

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6802185号
(P6802185)

(45) 発行日 令和2年12月16日(2020.12.16)

(24) 登録日 令和2年11月30日(2020.11.30)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 A

請求項の数 40 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2017-555780 (P2017-555780)	(73) 特許権者	399052796
(86) (22) 出願日	平成28年4月27日 (2016.4.27)		ダイナ ファーバー キャンサー インス
(65) 公表番号	特表2018-514210 (P2018-514210A)		ティチュート, インコーポレイテッド
(43) 公表日	平成30年6月7日 (2018.6.7)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/029495		2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
(87) 国際公開番号	W02016/176288		ベニュー 4 5 0
(87) 国際公開日	平成28年11月3日 (2016.11.3)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成31年4月26日 (2019.4.26)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	62/153,475	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成27年4月27日 (2015.4.27)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハイスループット B H 3 プロファイリング：少量の細胞での B H 3 プロファイルのための迅速かつ拡大縮小可能な技術

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試験作用因子に対する細胞の感受性を予測する方法であって、

a) 血清を有する培養培地中、試験作用因子の存在下および非存在下で、接着性固体表面に付着した細胞を培養するステップ；

b) 血清が存在する前記培養培地中の培養された前記付着細胞を、B H 3 プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性 B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップであって、前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、糖、p H 緩衝剤、塩、キレート剤および炭素源を含む、ステップ；

c) 血清が存在する前記培養培地中の前記付着細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型ミトコンドリア外膜透過化 (M O M P) の量を測定するステップ；および

d) 前記試験作用因子の存在下で培養された前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量を、前記試験作用因子の非存在下で培養された前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量と比較するステップ

を含み、

前記試験作用因子の非存在下で培養された前記細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量と比較した、前記試験作用因子の存在下で培養された前記細胞における M O M P の増加が、前記細胞が前記試験作用因子に対して感受性であることを示す、方法。

【請求項 2】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、2 ×、3 × または 4 × の濃度で添加される、請

10

20

求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、2 × の濃度で添加され、B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、顕微鏡法によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、3 × または 4 × の濃度で添加され、B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、蛍光活性化セルソーティング (F A C S) によって測定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記接着性固体表面が、1 種または複数の接着促進化合物でコーティングされている、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 6】

前記 1 種または複数の接着促進化合物が、細胞外マトリックス (E C M) タンパク質である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 E C M タンパク質が、コラーゲン 1、ラミニン、コラーゲン 4 およびフィブロネクチンからなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 E C M タンパク質が、動物組織に由来する E C M タンパク質混合物である、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 9】

前記 1 種または複数の接着促進化合物が抗体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 1 種または複数の接着促進化合物が、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンである、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液が、トレハロース由来実験緩衝液 (D T E B) またはマンニトール実験緩衝液 (M E B) である、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

30

前記 B H 3 ドメインペプチドとの接触の後、その前、またはそれと同時に前記細胞が透過化される、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記 B H 3 プロファイリング緩衝液に透過化剤が補充される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記透過化剤が、ジギトニンまたはサポニンである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、i) 電位差測定用色素と接触した細胞における前記電位差測定用色素の発光、または i i) ミトコンドリア膜間腔からの分子の放出を決定することによって測定される、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 16】

B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量が、F A C S、プレート蛍光定量法、蛍光イメージングまたは自動画像解析によって測定される、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

M O M P を測定する前に前記細胞を固定するステップをさらに含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

50

固定された前記細胞が、電位差測定用色素と接触する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記電位差測定用色素が、5, 5', 6, 6' - テトラクロロ - 1, 1', 3, 3' - テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニオンヨード (JC - 1)、ジヒドロローダミン 1 2 3、テトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) またはテトラメチルローダミンエチルエステル (TMRE) である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

固定された前記細胞が、チトクローム C、SMAC / Diablo、Omi、アデニル酸キナーゼ - 2 またはアポトーシス誘導因子に対する抗体と接触する、請求項 1 7 に記載の方法。

10

【請求項 2 1】

固定された前記細胞が、Tom 2 0 または VDAC に対する抗体と接触する、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 BH3 ドメインペプチドが、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、または HRK ポリペプチドの BH3 ドメインに由来する、請求項 1 から 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 BH3 ドメインペプチドが、配列番号 1 ~ 1 5 からなる群より選択される、請求項 1 から 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 4】

前記試験作用因子が治療剤である、請求項 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

試験治療剤が化学療法剤である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記細胞が初代ヒト腫瘍細胞である、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記細胞が、患者由来異種移植片 (PDX) から得られる、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記細胞が培養ヒト細胞である、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 9】

前記細胞が、初代動物腫瘍細胞である、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記細胞が、ヒトまたは動物組織に由来する健康な細胞である、請求項 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

複数の試験作用因子を用いて繰り返される、請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

接着性作用因子でコーティングされている複数のウェルを含むマルチウェルプレートであって、前記複数のウェルの少なくとも 1 つが、試験治療剤、BH3 ドメインペプチド、および血清が存在する培養培地中の細胞を含む、マルチウェルプレート。

【請求項 3 3】

前記 BH3 ドメインペプチドが、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、または HRK ポリペプチドの BH3 ドメインに由来する、請求項 3 2 に記載のマルチウェルプレート。

【請求項 3 4】

前記 BH3 ドメインペプチドが、配列番号 1 ~ 1 5 からなる群より選択される、請求項

50

3 2 に記載のマルチウェルプレート。

【請求項 3 5】

前記試験治療剤が化学療法剤である、請求項 3 2 から 3 4 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

【請求項 3 6】

前記接着性作用因子が細胞外マトリックス (E C M) タンパク質である、請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

【請求項 3 7】

前記 E C M タンパク質が、コラーゲン 1、ラミニン、コラーゲン 4 およびフィブロネクチンからなる群より選択される、請求項 3 6 に記載のマルチウェルプレート。

10

【請求項 3 8】

前記接着性作用因子が抗体である、請求項 3 2 から 3 5 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

【請求項 3 9】

接着性作用因子でコーティングされている複数のウェルを含むマルチウェルプレートを含むキットであって、前記複数のウェルの少なくとも 1 つが、試験治療剤および B H 3 ドメインペプチドを含む、キット。

【請求項 4 0】

B H 3 プロファイリング緩衝液を収容するバイアルおよび治療剤に対する細胞の感受性を予測するために前記キットを使用するための指示をさらに含む、請求項 3 9 に記載のキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願

この出願は、米国特許法 § 1 1 9 (e) の下、2 0 1 5 年 4 月 2 7 日に提出された米国仮出願第 6 2 / 1 5 3 , 4 7 5 号 (この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される) の利益を主張する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

30

ダイナミック B H 3 プロファイリング (D B P) は、薬物が細胞のアポトーシス感受性をどのように変化させるかを決定する。ダイナミック B H 3 プロファイリングの方法は、ウェル中で培養培地の存在下、細胞を化学化合物で約 4 ~ 7 2 時間処理することを含んでいた。次に、細胞がウェルから取り上げられ、遠心分離機を使用して培養培地から分離された。分離された細胞が B H 3 プロファイリング緩衝液中に入れられ、B H 3 プロファイリングペプチドと接触し、ミトコンドリア膜電位 (M O M P) の消失が測定された。B H 3 ペプチドに対するミトコンドリア感受性の増加は、細胞が化学化合物に対して感受性であることを示した。しかし、これは、相当量のヒト作業員による取り扱いを伴う骨の折れる工程であり、それにより誤り率が増加する。加えて、この工程は、限りのある材料 (例えば、腫瘍細胞) を大量に要する。これらの制限は、克服すべき障壁の代表である。したがって、自動化された効率的で費用対効果の高い B H 3 プロファイリング方法が必要である。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 3 】

様々な態様では、本開示は、薬物が細胞のアポトーシス感受性をどのように変化させるかを決定するための改良法を提供する。

【 0 0 0 4 】

したがって、一部の態様では、本開示は、試験作用因子に対する細胞の感受性を予測する方法であって、血清を有する培養培地中、試験作用因子の存在下および非存在下で、接

50

着性固体表面上にて細胞を培養するステップ；培養された細胞を、BH3プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性BH3ドメインペプチドと（例えば、接着性固体表面上で）接触させるステップ；細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型ミトコンドリア外膜透過化（MOMP）の量を測定するステップ；および試験作用因子の存在下で培養された細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量を、試験作用因子の非存在下で培養された細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較するステップを含み、試験作用因子の非存在下で培養された細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較した、試験作用因子の存在下で培養された細胞におけるMOMPの増加は、細胞が試験作用因子に感受性であることを示す、方法を提供する。

【0005】

10

一部の実施形態では、方法は、細胞をBH3プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性BH3ドメインペプチドと接触させる前に、細胞から培養培地を洗浄するステップをさらに含む。

【0006】

一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、2×、3×または4×の濃度で添加される。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、2×の濃度で添加され、BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量は顕微鏡法によって測定される。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、3×または4×の濃度で添加され、BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量は、蛍光活性化セルソーティング（FACS）によって測定される。

20

【0007】

一部の実施形態では、接着性固体表面は、1種または複数の接着促進化合物でコーティングされている。一部の実施形態では、1種または複数の接着促進化合物は細胞外マトリックス（ECM）タンパク質である。一部の実施形態では、ECMタンパク質は、コラーゲン1、ラミニン、コラーゲン4およびフィブロネクチンからなる群より選択される。一部の実施形態では、ECMタンパク質混合物は動物組織に由来し、未知の組成である。一部の実施形態では、1種または複数の接着促進化合物は抗体である。一部の実施形態では、1種または複数の接着促進化合物はストレプトアビジンまたはニュートラアビジンである。

【0008】

30

一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、トレハロース由来実験緩衝液（Derived from Trehalose Experimental Buffer）（DEB）またはマンニトール実験緩衝液（MEB）である。一部の実施形態では、細胞は、BH3ドメインペプチドとの接触の後、その前、またはそれと同時に透過化される。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液に透過化剤が補充される。一部の実施形態では、透過化剤はジギトニンまたはサポニンである。

【0009】

方法の一部の実施形態では、BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量は、i）電位差測定用色素と接触した細胞における前記電位差測定用色素の発光、またはii）ミトコンドリア膜間腔からの分子の放出を決定することによって測定される。一部の実施形態では、BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量は、FACS、プレート蛍光定量法、蛍光イメージングまたは自動画像解析によって測定される。

40

【0010】

一部の実施形態では、方法は、MOMPを測定する前に細胞を固定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、固定された細胞は、電位差測定用色素と接触する。一部の実施形態では、電位差測定用色素は、5，5'，6，6'-テトラクロロ-1，1'，3，3'-テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニンヨージド（JC-1）、ジヒドロロダミン123、テトラメチルロダミンメチルエステル（TMRE）またはテトラメチルロダミンエチルエステル（TMRE）である。

【0011】

50

一部の実施形態では、固定された細胞は、MOMPを測定するためにチトクロームC、SMAC/Diablo、Omi、アデニル酸キナーゼ-2またはアポトーシス誘導因子に対する抗体と接触する。一部の実施形態では、固定された細胞は、例えば、MOMP後のミトコンドリア位置の対比測定として、MOMPによって放出されないTom20またはVDACなどのミトコンドリア抗原に対する抗体と接触する。

【0012】

一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、またはHRKポリペプチドのBH3ドメインに由来する。

【0013】

一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、配列番号1～15からなる群より選択される。一部の実施形態では、試験作用因子は治療剤である。一部の実施形態では、試験治療剤は化学療法剤である。

【0014】

一部の実施形態では、細胞は初代ヒト腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は患者由来異種移植片(PDX)から得られる。一部の実施形態では、細胞は培養ヒト細胞である。一部の実施形態では、細胞は初代動物腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒトまたは動物組織に由来する健康な細胞である。一部の実施形態では、方法は、複数の試験作用因子を用いて繰り返される。

【0015】

一部の態様では、本開示は、試験治療剤およびBH3ドメインペプチドを含むマルチウェルプレートであって、各ウェルが、接着性作用因子でコーティングされている、マルチウェルプレートを提供する。

【0016】

一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、またはHRKポリペプチドのBH3ドメインに由来する。一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、配列番号1～15からなる群より選択される。一部の実施形態では、試験治療剤は化学療法剤である。一部の実施形態では、接着性作用因子は細胞外マトリックス(ECM)タンパク質である。一部の実施形態では、ECMタンパク質は、コラーゲン1、ラミニン、コラーゲン4およびフィブロネクチンからなる群より選択される。一部の実施形態では、接着性作用因子は抗体である。

【0017】

一部の態様では、本開示は、本開示によって記載されるマルチウェルプレートを含むキットであって、BH3プロファイリング緩衝液を収容するバイアルおよび治療剤に対する細胞の感受性を予測するためにキットを使用するための指示をさらに含むキットを提供する。

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

試験作用因子に対する細胞の感受性を予測する方法であって、

a) 血清を有する培養培地中、試験作用因子の存在下および非存在下で、接着性固体表面上にて細胞を培養するステップ；

b) 培養された前記細胞を、BH3プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性BH3ドメインペプチドと接触させるステップ；

c) 前記細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型ミトコンドリア外膜透過化(MOMP)の量を測定するステップ；および

d) 前記試験作用因子の存在下で培養された前記細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量を、前記試験作用因子の非存在下で培養された前記細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較するステップ

を含み、

前記試験作用因子の非存在下で培養された前記細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較した、前記試験作用因子の存在下で培養された前記細胞におけるM

10

20

30

40

50

OMPの増加が、前記細胞が前記試験作用因子に対して感受性であることを示す、方法。

(項目2)

前記細胞を前記BH3プロファイリング緩衝液および前記アポトーシス促進性BH3ドメインペプチドと接触させる前に、前記細胞から前記培養培地を洗浄するステップをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記BH3プロファイリング緩衝液が、2×、3×または4×の濃度で添加される、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記BH3プロファイリング緩衝液が、2×の濃度で添加され、BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量が、顕微鏡法によって測定される、項目1に記載の方法。

10

(項目5)

前記BH3プロファイリング緩衝液が、3×または4×の濃度で添加され、BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量が、蛍光活性化セルソーティング(FACS)によって測定される、項目1に記載の方法。

(項目6)

前記接着性固体表面が、1種または複数の接着促進化合物でコーティングされている、項目1から5のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記1種または複数の接着促進化合物が、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質である、項目6に記載の方法。

20

(項目8)

前記ECMタンパク質が、コラーゲン1、ラミニン、コラーゲン4およびフィブロネクチンからなる群より選択される、項目7に記載の方法。

(項目9)

前記ECMタンパク質が、動物組織に由来するECMタンパク質混合物である、項目7に記載の方法。

(項目10)

前記1種または複数の接着促進化合物が抗体である、項目6に記載の方法。

(項目11)

前記1種または複数の接着促進化合物が、ストレプトアビジンまたはニュートラアビジンである、項目6に記載の方法。

30

(項目12)

前記BH3プロファイリング緩衝液が、トレハロース由来実験緩衝液(DTEB)またはマンニトール実験緩衝液(MEB)である、項目1から11のいずれか一項に記載の方法。

(項目13)

前記BH3ドメインペプチドとの接触の後、その前、またはそれと同時に前記細胞が透過化される、項目1から12のいずれか一項に記載の方法。

(項目14)

前記BH3プロファイリング緩衝液に透過化剤が補充される、項目13に記載の方法。

40

(項目15)

前記透過化剤が、ジギトニンまたはサポニンである、項目14に記載の方法。

(項目16)

BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量が、i)電位差測定用色素と接触した細胞における前記電位差測定用色素の発光、またはii)ミトコンドリア膜間腔からの分子の放出を決定することによって測定される、項目1から15のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

BH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量が、FACS、プレート蛍光定量法、蛍光イメージングまたは自動画像解析によって測定される、項目1から15のいずれか一項に

50

記載の方法。

(項目 18)

MOMPを測定する前に前記細胞を固定するステップをさらに含む、項目 1 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 19)

固定された前記細胞が、電位差測定用色素と接触する、項目 18 に記載の方法。

(項目 20)

前記電位差測定用色素が、5, 5', 6, 6' - テトラクロロ - 1, 1', 3, 3' - テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニオンヨード (JC - 1)、ジヒドロローダミン 123、テトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) またはテトラメチルローダミンエチルエステル (TMRE) である、項目 19 に記載の方法。

10

(項目 21)

固定された前記細胞が、チトクローム C、SMAC / Diablo、Omi、アデニル酸キナーゼ - 2 またはアポトーシス誘導因子に対する抗体と接触する、項目 18 に記載の方法。

(項目 22)

固定された前記細胞が、Tom20 またはVDAC に対する抗体と接触する、項目 18 に記載の方法。

(項目 23)

前記 BH3 ドメインペプチドが、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、または HRK ポリペプチドの BH3 ドメインに由来する、項目 1 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 24)

前記 BH3 ドメインペプチドが、配列番号 1 ~ 15 からなる群より選択される、項目 1 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 25)

前記試験作用因子が治療剤である、項目 1 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 26)

試験治療剤が化学療法剤である、項目 25 に記載の方法。

(項目 27)

前記細胞が初代ヒト腫瘍細胞である、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 28)

前記細胞が、患者由来異種移植片 (PDX) から得られる、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 29)

前記細胞が培養ヒト細胞である、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 30)

前記細胞が、初代動物腫瘍細胞である、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 31)

前記細胞が、ヒトまたは動物組織に由来する健康な細胞である、項目 1 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 32)

複数の試験作用因子を用いて繰り返される、項目 1 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 33)

各ウェルが接着性作用因子でコーティングされている、試験治療剤および BH3 ドメインペプチドを含むマルチウェルプレート。

(項目 34)

前記 BH3 ドメインペプチドが、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、または HRK ポリペプチドの BH3 ドメインに由来する、項目 33 に記載のマルチウ

50

エルプレート。

(項目 3 5)

前記 B H 3 ドメインペプチドが、配列番号 1 ~ 1 5 からなる群より選択される、項目 3 3 に記載のマルチウェルプレート。

(項目 3 6)

前記試験治療剤が化学療法剤である、項目 3 3 から 3 5 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

(項目 3 7)

前記接着性作用因子が細胞外マトリックス (E C M) タンパク質である、項目 3 3 から 3 6 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

(項目 3 8)

前記 E C M タンパク質が、コラーゲン 1、ラミニン、コラーゲン 4 およびフィブロネクチンからなる群より選択される、項目 3 7 に記載のマルチウェルプレート。

(項目 3 9)

前記接着性作用因子が抗体である、項目 3 3 から 3 6 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレート。

(項目 4 0)

項目 3 3 から 3 9 のいずれか一項に記載のマルチウェルプレートを含むキットであって、B H 3 プロファイリング緩衝液を収容するバイアルおよび治療剤に対する細胞の感受性を予測するために前記キットを使用するための指示をさらに含む、キット。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

【図 1】図 1 は、ハイスループットダイナミック B H 3 プロファイリングのための方法の一実施形態を示す。患者からの腫瘍を解離させて単一細胞懸濁物にし、3 8 4 ウェルプレートに分配する。細胞を薬物で 4 ~ 7 2 時間処理し、次に B H 3 プロファイルに供する。チトクローム c の相対的消失 (デルタプライミング (d e l t a p r i m i n g)) は、この薬物が細胞をアポトーシスへと感作し、個別化化学療法または臨床状況でのさらなる評価のための化合物を提示し得ることを示す。

【 0 0 1 9 】

【図 2】図 2 は、3 8 4 ウェルプレート中において生存細胞から培地を低残留体積 (5 μ L 未満) で吸引および洗浄する効果を示す。いくつかの結腸がん細胞を組織培養処理済みプレート上に蒔き、1 日後に細胞はハイスループットスクリーニング (H T S) B H 3 プロファイリングを受けた。洗浄後に維持される細胞もあれば、消失する細胞もあることに留意されたい。これは、低残留体積でプレート洗浄装置を使用する周知の問題である。細胞をチトクローム c 抗体で染色する。

【 0 0 2 0 】

【図 3】図 3 は、膵臓がん細胞株におけるチトクローム c 消失の用量応答曲線を示す。S U 8 6 . 8 6 膵臓がん細胞株を、用量を増加させた合成 B i m ペプチドで処理した。細胞を DNA 色素 (H o e c h s t 3 3 3 4 2) および抗チトクローム c 抗体で染色した。より高い濃度のペプチドでチトクローム c の漸進性の消失が起こった。個々の細胞からのチトクローム c の消失を定量した結果、3 つ組のウェルの標準偏差を表すエラーバー付きの用量応答曲線が得られた。本実験に 2 $\times$ 濃縮 M E B 緩衝液を使用した。

【 0 0 2 1 】

【図 4】図 4 は、いくつかの膵臓がん細胞株についての H T S B H 3 プロファイルの結果および F A C S B H 3 プロファイルの結果の比較を示す。ハイスループット顕微鏡法アッセイの E C - 5 0 は減少したが、相関しており、アッセイの適合性を示している。

【 0 0 2 2 】

【図 5】図 5 A ~ 5 B は、結腸 P D X 腫瘍から新鮮単離された細胞の H T S B H 3 プロファイルを示す。図 5 A は、ダイナミック B H 3 プロファイリング後の結腸腫瘍の 4 $\times$ 画像を示す。薬物処理および B H 3 プロファイルの後、ミトコンドリアを表示するために細

10

20

30

40

50

胞を抗チトクローム c および E p C a m で染色した。図 5 B は、結腸 P D X 腫瘍の用量応答像および曲線を示す。図 5 B (上)では、細胞を抗チトクローム c (図示)で染色し、H o e c h s t 3 3 3 4 2 (図示せず)および T o m 2 0 ミトコンドリア対比染色 (図示せず)でも染色する。図 5 B (下)では、チトクローム c および T o m 2 0 の蛍光強度を相関させることによってチトクローム c 消失の用量応答曲線を計算する。

【 0 0 2 3 】

【図 6】図 6 は、一次ヒト C L L 腫瘍の H T S B H 3 プロファイルを示す。チトクローム c のペプチド誘導型消失を、チトクローム c のシグナルの消失によって示す。下は、チトクローム c の消失の用量応答曲線である。

【 0 0 2 4 】

【図 7】図 7 は、D M S O で 2 4 時間模擬処理され、次に B H 3 プロファイルを受けたマウス M M T V 腫瘍から新鮮単離された細胞の B H 3 プロファイル後のチトクローム c の消失のウェル全体像を示す。

【 0 0 2 5 】

【図 8 - 1】図 8 A ~ 8 D は、他の目的の非腫瘍細胞からの目的のヒト腫瘍細胞の分染を示す。図 8 A は、ハイスループットダイナミック B H 3 プロファイリング (H T - D B P) 後の腫瘍細胞 (8 9 0 2 細胞) および他の非腫瘍マウス細胞 (B a x / B a k D K O M E F) を示す。8 9 0 2 腫瘍細胞は M O M P を受け、一方で B a x / B a k D K O 細胞はチトクローム c を失わなかった。ヒト E p C a m の染色に基づき 8 9 0 2 腫瘍細胞を特定した。図 8 B は、図 8 A の定量である。図 8 C は、H T - D B P 後に脾臓患者由来異種移植片から新鮮単離された細胞を示す。脾臓腫瘍細胞は腫瘍マーカー E p C a m でマークされ、一方で他の細胞は E p C a m でマークされない。図 8 D は、H T - D B P を使用した脾臓患者由来異種移植片 (P C A 1 9) およびウェル内の細胞の全て (全細胞) の B H 3 ペプチドの用量応答を示す。脾臓腫瘍細胞だけを分析するとき、用量応答曲線がシフトしたことに留意されたい。

【図 8 - 2】図 8 A ~ 8 D は、他の目的の非腫瘍細胞からの目的のヒト腫瘍細胞の分染を示す。図 8 A は、ハイスループットダイナミック B H 3 プロファイリング (H T - D B P) 後の腫瘍細胞 (8 9 0 2 細胞) および他の非腫瘍マウス細胞 (B a x / B a k D K O M E F) を示す。8 9 0 2 腫瘍細胞は M O M P を受け、一方で B a x / B a k D K O 細胞はチトクローム c を失わなかった。ヒト E p C a m の染色に基づき 8 9 0 2 腫瘍細胞を特定した。図 8 B は、図 8 A の定量である。図 8 C は、H T - D B P 後に脾臓患者由来異種移植片から新鮮単離された細胞を示す。脾臓腫瘍細胞は腫瘍マーカー E p C a m でマークされ、一方で他の細胞は E p C a m でマークされない。図 8 D は、H T - D B P を使用した脾臓患者由来異種移植片 (P C A 1 9) およびウェル内の細胞の全て (全細胞) の B H 3 ペプチドの用量応答を示す。脾臓腫瘍細胞だけを分析するとき、用量応答曲線がシフトしたことに留意されたい。

【 0 0 2 6 】

【図 9】図 9 は、H T S ダイナミック B H 3 プロファイルによって得られたデータセットを示す。脾臓がん細胞株 (S U 8 6 . 8 6) を異なる薬物で 2 4 および 7 2 時間処理して、2 4 時間目にプライミングを増加させる薬物を見出し、どのようにこれを 7 2 時間での細胞死と比較するかを見出した。2 4 時間処理した細胞に B H 3 プロファイリングを施して、アポトーシスについて細胞をプライミングした分子を特定した。残留した生存細胞の数を反映させるために、7 2 時間処理した細胞を計数した。1 回の実験でデータを生成した。

【 0 0 2 7 】

【図 1 0 - 1】図 1 0 A および 1 0 B は、化学化合物ライブラリーを使用したマウス M M T V - P y M T 腫瘍由来がん細胞株に対する H T S B H 3 プロファイリングアッセイの再現性を示す。図 1 0 A および図 1 0 B のそれぞれに、同じ腫瘍に関する技術的反復を示す。各点は、単一の化学化合物による処理を表す。

【図 1 0 - 2】図 1 0 A および 1 0 B は、化学化合物ライブラリーを使用したマウス M M

10

20

30

40

50

T V - P y M T 腫瘍由来がん細胞株に対する H T S B H 3 プロファイリングアッセイの再現性を示す。図 1 0 A および図 1 0 B のそれぞれに、同じ腫瘍に関する技術的反復を示す。各点は、単一の化学化合物による処理を表す。

【 0 0 2 8 】

【図 1 1 - 1】図 1 1 A ~ 1 1 C は、いくつかの膵臓がん細胞株にわたる 2 × 緩衝液濃度を用いた B i m ペプチドに対する応答の例を示す。細胞を抗チトクローム c 抗体および H o e c h s t 3 3 3 4 2 色素で染色した。図 1 1 A は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する、R P M I 中で培養された Y A P C、P a n c 0 2 . 0 3 および S U 8 6 . 8 6 細胞の応答を示す。図 1 1 B は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する H P A C、P a t u 8 9 8 8 T および P a t u 8 9 0 2 膵臓がん細胞の応答を示す。H P A C および P a t u 8 9 8 8 T 細胞を R P M I 中で培養し、P a t u 8 9 0 2 細胞を D M E M 中で培養した。図 1 1 C は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する B x P c 3、P a n c 0 4 . 0 3 および A S P C - 1 膵臓がん細胞の応答を示す。B x P c 3 細胞を D M E M 中で培養し、P a n c 0 4 . 0 3 および A S P C - 1 細胞を R P M I 中で培養した。2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチドを用いた全ての膵臓がん細胞株の処理を図 1 1 A ~ 1 1 C に示すが、この処理の結果、蛍光顕微鏡法によって測定されるように、チトクローム c の消失が生じた。

10

【図 1 1 - 2】図 1 1 A ~ 1 1 C は、いくつかの膵臓がん細胞株にわたる 2 × 緩衝液濃度を用いた B i m ペプチドに対する応答の例を示す。細胞を抗チトクローム c 抗体および H o e c h s t 3 3 3 4 2 色素で染色した。図 1 1 A は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する、R P M I 中で培養された Y A P C、P a n c 0 2 . 0 3 および S U 8 6 . 8 6 細胞の応答を示す。図 1 1 B は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する H P A C、P a t u 8 9 8 8 T および P a t u 8 9 0 2 膵臓がん細胞の応答を示す。H P A C および P a t u 8 9 8 8 T 細胞を R P M I 中で培養し、P a t u 8 9 0 2 細胞を D M E M 中で培養した。図 1 1 C は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する B x P c 3、P a n c 0 4 . 0 3 および A S P C - 1 膵臓がん細胞の応答を示す。B x P c 3 細胞を D M E M 中で培養し、P a n c 0 4 . 0 3 および A S P C - 1 細胞を R P M I 中で培養した。2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチドを用いた全ての膵臓がん細胞株の処理を図 1 1 A ~ 1 1 C に示すが、この処理の結果、蛍光顕微鏡法によって測定されるように、チトクローム c の消失が生じた。

20

30

【図 1 1 - 3】図 1 1 A ~ 1 1 C は、いくつかの膵臓がん細胞株にわたる 2 × 緩衝液濃度を用いた B i m ペプチドに対する応答の例を示す。細胞を抗チトクローム c 抗体および H o e c h s t 3 3 3 4 2 色素で染色した。図 1 1 A は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する、R P M I 中で培養された Y A P C、P a n c 0 2 . 0 3 および S U 8 6 . 8 6 細胞の応答を示す。図 1 1 B は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する H P A C、P a t u 8 9 8 8 T および P a t u 8 9 0 2 膵臓がん細胞の応答を示す。H P A C および P a t u 8 9 8 8 T 細胞を R P M I 中で培養し、P a t u 8 9 0 2 細胞を D M E M 中で培養した。図 1 1 C は、2 × 緩衝液中の 0 μ M B i m ペプチド (上) および 2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチド (下) に対する B x P c 3、P a n c 0 4 . 0 3 および A S P C - 1 膵臓がん細胞の応答を示す。B x P c 3 細胞を D M E M 中で培養し、P a n c 0 4 . 0 3 および A S P C - 1 細胞を R P M I 中で培養した。2 × 緩衝液中の 1 0 0 μ M B i m ペプチドを用いた全ての膵臓がん細胞株の処理を図 1 1 A ~ 1 1 C に示すが、この処理の結果、蛍光顕微鏡法によって測定されるように、チトクローム c の消失が生じた。

40

【 0 0 2 9 】

50

【図12-1】図12A~12Bは、いくつかの緩衝液濃度で0 μ M Bimペプチドまたは100 μ M Bimペプチドのいずれかを用いた膵臓がん細胞株の処理を示す。図12Aは、8902細胞を示す。図12Bは、8988T細胞を示す。細胞を抗チトクロームc抗体およびHoechst 33342色素で染色した。2 $\times$ 、3 $\times$ 、4 $\times$ または5 $\times$ 緩衝液濃度を用いた処理からのデータを示す。3 $\times$ 、4 $\times$ 、および5 $\times$ で0 μ M Bimペプチドを用いた細胞の処理の結果、蛍光顕微鏡法により測定されるように、チトクロームcの非特異的消失が生じたが、これは、これらの緩衝液濃度で不十分なアッセイ品質であることを示す。チトクロームcのペプチド誘導型消失は、2 $\times$ 緩衝液の濃度で生じた。

【図12-2】図12A~12Bは、いくつかの緩衝液濃度で0 μ M Bimペプチドまたは100 μ M Bimペプチドのいずれかを用いた膵臓がん細胞株の処理を示す。図12Aは、8902細胞を示す。図12Bは、8988T細胞を示す。細胞を抗チトクロームc抗体およびHoechst 33342色素で染色した。2 $\times$ 、3 $\times$ 、4 $\times$ または5 $\times$ 緩衝液濃度を用いた処理からのデータを示す。3 $\times$ 、4 $\times$ 、および5 $\times$ で0 μ M Bimペプチドを用いた細胞の処理の結果、蛍光顕微鏡法により測定されるように、チトクロームcの非特異的消失が生じたが、これは、これらの緩衝液濃度で不十分なアッセイ品質であることを示す。チトクロームcのペプチド誘導型消失は、2 $\times$ 緩衝液の濃度で生じた。

【0030】

【図13】図13A~13Bは、いくつかの緩衝液濃度で0 μ M Bimペプチドまたは100 μ M Bimペプチドのいずれかを用いた膵臓がん細胞株の処理を示す。図13Aは、FACSデータを示す。図13Bは、FACSデータのヒストグラムを示す。細胞を抗チトクロームc抗体で染色した。2 $\times$ 、3 $\times$ 、4 $\times$ または5 $\times$ 緩衝液濃度を用いた処理からのデータを示す。2 $\times$ および3 $\times$ 濃度の緩衝液の100 μ M Bimペプチドを用いた細胞の処理の結果、チトクロームc陽性細胞集団のペプチド誘導型の減少が生じた。

【0031】

【図14】図14は、不良な細胞付着のハイスループット顕微鏡法のBH3像に対する効果を示す。結腸がんPDXから単離した細胞を、組織培養処理済みの細胞表面に置いたが、接着しなかった。ウェル中で洗浄したために細胞はウェルの側方に移った。

【0032】

【図15】図15は、結腸がんおよび膵臓がん患者由来異種移植片からの腫瘍細胞が、異なる細胞外マトリックスでコーティング済みの表面に貼り付いたことを示す。C1はコラーゲン1であり；C4はコラーゲン4であり；Lはラミニンであり；Fはフィブロネクチンであり；マトリゲルは組成不明のECMタンパク質の混合物である。

【0033】

【図16】図16は、BH3プロファイルの間に一次卵巣腹水がEpCamコーティング済みプレートに貼り付いたが、ニュートラアビジンコーティング済みプレート、アミンプレート、組織培養処理済みプレート、またはポリ-L-リシンプレートに貼り付かなかったことを示す。細胞をDNA色素Hoechst 33342で染色する。

【0034】

【図17】図17は、一次CLL腫瘍がCD19コーティング済みプレート、アミンプレート、組織培養処理済みプレート、またはポリ-L-リシンプレートに貼り付いたことを示す。細胞をDNA色素Hoechst 33342で染色する。

【0035】

【図18】図18A~18Cは、細胞わずか100個を用いて様々な程度のノイズでHT-DBPを行うことができることを示す。ここで、ウェル1個あたり異なる細胞数で膵臓細胞株を蒔き、ハイスループットBH3プロファイルに供した。図18Aは、異なる細胞数でBimペプチドの用量応答を示す。図18Bは、図18AからのBimペプチドの用量応答の最大プラトーを示す。図18Cは、アッセイのノイズの尺度としての、Bimの用量応答の最大プラトーの標準偏差を示す。図18Cからのノイズ測定に基づき全ての細

10

20

30

40

50

胞数で用量応答を観測することが可能であるものの、HT-DBPは細胞500個またはそれ超で最適であることに留意されたい。

【0036】

【図19】図19Aおよび19Bは、予備BH3プロファイルがMMTV-PyMTマウス乳腺腫瘍から単離された腫瘍細胞を使用するHT-DBPのために使用された単一で正しいペプチド濃度を特定したことを示す。多くの腫瘍について、アポトーシス性プライミングは予備決定されない。これには、凍結させることができない腫瘍が含まれる。これらの場合、HT-DBPに必要な最小細胞数を減少させるためのHT-DBPを行うために理想的なペプチド濃度を特定することが重要である。HT-DBP予備プロファイルおよび4時間隔てて行われたBH3プロファイルにより、同様のレベルのアポトーシス性プライミングがもたらされたことが見出された。

10

【0037】

【図20-1】図20A~20Cは、化学化合物ライブラリーを使用したMMTV-PyMTマウス腫瘍のHT-DBPを示す。図20Aは、技術的反復を示す。図20Bは、アポトーシス性プライミング(x軸)を増加させた化合物を示す。y軸に細胞計数も示す。図20Cは、アポトーシス性プライミングを増加させたまたは増加させなかった化合物のいくつかの画像を示す。

【図20-2】図20A~20Cは、化学化合物ライブラリーを使用したMMTV-PyMTマウス腫瘍のHT-DBPを示す。図20Aは、技術的反復を示す。図20Bは、アポトーシス性プライミング(x軸)を増加させた化合物を示す。y軸に細胞計数も示す。図20Cは、アポトーシス性プライミングを増加させたまたは増加させなかった化合物のいくつかの画像を示す。

20

【0038】

【図21】図21は、一次卵巣腹水腫瘍に対する選ばれた数の薬物に関するハイスループットダイナミックBH3プロファイルの例を示す。より大きなデルタプライミングを引き起こした薬物は、化学感受性を増加させる見込みがある薬物である。棒線3および7(左から)は、類似の作用機作を有する薬物を示す。棒線34、40、および42(左から)は、類似の作用機作を有する薬物を示す。

【0039】

【図22】図22は、CLL腫瘍に対する選ばれた数の薬物に関するハイスループットダイナミックBH3プロファイルの例を示す。より大きなデルタプライミングを引き起こした薬物は、化学感受性を増加させる見込みがある薬物である。エラーバーは、標準偏差を表す。

30

【発明を実施するための形態】

【0040】

ダイナミックBH3プロファイリングは、試験化合物または治療法に対する細胞の感受性を測定するために使用される技法である。この技法は、以前にWO2014/047,342に記載されており、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。ダイナミックBH3プロファイリングは、標的細胞をプログラム細胞死により近づける新薬の特定を可能にする。この技法は、患者のためになる見込みが最も高い治療薬の特定を可能にするので、個別化医療にも使用することができる。

40

【0041】

以前に記載されたダイナミックBH3プロファイリングの方法では、細胞は、典型的に血清を含有する培養培地の存在下で薬物で処理された。細胞は、薬物で処理された後、次に培養培地から分離され、細胞をBH3プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性BH3ドメインペプチドと接触させる前に洗浄された。血清を含む細胞培養培地の存在は、BH3ペプチドがミトコンドリア外膜透過化を誘導する能力を妨害すると予想されたので、この分離ステップが必要であった。加えて、細胞を表面(例えばアッセイプレート)に付着させることのBH3プロファイルに対する効果は未知であり、細胞に対するペプチドの効果を減少させると仮定された。したがって、以前に記載された技法は、細胞をア

50

ポトシス促進性 B H 3 ドメインペプチドに曝露する前に細胞を分離および洗浄することを含んでいた。これらの追加的な分離ステップおよび洗浄ステップは、工程を骨の折れるものにし、ヒト作業者の取り扱いを相当量伴っており、それにより、アッセイにおける誤りのリスクを増加させた。加えて、工程は、分離ステップおよび洗浄ステップの間の材料損失のために多数の細胞を要した。これらの制限は、いくつかの物流上の障壁を課し、個別化医療にまたは薬物スクリーニングツールとして使用することができる自動化またはハイスループット法に工程の規模を調整する (s c a l e) ことを困難にした。

【 0 0 4 2 】

本発明は、部分的に、細胞培養培地、塩類溶液 (例えば P B S)、および血清の存在が、 B H 3 ペプチドがミトコンドリア外膜透過化を誘導する能力を妨害しないので、ダイナミック B H 3 プロファイリングを行うために細胞を培養プレートから取り出す必要がないという驚くべき発見に基づく。その上、付着細胞を除去してしまうことが多い精力的な洗浄ステップ (例えば、細胞の上部にほとんど残留体積がない場合) は、不必要である。その代わりに、プレートのウェル中で薬物および B H 3 ドメインペプチドを用いて細胞を逐次的に処理することができる。これは、以前に記載されたダイナミック B H 3 プロファイリングのプロトコールに比べて決定的な進歩に相当する。技法は、今や全自動化することができ、作業者の偏りおよび高度に矛盾するデータを招くおそれがあるヒトの取り扱いをほとんど伴わない。自動化は、以前は不可能であった大規模薬物スクリーニングのための技法を使用できるようにする。また、アッセイは、必要な細胞数がより少ない。以前に記載されたダイナミック B H 3 プロファイリングの技法は、1つの条件あたり細胞 1 0 0 0 万から 3 0 0 0 万個の間を必要とする一方で、本発明の方法は、ウェル 1 個あたりわずか細胞 1 0 0 個、例えばウェル 1 個あたりわずか細胞 2 5 0 個を使用してシグナルを測定することができる。この細胞数の少なくとも 1 0 分の 1、例えば少なくとも 1 0 0 分の 1 の減少は、全自動化と一緒にあって、一次ヒト腫瘍、患者由来異種移植片または遺伝的に操作された動物腫瘍モデルを薬物のスクリーニングに使用することを容易にする。

【 0 0 4 3 】

ダイナミック B H 3 プロファイリングは、多様な B H 3 プロファイリング緩衝液濃度で実施することができることも発見された。驚くことに、細胞は、より高い濃度 (例えば、 $2 \times \sim 4 \times$) の B H 3 プロファイリングに耐容性を示し得ることが見出された。これは、方法をハイスループット薬物スクリーニングに適切なマイクロウェル環境で実施可能にする。

【 0 0 4 4 】

一部の態様では、本開示は、試験作用因子に対する細胞の感受性を予測する方法であって、血清を有する培養培地中、試験作用因子の存在下および非存在下で、接着性固体表面上にて細胞を培養するステップ；細胞を B H 3 プロファイリング緩衝液およびアポトシス促進性 B H 3 ドメインペプチドと接触させるステップ；細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型ミトコンドリア外膜透過化 (M O M P) の量を測定するステップ；および試験作用因子の存在下で培養された細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量を、試験作用因子の非存在下で培養された細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量と比較するステップを含み、試験作用因子の非存在下で培養された細胞における B H 3 ドメインペプチド誘導型 M O M P の量と比較した、試験作用因子の存在下で培養された細胞における M O M P の増加は、細胞が試験作用因子に対して感受性であることを示す、方法を提供する。

【 0 0 4 5 】

「血清を有する培養培地中、試験作用因子の存在下および非存在下で細胞を培養すること」は、試験作用因子の存在下および非存在下で細胞を適切な条件で培養して成長させることを意味する。「培養培地」(本明細書において「細胞培養培地」または「培地」とも呼ばれる) は、細胞の生存度を維持して増殖を支援する栄養素を含有する、細胞を培養するための培地である。本開示は、細胞を培養するための様々なパラメーターおよび条件を企図する。本発明は、細胞培養培地および血清の存在がダイナミック B H 3 プロファイリ

ングの感度に影響しないという驚くべき発見に部分的に基づく。したがって、一部の実施形態では、細胞は、血清を有する培養培地中で培養される。細胞培養培地は、以下の栄養素：塩、緩衝剤、アミノ酸、グルコースまたは他の糖、抗生物質、血清または血清代替物、およびペプチド増殖因子などの他の要素のいずれかを適切な量および組合せで含有し得る。細胞培養培地は、当技術分野において公知であり、天然培地または人工培地として分類され得る。細胞培養培地の例には、非限定的に、最小必須培地（MEM）、ダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）およびロズウェルパーク記念研究所培地（RPMI）が含まれる。細胞を培養するために適切な培地の選択は、当業者の能力の範囲内である。

【0046】

一部の細胞株（Colo205、HCT116、HT55）は、洗浄の間に接着しており、また一部は洗浄の間かなりの消失を示す。この細胞消失は、低残留体積で細胞を洗浄することの公知の特徴であり、より高い残留体積で減弱する。以前は、培地または洗浄緩衝液の残留体積がある状態で、BH3プロファイリングを行うことができることも、細胞によって耐容され得るBH3プロファイリング緩衝液の濃度も分かっていなかった。したがって、一部の実施形態では、細胞は、接着性固体表面上で培養される。この付着は、BH3プロファイル後の定量分析を容易にする。付着の非存在下で、細胞は消失する、またはしばしばウェルの縁に移動して定量分析を制限する。一部の実施形態では、固体表面はマルチウェルプレートである。マルチウェルプレートは、プラスチック（例えばポリスチレン）またはガラス製の可能性がある。一般的に、マルチウェルプレートは、96、384または1536ウェルのアレイを含む。一部の実施形態では、固体表面は、表面への細胞の接着に好都合なように処理される。一部の実施形態では、表面は、コロナ放電によって処理される。あるいは、表面は、接着促進化合物で処理される場合がある。接着促進化合物には、非限定的に、ポリ-D-リシン、ポリエチレンジイミン（PEI）、コムギ胚芽凝集素（WGA）および細胞外マトリックスタンパク質（例えば、コラーゲン1、ラミニニン、コラーゲン4およびフィブロネクチン）が含まれる。それ自体、細胞外マトリックスタンパク質を分泌する他の非がん細胞も、がん細胞と並べて表面上で培養することができる。一部の実施形態では、接着促進化合物は、細胞表面タンパク質に対する抗体である。例えば、がん細胞表面タンパク質（EpCam、CD19、CD45など）に特異的な抗体が表面にコーティングされ、がん細胞が添加されるとがん細胞を表面に接着させる場合がある。一部の実施形態では、接着促進化合物はストレプトアビジンであり、細胞はビオチン化される。

【0047】

細胞は、培養培地中において、試験作用因子が細胞をプログラム細胞死により近づけるのを可能にするために十分な、適切な条件および時間で培養される。一部の実施形態では、細胞は、オルガノイドの形態で培養される。BH3プロファイルを生成するために適切な任意の数の細胞を使用することができる。細胞数は、培養プレートのウェル1個あたりの細胞数として表現することができる。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約100個からウェル1個あたり約10000個の間の範囲である。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約100個からウェル1個あたり約500個の間の範囲である。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約200個からウェル1個あたり約10000個の間の範囲である。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約250個からウェル1個あたり約500個の範囲である。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約300個からウェル1個あたり約750個の範囲である。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約400個からウェル1個あたり約600個の範囲である。一部の実施形態では、細胞数は、ウェル1個あたり約100、約150、約200、約250、約300、約350、約400、約450、または約500個である。適切な条件は、細胞を細胞培養インキュベーターで標準的な細胞培養条件下（例えば、相対湿度>80%の空気および5~10%CO₂という加湿雰囲気中で37℃）で成長させることを含む。一部の実施形態では、細胞は、試験作用因子の存在下または非存在下で少なくとも30分間、45分間、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、16

10

20

30

40

50

時間、20時間、1日間、少なくとも2日間、少なくとも3日間、または少なくとも4日間培養される。

【0048】

試験作用因子に対する細胞感受性は、細胞または細胞要素（例えば、ミトコンドリア）をBH3プロファイリング緩衝液およびアポトーシス促進性BCL-2ファミリーからのBH3ドメインペプチドまたは直接ミトコンドリア活性を有する小型分子と接触させることによって決定される。これには、非限定的にABT-199、ABT-263、ABT-737、WEHI-539、A-1210477、およびABT-199が含まれる。BH3ペプチドがミトコンドリア外膜透過化(MOMP)を誘導する能力は、試験作用因子に曝露された細胞（または細胞要素、例えばミトコンドリア）および試験作用因子に曝露されなかった対照細胞（または細胞要素、例えばミトコンドリア）において測定される。試験作用因子の非存在下で培養された細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較して、試験作用因子の存在下で培養された細胞におけるBH3ペプチド誘導型MOMPが増加することは、細胞が試験作用因子に対して応答性である（例えば、細胞死が誘導される）ことを示す。試験作用因子の非存在下で培養された細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較して、試験作用因子の存在下で培養された細胞においてMOMPが変化しないことは、薬物が細胞死の誘導に効果を有さないことを示す。試験作用因子の非存在下で培養された細胞におけるBH3ドメインペプチド誘導型MOMPの量と比較して、試験作用因子の存在下で培養された細胞においてMOMPが減少することは、試験作用因子が細胞に脱感作効果または保護効果を有することを示す。BH3ドメインペプチド誘導型細胞死に関して脱感作効果または保護効果を有する試験作用因子は、他の非がん疾患（例えば神経変性疾患）を処置するために、または化学療法誘導型毒性から異なる細胞型を保護するための併用療法として、潜在的に有用な作用因子である。

【0049】

試験作用因子に曝露されていない細胞のBH3ペプチド誘導型MOMPのレベルと比較した、試験作用因子に曝露された細胞のBH3ペプチド誘導型MOMPのレベルにおける差は、統計的に有意である。統計的に有意であるということは、変化が、単なる偶然で起こると予想され得るものよりも大きいことを意味する。有意差は、適切な統計検定を使用することによって特定され得る。統計的有意性の検定は、当技術分野において周知であり、Petrucelli, ChenおよびNandramによるApplied Statistics for Engineers and Scientists、1999年、再版に例示されている。

【0050】

本明細書に使用される用語「BH3プロファイリング緩衝液」は、糖、pH緩衝剤、塩、キレート剤およびMOMPの測定を行うために有用な電子伝達鎖のための炭素源を含む水溶液を指す。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、トレハロース由来実験緩衝液(DTEB)である。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液はマンニトール実験緩衝液(MEB)である。DTEBは、135mMトレハロース、10mM Hepes、50mM KCl、20μM EGTA、20μM EDTA、0.1% BSAおよび5mMスクシネートから構成される。MEBは、150mMマンニトール、10mM Hepes、50mM KCl、20μM EGTA、20μM EDTA、0.1% BSAおよび5mMスクシネートから構成される。マンニトールの代わりにスクロースおよび他の糖が使用される場合がある。KClのいくつかの増加は耐容されるが、BH3プロファイリングに有害な可能性がある。濃縮緩衝液(2×~5×)は、下の表1に記載されるように、上記試薬の濃度を比例的に増加させることを必要とする。

【表 1】

表 1:マンニトール実験緩衝液(MEB)の組成

	1X	2X	3X	4X	5X
マンニトール	150 mM	300 mM	450 mM	600 mM	750 mM
HEPES-KOH	10 mM	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM
KCl	50 mM	100 mM	150 mM	200 mM	250 mM
EGTA	0.02 mM	0.04 mM	0.06 mM	0.08 mM	0.1 mM
EDTA	0.02 mM	0.04 mM	0.06 mM	0.08 mM	0.1 mM
BSA	0.10%	0.20%	0.30%	0.40%	0.50%
スクシネート	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM	25 mM

10

【 0 0 5 1 】

任意の特定の理論に縛られることを望むわけではないが、増加した緩衝液濃度（例えば $2 \times \sim 5 \times$ 緩衝液）は、血清を有する培地の存在下で B H 3 プロファイリングを実施できるようにする。一部の実施形態では、緩衝液の濃度は、約 $1 \times$ から約 $5 \times$ の範囲である。一部の実施形態では、緩衝液の濃度は、約 $1 \times$ から $4 \times$ の範囲である。一部の実施形態では、緩衝液の濃度は、約 $2 \times$ から約 $3 \times$ の範囲である。一部の実施形態では、緩衝液の濃度は、約 $1 \times$ 、約 $2 \times$ 、約 $3 \times$ 、約 $4 \times$ 、または約 $5 \times$ である。一部の実施形態では、緩衝液の濃度は、 $1 \times$ 、 $2 \times$ 、 $3 \times$ 、 $4 \times$ 、または $5 \times$ である。

20

【 0 0 5 2 】

アポトーシス促進性 B C L - 2 B H 3 タンパク質およびペプチドには、B c l - 2 相互作用性細胞死媒介因子 (B I M) ; その変異体 (B I M A V) ; B H 3 相互作用性ドメインスアゴニスト (B I D) ; B c l - 2 関連死プロモーター (B A D) ; N O X A ; アポトーシスの p 5 3 アップレギュレーション型モジュレーター (P U M A) ; B c l - 2 改変因子 (B M F) およびハラキリ (h a r a k i r i) (H R K) が含まれる (表 2 参照)。

【 0 0 5 3 】

一部の実施形態では、方法は、B H 3 ドメインペプチドとの接触の後、その前、またはそれと同時に細胞を透過化するステップを含む。一般的に、透過化は、ミトコンドリア外膜を透過化することなしに細胞膜が透過性になるように、細胞を試薬で処理する工程を指す。透過化のために使用される試薬には、有機溶媒（例えば、アセトンおよびメタノール）および洗剤（例えば、ジギトニン、サポニン、トリトン X - 1 0 0 および T w e e n - 2 0 ）が含まれる。任意の特定の理論に縛られることを望むわけではないが、細胞は、ミトコンドリアへの B H 3 ペプチドの接近を可能にするように透過化される。細胞は、当技術分野において公知の方法によって透過化される。例えば、細胞は、細胞をジギトニン、サポニン、メタノール、トリトン X - 1 0 0 または当技術分野において認識されている他の細胞透過化剤と接触させることによって透過化される。一部の実施形態では、B H 3 プロファイリング緩衝液は、ジギトニンまたはサポニンなどの透過化試薬を含む。

30

【 0 0 5 4 】

当業者は、培養細胞に試験作用因子、B H 3 プロファイリング緩衝液および / または B H 3 ドメインペプチドを添加するためのいくつかの方法を認識している。例えば、ハイスループット薬物スクリーニングのために、一般的に自動液体取り扱いシステムが利用される。自動液体取り扱いシステムは、アッセイプレートのウェルに一定体積の液体を分配するために、ロボットアームによって制御される液体分注容器のアレイを利用する。一般的に、アレイは、9 6 , 3 8 4 または 1 5 3 6 個の液体分注チップを含む。自動液体取り扱いシステムの非限定的な例には、デジタル分注器（例えば、H P D 3 0 0 デジタル分注器）およびピンニングマシン (p i n n i n g m a c h i n e) (例えば、M U L T I - B L O T (商標) R e p l i c a t o r S y s t e m , C y B i o , P e r k i n E l m e r J a n u s) が含まれる。本開示により非自動化方法も企図されており、そ

40

50

れには、非限定的に、手動デジタル式繰り返しマルチチャンネルピペットが含まれる。

【0055】

細胞をBH3ドメインペプチドで処理した後、ミトコンドリア外膜透過化(MOMP)が測定される。外膜の透過化はいくつかの方式で測定することができる。例えば、外膜の透過化は、ミトコンドリア膜電位の消失を決定することによって測定することができる。ミトコンドリア膜電位の消失は、例えば電位差測定用色素または放射測定用色素(radiometric dye)で細胞を処理することによって測定される。電位差測定用色素の例には、非限定的に、蛍光JC-1プローブ(5, 5', 6, 6'-テトラクロロ-1, 1', 3, 3'-テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニンヨージド)もしくはジヒドロローダミン123、またはテトラメチルローダミンメチルエステル(TMRE)もしくはテトラメチルローダミンエチルエステル(TMRE)が含まれる。これらおよび他の電位差測定用色素は、当技術分野において周知である。

10

【0056】

あるいは、外膜の透過化は、ミトコンドリア膜間腔からの分子の放出を測定することによって決定される。ミトコンドリア膜間腔から放出される分子の例には、チトクロームc、SMAC/Diablo、Omi、アデニル酸キナーゼ-2、またはアポトーシス誘導因子(AIF)が含まれる。ミトコンドリア膜間腔からの分子の放出は、当技術分野において周知の方法によって測定することができる。例えば、分子の放出は、分子に対する抗体、すなわち、チトクロームc、SMAC/Diablo、Omi、アデニル酸キナーゼ-2またはアポトーシス誘導因子(AIF)に対する抗体を使用することによって測定することができる。検出は、例えば、ELISA、FACS、免疫プロット、免疫蛍光法、免疫組織化学法、プレート蛍光定量法、蛍光イメージングまたは自動画像解析による可能性がある。細胞の分析は、顕微鏡法を使用して手動で成し遂げることができ、または例えば核の位置を特定するためにCellProfilerもしくはMetamorph画像解析ソフトウェアなどのソフトウェアを使用することによって自動化することもできる。

20

【0057】

外膜の透過化を測定する前に、任意選択で、細胞は固定される。細胞は、アルデヒド(例えばホルムアルデヒド)またはメタノールを使用することによってなどの、当技術分野において公知の方法によって固定される。

【0058】

ミトコンドリア外膜の透過化は、単一細胞レベルまたは多細胞レベルで測定することができる。追加的に、本明細書に開示の方法の一部は、細胞の亜集団をアッセイすることを可能にする。例えば、腫瘍特異的マーカーまたは腫瘍関連マーカー(例えばEpCam)を使用して腫瘍細胞を特定することができる。これは、正常細胞と腫瘍細胞とを識別できるようにする。次に、腫瘍細胞においてMOMPが本明細書に記載のように測定される。

30

【0059】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法に使用される細胞は、がん細胞、またはがん性であることが疑われる細胞である。一部の実施形態では、細胞は、不死化がん細胞株を含む。一部の実施形態では、細胞は、不死化マウスまたはヒトがん細胞株である。一部の実施形態では、細胞は、非悪性のヒトまたはマウス初代細胞である。樹立されたがん細胞株は当技術分野において周知であり、それらには、例えば膵臓がん細胞株(例えば、YAPC、Panc02.03およびSU86.86など)、乳がん細胞株(例えば、AU565、BT-20、CAL-120、HME1およびKPL-1など)、腎臓がん株(例えば、769-P、ACNH、HEK TE、SLR20およびUMRC2など)、骨がん細胞株(例えば、CAL-78、HOS、MG-63およびSK-ES-1など)およびリンパ系がん細胞株(例えば、AML-193、BDCM、CML-T1およびJM1など)が含まれる。当業者は、他のがん細胞株、例えばBarretinaら(The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. Nature. 2012年3月28日; 483巻(7391号))

40

50

：603～7頁。doi：10.1038/nature11003）に開示されているものを認識している。一部の実施形態では、細胞は被験体由来する。例えば、がん細胞は、外科的技法（例えば、生検）によって被験体から単離される場合がある。したがって、一部の実施形態では、細胞は初代腫瘍細胞、例えば初代ヒト腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、培養ヒト細胞である。一部の実施形態では、細胞は初代動物腫瘍細胞である。一部の実施形態では、細胞は、患者由来異種移植片（PDX）を含む。本明細書に使用される用語「患者由来異種移植片」（PDX）は、免疫不全マウスへのがん性一次腫瘍の移植によって生成した組織を指す。

【0060】

接着性固体表面上で細胞を培養することを含む方法に、非がん性細胞を使用することもできる。一部の実施形態では、非がん性細胞は、健常細胞（例えば、いかなる明白なまたは潜伏した病的状態も有さない細胞）である。一部の実施形態では、非がん性細胞は、感染作用因子、例えばウイルスまたは細胞内細菌に感染している。一部の実施形態では、非がん性細胞は、その他の点では正常に機能していない器官からのものである。一部の実施形態では、非がん性細胞は、ストレス、例えばとりわけ低酸素、卒中、心筋梗塞などの血管ストレスを受けやすい。一部の実施形態では、細胞は、ヒトまたは動物組織に由来する健康な細胞である。例えば、本明細書に提供されるBH3プロファイリングアッセイに、例えば、BH3ドメインペプチド誘導型細胞死に対して保護効果を示す作用因子を特定するために、血清を有する培養培地中、接着性固体表面上で細胞を培養することを伴うアッセイに、非がん性細胞を使用することができ、そのような作用因子は、神経変性疾患の間に細胞死のプライミングを低下させるために有用であり得る。別の実施形態では、マウスが特定の作用因子で処置され、次に屠殺される場合がある。作用因子が毒性効果を有するかどうかを特定するために、例えば、接着性固体表面上で細胞を培養することを伴う、本開示によるハイスループットBH3プロファイリングがマウスの組織に行われる場合がある。あるいは、正常な一次組織に対して薬物の毒性スクリーニングを行うために、例えば、接着性固体表面上で細胞を培養することを伴う、本開示によるハイスループットBH3プロファイリングが正常細胞のパネルに対して実施される場合がある。例えば、接着性固体表面上で細胞を培養することを伴う、本開示による正常細胞のBH3プロファイリングは、環境中の毒性作用因子（例えば、放射線、ガス、生物学的作用因子など）の存在について試験するためにも有用であり得る。

【0061】

本明細書に使用される「被験体」は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物は、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシである。一部の実施形態では、被験体は、遺伝的に改変された動物である。例えば、特定のがんを発生するようにマウスを遺伝的に操作することができる。一部の実施形態では、被験体は、以前にがんを有すると診断されており、すでにがんの処置を受けている可能性がある。あるいは、一部の実施形態では、被験体は、以前にがんを有すると診断されていない。

【0062】

本開示による例示的な試験作用因子には、非限定的に、小型有機分子、小型無機分子、ペプチド、タンパク質、タンパク質類似体、酵素、核酸、核酸類似体、抗体、抗原、ホルモン、脂質、多糖、増殖因子、ウイルス、細胞、生物活性剤、薬学的薬剤、ならびにそれらの組合せおよびプロドラッグが含まれる。一部の実施形態では、試験作用因子は、化学療法剤などの抗がん剤である。さらなる例示的な試験作用因子には、非限定的に、ガス、微粒子、放射線、電磁放射線、およびエアロゾルが含まれる。

【0063】

小型分子化学療法剤の例には、アルキル化剤（シクロホスファミド、クロルメチン、テモゾロミド）、アントラサイクリン（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン）、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（ボリノスタット、ロミデプシン）、トポイソメラーゼI/II阻害剤（イリノテカン、トポテカン、エトポシド）、キナーゼ阻害剤（ゲフィチニブ、イマチニブ、ボルテゾミブ）、

ヌクレオチド類似体および前駆体類似体（アザシチジン、フルオロウラシル、メトトレキサート）、白金系薬剤（シスプラチン、カルボプラチン）、レチノイド（アリトレチノイン、ベキサロテン）ならびにピンカアルカロイド（ピンブラスチン、ビンデシン、ビンノレピン）が含まれる。ペプチドおよびタンパク質の例には、プレオマイシン、ダクチノマイシン、抗腫瘍抗体（抗HER2/neu、アレムツズマブ、トラスツズマブ、ブレンツキシマブ）が含まれる。当業者は、がんに関係する遺伝子の発現を標的化するRNAi分子としての化学療法RNAi分子を認識している。例えば、HoxA1に対するRNAi分子は、Brockら、Sci Transl Med 6巻217ra2頁（2014年）によって開示されたように、乳腺腫瘍細胞の形成を阻害することができる。一部の実施形態では、化学療法剤には、非限定的に、キナーゼ阻害剤、アポトーシス誘導因子、血管新生阻害剤、およびモノクローナル抗体が含まれる。

10

【0064】

一部の態様では、本開示は、個別化医療に関する。一部の実施形態では、本明細書に記載の方法は、化学療法レジメンのカスタマイズに有用である。例えば、公知の化学療法剤のパネルに対するがんの感受性を決定するために、がんを有する被験体から単離されたがん細胞に対してハイスループットBH3プロファイリングを行うことができる。化学療法剤には、非限定的に、キナーゼ阻害剤、アポトーシス誘導因子、血管新生阻害剤、およびモノクローナル抗体が含まれる。

【0065】

一部の態様では、本開示は創薬に関する。一部の実施形態では、本開示によって記載される方法は、細胞をプログラム細胞死により近づける新薬を特定するために試験作用因子の大型ライブラリーをスクリーニングするために有用である。

20

【0066】

アポトーシス促進性BCL-2 BH3ドメインペプチド

アポトーシス促進性BCL-2 BH3ドメインペプチドは、以前にWO2014/047,342に記載されており、その内容は、参照により本明細書に組み込まれる。特に、アポトーシス促進性BCL-2 BH3ドメインペプチドは195アミノ酸長未満であり、例えば、150、100、75、50、35、25または15アミノ酸長未満またはそれと等しい。アポトーシス促進性BCL-2 BH3ペプチドの非限定的な例には、Bcl-2相互作用性細胞死媒介因子（BIM）；その変異体（BIM AV）；BH3相互作用性ドメインデスアゴニスト（BID）；Bcl-2関連死プロモーター（BAD）；NOXA；アポトーシスのp53アップレギュレーション型モジュレーター（PUMA）；Bcl-2改変因子（BMF）およびハラキリ（HRK）が含まれる。

30

【0067】

一部の実施形態では、アポトーシス促進性BCL-2 BH3ドメインペプチドは、表2に示される配列番号1～15の配列を含む。PUMA2A（配列番号16）は、陰性対照ペプチドである。

【表 2】

表 2:アポトーシス促進性

ペプチド	配列	配列番号
BIM	Ac-MRPEIWIAQELRRIGDEFNA-NH ₂	1
BIM AC	AC-MRPEIWIAQELRRIGDEFNV-NH ₂	2
BID	EDIIRNIARHLAQ VGD SMDR	3
BIM AV	MRPEIWIAQELRRIGDEFNA	4
BID mut	EDIIRNIARHAAQVGASMDR	5
BAD	LWAAQRYGRELRRMSDEFEGSFKGL	6
BIK	MEGSDALALRLACIGDEMDV	7
NOXA A	AELPPEFAAQLRKIGDKVYC	8
NOXA B	PADLKDECAQLRRIGDKVNL	9
HRK S S	AAQLTAARLKALGDELHQ	10
PUMA	EQWAREIGAQLRRMADDLNA	11
BMF	HQAEVQIARKLQLIADQFHR	12
huBAD	NLWAAQRYGRELRRMSDEFVDSFKK	13
BAD mut	LWAAQRYGREARRMSDEFEGSFKGL	14
MS1	RPEIWMTQGLRRLGDEINAYYAR	15
PUMA2A	EQWAREIGAQARRMAADLNA	16

【 0 0 6 8 】

一部の実施形態では、B H 3 ドメインペプチドは、配列 N H₂ - X X X X X X X X X X L X X X X D X X X X - C O O H (配列番号 1 7) を (全体的または部分的に) 含むペプチドを含む。本明細書に使用される X は、任意のアミノ酸であり得る。あるいは、B H 3 ドメインペプチドは、配列番号 1 7 の少なくとも 5、6、7、8、9、15 個またはそれを超えるアミノ酸を含む。

【 0 0 6 9 】

B H 3 ドメインペプチドは、標準的な改変を使用して改変することができる。改変は、アミノ (N -) 末端、カルボキシ (C -) 末端、内部、または前述のいずれかの組合せで起こり得る。本明細書に記載の一態様では、ポリペプチドに 1 種類を超える改変があり得る。改変には、非限定的に、アセチル化、アミド化、ビオチン化、シンナモイル化、ファルネシル化、ホルミル化、ミリストイル化、パルミトイル化、リン酸化 (S e r、T y r または T h r)、ステアロイル化、スクシニル化、スルフリル化および環化 (ジスルフィド架橋またはアミド環化を介する)、ならびに C y s 3 または C y s 5 による改変が含まれる。改変された B H 3 ドメインペプチドは、B H 3 ドメインペプチドの生物学的活性を保持する。生物学的活性を保持することにより、必ずしも天然に存在する B H 3 ドメインポリペプチドと同じレベルの効力ではないにしろ、B H 3 ポリペプチドによって細胞死が誘導されることを意味する。誘導されるおよび刺激されるという用語は、本明細書全体にわたり互換的に使用される。

【 0 0 7 0 】

任意選択で、B H 3 ドメインペプチドは、形質導入ドメインに付着される。形質導入ドメインは、それが存在するペプチドを所望の細胞の目的地に方向付ける。したがって、形質導入ドメインは、ペプチドが形質膜を横切るように、例えば細胞外から形質膜を通過して細胞質に入るように方向付けることができる。代替的または追加的に、形質導入ドメインは、ペプチドを細胞内の所望の位置、例えば核、リボソーム、E R、ミトコンドリア、リソソーム、またはペルオキシソームに方向付けることができる。一部の実施形態では、形質導入ドメインは、公知の膜トランスポレーション配列に由来する。あるいは、形質導

入ドメインは、ポリエチレングリコール、コレステロール部分、オクタン酸およびデカン酸などの、膜取込みを促進することが公知の化合物である。形質導入ドメインは、BH3ドメインペプチドのN末端またはC末端のいずれかに連結される場合がある。

【0071】

BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、または両方の組合せのポリマーであり得る。あるいは、BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、環状ペプチドである。環状ペプチドは、当技術分野において公知の方法によって調製される。例えば大環状化は、多くの場合にペプチドN末端とC末端との間、側鎖とN末端もしくはC末端との間[例えば、pH 8.5でK3Fe(CN)6を用いる](Samsonら、Endocrinology、137巻:5182~5185頁(1996年))、または2つのアミノ酸側鎖の間にアミド結合を形成することによって成し遂げられる。例えば、DeGrado、Adv Protein Chem、39巻:51~124頁(1988年)を参照されたい。

【0072】

BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、現代のクローニング技法を使用して調製される、または固体法もしくは部位特異的変異誘発によって合成され得る。一部の実施形態では、ネイティブなBH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、標準的なタンパク質精製技法を使用した適切な精製スキームによって細胞または組織供給源から単離することができる。別の実施形態では、BH3ドメインポリペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、組換えDNA技法によって産生される。組換え発現の代わりに、BH3ドメインペプチドおよび/または形質導入ドメインペプチドは、標準的なペプチド合成技法を使用して化学合成することができる。

【0073】

様々な実施形態では、BH3ペプチドは、その二次構造、例えば α -ヘリックス構造を維持する。ヘリックスの安定化方法は、当技術分野において公知である。

【0074】

「単離された」または「精製された」BH3ドメインペプチドは、BH3ドメインペプチドが由来する細胞もしくは組織供給源からの細胞物質もしくは他の混入タンパク質を実質的に含まない、または化学合成された場合、化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない。

【0075】

マルチウェルプレート

一部の態様では、本開示は、試験治療剤およびBH3ドメインペプチドを含むマルチウェル細胞培養プレートであって、各ウェルが接着性作用因子でコーティングされている、マルチウェル細胞培養プレートを提供する。一部の実施形態では、マルチウェルプレートは、プラスチックまたはガラスである。一部の実施形態では、マルチウェルプレートは、6、24、96、384または1536ウェルのアレイを含む。しかし、当業者は、マルチウェルプレートが、6、24、96、384または1536の倍数であるウェルの数を有するマルチウェルプレートのように、他の許容され得る多様な構成に構築され得ることを認識している。例えば、一部の実施形態では、マルチウェルプレートは、(1536の倍数である)3072ウェルのアレイを含む。

【0076】

一部の実施形態では、プレートの各ウェルは、接着性作用因子でコーティングされている。一部の実施形態では、接着性作用因子は、ポリ-D-リシン、ポリエチレンジイミン(PEI)、またはコムギ胚芽凝集素(WGA)である。一部の実施形態では、接着性作用因子は、細胞外マトリックス(ECM)タンパク質である。一部の実施形態では、ECMタンパク質は、コラーゲン1、ラミニン、コラーゲン4およびフィブロネクチンからなる群より選択される。一部の実施形態では、接着性作用因子は、ECMタンパク質の組合せ(例えば、マトリゲル、またはフィーダー細胞によって分泌される1種もしくは複数のE

ＣＭタンパク質）である。一部の実施形態では、接着性作用因子は抗体である。例えば、細胞表面タンパク質に対する抗体が、マルチウェルプレートの各ウェルにコーティングされる場合がある。一部の実施形態では、接着性作用因子はストレプトアビジンである。

【 0 0 7 7 】

本明細書に使用される用語「試験治療剤」は、特定の疾患に関するその治療的価値を決定するために評価されている分子、ペプチド、タンパク質、もしくは化合物またはそれらの組合せを指す。例えば、新しいモノクローナル抗体の能力が腫瘍細胞におけるアポトーシスを誘導する能力について試験される場合がある。一部の実施形態では、プレートは、試験治療剤を含む。一部の実施形態では、試験治療剤は化学療法剤である。一部の実施形態では、プレートは、１種を超える試験治療剤を含む。例えば、各薬剤を単独または別の薬剤と組合せて化学療法剤のパネルを試験するために、プレートが使用される場合がある。一部の実施形態では、プレートの各ウェルは、単一の試験治療剤を含む。一部の実施形態では、プレートの各ウェルは、少なくとも２種、少なくとも３種、少なくとも４種、少なくとも５種、少なくとも６種、少なくとも７種、少なくとも８種、少なくとも９種または少なくとも１０種の治療剤を含む。一部の実施形態では、プレートの各ウェルは、１０種を超える治療剤を含む。

【 0 0 7 8 】

化学療法剤の非限定的な例には、小型分子、ペプチドまたはタンパク質（例えば、ペプチド抗生物質および抗体）およびRNA干渉（RNAi）分子が含まれる。小型分子化学療法剤の例には、アルキル化剤（シクロホスファミド、クロルメチン、テモゾロミド）、アントラサイクリン（ダウノルビシン、ドキソルビシン、ミトキサントロン）、タキサン（パクリタキセル、ドセタキセル）、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤（ボリノスタット、ロミデプシン）、トポイソメラーゼⅠ／Ⅱ阻害剤（イリノテカン、トポテカン、エトポシド）、キナーゼ阻害剤（ゲフィチニブ、イマチニブ、ボルテゾミブ）、ヌクレオチド類似体および前駆体類似体（アザシチジン、フルオロウラシル、メトトレキサート）、白金系薬剤（シスプラチン、カルボプラチン）、レチノイド（アリトレチノイン、ベキサロテン）ならびにピンカアルカロイド（ピンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン）が含まれる。ペプチドおよびタンパク質の例には、プレオマイシン、ダクチノマイシン、抗腫瘍抗体（抗HER2/neu、アレムツズマブ、トラスツズマブ、ブレンツキシマブ）が含まれる。当業者は、がんに関係する遺伝子の発現を標的化するRNAi分子としての化学療法RNAi分子を認識している。例えば、Hox A1に対するRNAi分子は、Brockら、Sci Transl Med 6巻217ra2頁（2014年）によって開示されたように、乳腺腫瘍細胞の形成を阻害することができる。

【 0 0 7 9 】

一部の実施形態では、マルチウェルプレートは、BH3ドメインペプチドを含む。一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、またはHRKポリペプチドのBH3ドメインに由来する。一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、配列番号１～１５からなる群より選択される。一部の実施形態では、プレートは、１つ超のBH3ドメインペプチドを含む。例えば、一部の実施形態では、プレートは、少なくとも２種、少なくとも３種、少なくとも４種、少なくとも５種、少なくとも６種、少なくとも７種、少なくとも８種、少なくとも９種または少なくとも１０種のBH3ドメインペプチドを含む。

【 0 0 8 0 】

キット

本発明の一部の態様は、BH3プロファイリングを行うためのキットを含む。一部の実施形態では、キットは、試験治療剤およびBH3ドメインペプチドを有するマルチウェルプレートを含む。一部の実施形態では、マルチウェルプレートの各ウェルは、接着性作用因子でコーティングされている。一部の実施形態では、接着性作用因子はECMタンパク質である。一部の実施形態では、ECMタンパク質は、コラーゲン１、ラミニン、コラーゲン４およびフィブロネクチンからなる群より選択される。一部の実施形態では、接着性

作用因子は抗体である。例えば、細胞表面タンパク質に対する抗体は、マルチウェルプレートの各ウェルにコーティングされる場合がある。一部の実施形態では、接着性作用因子はストレプトアビジンである。

【0081】

一部の実施形態では、キットは、試験治療剤を有するマルチウェルプレートを含む。一部の実施形態では、試験治療剤は化学療法剤である。一部の実施形態では、キットは、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種または少なくとも10種の治療剤を有するマルチウェルプレートを含む。一部の実施形態では、キットは、各ウェルが10種を超える治療剤を含むマルチウェルプレートを含む。一部の実施形態では、キットは、BH3ドメインペプチドを有するマルチウェルプレートを含む。一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、BID、BIM、BAD、NOXA、PUMA、BMF、またはHRKポリペプチドのBH3ドメインに由来する。一部の実施形態では、BH3ドメインペプチドは、配列番号1～15からなる群より選択される。

10

【0082】

一部の態様では、キットは、BH3プロファイリング緩衝液を収容するバイアルをさらに含む。一部の実施形態では、バイアルは、ガラスまたはプラスチック製バイアルである。一部の実施形態では、バイアルは、その表面に体積測定目盛を備える。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、1×、2×、3×、4×、5×、6×、7×、8×、9×、または10×の濃度である。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、10×を超える濃度である。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液は、トレハロース由来実験緩衝液(DTEB)またはマンニトール実験緩衝液(MEB)である。一部の実施形態では、BH3プロファイリング緩衝液に、透過化剤が補充される。一部の実施形態では、透過化剤はジギトニンまたはサポニンである。

20

【0083】

一部の実施形態では、キットは、電位差測定用色素をさらに含む。一部の実施形態では、電位差測定用色素は、5, 5', 6, 6'-テトラクロロ-1, 1', 3, 3'-テトラエチルベンゾイミダゾリルカルボシアニンヨージド(JC-1)、ジヒドロローダミン123、テトラメチルローダミンメチルエステル(TMRE)またはテトラメチルローダミンエチルエステル(TMRE)である。あるいは、一部の実施形態では、キットは、チトクロームc、SMAC/Diablo、Omi、アデニル酸キナーゼ-2またはアポトーシス誘導因子に対する抗体をさらに含む。

30

【0084】

一部の態様では、キットは、治療剤に対する細胞の感受性を予測するためにキットを使用するための指示をさらに含む。指示は、一般的に印刷されたパンフレットまたは紙シートとして提供されるが、指示がキットに付随すべきものであることを使用者が明確に認識するように提供された任意の口述または電子的な指示、例えば、オーディオビジュアル(例えば、ビデオテープ、DVDなど)、インターネット、および/またはウェブベースの通信なども含み得る。

【0085】

以下の非限定的な実施例で本発明をさらに例証する。

【実施例】

【0086】

(実施例1：ハイスループットダイナミックBH3プロファイリング)

ダイナミックBH3プロファイリング(DBP)は、薬物が一次ヒト腫瘍(または患者由来異種移植片)のアポトーシス感受性をどのように変化させるかを決定する。現在使用されているダイナミックBH3プロファイリングの方法は、ウェル内において細胞を化学化合物で16～24時間処理すること、細胞をウェルから取り上げること、遠心分離機を使用して細胞を培地から分離し、細胞をBH3プロファイリング緩衝液(DTEB)およびBH3プロファイリングペプチド中に入れることを伴う。内因性チトクロームcの消失

50

【 0 0 8 7 】

20

【 0 0 8 8 】

1. 腫瘍を単一細胞懸濁物にする（機械的溶解および酵素消化による）。

30

【 0 0 9 1 】

40

【 0 0 9 3 】

【 0 0 9 4 】

【 0 0 9 5 】

8. チトクローム c を染色するために染色溶液を添加する。

【0096】

9. 任意選択で、染色溶液を洗い流してバックグラウンドのシグナルを減少させる。

【0097】

10. 蛍光顕微鏡法または FACS および画像解析ソフトウェア (例えば Metamorph Image Analysis) を使用してチトクローム c の消失を定量する。

【0098】

結果

この方法は、細胞が単一細胞懸濁物の状態になった後、ほとんどヒトの取り扱いを必要としない、ほぼ全自動化された手順である (図 1)。この方法を、いくつかのがん細胞株 (図 3、4、11)、いくつかの PDX モデル (図 5)、一次腫瘍 (図 6)、および遺伝的に操作されたマウスモデル (図 7) に適用した。

【0099】

図 3 に、膵臓細胞における用量応答実験からのデータを示す。簡潔には、SU86.8 膵臓がん細胞を、用量を増加させた合成 Bim ペプチドで処理し、上記プロトコールに供した。結果は、より高濃度のペプチドでチトクローム c の漸進的な消失が起こることを示している。チトクローム c の消失は、Bim ペプチドによる細胞におけるミトコンドリア外膜透過化 (MOMP) の誘導を指し示している。

【0100】

ハイスループット BH3 プロファイリングは、以前に使用された iBH3 プロファイリングアッセイよりも減少した感受性であるが、類似した選択性を提供する。図 4 は、HTS BH3 プロファイルの結果と FACS BH3 プロファイルの結果との比較を示す。絶対 EC-50 値は、自動化顕微鏡的 BH3 プロファイルの方が系統的に高い。これは、ミトコンドリアへのペプチドの接近が困難であることに起因し得る。任意の特定の理論に縛られることを望むわけではないが、異なる分析方法の EC-50 は、それにもかかわらず類似しているため、アッセイに後方互換性があることを示している。

【0101】

ハイスループット BH3 プロファイリングは、初代ヒト腫瘍細胞、PDX からの細胞、および遺伝的に操作されたマウスモデルからの細胞にも適用可能である (図 5 ~ 7)。EpCam などの腫瘍特異的マーカーを使用して目的の細胞または腫瘍細胞を確実に特定することができる。図 8 に、8902 細胞は EpCam で染色されるが、マウス Bax/Bak ダブルノックアウト細胞は EpCam で染色されない例を提供する。追加的に、図 8 に、膵臓の患者由来異種移植片から見出される正常細胞から膵臓腫瘍細胞が区別される例を提供する。両方の例では、目的の細胞と非目的細胞との間の差を識別し、異なる集団におけるチトクローム c の放出を決定することができる。

【0102】

このプロトコールは、ヒト初代腫瘍細胞、PDX、遺伝的に操作されたマウスモデルまたは樹立されたがん細胞株のいずれかに対して多数の化合物をスクリーニングするために創薬の状況でも使用することができる (図 9)。特に、図 9 に示されるデータが単一の実験からまとめられたものであるのに対して、旧バージョンの BH3 プロファイルは、匹敵するデータ量を獲得するために数週間を要した。その上、このデータは、同じ細胞株に対する異なる生物学的実験から再現性よく生成される (図 10A ~ 10B)。

【0103】

ハイスループット BH3 プロファイリングのプロトコールは、現在使用されている BH3 プロファイリング方法が直面する多くの難題を克服するものである。第 1 に、洗浄および染色ステップのために培養プレートから細胞を取り出す必要性が排除された。新しい方法は、細胞を培養ウェル内に保ち、しかも BH3 プロファイリング緩衝液 (DTEB または MEB、ホルムアルデヒド、中和緩衝液、染色溶液) を添加している間に最適なイメージングのために細胞を接着させ続ける。これは、2 つの進歩を使用することによって達成された。第 1 に、細胞外マトリックスコーティング済みプレートまたは抗体コーティング

10

20

30

40

50

済みプレートは、B H 3 プロファイルの間に細胞を付着させ続ける。細胞外マトリックスコーティング済みプレートは、薬物インキュベーションの間により良好な細胞生存度を生み出すという追加的な利点を有する。さらに、接着性表面の使用は、イメージング平面内に細胞を保つことによって高品質の顕微鏡法を容易にし、抗体染色後の洗浄を容易にして、蛍光バックグラウンドを減少させる。

【 0 1 0 4 】

第2に、培地がほとんどまたは全く残らず、かなりの細胞消失を招く可能性がある洗浄ステップを行う代わりに（図2）、濃縮緩衝液を用いてB H 3 プロファイリングを行うことができるという発見によって、ウェルに多大な残留体積がある状態でアッセイにおける洗浄ステップを行うことが可能になる。濃縮緩衝液の使用によって容易になった比較的多大な残留体積は、そうでなければ低残留体積で経験される、細胞に適用される剪断力または圧力を減少させることによって、残留細胞数の増加をもたらした可能性がある。

10

【 0 1 0 5 】

ハイスルーブットB H 3 プロファイリングのプロトコールによって克服された別の相当な困難は、B H 3 プロファイリング緩衝液を有するウェル中にペプチドを添加することである。ペプチドが添加されてから1時間以内にミトコンドリア外膜透過化が起こるので、これは、時間に対して感受性のステップである。さらに、薬物スクリーニングの状況で、各薬物の2～4つの間のペプチド濃度が試験されるが、これは、異なるペプチド濃度を各ウェルに加える必要があることを意味している。マルチチャンネルピペットの使用は、拡大縮小可能なアプローチを提供しない。本明細書に記載のハイスルーブット方法は、培養プレートにペプチドを迅速に添加するために384ウェルピンニングマシンおよびデジタル薬物プリンター（HP D300）を利用することによってその問題を解決する。

20

【 0 1 0 6 】

ハイスルーブットB H 3 プロトコールは、多様ながん細胞株にわたりいくつかの緩衝液濃度を使用することも許容する。血清またはPBSを含有する培養培地の存在下で全ての実験を行った。図3は、2×濃縮緩衝液中のいくつかの濃度のB i mペプチドを使用して生成した、膵臓がん細胞株（SU86.86）についての用量応答曲線のデータを示す。図11A～11Cは、2×緩衝液中の100 μM B i mペプチドに対するいくつかのがん細胞株の応答を示す。2×緩衝液中のB i mを用いた全ての細胞株の処理は、蛍光顕微鏡法によって測定されるようにチトクロームcの消失をもたらした。

30

【 0 1 0 7 】

図12は、2×、3×、4×および5×緩衝液中の100 μM B i mペプチドで処理され、次に蛍光顕微鏡法によって測定された接着性膵臓がん細胞株を示す。非特異的なチトクロームcの消失は、約3×およびそれ超の濃度で起こり、一方でペプチド誘導型チトクロームcの消失は、2×緩衝液の場合のみで起こった。

【 0 1 0 8 】

図13は、2×から3×の間の緩衝液濃度は、全ての試験懸濁細胞株について許容され得る毒性プロファイルを有し、最大5×の緩衝液濃度は、一部の細胞株（例えば、MOLM-13、AML2、THP1）に無毒であることを実証している。

【 0 1 0 9 】

40

この形式で懸濁物中の細胞に関してB H 3 プロファイルを実行することができるものの、細胞が付着していないことは、顕微鏡法ベースの分析を使用した十分なデータ定量を阻止する。例えば図14は、薬物処理またはB H 3 プロファイリングの前に付着していなかった結腸がんPD X細胞の例である。細胞はウェルの隅に凝集する。これがFACS分析の最終的な問題ではないものの、これらの細胞クラスターは、顕微鏡法ベースの分析が容易ではない。対照的に、図5における結腸がんPD Xの画像は、コラーゲンIコーティング済みプレート上に蒔かれたものであり、ウェル全体に均等に分布し、顕微鏡法ベースの分析が容易である。コラーゲンIコーティング済み表面に加えて、いくつかの細胞外マトリックスコーティング済み表面は、腫瘍細胞の接着を容易にする（図15）。公知の懸濁腫瘍について、抗体コーティング済みプレートは、B H 3 プロファイル後の細胞表面への

50

付着およびそれゆえに、より良好な定量を容易にする。増強した付着の例は、卵巣腹水腫瘍およびC L L腫瘍を使用して提供される（それぞれ図16および図17）。

【0110】

ダイナミックBH3プロファイリングの以前の反復と比較して、HT-DBPは、より少ない細胞数で有効に機能する。わずか細胞100個を用いたHT-DBPの例を図18に提供する。図19に概説した予備BH3プロファイルを使用して、必要細胞数のさらなる減少を行って、化学化合物のスクリーニングを行うために単一のBH3ペプチド濃度を特定する。この予備プロファイルを、多くの場合、化学化合物スクリーニングのために使用されるBH3プロファイルの4時間前に行う。図19Bにおいて、予備BH3プロファイルが4時間後のBH3プロファイルと完全に重なることに留意されたい。

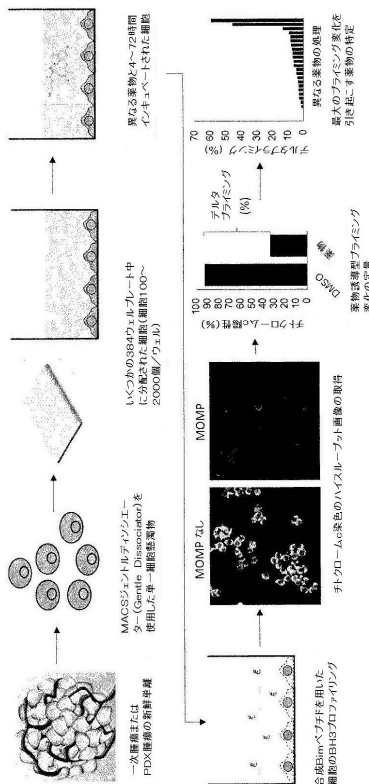
10

【0111】

ハイスループットダイナミックBH3プロファイルの例および一次MMTV-PyMTマウス腫瘍に対してこの方法を使用して、一次腫瘍に対してハイスループットスクリーニングを直接行う可能性を図20に示す。追加的に、一次卵巣腹水腫瘍に行われたハイスループットスクリーニングを図21に示し、一次C L L腫瘍に行われたものを図22に示す。ここで、おそらく化学感受性に最大の増加を引き起こす薬物は、デルタプライミングにも最大の増加を産生する。

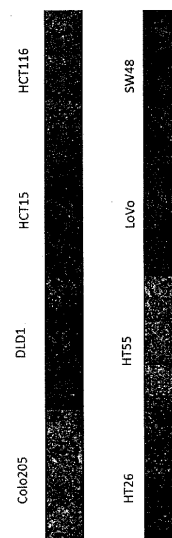
【図1】

FIG. 1



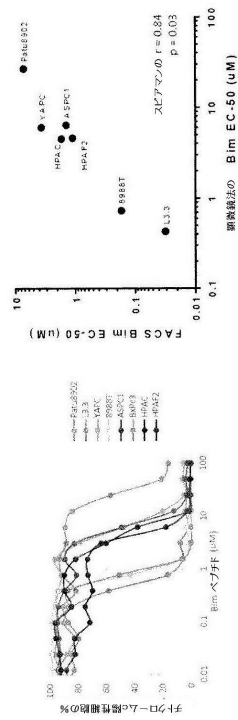
【図2】

FIG. 2



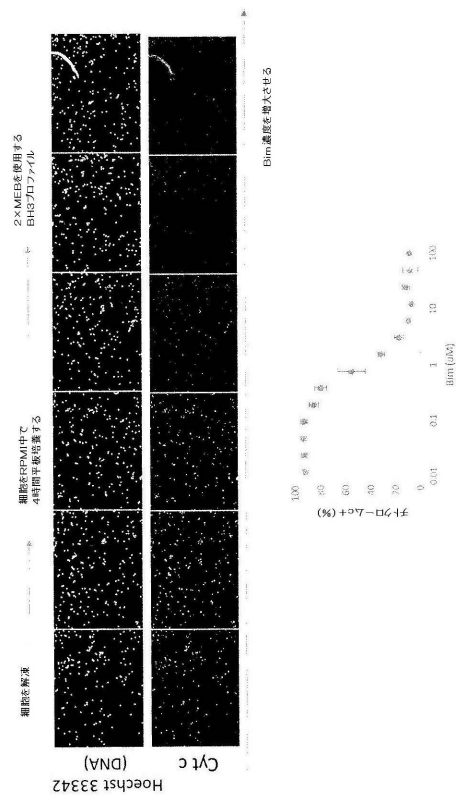
【 図 4 】

FIG. 4

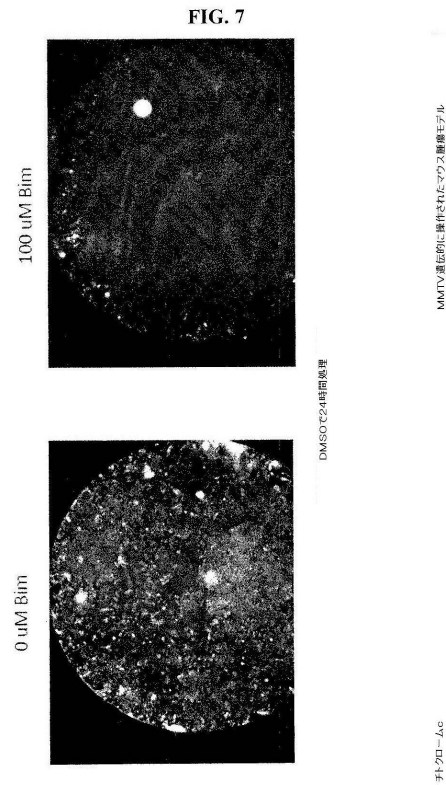


【 図 6 】

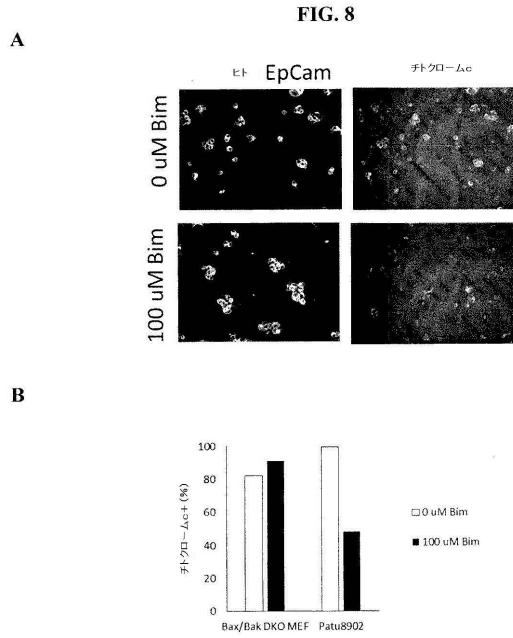
FIG. 6



【図 7】

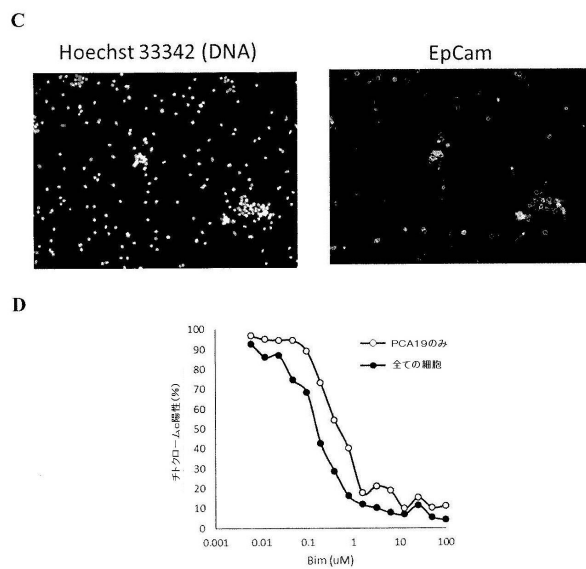


【図 8 - 1】



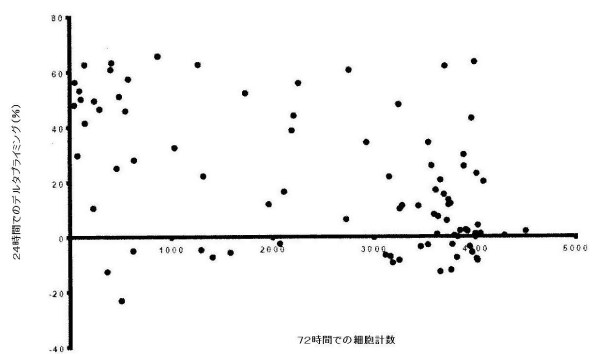
【図 8 - 2】

FIG. 8 続き



【図 9】

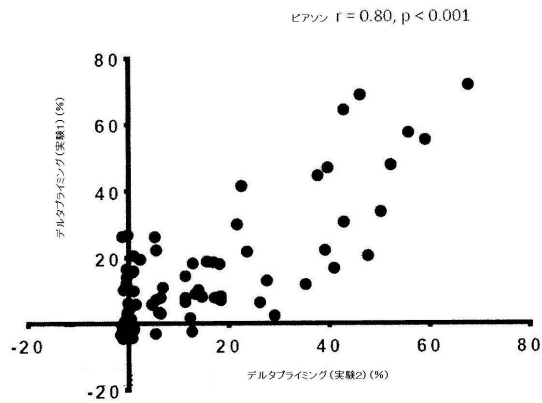
FIG. 9



【図 10 - 1】

FIG. 10

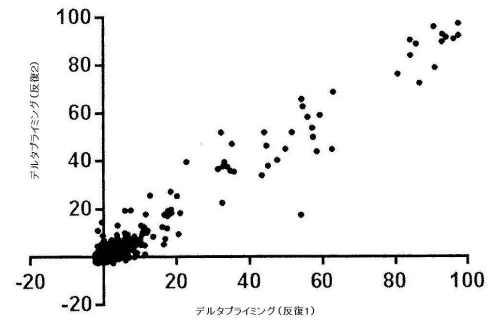
A



【図 10 - 2】

FIG. 10 続き

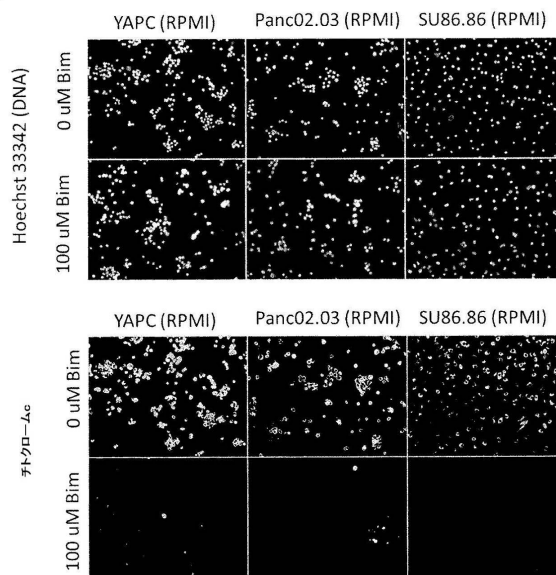
B



【図 11 - 1】

FIG. 11

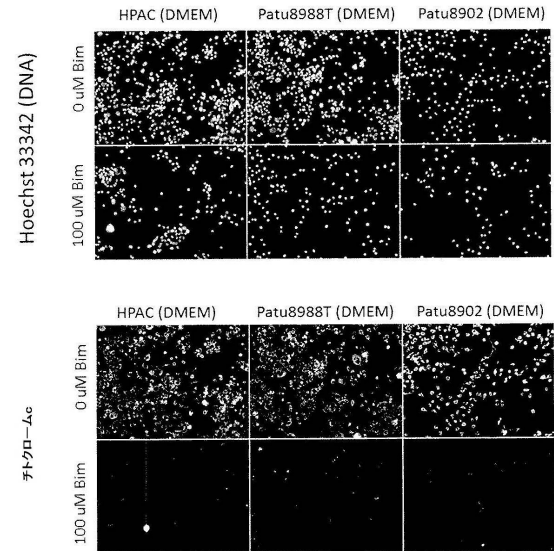
A



【図 11 - 2】

FIG. 11 続き

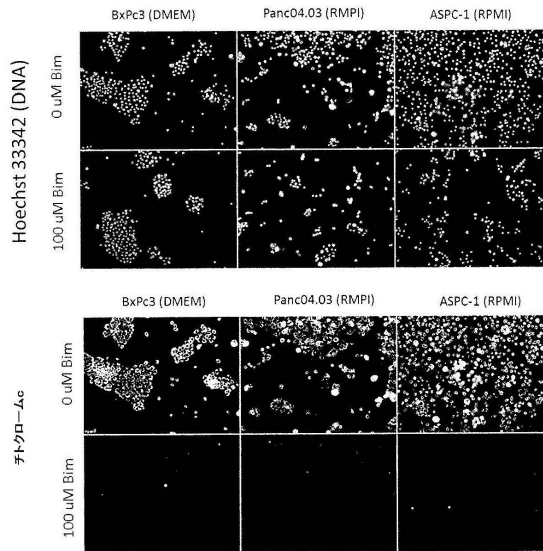
B



【図 11 - 3】

FIG. 11 続き

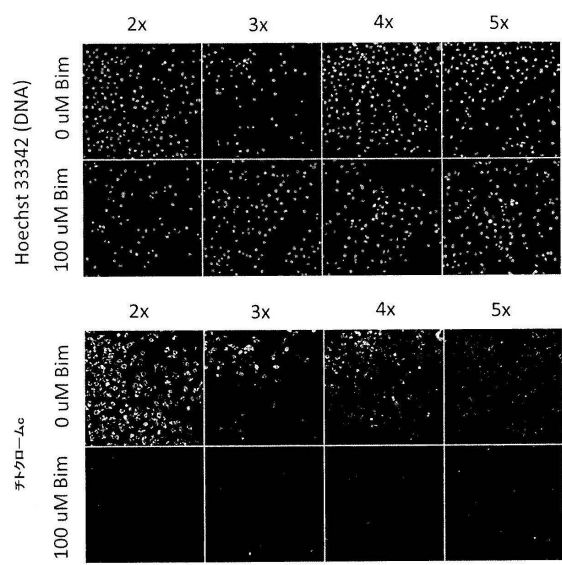
C



【図 12 - 1】

FIG. 12

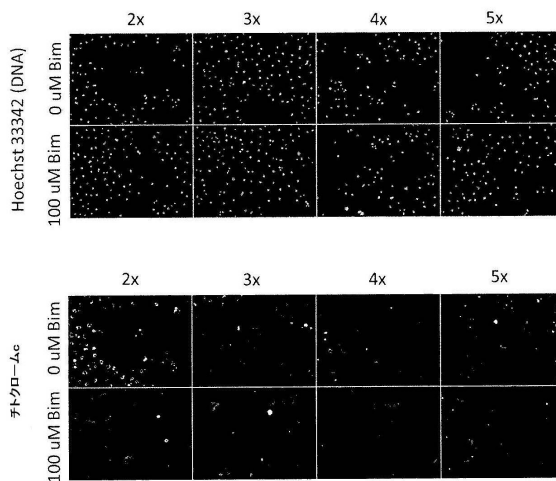
A



【図 12 - 2】

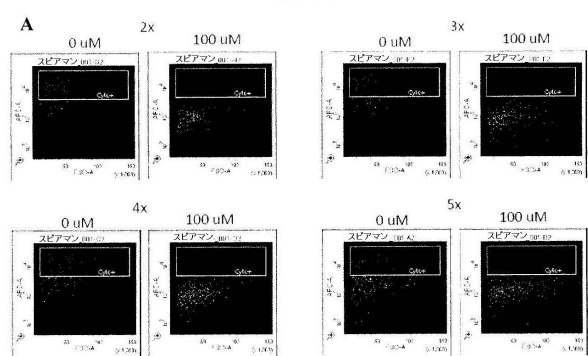
FIG. 12 続き

B

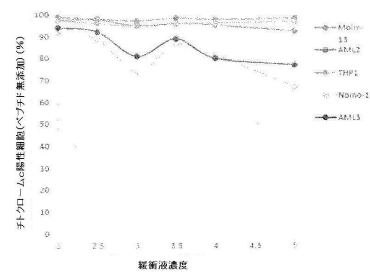


【図 13】

FIG. 13

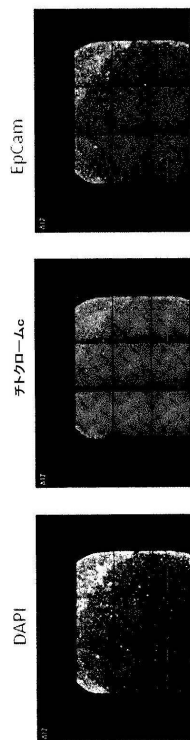


B



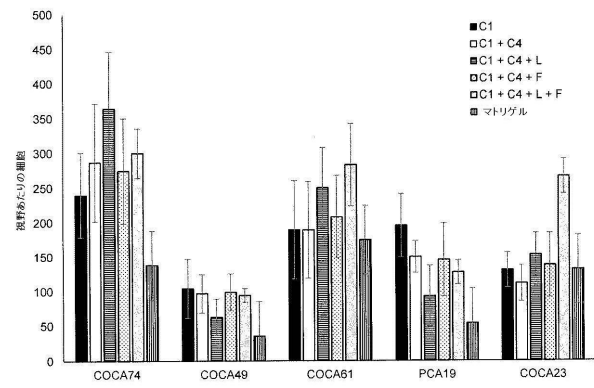
【図 14】

FIG. 14



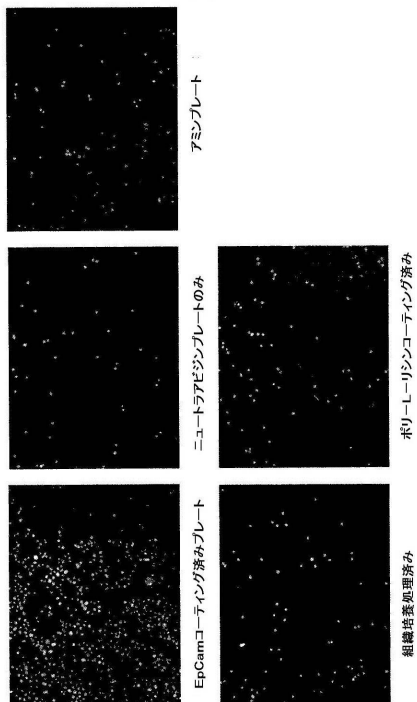
【図 15】

FIG. 15



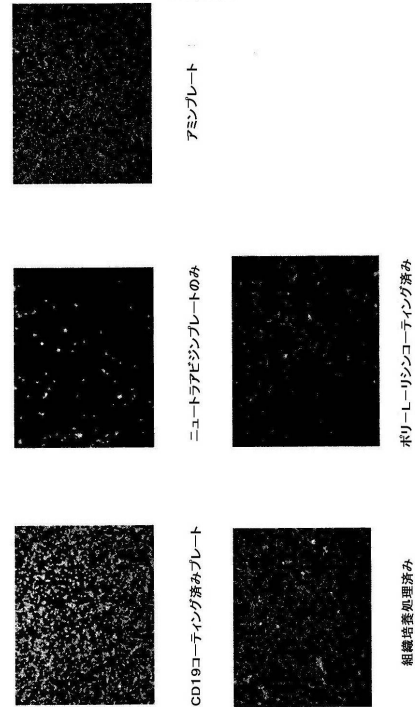
【図 16】

FIG. 16



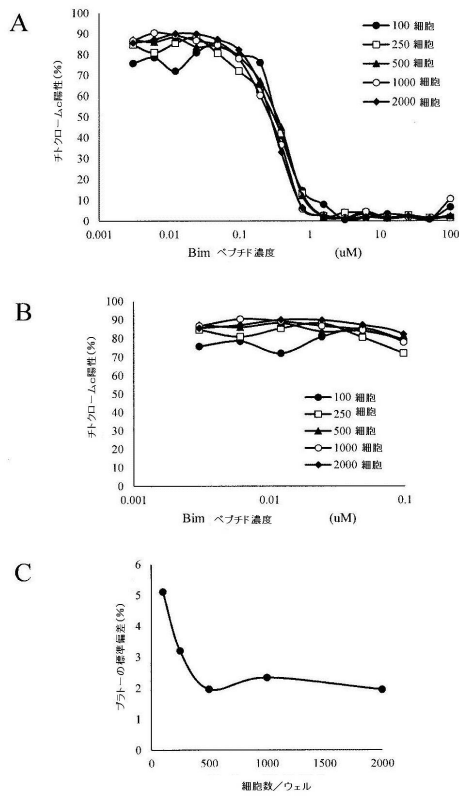
【図 17】

FIG. 17



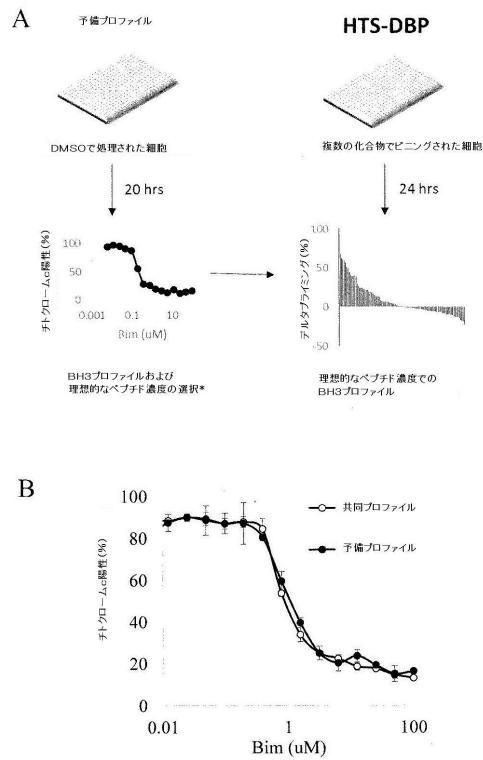
【図 18】

FIG. 18



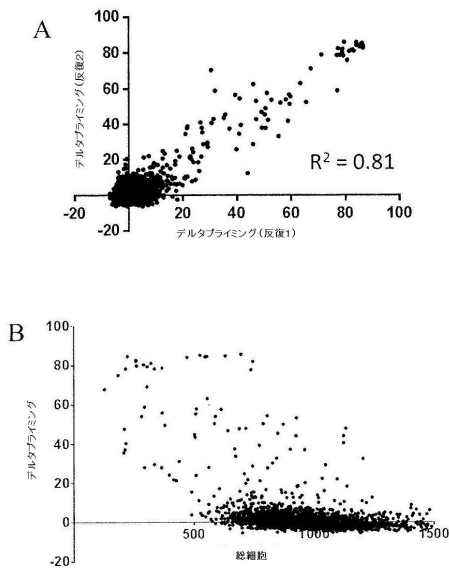
【図 19】

FIG. 19



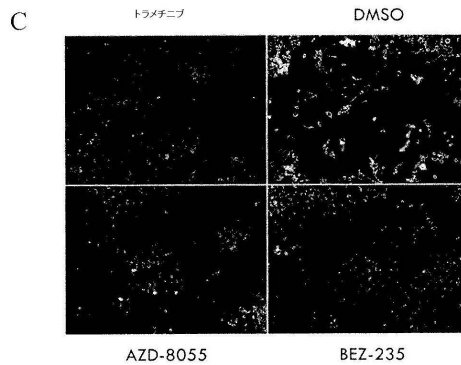
【図 20 - 1】

FIG. 20



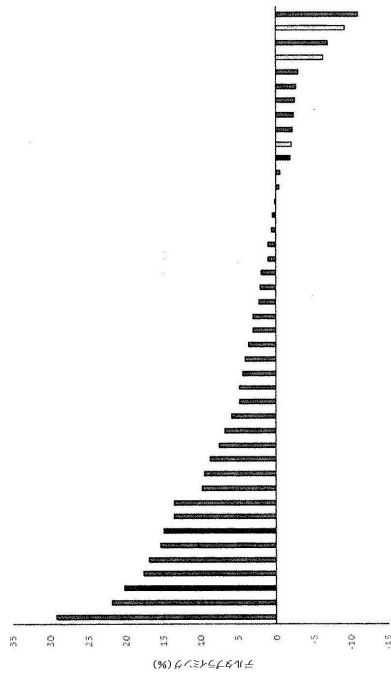
【図 20 - 2】

FIG. 20 続き



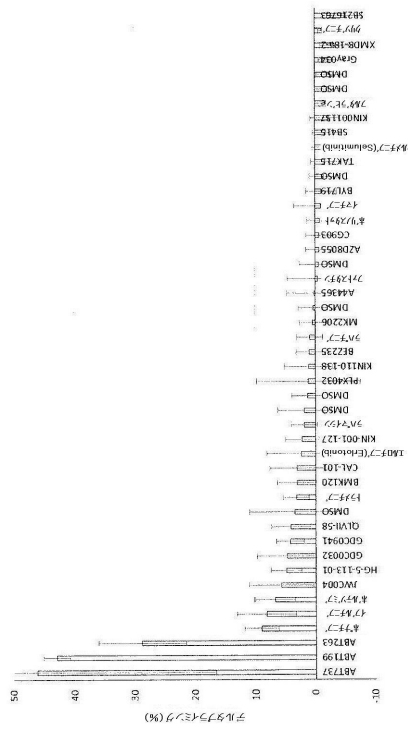
【図 2 1】

FIG. 21



【図 2 2】

FIG. 22



【配列表】

0006802185000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 レタイ, アントニー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02052, メドフィールド, パイン ストリート 1
37

(72)発明者 ボーラ, パトリック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02139, ケンブリッジ, ハーバード ストリート
334, 6エー

(72)発明者 ライアン, ジェレミー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02145, サマービル, ブロードウェイ 449,
ユニット 2

審査官 小林 薫

(56)参考文献 国際公開第2014/047342(WO, A1)

特表2012-529890(JP, A)

国際公開第2015/010094(WO, A1)

特開2005-130867(JP, A)

国際公開第2013/188978(WO, A1)

特開2014-081365(JP, A)

特表2006-520606(JP, A)

特表2009-543044(JP, A)

特開2009-240173(JP, A)

国際公開第2015/042249(WO, A1)

国際公開第2013/170176(WO, A2)

ACS Chem. Biol., 2014, Vol.9, p.1962-1968

Cell, 2015.02.26, Vol.160, p.977-989

Cancer Discov., 2014, Vol.4, p.362-375

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00

C12M 1/00-3/10

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)

UniProt/GeneSeq