は部分的一本鎖若しくは二本鎖であってもよい。

【００８６】

［0097］ 治療用薬剤（例えば、ペプチド、ＲＮＡ分子、タンパク質－核酸複合体）は例として挙げられること、及び治療用薬剤各種の組み合わせを用いて対象を治療し得ることが理解されるであろう。例えば、組成物は、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性を低下させるために使用し得る１つ以上の異なる種類の治療用薬剤を含み得る。例えば、タンパク質又はペプチドは、小分子（例えば、分子量が９００ダルトン未満の分子）、ＲＮＡ分子、ＤＮＡ分子、又は複合体化した分子（例えば、タンパク質－核酸分子）と共投与されてもよい。同様に、ＲＮＡ分子は、小分子、ＤＮＡ分子、又は複合体化した分子と共に投与され

てもよい。別の例において、小分子は、ＤＮＡ分子又は複合体化した分子と共投与されてもよい。これらの組み合わせは、癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）を有する又は有する疑いがある対象の治療に使用し得る薬剤の異なる組み合わせの非限定的な例である。

【００８７】

［0098］ 組成物はまた、賦形剤も含み得る。賦形剤は、物質であって、ＰＫＭＹＴ１の発現又は活性レベルを低下させるために使用される治療用薬剤又は１つ若しくは複数の治療用薬剤に特性を付与するために使用され得る物質を含み得る。例えば、賦形剤は、治療用薬剤の安定化用物質を含み得る。賦形剤は、治療用薬剤の固体、液体、又はゲル製剤の増量用物質を含み得る。ある場合には、物質は、治療用薬剤に（例えば、溶解度を増強することによって）治療増強を付与し得る。物質は、粘度など、組成物の特性を変化させるために使用されてもよい。物質は、治療用薬剤の特性、例えば、バイオアベイラビリティ、吸収、親水性、疎水性、薬物動態等を変化させるために使用されてもよい。賦形剤は、結合剤、抗接着剤、コーティング、崩壊剤、流動化剤（例えば、シリカゲル、タルク、炭酸マグネシウム）、滑沢剤、保存剤、吸着剤、甘味料、媒体、又はこれらの組み合わせを含み得る。例えば、賦形剤は、粉末、ミネラル、金属、糖（例えばサッカリド又は多糖）、糖アルコール、天然に存在するポリマー（例えば、セルロース、メチルセルロース）、合成ポリマー（例えば、ポリエチレングリコール又はポリビニルピロリドン）、アルコール、増粘剤、デンプン、巨大分子（例えば、脂質、タンパク質、炭水化物、核酸分子）等を含み得る。

【００８８】

１つ以上の治療用薬剤の送達又は投与

［0099］ 本開示は、本明細書に記載される１つ以上の治療用薬剤を送達し、それを投与し、又はそれに曝露するための方法及び組成物を提供する。１つ以上の治療用薬剤は、対象に（例えば、インビボで）、又は対象からの細胞若しくは細胞集団に（例えば、エキソビボ又はインビボで）送達されてもよい。ある場合には、１つ以上の治療用薬剤は、ナノ粒子など、１つ以上の送達小胞で対象に送達されてもよい。ナノ粒子は、任意の好適なナノ粒子であってよく、固体、半固体、半液体又はゲルであってもよい。ナノ粒子は、親油性粒子及び両親媒性粒子であってもよい。例えば、ナノ粒子は、ミセル、リポソーム、エキソソーム、又は他の脂質含有小胞を含み得る。ある場合には、ナノ粒子は、特定の細胞又は細胞種（例えば、癌細胞）への標的化した送達となるように構成されてもよい。そのような場合、ナノ粒子は、特定の細胞又は細胞種（例えば、癌細胞）に特異的に結合し得る幾つものリガンド、例えば、抗体、核酸分子（例えば、リボ核酸（ＲＮＡ）分子又はデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）分子）、タンパク質、ペプチドで装飾されてもよい。

【００８９】

［00100］ １つ以上の治療用薬剤は、ウイルス手法を用いて送達されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、ウイルスベクターを用いて投与されてもよい。そのような場合、１つ以上の治療用薬剤は、細胞、細胞集団、又は対象への送達用のウイルスに封入されてもよい。ウイルスは、アデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）、レトロウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、又は他の有用なウイルスであり得る。ウイルスは改変されてもよく、又は天然に存在するものであってもよい。

【００９０】

［00101］ １つ以上の治療用薬剤は、対象（例えば、ヒト患者）又は対象の体へと（例えば、腫瘍部位に）、単一の又は様々な手法を用いて送達されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、経口的に、静脈内に、腹腔内に、腫瘍内に、皮下に、局所的に、経皮的に、経粘膜的に、又は別の投与手法を通じて送達され、又は投与されてもよい。

【００９１】

［00102］ １つ以上の治療用薬剤は、対象に経腸的に送達されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、対象に経口的に、経鼻的に、経直腸的に、舌下に、唇下に、頬側的に、局所的に、又は浣腸を通じて投与されてもよい。そのような場合、１つ以上の治療用薬剤は、錠剤、カプセル、点滴薬又は他の製剤に製剤化されてもよい。製剤は、経腸的

に送達されるように構成されてもよい。
【００９２】
［00103］ １つ以上の治療用薬剤は、対象に非経口的に送達されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、注射によって対象の一部位に投与されてもよい。部位は中枢神経系を含んでもよく、１つ以上の治療用薬剤は、硬膜外、脳内、脳室内等に送達されてもよい。部位は皮膚を含んでもよく、１つ以上の治療用薬剤は、表皮に送達されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は経皮パッチに製剤化されてもよく、これは１つ以上の治療用薬剤を対象の皮膚に送達することができる。１つ以上の治療用薬剤は、舌下に及び／又は頬側に（bucally）、羊膜外に、鼻腔的に、動脈内に、関節内に、静脈内に（intravavernously）、心臓内に（intracardiacally）、皮内に、病巣内に、筋肉内に、眼内に、骨内に、腹腔内に、髄腔内に、子宮内に、膣内に、静脈内に、膀胱内に、硝子体内に、皮下に、経皮的に、血管周囲に、経粘膜的に、又は別の投与経路を通じて送達されてもよい。ある場合には、１つ以上の治療用薬剤は、局所的に送達されてもよい。
【００９３】
［00104］ １つ以上の治療用薬剤は、エアロゾル、丸薬、錠剤、カプセル（例えば、非対称膜カプセル）、トローチ、エリキシル剤、エマルション、散剤、溶液、懸濁液、チンキ剤、液剤、ゲル、ドライパウダー、吸入剤、点滴薬、軟膏、パッチ、又はこれらの組み合わせに製剤化されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、ゲル又はポリマーに製剤化され、薄膜フィルムによって送達されてもよい。
【００９４】
［00105］ 一部の例では、１つ以上の治療用薬剤は、標的化した送達手法（例えば、腫瘍部位への標的化した送達のための）を用いるか、又は細胞による１つ以上の治療用薬剤の取込みを増加させる送達手法を用いて対象に送達されてもよい。送達手法は、磁気的薬物送達（例えば、磁気ナノ粒子ベースの薬物送達）、音響的標的化薬物送達手法、自己マイクロエマルション化薬物送達システム、又は他の送達手法を含み得る。ある場合には、１つ以上の治療用薬剤は、標的化した送達用に、又は細胞による取込みが増加するように製剤化されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、１つ以上の治療用薬剤の溶解性、疎水性、親水性、吸収性、半減期、バイオアベイラビリティ、放出プロファイル、又は他の特性を改善し得る別の薬剤と共に製剤化されてもよい。例えば、１つ以上の治療用薬剤は、１つ以上の治療用薬剤の放出プロファイルを制御し得るポリマーと共に製剤化されてもよい。１つ以上の治療用薬剤は、１つ以上の治療用薬剤の特性（例えば、バイオアベイラビリティ、薬物動態等）を変化させるため、コーティングとして、又はコーティング（例えば、ウシ顎下腺ムチンコーティング、ポリマーコーティング等）を施して製剤化されてもよい。
【００９５】
［00106］ 一部の例では、１つ以上の治療用薬剤は、レトロメタボリックドラッグデザインを用いて製剤化されてもよい。そのような場合、１つ以上の治療用薬剤が細胞における代謝効果に関して評価されてもよく、誘導体（例えば、化学的に合成された代替品又は改変された変異体）を含む新規製剤が、１つ以上の治療用薬剤の特性を変更する（例えば、有効性を増加させる、望ましくない副作用を最小限に抑える、バイオアベイラビリティを変化させる等）ように設計されてもよい。
【実施例】
【００９６】
実施例
実施例１－合成致死性対としてのＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの同定
［00107］ 文献及び公開データから、癌細胞における有用なバイオマーカーを掘り起こすことができ、例えば、マルチオミクス分析、腫瘍種（例えば原発腫瘍）の判定、細胞株、標的の取り扱い易さ、バイオマーカー保因率等の考察を用いて候補の更なる精緻化を実施することができる。かかるスクリーニングの一例では、例えば、癌細胞におけるＰＰＰ２Ｒ２Ａの頻度が非癌細胞と比較して高いこと、及び癌細胞におけるＰＫＭＹＴ１の発

現レベルが非癌細胞と比較して高いことを理由に、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１を有用なバイオマーカーとして同定し得る。調査される癌種としては、限定はされないが、急性骨髄性白血病（ＬＡＭＬ）、副腎皮質癌（ＡＣＣ）、膀胱尿路上皮癌（ＢＬＣＡ）、脳低悪性度神経膠腫（ＬＧＧ）、浸潤性乳癌（ＢＲＣＡ）、子宮頸部扁平上皮癌・子宮頸管腺癌（ＣＥＳＣ）、胆管癌（ＣＨＯＬ）、慢性骨髄球性白血病（ＬＣＭＬ）、腺癌（ＣＯＡＤ）、食道癌（ＥＳＣＡ）、多形性膠芽腫（ＧＢＭ）、頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣ）、色素嫌性腎（ＫＩＣＨ）、腎臓腎明細胞癌（ＫＩＲＣ）、腎臓腎乳頭細胞癌（ＫＩＲＰ）、肝臓肝細胞癌（ＬＩＨＣ）、肺腺癌（ＬＵＡＤ）、肺扁平上皮癌（ＬＵＳＣ）、リンパ系新生物びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣ）、中皮腫（ＭＥＳＯ）、卵巣漿液性嚢胞腺癌（ＯＶ）、膵臓腺癌（ＰＡＡＤ）、褐色細胞腫・傍神経節腫（ＰＣＰＧ）、ホルモン不応性前立腺腺癌（ＰＲＡＤ）、直腸腺癌（ＲＥＡＤ）、肉腫（ＳＡＲＣ）、皮膚皮膚黒色腫（ＳＫＣＭ）、精巣胚細胞腫瘍（ＴＧＣＴ）、胸腺腫（ＴＨＹＭ）、甲状腺癌（ＴＨＣＡ）、子宮癌肉腫（ＵＣＳ）、子宮体部子宮内膜癌（ＵＣＥＣ）、及びぶどう膜黒色腫（ＵＶＭ）を挙げることができる。

【００９７】

［00108］ 例えば、図２は、異なる癌種（Ｘ軸）におけるＰＰＰ２Ｒ２Ａ不活性化又は欠損の頻度（Ｙ軸）のプロットを示す。ある種の癌では（例えば、ホルモン不応性前立腺腺癌）、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの突然変異頻度は約１５％もの高さに上り得る。他のある癌種では（例えば、卵巣漿液性嚢胞腺癌、直腸腺癌）、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの突然変異頻度は１０％を上回り得る。様々な癌種において、不活性化につながるＰＰＰ２Ｒ２Ａの欠損には、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子の過剰メチル化、深い欠失、又は突然変異が含まれ得る。

【００９８】

［00109］ 図５は、様々な癌種（Ｘ軸）における正常（非癌）細胞と比べた癌細胞におけるＰＫＭＹＴ１の発現レベル（Ｙ軸、変化倍数として示される）のプロットを示す。ある種の癌では（例えば、肺扁平上皮癌）、非癌細胞と比較してＰＫＭＹＴ１の発現レベルが上昇する。図６は、正常細胞（ｎ＝５０）と比較した癌（腫瘍）細胞（ｎ＝３７１）におけるＰＫＭＹＴ１の発現レベル（Ｙ軸、ｌｎ（発現）として示される）の散布図を示す。このプロットから分かるとおり、癌細胞のＰＫＭＹＴ１発現は、正常細胞と比べて有意に高くなり得る。まとめると、図５～図６は、様々な癌種でＰＫＭＹＴ１が高発現となり得ることを実証している。

【００９９】

［00110］ 可能性のある合成致死性対としてのＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１の更なるスクリーニングを実施し得る。例えば、不活性の又は欠損しているＰＰＰ２Ｒ２Ａを有する細胞の集団全体にわたるＰＫＭＹＴ１の発現レベルを、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの正常な又は野生型の遺伝子型又は表現型を有する細胞の集団全体にわたるＰＫＭＹＴ１の発現レベルと比較し得る。図７Ａは、不活性の又は欠損しているＰＰＰ２Ｒ２Ａ（例えば、突然変異型ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）を有するか（ｎ＝７細胞）又は野生型ＰＰＰ２Ｒ２Ａを有するか（ｎ＝１５細胞）のいずれかである２つの細胞集団におけるＰＫＭＹＴ１のAchilles必須性スコア（Ｙ軸）の散布図を示す。図７Ｂは、不活性の又は欠損しているＰＰＰ２Ｒ２Ａ（例えば、突然変異型ＰＰＰ２Ｒ２Ａ）を有するか（ｎ＝６細胞）又は野生型ＰＰＰ２Ｒ２Ａを有するか（ｎ＝１２細胞）のいずれかである２つの細胞集団におけるＰＫＭＹＴ１のDEMETER必須性スコア（Ｙ軸）の散布図を示す。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損を有する細胞集団では、野生型ＰＰＰ２Ｒ２Ａを有する細胞集団と比べてＰＫＭＹＴ１の必須性がより高く；即ち、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損細胞では、野生型細胞と比べてＰＫＭＹＴ１ノックダウンの致死性がより高い。これらのデータは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１が合成致死性対の潜在的な候補であり得ること、及び両方の遺伝子のノックダウンが細胞死を引き起こし得ること、又はＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損細胞におけるＰＫＭＹＴ１のノックダウンが細胞死を引き起こし得ることを示唆するものであり得る。

【０１００】

実施例２－合成致死性対としてのＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ

[00111] ＰＫＭＹＴ１－ＰＰＰ２Ｒ２Ａ合成致死性は、実験的に試験し得る。一つの具体的な手法では、コンビナトリアルジェネティクスＣＲＩＳＰＲ手法（例えば、コンビナトリアル・ジェネティクス・アンマス（combinatorial genetics en masse：CombiGEM））を用いてＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子を細胞のゲノムからノックダウン又はノックアウトし得る。このような例では、ＤＮＡコンストラクトを作成し得る。このＤＮＡコンストラクトは、エンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓタンパク質）をＰＫＭＹＴ１遺伝子に向かわせるためのＰＫＭＹＴ１　ｇＲＮＡ、並びにエンドヌクレアーゼ（例えば、Ｃａｓタンパク質）をＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子に向かわせるためのＰＰＰ２Ｒ２Ａ　ｇＲＮＡを含み得る。ＰＫＭＹＴ１　ｇＲＮＡ及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ　ｇＲＮＡは、それぞれ内因性ＰＫＭＹＴ１遺伝子及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子の配列と相同又は相補的な配列を含み得る。一部の例では、ＤＮＡコンストラクトはまた、ゲノム中のＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａを置き換えるための置換遺伝子（例えば、機能不全配列、ランダムＤＮＡ配列）も含み得る。

【０１０１】

[00112] 対照ＤＮＡコンストラクトもまた作成し得る。例えば、遺伝子対が合成致死性であるかどうかを決定するため、ＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａを個別的に、並びにこの遺伝子対の組み合わせを破壊する効果をモニタすることが重要となることもある。更に、陰性対照の効果をモニタすることが重要となることもあり、ここでは、一方又は両方の遺伝子についての「ノンカット」対照として無効なｇＲＮＡ、例えば非特異的ｇＲＮＡを含むＤＮＡコンストラクトが構築されてもよい。陰性対照コンストラクトの別の例は、媒体対照を含み得る。ある場合には、陽性対照もまた使用し得る。陽性対照は、例えば、ポリメラーゼ（例えば、ＲＮＡポリメラーゼ、例えばＰＯＬＲ２Ｄ）用のｇＲＮＡを含むＤＮＡコンストラクトを含んでもよく、これは、細胞の生存又は増殖に必須の遺伝子のノックアウト（及びそれを実行する送達機構）が致死性を引き起こすことを実証できる。陽性対照の別の例では、合成致死性対であることが公知の２つの遺伝子（例えば、メチルチオアデノシンホスホリラーゼ（ＭＴＡＰ）及びタンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ５（ＰＲＭＴ５））のノックアウトを、例えば、その公知の合成致死性遺伝子の各々に向けられるｇＲＮＡを含むＤＮＡコンストラクトを用いて実施し得る。

【０１０２】

[00113] 次にＤＮＡコンストラクトを癌（例えば、肝癌又は卵巣癌）細胞に導入してもよく、この細胞は、一次供給源からの（例えば、腫瘍又は癌から単離された）細胞又は細胞株を含み得る。エンドヌクレアーゼ、例えばＣａｓ９もまた、癌細胞に導入し得る。次にＣａｓ９が、処理下の細胞のＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子を置換し、編集し、又は欠失させてもよく、場合によっては、ゲノム中のＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子をＤＮＡコンストラクト中の置換遺伝子に置き換え得る。次に時間の経過に伴う細胞の増殖又は生存能力をモニタして、治療の有効性を決定し得る。細胞の生存能力は、未処理の細胞の陰性対照又は対照集団で正規化するか、又はそれと比較し得る。

【０１０３】

[00114] 代謝活性を有する細胞による基質（無色）からのレゾルフィン（青色）の生成に基づく高感度蛍光（florescence）PrestoBlueアッセイを開発することにより、生存細胞を定量化した。簡潔に言えば、試験プレートは、９６ウェルプレートにウェル当たり１８，０００細胞を播種することから開始した。９０％を超える形質導入を実現するために達成されるウイルス力価に応じて、細胞をウェル当たり２～１０μＬのウイルス容積で形質導入した。形質導入から３２時間後、培地を抗生物質（ピューロマイシン）含有培地に交換し、アッセイの残りの間にわたって抗生物質を維持した。３日目、プレートを分割し、以前に１４日でコンフルエンシーに達するのに適格とされた量になるまで再び播種した。

【０１０４】

[00115] 試験した各遺伝子対につき合計８個のコンストラクトを調製した：ＮＴＣと対の、遺伝子Ａについて各２つのｓｇＲＮＡ（ｓｇ１、ｓｇ２）、ＮＴＣと対の、遺伝

子Ｂについて各２つのｓｇＲＮＡ（ｓｇ１、ｓｇ２）、４つのｓｇＲＮＡの組み合わせ（１，１；１，２；２，１；２，２）。

【０１０５】

［００１１６］　図８Ａ～図８Ｂは、ＣＲＩＳＰＲベースのＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａノックアウト手法の例示的データを示す。図８Ａは、導入されたＤＮＡコンストラクトの関数としての細胞生存能力の棒グラフを図示する。これらのＤＮＡコンストラクトはノックアウトに使用することができ、（ｉ）二重陰性対照（ＮＴＣ）配列、（ｉｉ）必須遺伝子のノックアウト用の陽性対照としてのポリメラーゼ（ＰＯＬ２）配列、（ｉｉｉ）ノックアウト用のＭＴＡＰ配列、（ｉｖ）ノックアウト用のＰＲＭＴ５配列、（ｖ）ノックアウト用のＭＴＡＰ及びＰＲＭＴ５配列、これは陽性合成致死性対照として働き得る、（ｖｉ）ノックアウト用のＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列、（ｖｉｉ）ノックアウト用のＰＫＭＹＴ１配列、及び（ｖｉｉｉ）二重ノックアウト用のＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１配列を含み得る。陽性対照配列は、内因性ＰＯＬＲ２Ｄ遺伝子を置き換えるための機能不全ＲＮＡポリメラーゼ遺伝子（例えば、ＰＯＬＲ２Ｄ遺伝子）を含むＤＮＡコンストラクトであってもよく、又はＤＮＡコンストラクトは、ポリメラーゼ遺伝子をノックダウン又はノックアウトするように構成されてもよい。この陽性対照配列を使用すると、例えば、ＤＮＡコンストラクトが予想どおり機能するか、例えば、ＤＮＡ複製、ひいては細胞増殖に必須の遺伝子のノックアウトが細胞生存能力の低下を引き起こすかを決定し得る。

【０１０６】

［００１１７］　処理下の細胞の生存能力は、陰性対照（例えば、未処理細胞、又はスクランブルｇＲＮＡを含むか、若しくはＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの正常なコピーを含むＤＮＡコンストラクトで処理した細胞）で正規化することができる。図８Ａを見ると分かるとおり、陰性対照細胞群（ＮＴＣ）は、試験した群の中で最も高い生存能力を有する。ポリメラーゼをノックアウトするためのＤＮＡコンストラクトによって細胞が処理される陽性対照（ＰＯＬ２）は、予想どおり、正規化後の生存能力の劇的な低下を引き起こす。ＭＴＡＰ及びＰＲＭＴ５をノックアウトするためのＤＮＡコンストラクトによって細胞が処理される陽性対照（ＭＴＡＰ－ＰＲＭＴ５）もまた、陰性対照群と比較して生存能力の低下を引き起こす。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ又はＰＫＭＹＴ１のいずれかの、単一遺伝子ノックアウトで処理される細胞もまた、陰性対照群と比較して生存能力の減少を示す。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１のノックアウトは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの単一ノックアウト（ｐ＜０．０００１）及び陰性対照と比べてはるかに低い生存能力を引き起こす。エラーバーは標準偏差を表す、ｎ＝３。

【０１０７】

［００１１８］　図８Ｂは、導入されたＤＮＡコンストラクトの関数としての細胞生存能力の棒グラフの別の例を図示する。生存能力は、陰性対照と比較した生存細胞の割合として測定することができる。これらのＤＮＡコンストラクトはノックアウトに使用することができ、（ｉ）二重陰性対照（ＮＴＣ）配列、（ｉｉ）必須遺伝子のノックアウト用の陽性対照としてのポリメラーゼ（ＰＯＬ２）配列、（ｉｉｉ）ノックアウト用のＭＴＡＰ配列、（ｉｖ）ノックアウト用のＰＲＭＴ５配列、（ｖ）ノックアウト用のＭＴＡＰ及びＰＲＭＴ５配列、これは陽性合成致死性対照として働き得る、（ｖｉ）ノックアウト用のＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列、（ｖｉｉ）ノックアウト用のＰＫＭＹＴ１配列、及び（ｖｉｉｉ）二重ノックアウト用のＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１配列を含み得る。

【０１０８】

［００１１９］　処理下の細胞の生存能力は、陰性対照（例えば、未処理細胞、又はスクランブルｇＲＮＡを含むか、若しくはＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの正常なコピーを含むＤＮＡコンストラクトで処理した細胞）で正規化することができる。図８Ａと同様に、図８Ｂの陰性対照細胞群（ＮＴＣ）は、試験した群の中で最も高い生存能力を有する。ポリメラーゼをノックアウトするためのＤＮＡコンストラクトによって細胞が処理される陽性対照（ＰＯＬＲ２Ｄ）は、予想どおり、正規化後の生存能力の劇的な低下を引き起こす。ＭＴＡＰ及びＰＲＭＴ５をノックアウトするためのＤＮＡコンストラクトによって細胞

が処理される陽性対照（ＭＴＡＰ－ＰＲＭＴ５）もまた、陰性対照群と比較して生存能力の低下を引き起こし、ＭＴＡＰ又はＰＲＭＴ５単独の単一遺伝子ノックアウトと同様である。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ又はＰＫＭＹＴ１のいずれかの、単一遺伝子ノックアウトで処理される細胞もまた、陰性対照群と比較して生存能力の減少を示す。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１のノックアウトは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの単一ノックアウト又はＰＫＭＹＴ１の単一ノックアウトと比べて有意に低い生存能力を引き起こす。エラーバーは標準偏差を表す、ｎ＝２。

【０１０９】

［００１２０］　図９は、コロニー形成アッセイ（例えば－クローン原性（clonogeneic）アッセイ）における導入されたＤＮＡコンストラクトの関数としての細胞生存能力の棒グラフの別の例を図示する。生存能力は、陰性対照と比較した生存細胞の割合として測定することができる。これらのＤＮＡコンストラクトはノックアウトに使用することができ、（ｉ）陰性対照（ＮＴＣ）配列、（ｉｉ）ノックアウト用の第１のｓｇＲＮＡ　ＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列、（ｉｉｉ）ノックアウト用の第２のｓｇＲＮＡ　ＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列、（ｉｖ）ノックアウト用の第１のｓｇＲＮＡ　ＰＫＭＹＴ１配列、（ｖ）ノックアウト用の第２のｓｇＲＮＡ　ＰＫＭＹＴ１配列、（ｖｉ）二重ノックアウト用の第１のｓｇＲＮＡ　ＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列及び第１のｓｇＲＮＡ　ＰＫＭＹＴ１配列、（ｖｉｉ）二重ノックアウト用の第１のｓｇＲＮＡ　ＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列及び第２のｓｇＲＮＡ　ＰＫＭＹＴ１配列、（ｖｉｉｉ）二重ノックアウト用の第２のｓｇＲＮＡ　ＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列及び第１のｓｇＲＮＡ　ＰＫＭＹＴ１配列、及び（ｉｘ）二重ノックアウト用の第２のｓｇＲＮＡ　ＰＰＰ２Ｒ２Ａ配列及び第２のｓｇＲＮＡ　ＰＫＭＹＴ１配列を含み得る。

【０１１０】

［００１２１］　処理下の細胞の生存能力は、陰性対照（例えば、未処理細胞、又はスクランブルｇＲＮＡを含むか、若しくはＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの正常なコピーを含むＤＮＡコンストラクトで処理した細胞）で正規化することができる。図８Ａ～図８Ｂと同様に、図９の陰性対照細胞群（ＮＴＣ）は、試験した群の中で最も高い生存能力を有する。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ又はＰＫＭＹＴ１のいずれかの、単一遺伝子ノックアウトで処理される細胞は、陰性対照群と比較して生存能力の減少を示す。ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１のノックアウトは、ＰＰＰ２Ｒ２Ａの単一ノックアウト又はＰＫＭＹＴ１の単一ノックアウトと比べて有意に低い生存能力を引き起こす。

【０１１１】

［００１２２］　Ｈｕｈ１は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａのホモ接合性欠失を有する。ＰＫＭＹＴ１欠失は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ　ＣＲＩＳＰＲ　ＫＯとは無関係に、致死性であるものと思われる。予想どおり、ＰＫＭＹＴ１ノックアウト単独は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ遺伝子座の内因性欠失を有するＨｕｈ１細胞において強力な細胞死滅を示す（図１０）。結腸直腸癌細胞株ＨＣＴ１１６を含めた４つの異なる細胞株について、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ－ＰＫＭＹＴ１の合成致死性相互作用の強度を表１に要約する。

【０１１２】

【表１】

SL 分類 *	細胞株	適応疾患	EOB**	生存割合
SL	Hep3B	HCC	0.52	0.17
SL	OVCAR8	卵巣	0.51	0.21
SL	HCT116	CRC	0.03	0.06
SL	Huh1	HCC	0.17	0.01

*合成致死(Synthetic Lethal: SL)は、遺伝子の組み合わせの生存割合(FV)が 0.2(20%)未満である。合成病気(Synthetic Sick: SS)は、遺伝子の組み合わせの生存割合が 0.2～0.5(20% - 50%)である。無効(No Effect: NE)は、遺伝子の組み合わせの生存割合が 0.5～1.0(50% - 100%)である。

**EOB =(FV 遺伝子 A x FV 遺伝子 B)-(FV 遺伝子 AB)。

表 1: 4 つの細胞株における PPP2R2A-PKMYT1

【０１１３】

［００１２３］　表２に示されるとおりＨｕｈ１ではＰＰＰ２Ｒ２Ａの低い残留発現（ｒｅｓｉｄｕａｌ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）がある。Ｈｕｈ１においてＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの両方をＣＲＩＳＰＲノックアウトすると、この細胞株でのＰＰＰ２Ｒ２Ａの残留発現（ｒｅｓｉｄｕａｌ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）が消失し、細胞生存能力の更なる減少が生じる。

【０１１４】

【表２】

Cas9 細胞株	処理(試料)	PPP2R2A 相対量*	説明
Hep3B	なし	100	対照, PPP2R2A の最大の発現
Hep3B	PPP2R2Asg1, 14 日目	1.3	CRISPR による PPP2R2A のノックアウトにより遺伝子発現が減少する
Huh1	なし	6.7	Huh1 の発現が減少
OVCAR8	なし	11.2	OVCAR8 の発現が減少

*PPP2R2A の発現レベルは、注記されるとおり異なる処理条件下で細胞株において PPP2R2A タンパク質に対する抗体を用いて決定した。

表 2: 細胞株における PPP2R2A の発現

【０１１５】

［００１２４］　表３に示されるとおりＨｕｈ１ではＰＫＭＹＴ１の高発現がある。Ｈｕｈ１においてＰＫＭＹＴ１及びＰＰＰ２Ｒ２Ａの両方をＣＲＩＳＰＲノックアウトすると、この細胞株でのＰＫＭＹＴ１の発現が消失し、細胞生存能力の更なる減少が生じる。

【０１１６】

【表３】

Cas9 細胞株	処理(試料)	PKMYT1 相対量	説明
Hep3B	なし	100	Hep3B における PKMYT1 の基礎発現
Hep3B	PKMYT1sg1, 14 日目	36	CRISPR による PKMYT1 のノックアウトにより遺伝子発現が減少する
Huh1	なし	166	Hep3B と比べて Huh1 の発現が増加
OVCAR8	なし	72	Hep3B と比べて OVCAR8 の発現が減少

*PMKYT1 の発現レベルは、注記されるとおり異なる処理条件下で細胞株において PKMYT1 タンパク質に対する抗体を用いて決定した。

表 3: 細胞株における PKMYT1 発現

【０１１７】

［００１２５］　ＤＮＡ修復に関わる一連の選び出された遺伝子が、ＰＰＰ２Ｒ２ＡとＰＫＭＹＴ１の合成致死性を説明する可能性のある経路としてシステム生物学分析により同定された。相同組換え修復機構（ＨＤＲ）によるＤＮＡ修復に関わることが公知の一連の選び出された２２個の異なる遺伝子をスクリーニングして、ＰＫＭＹＴ１とのその相互作用を決定した。このスクリーニングの結果は表４及び図１１に要約する。これらのスクリーニングから、ＰＰＰ２Ｒ２Ａのみがｐｋｍｙｔ１との高い相乗作用（excess over Bliss「EOB」）及び強力な細胞死滅（生存割合、ＦＶ）を有することが示された。ＰＰＰ２Ｒ２ＡとＰＫＭＹＴ１との間のこの唯一強力な相互作用は、文献に報告されたことがなかったものであり、予期しない観察結果であった。

【０１１８】

【表４】

遺伝子対*	EOB	生存割合	SL 分類
PPPR2R2A-PKMYT1	**0.52**	**0.17**	**SL**
PPP2R1A-PKMYT1	0.19	0.05	SL
CHEK1-PKMYT1	0.07	0.17	SL
PALB2-PKMYT1	0.20	0.35	SS
BRCA2-PKMYT1	0.21	0.36	SS
BRIP1-PKMYT1	0.11	0.45	SS
ARID1A-PKMYT1	0.05	0.45	SS
BAP1-PKMYT1	0.07	0.46	SS
WRN-PKMYT1	0.24	0.46	SS
RAD50-PKMYT1	0.08	0.48	SS
MRE11A-PKMYT1	0.10	0.49	SS
PTEN-PKMYT1	0.13	0.50	SS
BRCA1-PKMYT1	0.15	0.52	NE
NBN-PKMYT1	0.16	0.54	NE
TP53-PKMYT1	0.16	0.55	NE
RAD51-PKMYT1	-0.09	0.58	NE
CHEK2-PKMYT1	0.07	0.63	NE
BLM-PKMYT1	0.17	0.66	NE
ATM-PKMYT1	0.06	0.66	NE
PPP2R1B-PKMYT1	-0.01	0.7	NE
PARP1-PKMYT1	-0.05	0.72	NE
FANCC-PKMYT1	-0.09	0.80	NE
ATRX-PKMYT1	-0.02	0.88	NE

相同組換え修復機構(HDR)による DNA 修復に関わることが公知の一連の選び出された 22 個の異なる遺伝子を Hep3B 細胞においてスクリーニングして、PKMYT1 とのその相互作用を決定した。これらのスクリーニングから、PPP2R2A のみが高い相乗作用(EOB)及び生存割合(FV)としての強力な細胞死滅を呈したことが示された。

表 4: 合成致死性スクリーニング結果

【０１１９】

［00126］小分子阻害薬によるＰＫＭＹＴ１の阻害は、ＣＲＩＳＰＲの媒介によるＰＫＭＹＴ１のノックアウトに関する知見を再現し得る。ＣＲＩＳＰＲノックアウトを用いてＰＰＰ２Ｒ２Ａ発現を減少させた後、続いて細胞に小分子薬物を適用する（表５、図１２）。ＰＰＰ２Ｒ２Ａがノックアウトされない対照細胞もまた使用される。細胞株においてＰＰＰ２Ｒ２Ａがノックアウトされると、ＰＫＭＹＴ１阻害薬が効力の増加を示すことが観察される。

【０１２０】

【表５】

阻害薬	PKMYT1 IC_{50}(nM)	Wee1 IC_{50}(nM)
PD0166285	8.2	0.85
MK1775	1,100	2.4
PD173952	46	5.3

PPP2R2A 及び対照細胞株で試験した 3 つの化合物のインビトロ効力について、PKMYT1 及び Wee1 の選択的結合アッセイにより評価した。

表 5: 小分子阻害薬

【０１２１】

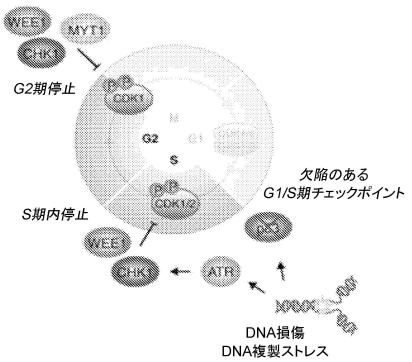
［００１２７］　まとめると、これらの結果は、ＰＰＰ２Ｒ２Ａ及びＰＫＭＹＴ１が合成致死性対であり得ることを裏付けている。そのような場合、ＰＫＭＹＴ１の活性レベル又は発現の低下を生じさせる１つ以上の治療用薬剤の治療有効量でＰＰＰ２Ｒ２Ａ欠損細胞を治療することは、実行可能な治療選択肢であり得る。

【０１２２】

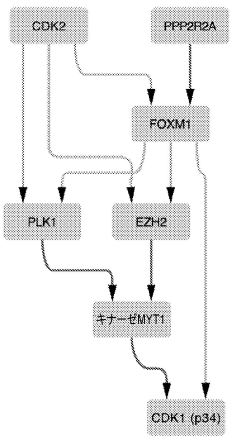
［００１２８］　本発明の好ましい実施形態を本明細書に示し、説明したが、当業者には、かかる実施形態が単に例として提供されるに過ぎないことは明らかであろう。本発明が、本明細書内に提供される具体的な例によって限定されることは意図されない。本発明は前述の明細書を参照して説明されているが、本明細書における実施形態の説明及び例示は、限定的な意味で解釈されるべきであることを意図するものではない。当業者には、本発明から逸脱することなく多数の変形例、変更例、及び置換例が想起されるであろう。更に、本発明の態様はいずれも、本明細書に示される具体的な描写、構成又は相対的比率に限定されず、それらは種々の条件及び変数に依存すると理解されるものとする。本発明の実施においては、本明細書に記載される発明の実施形態の様々な代替例を用い得ることは理解されるであろう。従って、本発明はまた、任意のかかる代替例、改良例、変形例又は均等物も包含するものとすることが企図される。以下の特許請求の範囲が本発明の範囲を定義すること、並びに特許請求の範囲内にある方法及び構造並びにその均等物がそれに包含されることが意図される。

【図面】

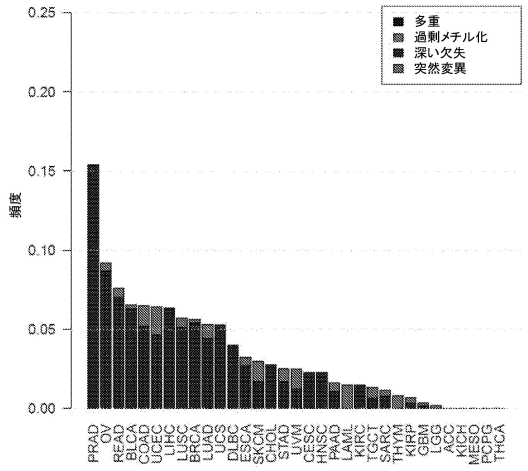
【図１Ａ】



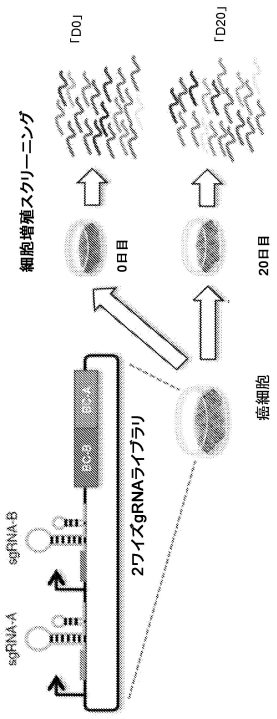
【図１Ｂ】



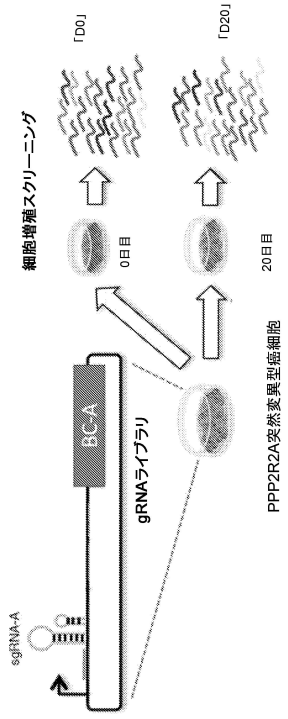
【図２】


多重
過剰メチル化
深い欠失
突然変異
頻度
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
PRAD
OV
READ
BLCA
COAD
UCEC
LIHC
LUSC
BRCA
LUAD
UCS
DLBC
ESCA
SKCM
CHOL
STAD
UVM
CESC
HNSC
PAAD
LAML
KIRC
TGCT
SARC
THYM
KIRP
GBM
LGG
ACC
KICH
MESO
PCPG
THCA

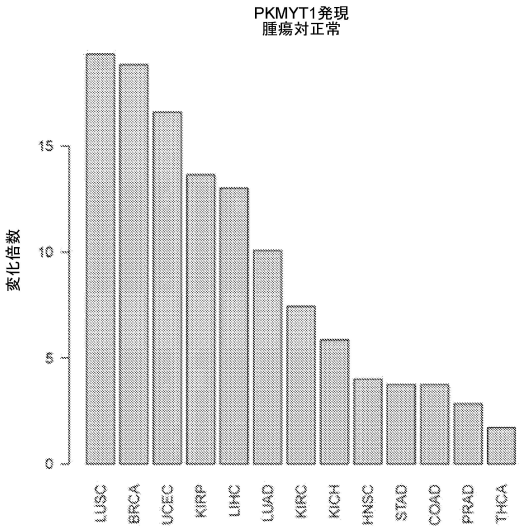
【図３】


「D0」
「D20」
細胞増殖スクリーニング
0日目
20日目
癌細胞
BC-A
BC-B
2アイズgRNAライブラリ
sgRNA-B
sgRNA-A

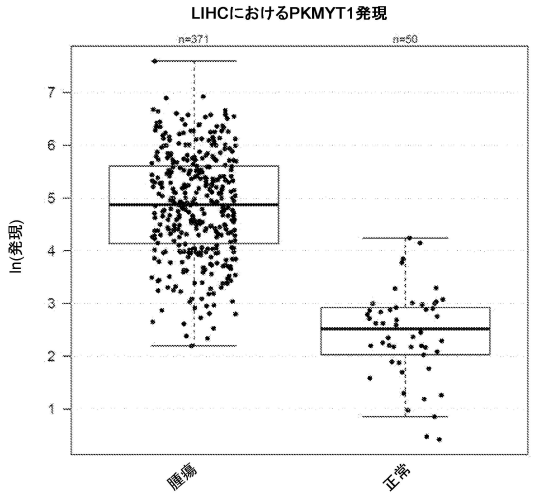
【図４】


「D0」
「D20」
細胞増殖スクリーニング
0日目
20日目
BC-A
gRNAライブラリ
PPP2R2A突然変異型癌細胞
sgRNA-A

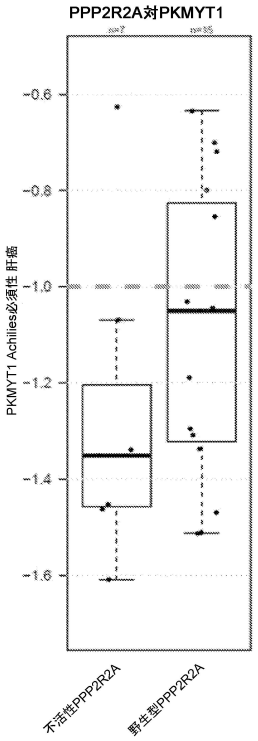
【図５】


PKMYT1発現
腫瘍対正常
変化倍数
15
10
5
0
LUSC
BRCA
UCEC
KIRP
LIHC
LUAD
KIRC
KICH
HNSC
STAD
COAD
PRAD
THCA

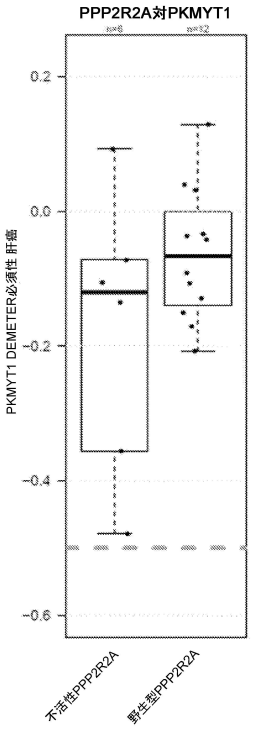
【図６】



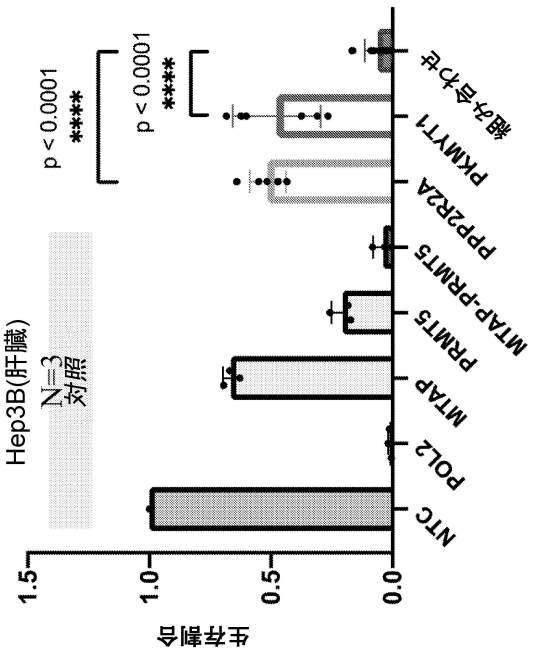
【図７Ａ】



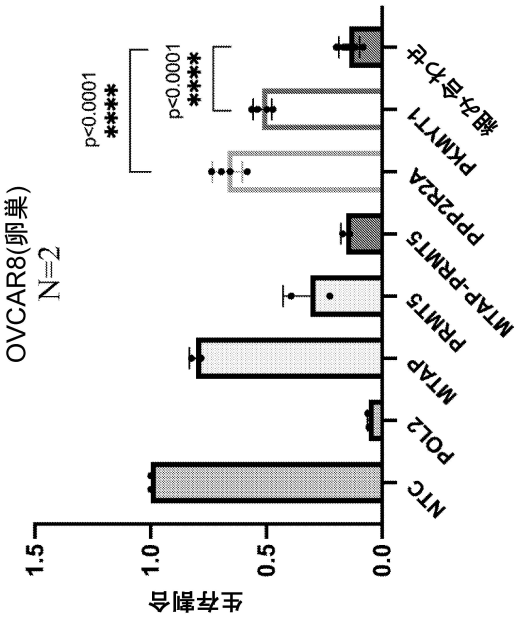
【図７Ｂ】



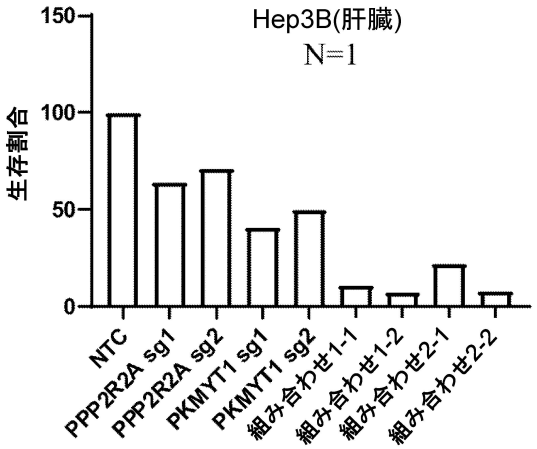
【図８Ａ】



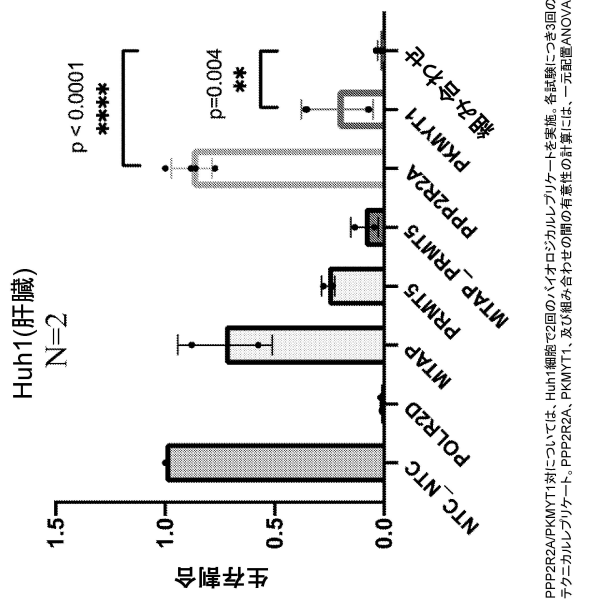
【図８Ｂ】



【図９】

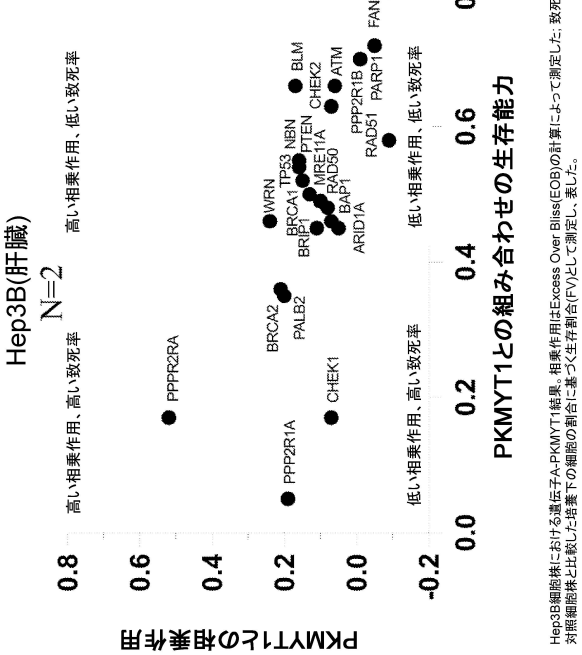


【図１０】



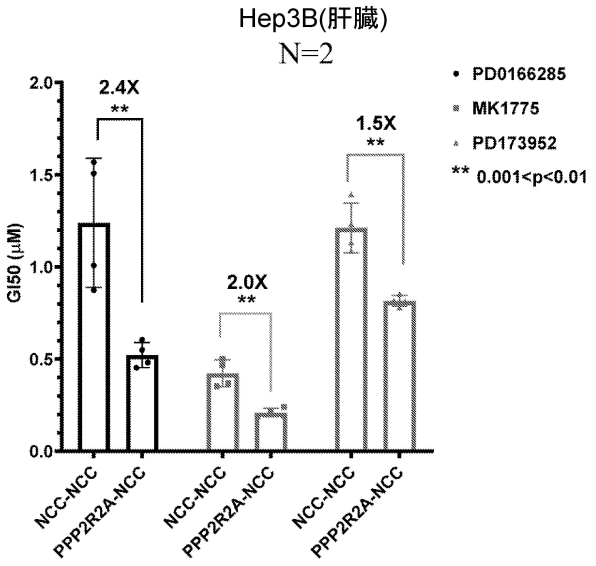
PPP2R2A/PKMYT1対については、Huh1細胞で2回のバイオロジカルレプリケートを実施。各試験につき3回のテクニカルレプリケート。PPP2R2A、PKMYT1、及び組み合わせの阻害の有意性の計算には、一元配置ANOVA統計手法を使用。

【図１１】



Hep3B細胞株における遺伝子A-PKMYT1結果。相乗作用はExcess Over Bliss(EOB)の計算によって測定した。致死率は、対照細胞株と比較した培養下の細胞の割合に基づく生存割合(FV)として測定し、表した。

【図１２】



PPP2R2Aノックアウトを有する同質遺伝子細胞株(PPP2R2A-NCC)及び対照細胞株(NCC-NCC)における小分子阻害薬を使用したPKMYT1の阻害。各アッセイにつき2回のバイオロジカルレプリケートを実施、各試験につき3回のテクニカルレプリケート。NCCとPPP2R2Aとの間の有意性の計算には、スチューデントt検定統計手法を使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/25230

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

- see extra sheet for Box No. III Observations where unity of invention is lacking -

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 7, 14-15, 18-24 limited to a small molecule modulator of PKMYT1 and altered expression/activity level of PP2A

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/25230

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - G01N 33/573, A61P 35/00, C12N 9/12 (2021.01)
CPC - A61P 35/00, A61P 35/02, C12N 9/12, G01N 33/573, C12Q 2600/158

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2016/0008361 A1 (Merck Sharp & Dohme Corp.) 14 January 2016 (14.01.2016) Claim 1, para [0004], [0028], [0103], [0104], [0159]	1-3, 7, 14-15, 18-24
Y	GORDON et al., Protein Phosphatase 2A Inhibition with LB100 Enhances Radiation-Induced Mitotic Catastrophe and Tumor Growth Delay in Glioblastoma. Mol Cancer Ther. July 2015, Vol 14, No 7, pg 1540-7. abstract, pg 1540, col 2, para 2, pg 1542, col 2, para 3	1-3, 7, 14-15, 18-24
Y	MANCHADO et al., Targeting Mitotic Exit Leads to Tumor Regression In Vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55alpha,delta Phosphatase. Cancer Cell, 14 December 2010, vol. 18, pg 641-654; abstract, pg 650, col 2, para 1	18-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
23 August 2021	SEP 30 2021
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/25230

Continuation of:
Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Groups I+: Claims 1-24, 57-58, drawn to a method for treating a subject having a cancer or identifying a cancer in a subject, wherein said cancer is associated with altered expression/activity level of Protein Phosphatase 2 (PP2A) or mutation/deletion in genes encoding PP2A, and in some aspects comprising administering to said subject one or more therapeutic agents that causes a difference in expression or activity of protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1 (PKMYT1) or WEE1 G2 checkpoint kinase (WEE1). The method will be searched to the extent that the therapeutic agent encompasses a small molecule modulator of PKMYT1 the cancer is associated with altered expression or activity level of PP2A. It is believed that claims 1-3, 7, 14-15, 18-24, encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass a small molecule modulator of PKMYT1 and altered expression/activity level of PP2A. Additional therapeutic agent(s) and/or PP2A status(es) will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected therapeutic agent(s) and/or PP2A status(es). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a method for treating a subject having a cancer or identifying a cancer in a subject, comprising administering a DNA construct targeting WEE1 and the cancer is associated with mutation/deletion in genes encoding PP2A (claims 1, 4-10, 12-13, 18-24, 57-58).

Groups II+: Claims 25-56, drawn to a composition or kit for treating a subject having a cancer comprising one or more therapeutic agents that causes a difference in expression or activity of PKMYT1 or WEE1, wherein said cancer is associated with altered expression/activity level of PP2A or mutation/deletion in genes encoding PP2A. Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The composition may be searched, for example, to the extent that the therapeutic agent encompasses a small molecule modulator of PKMYT1 and the cancer is associated with altered expression or activity level of PP2A, for an additional fee and election as such. It is believed that claims 25-27, 31, 38-39, 42-53 read on this exemplary invention. Additional therapeutic agent(s) and PP2A status will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected therapeutic agent(s) and PP2A status. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the"+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a method for treating a subject having a cancer, comprising administering a DNA construct targeting WEE1 and the cancer is associated with mutation/deletion in genes encoding PP2A (claims 25, 28-34, 36-37, 42-51, 54-56).

The inventions listed as Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Groups I+ include the special technical feature of a method which differs from the special technical feature of a composition, as disclosed by Groups II+.

The inventions of Groups I+ and II+ each include the special technical feature of a specific modulator and PP2A status, not required by any of the other inventions of Groups I+ and II+, respectively.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of treating a subject having a cancer, comprising administering to said subject one or more therapeutic agents that causes a difference in expression or activity of PKMYT1 or WEE1, wherein said cancer is associated with altered expression/activity level of PP2A or mutation/deletion in genes encoding PP2A.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art in view of US 2016/0008361 A1 to Merck Sharp & Dohme Corp. (hereinafter "MSD") and the article "Protein Phosphatase 2A Inhibition with LB100 Enhances Radiation-Induced Mitotic Catastrophe and Tumor Growth Delay in Glioblastoma" Gordon et al., (Mol Cancer Ther: 14(7) 1540-7, July 2015), (hereinafter "Gordon").

MSD teaches (instant claim 1) a method for treating a subject having or suspected of having a cancer, comprising administering to said subject a therapeutically effective amount of one or more therapeutic agents that causes a difference in expression or activity of protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1 (PKMYT1) or WEE1 G2 checkpoint kinase (WEE1) in said subject, thereby treating said subject for said cancer (Claim 1, A method for treating a patient diagnosed with a WEE1 kinase associated cancer with a WEE1 inhibitor comprising.....(d) administering a WEE1 inhibitor to the selected patient.), wherein said cancer is associated with cancerous tissue comprising a cell that has a difference in expression or activity level of PKMYT1 as compared to a healthy control (Claim 1, (a) measuring the gene expression level of PKMYT1 in a biological sample comprising cancer cells obtained from said patient and in a control sample; (b) determining whether the gene expression level in said patient sample is above or below the level of that in said control sample; (c) selecting said patient for treatment with a WEE1 inhibitor, wherein the level of the predictive biomarker from said patient sample is below that of the control sample.). MSD does not specifically teach wherein said cancer is associated with cancerous tissue comprising a cell that has a difference in expression or activity level of Protein Phosphatase 2 (PP2A).

---continued on next sheet----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 21/25230

Continuation of:
Box No. III. Observations where unity of invention is lacking

Gordon teaches that PP2A inhibition enhances radiation-induced mitotic catastrophe and tumor growth delay in glioblastoma (abstract, An emerging, though counterintuitive, therapeutic approach is inhibition of PP2A to drive damaged cells through the cell cycle, sensitizing them to radiotherapy. We investigated the effects of PP2A inhibition on U251 glioblastoma cells following radiation treatment in vitro and in a xenograft mouse model in vivo. Radiotherapy alone augmented PP2A activity, though this was significantly attenuated with combination LB100 treatment.; pg 1542, col 2, para 3, PP2A activity was measured in U251 cells after 2 mmol/L LB100 treatment, 5 -Gy radiation, and LB100 followed by 5-Gy radiation in vitro. Three and 6 hours after radiation alone, U251 cells showed 194% and 200% of the PP2A activity in comparison with control cells ($P < 0.001$; Fig. 1A).). MSD also teaches that at least one of the effects of WEE1 inhibitor on cancer cells is to promote mitotic catastrophe (MSD, para [0004], Deregulated WEE1 expression or activity is believed to be a hallmark of pathology in several types of cancer. WEE1 is often overexpressed in glioblastomas and its activity protects this tumor type from mitotic catastrophe such that high WEE1 levels are associated with poor prognosis (Mir, S. E., et al., Cancer Cell, 2010, 18(3):244-257).). In addition, MSD teaches a combination therapy comprising WEE1 inhibitors and radiation (para [0104], the WEE1 inhibitor of the invention are useful as remedies, for example, for breast cancer.....or as sensitizers for chemotherapy or radiation therapy of those cancers.), it would have been obvious to on of ordinary skill in the art to have measured PP2A expression or activity in subjects receiving radiation therapy prior to administering a combination therapy of WEE1 inhibitors and radiation, since radiation causes increase in PP2A activity (Gordon, induce (para [0104], pg 1542, col 2, para 3, PP2A activity was measured in U251 cells after 2 mmol/L LB100 treatment, 5-Gy radiation, and LB100 followed by 5-Gy radiation in vitro. Three and 6 hours after radiation alone, U251 cells showed 194% and 200% of the PP2A activity in comparison with control cells ($P < 0.001$; Fig. 1A).).

MSD further teaches a composition for treating a subject having or suspected of having a cancer (Claim 14, A kit to identify a cancer patient sensitive to treatment with a WEE1 inhibitor comprising a detection agent capable of detecting the expression product of PKMYT1 in a biological test sample.).

As said technical features were known in the art at the time of the invention, these cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+ and II+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/496(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/496		
Ａ６１Ｋ	*31/4706(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/4706		
Ａ６１Ｋ	*31/517(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/517		
Ａ６１Ｋ	*31/519(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/519		
Ａ６１Ｋ	*31/403(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/403		
Ａ６１Ｐ	*35/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/55 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/55		
Ｃ１２Ｎ	*15/09 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/09	１１０	
Ｃ１２Ｎ	*15/113(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/113	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*9/22 (2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	9/22		

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

シンガポール共和国，シンガポール ０６８９１４ ロビンソン ロード １６０ エスビーエフ センター ２３－０２

(72)発明者 ブリュー，クリスティーン テイラー
シンガポール共和国，シンガポール ０６８９１４ ロビンソン ロード １６０ エスビーエフ センター ２３－０２

(72)発明者 ウィンザー，マイケル デイビッド
シンガポール共和国，シンガポール ０６８９１４ ロビンソン ロード １６０ エスビーエフ センター ２３－０２

(72)発明者 バナジー，サウラブ
シンガポール共和国，シンガポール ０６８９１４ ロビンソン ロード １６０ エスビーエフ センター ２３－０２

(72)発明者 ヨスト，ショーン
シンガポール共和国，シンガポール ０６８９１４ ロビンソン ロード １６０ エスビーエフ センター ２３－０２

Ｆターム（参考） 4B050 CC07 KK13 LL01
4B063 QA13 QA19 QA20 QQ42 QQ52 QR08 QR14 QR32 QR35 QR55 QR62 QS25 QS34
4C084 AA13 AA19 BA03 NA14 ZB261
4C086 AA01 AA02 BC28 BC46 BC50 BC73 BC82 CB03 CB06 CB09 GA02 GA07 GA10 GA12 MA01 MA04 NA14 ZB26