

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6533519号
(P6533519)

(45) 発行日 令和1年6月19日 (2019. 6. 19)

(24) 登録日 令和1年5月31日 (2019. 5. 31)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
G O 1 N 33/92 (2006. 01)	G O 1 N 33/92
G O 1 N 33/15 (2006. 01)	G O 1 N 33/15 Z

請求項の数 11 (全 51 頁)

(21) 出願番号	特願2016-513125 (P2016-513125)	(73) 特許権者	500213834
(86) (22) 出願日	平成26年5月9日 (2014. 5. 9)		メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
(65) 公表番号	特表2016-521286 (P2016-521286A)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
(43) 公表日	平成28年7月21日 (2016. 7. 21)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/037514	(73) 特許権者	500184305
(87) 国際公開番号	W02014/183047		ザ・トラスティーズ・オブ・プリンストン・ユニバーシティ
(87) 国際公開日	平成26年11月13日 (2014. 11. 13)		THE TRUSTEES OF PRINCETON UNIVERSITY
審査請求日	平成29年5月8日 (2017. 5. 8)		アメリカ合衆国 08544 ニュージャージー州, プリンストン, プロスペクト・アヴェニュー 87, サード・フロアー
(31) 優先権主張番号	61/822, 095		
(32) 優先日	平成25年5月10日 (2013. 5. 10)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 RASがんにおける脂質捕捉

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの試験薬剤の効果を、該少なくとも1つの試験薬剤を、低酸素状態の細胞またはRAS駆動性がんを含むがんの処置に有用と特定し、かつ／または特徴付ける指標として使用する方法であって、該少なくとも1つの試験薬剤は、適切な対照と比較して脂肪酸の細胞取込みを変化させる該薬剤の能力を決定することを含む方法によって同定および／または特徴付けられ、該決定するステップが、

腫瘍細胞の集団を、少なくとも1つの試験薬剤と接触させることと；

血清、標識化グルコースおよび標識化グルタミンを含む培地の存在下で該腫瘍細胞をインキュベートすることと；

該腫瘍細胞中の標識化脂肪酸の量を測定することと；

該腫瘍細胞中の非標識化脂肪酸の量を測定することと；

脂肪酸の該細胞取込みを該適切な対照と比較して変化させる該薬剤の能力について、該少なくとも1つの試験薬剤を同定および／または特徴付けること

を含み、該非標識化脂肪酸の量の増加および／または該標識化脂肪酸の量の減少が、脂肪酸の該細胞取込みの増加を示し、該非標識化脂肪酸の量の減少および／または該標識化脂肪酸の量の増加が、脂肪酸の該細胞取込みの減少を示し、そして、該適切な対照が、がん性ではない以外は同一の細胞または組織を含む、方法。

【請求項 2】

前記細胞が不死化ベビーマウス腎臓 (iBMK) 細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記脂質が多価不飽和である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記脂質がリン脂質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記脂質がリゾリン脂質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記標識化脂肪酸が ^{13}C を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記標識化脂肪酸が、 $\text{U-}^{13}\text{C}$ -グルコースおよび／または $\text{U-}^{13}\text{C}$ -グルタミンの代謝によって標識される、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 8】

前記腫瘍細胞が、1 % 以下の O_2 レベルを有する培地中でインキュベートされる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記腫瘍細胞が、0.5 % 以下の O_2 レベルを有する培地中でインキュベートされる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記薬剤が、Ras 駆動がんの処置において有用である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記薬剤が、低酸素状態の細胞を含むがんの処置において有用である、請求項 1 に記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

政府支援

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成金番号 CA163591 の下、政府支援により成された。政府は、本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

背景

がん細胞は、増殖を支持するために一定のエネルギー供給および構造的な構成成分を必要とする。多くのがん細胞は、高い *de novo* 脂質合成速度を有することが示されている（例えば、Santos & Schulze *FEBS J Mini Review* 279 巻（15 号）：2610 頁、2012 年 7 月 3 日参照）。近年、がんを処置するために、いくつかの治療開発戦略が、脂質生合成の阻害剤に焦点を合わせている。

【0003】

ヒトのがんにおいて最も一般的に活性化される経路のうちの 2 つが、PI3K-Akt 経路および Ras 経路である。PI3K-Akt 経路は、がんにおいて役割を果たすことに加えて、インスリンシグナル伝達の主なエフェクターであるため、この経路の代謝効果は広範囲に研究されてきた。Akt 活性化は、グルコースの取込み、解糖フラックス、および乳酸排出、すなわちワールブルグ効果を促進する。さらに、Akt 活性化は、mTOR の下流活性化によって、タンパク質合成を増加させる。最後に Akt は、酵素リン酸化、および SREBP の mTOR 依存性活性化のような転写活性化を含めた機序を介して、脂質生成を誘導する。 40

【0004】

脂肪酸は、脂質の主な構成成分である。脂肪酸の合成には、細胞質アセチル-CoA の生成が必要である（図 1A）。酸素正常状態では、主な経路は、グルコースからピルビン酸への異化反応を含み、ピルビン酸は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによってミトコンドリアアセチル-CoA に変換される。次に、アセチル-CoA は、クエン酸の形態で細胞 50

質ゾルに輸送され、直接的なAkt標的であるATP-クエン酸リアーゼによって切断されて、細胞質アセチル-CoAを生成する。低酸素状態では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼが、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼによって不活化され、グルタミンによって駆動される還元的カルボキシル化が、クエン酸、したがってアセチル-CoAの分率を増加させる原因となる。

【0005】

脂肪酸合成経路のその後のステップは、SREBP標的であるアセチル-CoAカルボキシラーゼおよび脂肪酸シンターゼによって触媒され、パルミチン酸(C16:0、ここで16は、脂肪酸における炭素原子の数を指し、0は二重結合の数を指す)を生じる。次に、パルミチン酸は、様々な伸長反応および不飽和化反応のための基質となって、細胞による多様な脂肪酸の要求に応える。多様な脂肪酸のうち、最も豊富に存在するものが、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸(C18:1)である。オレイン酸は、伸長によってパルミチン酸からステアリン酸(C18:0)になり、その後、電子アクセプターとして酸素を必要とする $\Delta 9$ ステアロイル-CoAデサチュラーゼ1(SCD1)による不飽和化を受けて生成される。適切な膜流動性、したがって細胞完全性を確保するためには、細胞によって、ステアリン酸に対するオレイン酸の特定の比が維持されなければならない、著しい不均衡は、アポトーシスを誘導することが示されている。SCD1は、PI3K-Akt-mTOR経路によって調節され、肥満およびがんの両方の薬理学的標的として調査されている。

10

【0006】

Ras活性化は、PI3K-Akt経路の活性化と同様に、グルコースの取込みおよび乳酸排出を誘導する。Rasは、PI3K-Akt経路を活性化することが公知であるが、近年の知見では、下流の代謝効果が分岐し得ることが示唆されている。例えば、Rasは、ミトコンドリア呼吸を低減する。さらに、Rasは、マクロピノサイトーシスおよび自己貪食を誘導し、それによって代謝基質の潜在的に可能な代替源を提供する。分岐的な代謝効果のさらなる裏付けとして、マウス異種移植実験によって、Ras駆動性腫瘍とPI3K-Akt活性化を伴う腫瘍との間でカロリー制限への感度に差異があることが明らかになった。Aktの脂質生成促進効果とは対照的に、脂質代謝に対するRasの影響は、調査されていない。さらに、脂質代謝を含めた代謝における酸素利用性と癌遺伝子シグナル伝達の相互作用は、広範に調査されていない。

20

30

上述の観察は、Ras駆動性がんの処置に有用な組成物および製剤が絶えず必要であるという証拠となる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Santos & Schulze FEBS J MiniReview 279巻(15号):2610頁、2012年7月3日

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

40

要旨

本開示は、具体的には、低酸素状態の細胞が、血清脂肪酸を捕捉することによってde novo脂質生成を迂回し、したがってアセチル-CoAの必要性および酸素依存性SCD1-反応の両方を迂回するという認識、さらにはde novo脂質生成の低酸素状態による再プログラミングが、酸素正常状態の細胞においてRas活性化によって再生され得るという認識を包含する。したがって本開示は、例えばRas駆動性腫瘍を含めたRas駆動性細胞が、SCD1阻害に耐性を示し得ることを実証する。さらに本開示は、例えばRas駆動性腫瘍を含めたRas駆動性細胞が、それらによる脂質捕捉の成功を低減する治療レジメンに対して感受性を示し得ることを実証する。

【0009】

50

本開示は、具体的には、低酸素状態の細胞および／またはR a s 駆動性細胞による脂質捕捉にとって好ましい基質が、1つの脂肪酸の尾部を有するリン脂質（リゾリン脂質）を含むことを実証する。本開示は、例えばR a s 駆動性腫瘍を含めたR a s 駆動性細胞が、それらによるリゾリン脂質捕捉の成功を低減する治療レジメンに対して感受性を示し得ることを実証する。

【0010】

¹³C-トレーサーおよびリピドミクス（lipidomics）を使用して、形質転換細胞における脂質生成を、癌遺伝子発現および酸素利用性の関数として研究した。低酸素状態では、脂肪酸の移入を増やすことによって、de novo脂肪酸合成および不飽和化の要求が減少することが見出された。発癌性R a s は、低酸素状態の代謝表現型の発生を繰り返し、脂肪酸取込みへの依存度が増加すると、R a s 駆動性がん細胞はSCD1阻害に耐性を有するようになる。移入脂肪酸の主な供給源は、1つの脂肪酸の尾部を有する血清脂質であるリゾ脂質（lysolipid）である。単一の脂肪酸の尾部を有する脂質を異化する能力は、侵襲性のがんおよびR a s 駆動性がんにおいて増強されることが既に示されていた。本発明の結果は、関係するリゾ脂質の捕捉が、低酸素状態の細胞およびR a s 駆動性がん細胞の両方における脂肪酸獲得の主な経路であり得ることを示している。

10

【0011】

また本開示は、具体的には、ホスファチジルグリセロール脂質ならびに／またはより高い不飽和度および／もしくはより長い炭素鎖を有する脂肪酸が、腫瘍（例えばR a s 関連腫瘍）において、それに隣接する良性腫瘍よりも高いレベルで典型的に検出可能であったことを実証する。本開示は、例えばR a s 駆動性腫瘍を含めたR a s 駆動性細胞が、それらによるこのようなホスファチジルグリセロール脂質および／またはより高い不飽和度を有する脂肪酸の捕捉の成功を低減する治療レジメンに対して感受性を示し得ることを実証する。

20

【0012】

一態様では、本開示は、具体的には、例えば脂質摂取の食事管理によって、血清中の捕捉脂質のレベルおよび／またはタイプを制御することによって、R a s 駆動性細胞（例えばR a s 関連腫瘍）による脂質捕捉の成功を低減するための様式を提供する。一部の実施形態では、脂質摂取は、好適な捕捉脂質の摂取を制限することによって制御される。一部の実施形態では、脂質摂取は、他の脂質と比較して、好適な捕捉脂質の相対的な摂取を調節することによって制御される。一部の特定の実施形態では、脂質摂取は、脂質を含む、特に目的の細胞または腫瘍にとって好適な捕捉脂質ではない脂質を含有する栄養サプリメントを提供および／または使用することによって制御される。

30

【0013】

多くの実施形態では、例えばR a s 駆動性の制御による脂質捕捉を低減するための食事管理は、過剰の完全飽和した脂肪酸を含む治療食（diet）を消費することまたは投与することを含む。一部の実施形態では、このような食事管理は、このような完全飽和した脂肪酸を含むまたはそれからなる栄養サプリメントを使用することであり、または使用することを含む。

40

【0014】

単なる一つの例を挙げると、一部の実施形態では、栄養サプリメントにおける多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比が1を超える、栄養サプリメント、代用食品、または食事レジメンが提供または利用される。

【0015】

一部の実施形態では、多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比は、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を超える。

【0016】

一部の実施形態では、栄養サプリメント、代用食品、または食事レジメンは、10重量%未満、9重量%、8重量%、7重量%、6重量%、5重量%、4重量%、3重量%、3

50

重量%、または好ましくは1重量%未満、0.9重量%、0.8重量%、0.7重量%、0.6重量%、0.5重量%、0.4重量%、もしくは0.3重量%の必須脂肪酸を含む。

【0017】

一部の実施形態では、栄養サプリメント、代用食品、または食事レジメンは、0.1重量%未満の濃度のアラキドン酸を含む。

【0018】

一部の実施形態では、栄養サプリメントまたは代用食品の少なくとも70重量%は、脂質である。

【0019】

一部の実施形態では、利用される脂質は、動物源および／または植物源に由来する。一部の実施形態では、利用される脂質は、ココナツに由来する。

【0020】

一部の実施形態では、利用される脂質は、陸生動物源または酪農源 (d a i r y s o u r c e) に由来する。

【0021】

一部の実施形態では、栄養サプリメント、代用食品、または食事レジメンは、タンパク質源をさらに含む。

【0022】

一部の実施形態では、栄養サプリメント、代用食品、または食事レジメンは、炭水化物源をさらに含む。

【0023】

一部の実施形態では、栄養サプリメントまたは代用食品は、丸剤またはカプセル剤の形態である。

【0024】

別の態様では、がんを処置する方法であって、多価不飽和脂肪酸に対して1を超える比の飽和脂肪酸を含む治療食を、がんの処置を必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。

【0025】

一部の実施形態では、多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比は、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を超える。

【0026】

一部の実施形態では、がんは、R a s 駆動性がんである。一部の実施形態では、R a s 駆動性がんは、膵臓がん、非小細胞肺癌、結腸直腸がん、膀胱がん、腎臓がん、甲状腺がん、黒色腫、肝細胞癌、および血液系悪性腫瘍からなる群から選択される。

【0027】

一部の実施形態では、治療食は、少なくとも2週間の期間にわたって投与される。一部の実施形態では、治療食は、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、21週間、22週間、23週間、24週間、25週間、26週間の期間にわたって、または治療エンドポイントが観察されるまで投与される。

【0028】

一部の実施形態では、飽和脂肪酸は、動物源および／または植物源に由来する。一部の実施形態では、飽和脂肪酸は、ココナツに由来する。一部の実施形態では、飽和脂肪酸は、陸生動物源または酪農源に由来する。

【0029】

一部の実施形態では、該方法は、化学療法剤を投与することをさらに含む。

【0030】

本開示の別の態様では、がんを処置する方法であって、がん細胞成長の1種または複数の薬理学的阻害剤を、がんの処置を必要としている患者に投与することと、該患者に、例

10

20

30

40

50

えば多価不飽和脂肪酸に対して1を超える比の飽和脂肪酸を含む治療食を消費することによって、好適な捕捉脂質の摂取を制限する治療食を消費するように指示することを含む方法が提供される。

【0031】

本開示の別の態様では、がんを処置する方法であって、本明細書に記載の栄養サプリメントのいずれかを含む治療食を、がんの処置を必要としている患者に投与することを含む方法が提供される。

【0032】

本開示の別の態様では、がんを処置する方法であって、がん細胞成長の1種または複数の薬理的阻害剤を、がんの処置を必要としている患者に投与することと、該患者に、本明細書に記載の栄養サプリメントのいずれかを含む治療食を消費するように指示することを含む方法が提供される。

10

【0033】

本開示の他の特色および利点は、以下の詳細な記載から明らかになる。しかしこの詳細な記載から、当業者には、本開示の精神および範囲内の様々な変更および改変が明らかになるはずなので、詳細な記載および具体例は、本開示の好ましい実施形態を示しているものの、単に例示的なものであることを理解されたい。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

R a s 関連腫瘍による脂質捕捉を阻害することによって、R a s 関連がんを処置する方法。

20

(項目2)

環境からの好適な捕捉脂質を制限することを含む、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記好適な捕捉脂質が、多価不飽和脂質であるか、またはそれを含む、項目2に記載の方法。

(項目4)

前記好適な捕捉脂質が、リン脂質であるか、またはそれを含む、項目2に記載の方法。

(項目5)

前記好適な捕捉脂質が、リゾリン脂質であるか、またはそれを含む、項目3に記載の方法。

30

(項目6)

前記好適な捕捉脂質が、ホスファチジルグリセロール脂質であるか、またはそれを含む、項目2に記載の方法。

(項目7)

前記好適な捕捉脂質が、より高い不飽和度の脂肪酸であるか、またはそれを含む、項目2に記載の方法。

(項目8)

前記好適な捕捉脂質が、より長い炭素鎖であるか、またはそれを含む、項目2に記載の方法。

40

(項目9)

腫瘍関連性R a s 変異体タンパク質、該変異体をコードする核酸および／または相補的な核酸の存在またはレベルを検出することによって、脂質生合成阻害剤を用いる治療に対する応答性の見込みに基づき腫瘍を分類する方法。

(項目10)

脂質捕捉に対する薬剤の効果を、適切な対照と比較して決定することによって、がんの処置に有用な薬剤を同定し、かつ／または特徴付ける方法。

(項目11)

脂質捕捉を阻害するステップが、食事による脂質摂取を制御することを含む、項目1に記載の方法。

50

(項目 1 2)	過剰の完全飽和した脂肪酸が消費されるように、食事による脂質摂取が制御される、項目 1 1 に記載の方法。	
(項目 1 3)	多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比が、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を超えるように、食事による脂質摂取が制御される、項目 1 1 に記載の方法。	
(項目 1 4)	多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比が、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を超えるように、食事による脂質摂取が制御される、項目 1 1 に記載の方法。	10
(項目 1 5)	0.3 重量%未満の必須脂肪酸を含む脂肪酸を含む、栄養サプリメント。	
(項目 1 6)	0.1 重量%未満の濃度のアラキドン酸を含む、項目 1 5 に記載の栄養サプリメント。	
(項目 1 7)	前記栄養サプリメントの少なくとも70重量%が脂質である、項目 1 5 に記載の栄養サプリメント。	
(項目 1 8)	前記脂質が、動物源および／または植物源に由来する、項目 1 5 に記載の栄養サプリメント。	20
(項目 1 9)	前記脂質が、ココナツに由来する、項目 1 8 に記載の栄養サプリメント。	
(項目 2 0)	前記脂質が、陸生動物源または酪農源に由来する、項目 1 8 に記載の栄養サプリメント。	
(項目 2 1)	タンパク質源をさらに含む、項目 1 5 に記載の栄養サプリメント。	
(項目 2 2)	炭水化物源をさらに含む、項目 1 5 に記載の栄養サプリメント。	30
(項目 2 3)	丸剤またはカプセル剤の形態である、項目 1 5 に記載の栄養サプリメント。	
(項目 2 4)	がんを処置する方法であって、過剰の飽和脂肪酸を含む治療食を、がんの処置を必要としている患者に投与することを含む方法。	
(項目 2 5)	前記過剰が、多価不飽和脂肪酸に対して1を超える飽和脂肪酸の比からなるか、またはその比を含む、項目 2 4 に記載の方法。	
(項目 2 6)	多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の前記比が、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を超える、項目 2 4 に記載の方法。	40
(項目 2 7)	前記がんが、R a s 関連がんである、項目 2 4 に記載の方法。	
(項目 2 8)	前記 R a s 駆動がんが、膵臓がん、非小細胞肺癌、結腸直腸がん、膀胱がん、腎臓がん、甲状腺がん、黒色腫、肝細胞癌、および血液系悪性腫瘍からなる群から選択される、項目 2 7 に記載の方法。	
(項目 2 9)	前記治療食が、少なくとも2週間にわたって投与される、項目 2 4 に記載の方法。	
(項目 3 0)		50

前記治療食が、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、21週間、22週間、23週間、24週間、25週間、26週間の期間にわたって、または治療エンドポイントが観察されるまで投与される、項目29に記載の方法。

(項目31)

前記飽和脂肪酸が、動物源および／または植物源に由来する、項目24に記載の方法。

(項目32)

前記飽和脂肪酸が、ココナツに由来する、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記飽和脂肪酸が、陸生動物源または酪農源に由来する、項目31に記載の方法。

(項目34)

化学療法剤を投与することをさらに含む、項目24に記載の方法。

(項目35)

がんを処置する方法であって、がん細胞成長の1種または複数の薬理的阻害剤を、がんの処置を必要としている患者に投与することと、該患者に、多価不飽和脂肪酸に対して1を超える比の飽和脂肪酸を含む治療食を消費するように指示することを含む、方法。

(項目36)

化学療法を投与することをさらに含む、項目1に記載の方法。

(項目37)

がんを処置する方法であって、がん細胞成長の1種または複数の薬理的阻害剤を、がんの処置を必要としている患者に投与することと、該患者に、項目15に記載の栄養サプリメントを含む治療食を消費するように指示することを含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、パルミチン酸が、主に、酸素正常状態ではグルコースから合成され、低酸素状態ではグルタミンからの寄与の割合が増加することを示す図である。(A)パルミチン酸(C16:0)のde novo合成の模式図である。ACL、ATPクエン酸リアーゼ；ACC、アセチル-CoAカルボキシラーゼ；FAS、脂肪酸シンターゼ；FFA、遊離脂肪酸。(B)U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミン中、倍加数>5で成長させたMDA-MB-468細胞由来の細胞脂質からけん化したパルミチン酸(C16:0)の標識化パターン。(C)(B)による¹³C-標識化パターンに基づく、de novo合成によって獲得された細胞のパルミチン酸(C16:0)脂肪酸の尾部の百分率。(D)酸素正常状態および低酸素状態において、グルコースおよびグルタミンが脂質生成に寄与することを示す模式図。(E)酸素正常状態および低酸素状態(1%O₂)におけるU-¹³C-グルコース(Gluc)およびU-¹³C-グルタミン(Gln)からのアセチル基の標識化百分率。定常状態におけるN-アセチル-グルタミン酸およびグルタミン酸からのアセチル標識化。脂肪酸標識化の分析によって、等価な結果が得られる。すべてのデータは、N=3の平均値±SDである。

【図2】図2は、低酸素状態がSCD1フラックスを低減し、脂肪酸の移入を増加させることを示す図である。(A)オレイン酸(C18:1)合成の模式図。(B)U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミン中、酸素正常状態および低酸素状態(1%O₂)で72時間成長させたMDA-MB-468細胞に由来するC18:0およびC18:1の標識化パターン。(C)酸素正常状態および低酸素状態(MDA-MB-468およびHeLa細胞については1%O₂、A549細胞については0.5%)における不飽和化指数(C18:1/C18:0)。(D~E)U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミンからの脂肪酸を72時間かけて標識化することによって測定した、酸素正常状態および低酸素状態におけるC18:0(D)およびC18:1(E)プールの移入百分率。すべてのデータは、N=3の平均値±SDである。*p<0.05；**p<0.01(両側T検定)。

10

20

30

40

50

【図3】図3は、発癌性Rasが、低酸素状態を模倣し、脂肪酸捕捉およびグルタミンからのアセチル-CoA標識化を増加させ、酸素消費を低減することを示す図である。(A)ベクター対照(CTL)と対比した、myrAktまたはH-Ras^{V12G}を発現するように操作された不死化ベビーマウス腎臓(iBMK)同質遺伝子の細胞株における不飽和化指数(C18:1/C18:0)。(B)U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミンからの定常状態の脂肪酸標識化によって測定したC18:1の移入百分率。(C)けん化脂質の測定に基づく、新鮮な培地および使用済み培地(10%血清、72時間のインキュベーション)によるC18:1の取込み速度。(D、E、F)ベクター対照(CTL)と対比した、発癌性K-Ras^{G12D}を有するHPNE細胞に関する同じ測定。(G)iBMK細胞におけるグルコースの取込みおよび乳酸排出;lac、乳酸;gluc、グルコース。(H)酸素消費。(I)グルタミン由来の α -ケトグルタル酸からの還元的カルボキシル化から生成されたクエン酸(M^{+5})と酸化的代謝によって生成されたクエン酸(M^{+4})の比。(J、K、L)HPNE細胞における同じ測定。すべてのデータは、 $N \geq 3$ の平均値 $\pm$ SDである。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (両側T検定)。

10

【図4】図4は、SCD1阻害への感度に対する、RasおよびAktの差別的な影響を示す図である。(A)200nMのCAY10566(SCD1阻害剤、SCDi)は、U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミンからのC18:1の標識化を阻止する。(B、C)xCELLigence機器における、A549細胞、iBMK-H-Ras^{V12G}細胞、およびiBMK-myrAkt細胞の成長に対するSCDiの影響。CTLはビヒクル対照である。(D)ビヒクル(CTL)またはSCDi(CAY10566、2.5mg/kgBIDp.o.)で処理した同種移植iBMK-H-Ras^{V12G}腫瘍およびiBMK-myrAkt腫瘍の成長。(E)それぞれSCDiで処理して13日後および14日後の、未処理対照に対するiBMK-H-Ras^{V12G}腫瘍およびiBMK-myrAkt腫瘍の成長百分率。パネルA~Cについて、データは、 $N \geq 3$ の平均値 $\pm$ SDである。パネル(D~E)について、データは、1群当たりマウス $N = 10$ の平均 $\pm$ SEMである。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (両側T検定)。

20

【図5】図5は、脂肪酸がリゾリン脂質から捕捉されることを示す図である。(A)A549細胞およびiBMK-H-Ras^{V12G}細胞の成長中の培地のリン脂質の変化倍率(10%血清を含む新鮮な培地に対する)。(B)LPC(18:1)の構造。(C)不飽和化指数(C18:1/C18:0)に対するLPC(18:1)補給(20 μ M、72時間)の効果。(D)iBMK-H-Ras^{V12G}細胞およびiBMK-myrAkt細胞におけるU-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミン標識化に基づく、細胞のC18:1プールへの移入の寄与百分率。(E~G)示された補給脂質(20 μ M)の存在下で、200nMのSCDi(CAY10566)がある状態またはない状態で72時間インキュベーションした後の、(未処理対照、CTLに対する)(E)iBMK-H-Ras^{V12G}に関する充填された細胞の体積、(F)iBMK-myrAktに関する充填された細胞の体積、(G)A549細胞に関する充填された細胞の体積。LPC、リゾホスファチジルコリン;PC、ホスファチジルコリン;PG、ホスファチジルグリセロール;PI、ホスファチジルイノシトール;MG、モノアシルグリセロール。データは、(A) $N = 3$ の平均値、(C~D) $N = 3$ の平均値 $\pm$ SD、(E~G) $N = 2$ の平均値である。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (両側T検定)。

30

40

【図6】図6は、酸素正常状態および低酸素状態における脂肪酸標識化を示す図である。U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミン中、酸素正常状態および低酸素状態(HeLaについては1%O₂、A549については0.5%)で72時間成長させた細胞からのけん化細胞脂質抽出物に由来する、ステアリン酸(C18:0)およびオレイン酸(C18:1)の標識化パターン。すべてのデータは、 $N = 3$ の平均値 $\pm$ SDである。

【図7】図7は、ステアリン酸(C18:0)の移入と対比した、de novo合成に対する発癌性Rasの効果を示す図である。(A)U-¹³C-グルコースおよびU-¹³

50

³C-グルタミンからの脂肪酸標識化（72時間）によって測定した、ベクター対照（CTL）と対比した、myrAktまたはH-Ras^{V12G}を発現するように操作された不死化ベビーマウス腎臓（iBMK）同質遺伝子の細胞株、およびベクター対照（CTL）と対比した発癌性K-Ras^{G12D}を有するHPNE細胞における、C18:0の移入百分率。（B）けん化脂質の測定に基づく、新鮮な培地および使用済み培地（10%血清、72時間のインキュベーション）からのC18:0の取込み速度。すべてのデータは、 $N \geq 3$ の平均値 $\pm$ SDである。 $* p < 0.05$; $** p < 0.01$ （両側T検定）。

【図8】図8は、6cmの組織培養皿における細胞成長に対するSCD1阻害の効果を示す図である。200nMのCAY10566で処理すると、96ウェル培養プレートで成長させるxCELLigence系を使用した場合よりも、6cmの皿上では細胞が速く成長し、したがって培地脂質を急速に消費するので、成長阻害の開始は、組織培養皿の方が早く生じる。 $N = 2$ の平均値。

【図9】図9は、200nMのCAY10566が、C18:1標識化を完全に阻止するのに十分であることを示す図である。細胞を、200nMのCAY10566（SCD1阻害剤、SCDi）またはビヒクル対照（CTL）で処理する一方で、U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミンを含む培地で48時間培養した。すべてのデータは、 $N \geq 3$ の平均値 $\pm$ SDである。

【図10】図10は、がん細胞によるリゾリン脂質の消費を示す図である。（A）MDA-MB-468およびiBMK-myrAkt細胞の成長中の培地のリン脂質の変化倍率（10%血清を含む新鮮な培地に対する）。（B）200nMのCAY10566（SCD1阻害剤、SCDi）またはビヒクル対照（CTL）で48時間処理したiBMK-H-Ras^{V12G}細胞による、培地からのLPC（18:1）の消費（nmol）。（C）約40%コンフルエンスまで培養した細胞に関する全C18:1の移入（図3Cからの取込み速度に基づく）。（D）けん化脂質の測定に基づく、新鮮な培地および使用済み培地（10%血清、48時間のインキュベーション）からの全C18:1の取込みに対するSCDi阻害の効果。細胞を、通常よりも高い密度で播種して、脂肪酸消費の最適な決定を容易にした。すべてのデータは、 $N \geq 3$ の平均値 $\pm$ SDである。

【図11】図11は、ヒト膵臓がんにおける腫瘍／良性の隣接組織の脂質の比を示す図である。ヒト膵臓腫瘍組織における脂質の存在量の相対比を、同じ患者からの良性の隣接組織と比較した。値は、20人の患者の平均であり、複数の仮説試験について補正して $p < 0.05$ である。略語：PE、ホスファチジルエタノールアミン；PS、ホスファチジルセリン；PG、ホスファチジルグリセロール；PC、ホスファチジルコリン；L、リゾリン脂質。大きい方の数字は、脂質の脂肪酸の尾部における炭素原子の総数を指し、小さい方の数字は、不飽和度を指す。O-は、エーテル脂質を指す。

【図12】図12は、A549異種移植を示す図である。対照、高い総脂肪、高スクロース、または高飽和脂肪の治療食を給餌された胸腺欠損ヌードマウスにおける異種移植A549（Ras駆動性肺がん）細胞の成長曲線を得た。値は、マウス5匹の平均 $\pm$ SEMである。

【発明を実施するための形態】

【0035】

定義

活性化剤：本明細書で使用される場合、用語「活性化剤」は、その存在またはレベルが、薬剤が存在しない状態（または異なるレベルの薬剤が存在する状態）で観察される標的のレベルまたは活性と比較して、標的のレベルまたは活性の上昇と相関する薬剤を指す。一部の実施形態では、活性化剤は、その存在またはレベルが、特定の参照レベルまたは活性（例えば公知の活性化剤、例えば陽性対照が存在するなどの適切な参照条件下で観察されるもの）と比較できるまたはそれを超える標的レベルまたは活性と相関する薬剤である。

【0036】

投与：本明細書で使用される場合、用語「投与」は、被験体または系に組成物を投与す

10

20

30

40

50

ることを指す。動物被験体（例えばヒト）への投与は、任意の適切な経路によって行うことができる。例えば、一部の実施形態では、投与は、気管支（気管支への滴下注入によるものを含む）、頬側、経腸、真皮中（interdermal）、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、髄腔内、静脈内、室内（intraventricular）、粘膜、経鼻、経口、直腸、皮下、舌下、局所、気管（気管内への滴下注入によるものを含む）、経皮、腔内および硝子体により行うことができる。

【0037】

薬剤：用語「薬剤」は、本明細書で使用される場合、例えばポリペプチド、核酸、糖類、脂質、小分子、金属、またはそれらの組合せを含めた任意の化学的クラスの化合物または実体を指すことができる。一部の実施形態では、薬剤は、自然に見出されるおよび／または自然から得られるという点で天然産物であり、または天然産物を含む。一部の実施形態では、薬剤は、人の手によって設計、操作および／もしくは生成されるという点で人為的な、ならびに／または自然には見出されない1つもしくは複数の実体であり、または1つもしくは複数の実体を含む。一部の実施形態では、薬剤は、単離形態または純粋形態で利用することができ、一部の実施形態では、薬剤は、粗製形態で利用することができる。一部の実施形態では、潜在的に可能な薬剤が、コレクションまたはライブラリーとして提供され、例えばこれらは、それらに含まれる活性剤（active agent）を同定しまたは特徴付けるために、スクリーニングされ得る。本発明に従って利用され得る薬剤の特定の一部の実施形態は、小分子、抗体、抗体断片、アプタマー、核酸（例えば、siRNA、shRNA、DNA/RNAハイブリッド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム）、ペプチド、ペプチド模倣薬等を含む。一部の実施形態では、薬剤は、ポリマーであり、またはポリマーを含む。一部の実施形態では、薬剤は、ポリマーではなく、かつ／またはいかなるポリマーも実質的に含まない。一部の実施形態では、薬剤は、少なくとも1つのポリマー部分を含有する。一部の実施形態では、薬剤は、いかなるポリマー部分も含まず、または実質的に含まない。

【0038】

類似体：本明細書で使用される場合、用語「類似体」は、1つまたは複数の特定の構造的な特色、要素、構成成分、または部分を、参照物質と共有する物質を指す。典型的に「類似体」は、参照物質と著しい構造的類似性を示しており、例えばコアまたはコンセンサス構造を共有しているが、ある特定の個別の形で異なっている。一部の実施形態では、類似体は、参照物質の化学的操作によって参照物質から生成することができる物質である。一部の実施形態では、類似体は、参照物質を生成するプロセスと実質的に類似の（例えば、そのプロセスと複数のステップを共有する）合成プロセスを実施することによって生成され得る物質である。一部の実施形態では、類似体は、参照物質を生成するために使用されるプロセスとは異なる合成プロセスを実施することによって生成され、または生成され得る。

【0039】

動物：本明細書で使用される場合、用語「動物」は、動物界の任意のメンバーを指す。一部の実施形態では、「動物」は、任意の発達段階のヒトを指す。一部の実施形態では、「動物」は、任意の発達段階の非ヒト動物を指す。一部の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物（例えば、げっ歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類、および／またはブタ）である。一部の実施形態では、動物には、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、および／または蠕虫（worm）が含まれるが、それらに限定されない。一部の実施形態では、動物は、遺伝子導入動物、遺伝子操作動物、および／またはクローンであり得る。

【0040】

アンタゴニスト：本明細書で使用される場合、用語「アンタゴニスト」は、i) 別の薬剤の効果を阻害、低減もしくは低下させ、かつ／またはii) 1つもしくは複数の生物学的現象を阻害、低減、低下もしくは遅延させる薬剤を指す。アンタゴニストは、例えば小分子、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、金属、および／または関連性のある阻害活

10

20

30

40

50

性を示す任意の他の実体を含めた、任意の化学的クラスの薬剤であってもよく、またはそれらを含むことができる。アンタゴニストは、直接的であってもよく（この場合、その標的に直接的に影響を与える）、または間接的であってもよい（この場合、例えばその標的のレベルまたは活性が変わるように、例えば標的の調節因子と相互作用することによって、その標的との結合以外によって影響を与える）。

【0041】

およそ：本明細書で使用される場合、用語「およそ」および「約」は、それぞれ、関連性のある文脈に相応する分野の当業者によって理解される通りの通常の統計的変動を包含することを企図する。ある特定の実施形態では、用語「およそ」または「約」は、それぞれ、別段指定されない限り、または別段文脈から明らかにならない限り、記載の値（例えば、このような数字が可能値の100%を超える場合）からいずれかの方向（超えるまたは未満）で25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%またはそれ未満以内に入る値の範囲を指す。

10

【0042】

と関連する：「関連する」という用語が本明細書で使用される場合、2つの事象または実体は、一方の存在、レベルおよび／または形態が他方のものと相関していれば、互いに「関連する」。例えば、特定の実体（例えば、ポリペプチド）は、その存在、レベルおよび／または形態が、特定の疾患、障害、または状態（例えば、関連性のある集団全体の）の発生率および／または感受性と相関していれば、その疾患、障害、または状態と関連するとみなされる。一部の実施形態では、2つまたはそれを超える数の実体は、それらが直接的または間接的に相互作用し、したがって互いに物理的に近接する、または近接したままであるならば、互いに物理的に「関連する」。一部の実施形態では、互いに物理的に関連する2つまたはそれを超える数の実体は、互いに共有結合によって連結しており、一部の実施形態では、互いに物理的に関連する2つまたはそれを超える数の実体は、互いに共有結合によって連結していないが、例えば水素結合、ファンデルワールス相互作用、疎水性相互作用、磁性、およびそれらの組合せによって非共有結合的に関連している。

20

【0043】

生物学的に活性な：本明細書で使用される場合、句「生物学的に活性な」は、生物系（例えば、細胞（例えば、単離された細胞、培養細胞、組織の細胞、生物の細胞）において、細胞培養物において、組織において、生物において等）において活性を有する物質を指す。例えば、生物に投与されると、その生物に対して生物学的効果を有する物質は、生物学的に活性であるとみなされる。活性が存在するためには、しばしば生物学的に活性な物質の一部または一断片だけが必要とされる（例えば必要である、十分である）、このような環境において、その一部または断片は、「生物学的に活性な」一部または断片であるとみなされることを、当業者は理解する。

30

【0044】

結合：用語「結合」は、本明細書で使用される場合、典型的に、2つまたはそれを超える数の実体の間またはそれらの中で非共有結合的に関連していることを指すと理解される。「直接的」な結合は、実体または部分間の物理的接触を含み、間接的な結合は、1つまたは複数の中間にある実体との物理的な接触による物理的相互作用を含む。2つまたはそれを超える数の実体間の結合は、典型的に、相互作用する実体または部分が単離において、またはより複雑な系の文脈（例えば、担体である実体と、および／または生物系もしくは細胞において、共有結合的に関連するまたはそれ以外の方法で関連する一方）において研究される場合を含めた、様々な文脈のいずれかにおいて評価することができる。

40

【0045】

特徴的な一部分：本明細書で使用される場合、用語「特徴的な一部分」は、最も広範な意味において、その存在（または非存在）が、物質の特定の特色、特質、または活性の存在（または非存在）と相関する、物質の一部分を指すために使用される。一部の実施形態では、物質の特徴的な一部分は、特定の特色、特質または活性を共有している物質および

50

関係する物質には見出されるが、特定の特色、特質または活性を共有していないものには見出されない一部分である。ある特定の実施形態では、特徴的な一部分は、少なくとも1つの機能的特徴を、無傷の物質と共有する。例えば一部の実施形態では、タンパク質またはポリペプチドの「特徴的な一部分」は、一緒になってタンパク質またはポリペプチドの特徴となるひと続きのアミノ酸、またはひと続きのアミノ酸の集合体を含む一部分である。一部分の実施形態では、このようなそれぞれのひと続きは、一般に、少なくとも2、5、10、15、20、50、またはそれを超える数のアミノ酸を含む。一般に、物質（例えば、タンパク質、抗体等）の特徴的な一部分は、上に特定した配列および／または構造の同一性に加えて、少なくとも1つの機能的特徴を、関連性のある無傷の物質と共有している一部分である。一部の実施形態では、特徴的な一部分は、生物学的に活性であり得る。

10

【0046】

組合せ治療：本明細書で使用される場合、用語「組合せ治療」は、被験体が、2つまたはそれを超える数の治療レジメン（例えば、2つまたはそれを超える数の薬剤）に同時に晒される状況を指す。一部の実施形態では、2つまたはそれを超える数の薬剤は、同時に投与することができ、一部の実施形態では、このような薬剤は、逐次的に投与することができ、一部の実施形態では、このような薬剤は、重複する投与レジメンで投与される。

【0047】

比較できる：用語「比較できる」は、本明細書で使用される場合、互いに同一にはなり得ないが、それらの間で比較できるのに十分類似しており、したがって、観察された差異または類似性に基づいて合理的に結論を引き出すことができる、2つまたはそれを超える数の薬剤、実体、状況、条件の組等を指す。一部の実施形態では、条件、環境、個体、または集団の比較できる組は、複数の実質的に同一の特色、および1つのまたは少数の変化した特色によって特徴付けられる。当業者は、文脈において、2つまたはそれを超える数のこのような薬剤、実体、状況、条件の組等が任意の所与の環境において比較できるとみなされるのに、どれほどの同一性の度合いが必要とされるかを理解する。例えば当業者は、環境、個体、または集団の異なる組の下でまたはそれらによって得られた結果または観察された現象の差異が、変化する特色の変動によって引き起こされているまたはその変動を示しているという妥当な結論を保証するのに十分な数およびタイプの実質的に同一の特色によって特徴付けられる場合に、互いに比較できると理解する。

20

30

【0048】

に対応する：本明細書で使用される場合、「に対応する」という用語は、適切な参照薬剤に存在する構造的要素または部分と、ある位置（例えば、三次元空間における、または別の要素もしくは部分に対する）を共有する、目的の薬剤における構造的要素または部分を示すためにしばしば使用される。例えば、一部の実施形態では、この用語は、ポリペプチドにおけるアミノ酸残基または核酸におけるヌクレオチド残基などの、ポリマーにおける残基の位置／同一性を指すために使用される。当業者は、このようなポリマーにおける残基が、単純化の目的で、正準のナンバリング系を使用して関係する参照ポリマーに基づいてしばしば指定され、したがって、例えば参照ポリマーの190位にある残基「に対応する」第1のポリマーの残基は、実際に第1のポリマーにおける190番目の残基である必要はないが、参照ポリマーにおける190番目の位置に見出される残基に対応することを、当業者は理解する。当業者には、ポリマー配列を比較するために特に設計された1つまたは複数の市販で利用可能なアルゴリズムの使用によることを含めて、「対応する」アミノ酸を同定する方法が容易に理解される。

40

【0049】

誘導体：本明細書で使用される場合、用語「誘導体」は、参照物質の構造的類似体を指す。すなわち「誘導体」は、参照物質と有意な構造的類似性を示し、例えばコアまたはコンセンサス構造を共有しているが、ある特定の個別の方法で異なっている物質である。一部の実施形態では、誘導体は、化学的操作によって参照物質から生成することができる物質である。一部の実施形態では、誘導体は、参照物質を生成するプロセスと実質的に類似

50

の（例えば、そのプロセスと複数のステップを共有する）合成プロセスを実施することによって生成され得る物質である。

【0050】

設計された：本明細書で使用される場合、用語「設計された」は、（i）その構造が人の手によって選択されるもしくは選択された薬剤、（ii）人の手を必要とするプロセスによって生成される薬剤、および／または（iii）天然物質および他の公知の薬剤とは異なる薬剤を指す。

【0051】

決定する：本明細書に記載の多くの方法論は、「決定する」ステップを含む。当業者は、本明細書を読めば、このような「決定」は、例えば本明細書に明確に言及されている特定の技術を含めて当業者が利用可能な様々な技術のいずれかを利用することができるか、またはそれらを使用することによって達成できることを理解する。一部の実施形態では、決定は、物理的試料の操作を含む。一部の実施形態では、決定は、例えばコンピューター、または関連性のある分析を実施するように適合された他のプロセッシングユニットを利用して、データまたは情報を考慮および／または操作することを含む。一部の実施形態では、決定は、関連性のある情報および／または材料を供給源から受け取ることを含む。一部の実施形態では、決定は、試料または実体の1つまたは複数の特色を、比較できる参照物と比較することを含む。

【0052】

診断情報：本明細書で使用される場合、「診断情報」または「診断に使用するための情報」は、患者が疾患、障害もしくは状態を有しているかどうかを決定し、および／あるいは疾患、障害または状態を、疾患、障害もしくは状態の予後、または疾患、障害もしくは状態の処置（一般的な処置または任意の特定の処置のいずれか）に対する応答の見込みに関して有意性を有する表現型のカテゴリーまたは任意のカテゴリーに分類するのに有用な情報である。同様に「診断」は、限定されるものではないが、被験体が疾患、障害もしくは状態（例えばがん）を有する可能性があるかもしくは発生する可能性があるかどうか、被験体に顕在化した疾患、障害もしくは状態の状況、病期分類もしくは特徴、腫瘍の性質もしくは分類に関係する情報、予後に関係する情報、および／または適切な処置を選択するのに有用な情報を含めた、任意のタイプの診断情報を提供することを指す。処置の選択は、特定の治療（例えば化学療法）剤または他の処置様式（modality）、例えば外科手術、放射線等の選択、治療を保留するかまたは送達するかどうかに関する選択、投与レジメンに関する選択（例えば、1つまたは複数の用量の特定の治療剤または治療剤の組合せの頻度またはレベル）等を含むことができる。

【0053】

剤形：本明細書で使用される場合、用語「剤形」は、被験体に投与するための物理的に別個の単位の活性剤（例えば、治療剤または診断剤）を指す。各単位は、所定量の活性剤を含有する。一部の実施形態では、このような量は、関連性のある集団に投与された場合に（すなわち治療投与レジメンを用いて）所望のまたは有益な転帰と相関することが決定付けられた投与レジメンに従って投与するのに適した、単位投与量（unit dosage amount）（またはその画分全体）である。特定の被験体に投与された治療組成物または薬剤の総量は、1人または複数の担当医によって決定され、複数の剤形の投与を含み得ることが、当業者には理解される。

【0054】

投与レジメン：本明細書で使用される場合、用語「投与レジメン」は、典型的に一定期間隔てて被験体に個々に投与される一群の単位用量（典型的に2つ以上）を指す。一部の実施形態では、所与の治療剤は、1つまたは複数の投与（dose）を含み得る推奨投与レジメンを有する。一部の実施形態では、投与レジメンは、複数の投与を含み、そのそれぞれは、同じ長さの期間によって互いに隔てられ、一部の実施形態では、投与レジメンは、複数の投与を含み、少なくとも2つの異なる期間によって個々の投与が隔てられる。一部の実施形態では、投与レジメン内のすべての投与は、同じ単位投与量（unit do

10

20

30

40

50

se amount) である。一部の実施形態では、投与レジメン内の異なる投与は、異なる量である。一部の実施形態では、投与レジメンは、第1の投与量で第1の投与を行い、その後、第1の投与量とは異なる第2の投与量で、1回または複数回の追加の投与を行うことを含む。一部の実施形態では、投与レジメンは、第1の投与量で第1の投与を行い、その後、第1の投与量と同じ第2の投与量で1回または複数回の追加の投与を行うことを含む。一部の実施形態では、投与レジメンは、関連性のある集団全体に投与された場合に、所望のまたは有益な転帰と相関する（すなわち治療投与レジメンである）。

【0055】

必須脂肪酸：本明細書で使用される場合、用語「必須脂肪酸」は、良好な健康のために身体が必要とするが合成できないため、特定の生物（例えばヒト）が摂取しなければならない脂肪酸を指す。例示的な必須脂肪酸として、オメガ-6脂肪酸およびオメガ-3脂肪酸が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0056】

マーカー：マーカーは、本明細書で使用される場合、その存在またはレベルが、特定の状況または事象の特徴である実体または部分を指す。一部の実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、疾患、障害または状態の存在または病期に特徴的であり得る。単なる一つの例を挙げると一部の実施形態では、この用語は、特定の腫瘍、腫瘍サブクラス、腫瘍の病期等に特徴的である遺伝子発現産物を指す。あるいはまたはさらには、一部の実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、例えば特定のクラスの腫瘍に特徴的であり得る特定のシグナル伝達経路の活性（または活性レベル）と相関する。マーカーの存在または非存在の統計的有意性は、特定のマーカーに応じて変わり得る。一部の実施形態では、マーカーの検出は、腫瘍が特定のサブクラスのものである確率が高いことをマーカーが反映するという点で、高度に特異的である。このような特異性は、感度を犠牲にして得られる場合がある（すなわち、腫瘍が、マーカーを発現すると予測される腫瘍である場合でも、陰性結果が生じ得る）。逆に、感度の度合いが高いマーカーは、感度がより低いマーカーよりも特異性が低いことがある。本発明によれば、有用なマーカーは、特定のサブクラスの腫瘍を精度100%で区別する必要はない。

20

【0057】

モジュレーター：用語「モジュレーター」は、目的の活性が、モジュレーターが存在しない場合以外は比較できる条件下で観察された活性と比較して、その活性のレベルおよび／または性質の変化と相関することが観察される系における存在またはレベルを有する実体を指すために使用される。一部の実施形態では、モジュレーターは、活性が、モジュレーターが存在しない場合以外は比較できる条件下で観察された活性と比較して、その存在が増加しているという点で活性化因子である。一部の実施形態では、モジュレーターは、活性が、モジュレーターが存在しない場合以外は比較できる条件と比較してその存在が低下するという点で、アンタゴニストまたは阻害剤である。一部の実施形態では、モジュレーターは、目的の活性を有する標的実体と直接的に相互作用する。一部の実施形態では、モジュレーターは、目的の活性を有する標的実体と間接的に相互作用する（すなわち、標的実体と相互作用する中間薬剤と直接的に相互作用する）。一部の実施形態では、モジュレーターは、目的の標的実体のレベルに影響を及ぼし、あるいはまたはさらには、一部の実施形態では、モジュレーターは、標的実体のレベルに影響を及ぼさずに、目的の標的実体の活性に影響を及ぼす。一部の実施形態では、モジュレーターは、目的の標的実体のレベルと活性の両方に影響を及ぼし、したがって観察された活性の差異は、観察されたレベルの差異によって完全には説明されず、または観察されたレベルの差異とは釣り合わない。

30

40

【0058】

医薬組成物：本明細書で使用される場合、用語「医薬組成物」は、1つまたは複数の薬学的に許容される担体と一緒に製剤化された活性化剤を指す。一部の実施形態では、活性化剤は、関連性のある集団に投与される場合に所定の治療効果を達成する、統計的に有意な確率を示す治療レジメンで投与するのに適した単位投与量で存在する。一部の実施形態

50

では、医薬組成物は、経口投与、例えば水薬（水性または非水性溶液または懸濁液）、錠剤、例えば頬側、舌下および全身吸収を標的としたもの、ボラス剤、散剤、顆粒剤、舌に適用するためのペースト剤；非経口投与、例えば皮下、筋肉内、静脈内もしくは硬膜外注射、例えば無菌の溶液もしくは懸濁液、または徐放製剤によるもの；局所適用、例えばクリーム剤、軟膏剤、または皮膚、肺もしくは口腔に適用される制御放出パッチもしくはスプレー剤；腔内または直腸内、例えばペッサリー、クリーム剤またはフォーム；舌下；眼；経皮；または経鼻、肺、および他の粘膜表面に適合されるものを含めた固体形態または液体形態による投与のために、特別に製剤化され得る。

【0059】

薬学的に許容される：用語「薬学的に許容される」は、本明細書で使用される場合、良好な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、または他の問題もしくは合併症なしに人間および／または動物の組織に接触させて使用するのに適しており、妥当なベネフィット／リスク比に相応する薬剤を指す。

【0060】

薬学的に許容される担体：本明細書で使用される場合、用語「薬学的に許容される担体」は、薬学的に許容される材料、組成物またはビヒクル、例えば液体もしくは固体フィラー、希釈剤、賦形剤、または身体のある臓器または一部分から身体の別の臓器または一部分に対象化合物の運搬または輸送に関与する溶媒封入材料を意味する。各担体は、製剤のその他の成分と適合性があり、患者にとって侵害性がないという意味で「許容され」なければならない。薬学的に許容される担体として働くことができる材料のいくつかの例として、糖、例えばラクトース、グルコースおよびスクロース；デンプン、例えばトウモロコシデンプンおよびバレイショデンプン；セルロース、およびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース；粉末化トラガント；麦芽；ゼラチン；タルク；賦形剤、例えばカカオバターおよび坐剤ワックス；油、例えばピーナツ油、綿実油、ペニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油および大豆油；グリコール、例えばプロピレングリコール；ポリオール、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール；エステル、例えばオレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル；寒天；緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張食塩水；リンゲル溶液；エチルアルコール；pH緩衝液；ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ酸無水物；ならびに医薬製剤に用いられる他の非毒性の適合性のある物質が挙げられる。

【0061】

防止：用語「防止」は、本明細書で使用される場合、特定の疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状の発症の遅延、ならびに／またはその頻度および／もしくは重症度の低減を指す。一部の実施形態では、防止は、集団ベースで評価され、したがって特定の疾患、障害または状態に罹患しやすい集団において、その疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状の発生、頻度および／または強度の統計的に有意な低減が観察される場合に、薬剤は、その疾患、障害または状態を「防止する」とみなされる。

【0062】

R a s 関連性：本明細書で使用される場合、用語「R a s 関連性」または「R a s 駆動性」は、R a s 癌遺伝子が活性化される（例えば、調節されないこともしくはその他の方法での増殖の増加を特徴としない、かつ／または活性化と関連もしくは相関するR a s 対立遺伝子もしくは変異を含有もしくは発現しないという点でがん性ではなく、その他の点では同一であることを含めた比較できる細胞または組織などの、適切な対照細胞または組織に対して、発現および／または活性が増加する）細胞または腫瘍を指すために使用される。一部の実施形態では、このようなR a s 活性化は、腫瘍において検出される。一部の実施形態では、腫瘍は、R a s 活性化との相関が確立されているタイプのものであり、またはそのようなタイプの子孫である。

【0063】

参照：用語「参照」は、本明細書では、目的の薬剤、個体、集団、試料、配列または値

10

20

30

40

50

と比較される、標準または対照の薬剤、個体、集団、試料、配列または値を記載するためにしばしば使用される。一部の実施形態では、参照の薬剤、個体、集団、試料、配列または値は、目的の薬剤、個体、集団、試料、配列または値の試験または決定と実質的に同時に試験および／または決定される。一部の実施形態では、参照の薬剤、個体、集団、試料、配列または値は、必要に応じて有形の媒体により具体化されている歴史的参照である。典型的に、当業者に理解される通り、参照の薬剤、個体、集団、試料、配列または値は、目的の薬剤、個体、集団、試料、配列または値を決定するかまたは特徴付けるために利用される条件と比較できる条件下で決定され、または特徴付けられる。

【0064】

応答：本明細書で使用される場合、処置への応答は、処置の結果として生じるまたは処置と相関する被験体の状態の任意の有益な変化を指すことができる。このような変化は、状態の安定化（例えば、処置がない状態で生じたと思われる悪化の防止）、状態の症状の緩和、および／または状態の治癒の見通しの改善等を含み得る。応答は、被験体の応答または腫瘍の応答を指すことができる。腫瘍または被験体の応答は、臨床基準および客観的基準を含めた、多種多様な基準に従って測定することができる。応答を評価するための技術には、臨床試験、陽電子放出断層撮影（tomography）、胸部X線CTスキャン、MRI、超音波、内視鏡検査、腹腔鏡検査、被験体から得られた試料における腫瘍マーカーの存在もしくはレベル、細胞診断、および／または組織学的検査が含まれるが、それらに限定されない。これらの技術の多くは、腫瘍のサイズを決定し、またはその他の方法で腫瘍負荷量全体を決定しようとするものである。処置への応答を評価するための方法および指針は、Therasseら、「New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors」、European Organization for Research and Treatment of Cancer、National Cancer Institute of the United States、National Cancer Institute of Canada、J. Natl. Cancer Inst.、2000年、92巻（3号）：205～216頁に論じられている。正確な応答基準は、腫瘍および／または患者の群を比較する場合に、比較される群が、応答速度を決定するために同じまたは比較できる基準に基づいて評価されるという条件で、任意の適切な方式で選択することができる。当業者は、適切な基準を選択することができる。

【0065】

リスク：文脈から理解される通り、疾患、障害または状態の「リスク」は、特定の個体が、疾患、障害または状態を発生する見込みの度合いである。一部の実施形態では、リスクは、百分率として表される。一部の実施形態では、リスクは、0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%から100%までである。一部の実施形態では、リスクは、参照試料または参照試料の群と関連するリスクに対するリスクとして表される。一部の実施形態では、参照試料または参照試料の群は、疾患、障害または状態の公知のリスクを有している。一部の実施形態では、参照試料または参照試料の群は、特定の一個体と比較できる個体からのものである。一部の実施形態では、相対的リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれを超える。

【0066】

試料：本明細書で使用される場合、用語「試料」は、典型的に、本明細書に記載の通り目的の供給源から得られたまたはそれに由来する生物学的試料を指す。一部の実施形態では、目的の供給源は、生物、例えば動物またはヒトを含む。一部の実施形態では、生物学的試料は、生体組織または流体であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、生物学的試料は、骨髄；血液；血液細胞；腹水；組織もしくは細針生検試料；細胞を含有する体液；浮動性（free floating）核酸；喀痰；唾液；尿；脳脊髄液、腹水；胸水；糞；リンパ；婦人科学的流体；皮膚スワブ；膣スワブ；口腔スワブ；鼻スワブ；洗浄液もしくは洗浄物、例えば腺管洗浄物もしくは気管支肺胞（bronchoalve

olar) 洗浄物；吸引物；擦過物；骨髓被検物；組織生検被検物；外科的被検物；糞、他の体液、分泌物および／もしくは排出物；ならびに／またはそれらに由来する細胞等であってもよく、またはそれらを含むことができる。一部の実施形態では、生物学的試料は、個体から得られた細胞であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、得られた細胞は、試料を得た個体から得られた細胞であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、試料は、目的の供給源から任意の適切な手段によって直接的に得られた「一次試料」である。例えば、一部の実施形態では、生物学的一次試料は、生検（例えば、細針吸引または組織生検）、外科手術、体液収集（例えば、血液、リンパ、糞等）等からなる群から選択される方法によって得られる。一部の実施形態では、用語「試料」は、文脈から明らかである通り、一次試料の処理によって（例えば、一次試料の1つまたは複数の構成成分を除去することによって、および／または一次試料に1つもしくは複数の薬剤を添加することによって）得られる調製物を指す。例えば、半透過膜を使用して濾過する。このような「処理された試料」は、試料から抽出された、または一次試料を、mRNAの増幅もしくは逆転写、ある特定の構成成分の単離および／もしくは精製などの技術で処理することによって得られた、例えば核酸またはタンパク質を含むことができる。

10

【0067】

小分子：本明細書で使用される場合、用語「小分子」は、低分子量の有機化合物および／または無機化合物を意味する。一般に「小分子」は、サイズが約5キロダルトン(kD)未満の分子である。一部の実施形態では、小分子は、約4kD未満、3kD未満、約2kD未満、または約1kD未満である。一部の実施形態では、小分子は、約800ダルトン(D)未満、約600D未満、約500D未満、約400D未満、約300D未満、約200D未満、または約100D未満である。一部の実施形態では、小分子は、約200g/mol未満、約1500g/mol未満、約1000g/mol未満、約800g/mol未満、または約500g/mol未満である。一部の実施形態では、小分子は、ポリマーではない。一部の実施形態では、小分子は、ポリマー部分を含まない。一部の実施形態では、小分子は、タンパク質またはポリペプチドではない（例えば、オリゴペプチドまたはペプチドではない）。一部の実施形態では、小分子は、ポリヌクレオチドではない（例えば、オリゴヌクレオチドではない）。一部の実施形態では、小分子は、多糖体ではない。一部の実施形態では、小分子は、多糖体を含まない（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質等ではない）。一部の実施形態では、小分子は、脂質ではない。一部の実施形態では、小分子は、モジュレート剤である。一部の実施形態では、小分子は、生物学的に活性である。一部の実施形態では、小分子は、検出可能である（例えば、少なくとも1つの検出可能な部分を含む）。一部の実施形態では、小分子は、治療剤である。

20

30

【0068】

固体形態：当技術分野で公知の通り、多くの化学的実体（特に、多くの有機分子および／または多くの小分子）は、例えば非晶質形態および／または結晶形態（例えば多形、水和物、溶媒和物等）などの様々な異なる固体形態を取り入れることができる。一部の実施形態では、このような実体は、任意の固体形態を含めた任意の形態で利用することができる。一部の実施形態では、このような実体は、特定の形態、例えば特定の固体形態で利用される。

40

【0069】

特異的な：用語「特異的な」は、活性を有する薬剤または実体を参照して本明細書で 사용되는場合、当業者には、その薬剤または実体が、潜在的に可能な標的または状態の間の違いを識別することを意味すると理解される。例えば薬剤は、競合する代替標的の存在下で薬剤の標的と優先的に結合する場合、その薬剤の標的に「特異的に」結合するとされる。一部の実施形態では、薬剤または実体は、その標的と結合する条件下では、競合する代替標的に検出可能に結合しない。一部の実施形態では、薬剤または実体は、競合する代替標的（複数可）と比較して、薬剤または実体の標的に対してより高いオン速度(on-rate)、より低いオフ速度(off-rate)、高い親和性、低い解離性、および

50

／または高い安定性で結合する。

【0070】

被験体：「被験体」は、哺乳動物（例えば一部の実施形態では、出生前のヒト形態を含めたヒト）を意味する。一部の実施形態では、被験体は、関連性のある疾患、障害または状態に罹患している。一部の実施形態では、被験体は、疾患、障害または状態に罹患しやすい。一部の実施形態では、被験体は、疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状または特徴を呈している。一部の実施形態では、被験体は、疾患、障害または状態の任意の症状または特徴を呈していない。一部の実施形態では、被験体は、疾患、障害もしくは状態に対する感受性、または疾患、障害もしくは状態のリスクに特徴的な1つまたは複数の特色を有している人である。被験体は、患者であってもよく、患者は、疾患の診断または処置を施す医師の診察を受けるヒトを指す。一部の実施形態では、被験体は、治療を施される個体である。

10

【0071】

実質的に：本明細書で使用される場合、用語「実質的に」は、目的の特徴または特性の全体的またはほぼ全体的な程度または度合いを呈する質的な状態を指す。生物学的分野の当業者は、生物学的現象および化学的現象が完了し、かつ／もしくは完全に至るまで進行し、もしくは達成されることは、仮にあるとしてもめったになく、または絶対的な結果を回避することを理解する。したがって、用語「実質的に」は、本明細書では、多くの生物学的現象および化学的現象に固有の、完全性の潜在的な欠如を捉えるために使用される。

【0072】

20

罹患しやすい：疾患、障害または状態（例えば、インフルエンザ）に「罹患しやすい」個体は、その疾患、障害または状態を発生するリスクがある。一部の実施形態では、疾患、障害または状態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害または状態の任意の症状も呈していない。一部の実施形態では、疾患、障害または状態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害および／または状態を有していると診断されていない。一部の実施形態では、疾患、障害または状態に罹患しやすい個体は、その疾患、障害または状態の発生に関連する状態に曝露された個体である。一部の実施形態では、疾患、障害および／または状態を発生するリスクは、集団ベースのリスクである（例えば、疾患、障害または状態に罹患している個体の家族）。

【0073】

30

症状が低減される：本発明によれば、特定の疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状の大きさ（例えば強度、重症度等）および／または頻度が低減される場合に、「症状が低減される」。明らかにする目的で、特定の症状の発症の遅延は、その症状の頻度が減少する1つの形態とみなされる。まだ腫瘍が小さい多くのがん患者は、症状がない。本発明は、症状が排除される場合だけに限定されるものではない。本発明は、具体的には、1つまたは複数の症状が、完全には排除されないが低減される（および被験体の状態が、それによって「改善される」）ような処置を企図する。

【0074】

治療剤：本明細書で使用される場合、句「治療剤」は、一般に、生物に投与されると所望の薬理学的効果を引き出す任意の薬剤を指す。一部の実施形態では、薬剤は、適切な集団全体に統計的に有意な効果があることを実証された場合に、治療剤であるとみなされる。一部の実施形態では、適切な集団は、モデル生物の集団であり得る。一部の実施形態では、適切な集団は、例えばある特定の年齢群、性別、遺伝的背景、既存の臨床状態等の様々な基準によって定義され得る。一部の実施形態では、治療剤は、疾患、障害および／または状態の1つまたは複数の症状または特色を、軽減する、寛解させる、和らげる、阻害する、防止する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、かつ／またはその発生率を低減するために使用できる物質である。一部の実施形態では、「治療剤」は、ヒトに投与するために販売され得る前に、政府機関によって承認されており、または承認される必要がある薬剤である。一部の実施形態では、「治療剤」は、ヒトに投与するために医学的処方箋が必要とされる薬剤である。

40

50

【0075】

治療レジメン：「治療レジメン」は、この用語が本明細書で使用される場合、関連性のある集団全体への投与が、所望のまたは有益な治療転帰と相関する投与レジメンを指す。

【0076】

治療有効量：本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」は、処置される被験体に、任意の医学的処置に適用できる妥当なベネフィット／リスク比で治療効果を付与する、治療用タンパク質（例えば、受容体チロシンキナーゼ抗体）の量を指す。治療効果は、客観的であってもよく（すなわち、いくつかの試験またはマーカーによって測定可能である）、または主観的であってもよい（すなわち被験体が効果の指標を示し、または効果を感じる）。特に「治療有効量」は、疾患に関連する症状を寛解させること、疾患の発症を防止もしくは遅延させること、および／または疾患の症状の重症度もしくは頻度を低減することなどによって、所望の疾患もしくは状態を処置する、寛解させる、もしくは防止するか、または検出可能な治療効果もしくは防止効果を呈するのに有効な、治療用タンパク質または組成物の量を指す。治療有効量は、一般に、複数の単位用量を含み得る投与レジメンで投与される。任意の特定の治療用タンパク質について、治療有効量（および／または有効な投与レジメンにおいて適切な単位用量）は、例えば投与経路、他の医薬品との組合せに応じて変わり得る。また、任意の特定の患者のための具体的な治療有効量（および／または単位用量）は、処置される障害および障害の重症度；用いられる具体的な医薬品の活性；用いられる具体的な組成物；患者の年齢、体重、全体的な健康状態、性別および治療食；用いられる具体的な融合タンパク質の投与時間、投与経路、および／または排出速度もしくは代謝速度；処置期間；ならびに医療分野で周知の類似の要因を含めた、様々な要因に応じて変わり得る。

【0077】

処置：本明細書で使用される場合、用語「処置」（また「処置する」または「処置すること」）は、特定の疾患、障害および／または状態（例えば、がん）の1つまたは複数の症状、特色および／または原因を、部分的または完全に軽減する、寛解させる、和らげる（relieves）、阻害する、その発症を遅延させる、その重症度を低減する、かつ／またはその発生率を低減する物質（例えば、抗受容体チロシンキナーゼ抗体または受容体型チロシンキナーゼアンタゴニスト）の任意の投与を指す。このような処置は、関連性のある疾患、障害および／もしくは状態の徴候を呈していない被験体、ならびに／または疾患、障害および／もしくは状態の初期徴候だけを呈している被験体に対して行うことができる。あるいはまたはさらには、このような処置は、関連性のある疾患、障害および／または状態の、1つまたは複数の確立された徴候を呈している被験体に対して行うことができる。一部の実施形態では、処置は、関連性のある疾患、障害および／または状態に罹患していると診断された被験体に対して行うことができる。一部の実施形態では、処置は、関連性のある疾患、障害および／または状態が発生するリスクの増加に統計的に相関している、1つまたは複数の感受性要因を有することが公知の被験体に対して行うことができる。

【0078】

単位用量：表現「単位用量」は、本明細書で使用される場合、医薬組成物の単回用量としておよび／または物理的に別個の単位で投与される量を指す。多くの実施形態では、単位用量は、所定量の活性剤を含有する。一部の実施形態では、単位用量は、薬剤の単回用量全体を含有する。一部の実施形態では、2つ以上の単位用量は、全単回用量を達成するために投与される。一部の実施形態では、所期の効果を達成するために、複数の単位用量の投与が必要とされ、または必要であると予測される。単位用量は、例えば、所定量の1つまたは複数の治療剤を含有する液体（例えば許容される担体）の体積、所定量の固体形態の1つまたは複数の治療剤、所定量の1つまたは複数の治療剤を含有する徐放製剤または薬物送達デバイス等であり得る。単位用量は、治療剤（複数可）に加えて、様々な構成成分のいずれかを含む製剤として存在し得ることが理解される。例えば下記の通り、許容される担体（例えば、薬学的に許容される担体）、希釈剤、安定剤、バッファ、保存剤等

が含まれ得る。多くの実施形態では、特定の治療剤の適切な1日総投与量は、単位用量の一部または複数を構成することができ、例えば担当医によって良好な医学的判断の範囲内で決定され得ることを、当業者は理解する。一部の実施形態では、任意の特定の被験体または生物のための具体的な有効用量レベルは、処置される障害および障害の重症度；用いられる具体的な活性化合物の活性；用いられる具体的な組成物；被験体の年齢、体重、全体的な健康状態、性別および治療食；用いられる具体的な活性化合物の投与時間および排出速度；処置期間；用いられる具体的な化合物（複数可）と組み合わせてまたは同時に使用される薬物および／または追加の治療、ならびに医療分野で周知の類似の要因を含めた、様々な要因に応じて変わり得る。

【0079】

ある特定の実施形態の詳細な説明

がんにおける脂質代謝

がん細胞は、それらの増殖を支持するために一定のエネルギー供給および構造的な構成成分を必要とする。癌遺伝子は、代謝を活発に再プログラムして、この供給を容易にする（1、2）。ヒトのがんにおいて最も一般的に活性化される経路の2つが、PI3K-Akt経路およびRas経路である（3）。PI3K-Akt経路は、がんにおいて役割を果たすことに加えて、インスリンシグナル伝達の主なエフェクターであるため、この経路の代謝効果は広範囲に研究されてきた。Akt活性化は、グルコースの取込み、解糖フラックス、および乳酸排出、すなわちワールブルグ効果を促進する（2）。さらに、Akt活性化は、mTORの下流活性化によって、タンパク質合成を増加させる（4）。最後にAktは、酵素リン酸化、およびSREBPのmTOR依存性活性化のような転写活性化を含めた機序を介して、脂質生成を誘導する（5、6）。

【0080】

脂肪酸は、脂質の主な構成成分である。脂肪酸の合成には、細胞質アセチル-CoAの生成が必要である（図1A）。酸素正常状態では、主な経路は、グルコースからピルビン酸への異化反応を含み、ピルビン酸は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによってミトコンドリアアセチル-CoAに変換される。次に、アセチル-CoAは、クエン酸の形態で細胞質ゾルに輸送され、直接的なAkt標的であるATP-クエン酸リアーゼによって切断されて、細胞質アセチル-CoAを生成する。低酸素状態では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼが、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼによって不活化され（7、8）、グルタミンに駆動される還元的カルボキシル化が、クエン酸、したがってアセチル-CoAの分率を増加させる原因となる（9～11）。

【0081】

脂肪酸合成経路のその後のステップは、SREBP標的であるアセチル-CoAカルボキシラーゼおよび脂肪酸シンターゼによって触媒され、パルミチン酸（C16:0、ここで16は、脂肪酸における炭素原子の数を指し、0は二重結合の数を示す）を生じる。次に、パルミチン酸は、様々な伸長反応および不飽和化反応のための基質となって、細胞による多様な脂肪酸の必要性に対応する。多様な脂肪酸のうち、最も豊富に存在するものが、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸（C18:1）である（12）。オレイン酸は、伸長によってパルミチン酸からステアリン酸（C18:0）になり、その後、電子アクセプターとして酸素を必要とする Δ^9 ステアロイル-CoAデサチュラーゼ1（SCD1）による不飽和化を受けて生成される。適切な膜流動性、したがって細胞完全性を確保するためには、細胞によって、ステアリン酸に対するオレイン酸の特定の比が維持されなければならない。著しい不均衡は、アポトーシスを誘導することが示されている（13～15）。SCD1は、PI3K-Akt-mTOR経路によって調節され（5）、肥満およびがんの両方の薬理学的標的として調査されている（16～19）。

【0082】

実際に本開示より以前は、本明細書に含まれる実施例で議論されている通り、本開示より以前は、がん細胞が、それらの非必須脂肪酸の大部分をde novo合成すると一般に想定されていた。この想定は、主に、10%血清および酸素正常状態で実施された細胞

10

20

30

40

50

培養実験に基づくものである。この想定は、最も重要な発癌性経路の1つであるPI3K-Akt-mTORのグルコース依存性の脂質生成促進効果によって支持される。また、RasはAktを活性化するので、グルコース依存性の脂質生成促進の役割も有している可能性があると予測されている。本開示は、とりわけ、このような想定に関する問題の源を実証する。

【0083】

Ras活性化は、PI3K-Akt経路の活性化と同様に、グルコースの取込みおよび乳酸排出を誘導する(20)。Rasは、PI3K-Akt経路を活性化することが公知であるが、下流の代謝効果が分岐し得ることが近年の知見から示唆されていることを、本開示では十分認識されている。例えば、Rasは、ミトコンドリア呼吸を低減する(21)。さらに、Rasは、マクロピノサイトーシスおよび自己貪食を誘導し、それによって代謝基質の潜在的に可能な代替源を提供する(22~24)。分岐的な代謝効果のさらなる支持として、マウス異種移植実験によって、Ras駆動性腫瘍とPI3K-Akt活性化を伴う腫瘍との間でカロリー制限への感度に差異があることが明らかになった(25)。Aktの脂質生成促進効果とは対照的に、脂質代謝に対するRasの影響は、以前には調査されていなかった。さらに、脂質代謝を含めた代謝に対する、酸素利用性と癌遺伝子シグナル伝達の相互作用は、本開示より以前は広範に調査されていなかった。

【0084】

本明細書に記載の通り、本発明者らは、¹³C-トレーサーおよびリピドミクスを使用して、形質転換細胞における脂質生成を、癌遺伝子発現および酸素利用性の関数として研究した。本発明者らは、低酸素状態では、脂肪酸の移入を増加させることによって、de novo脂肪酸合成および不飽和化の要求が減少することを見出した。発癌性Rasは、低酸素状態の代謝表現型を繰り返し、脂肪酸取込みへの依存度が増加すると、Ras駆動性がん細胞はSCD1阻害に耐性を有するようになる。移入脂肪酸の主な供給源は、1つの脂肪酸の尾部を有する血清脂質であるリゾ脂質である。単一の脂肪酸の尾部を有する脂質を異化する能力は、侵襲性のがんおよびRas駆動性がんにおいて増強されることが以前に示された(26~28)。本発明の結果は、関係するリゾ脂質の捕捉が、低酸素状態の細胞およびRas駆動性がん細胞の両方における脂肪酸獲得の主な経路であり得ることを示している。

【0085】

したがって本開示は、Rasが、グルコース依存性のde novo脂質生成を誘導しないが、その代わりに血清脂肪酸の捕捉を刺激することを実証する。このような捕捉は、本明細書で研究される全ての細胞に固有の特性であり、Ras活性化、低酸素状態、および/または培地への生理的濃度のリゾリン脂質(すなわち、ただ1つの脂肪酸の尾部を有するリン脂質)の添加によって、さらに増加する。捕捉が増強されると、Ras駆動性細胞は、主な哺乳動物デサチュラーゼであるSCD1の薬理的阻害に耐性を有するようになる。さらに、捕捉が増強されると、電子アクセプターとして酸素分子を必要とするSCD1を回避することによって、低酸素状態でのRas駆動性腫瘍の成長を容易にし得る。

【0086】

脂質捕捉の標的化

本開示は、特に、例えばRas関連腫瘍などの腫瘍細胞における脂質捕捉を標的化するための様々な技術の価値を実証し、それを提供する。一部の実施形態では、このような標的化は、それらの環境から脂質を上手く捕捉する細胞(例えば、腫瘍細胞)および/または腫瘍の同定を可能にする。一部の実施形態では、提供される技術によって、脂質捕捉の度合いおよび/もしくは種類、ならびに/または脂質生合成と比較した場合の脂質捕捉への相対的な依存を同定し、かつ/または特徴付けることができる。したがって、このような技術は、脂質捕捉系を改変することによって成長、増殖および/または生存率が影響を受け得る細胞および/または腫瘍の同定を可能にする。

【0087】

単なるいくつかの例を挙げれば、本開示を読解することによって当業者には明らかになる

通り、脂質を捕捉する細胞および／または腫瘍は、脂質合成を阻害する様式を用いると、成長阻害に対する感受性が低下するのに対して、このような細胞および／または腫瘍は、脂質捕捉に干渉する様式を用いると、成長阻害に対する感受性が高くなる。したがって一部の実施形態では、本発明は、異なるタイプの治療に応答する可能性が相対的に高いまたはなさそうなものとして、細胞および／または腫瘍を分類する技術を提供する。例えば本発明によれば、脂質を捕捉する細胞は、脂質生合成を阻害または妨害する治療に応答する可能性が低く、脂質捕捉を阻害または妨害する治療に応答する可能性が高い。あるいはまたはさらには、一部の実施形態では、本発明は、特定の腫瘍を処置するのに適した治療様式を選択する技術、および／またはこのような様式を用いてこのような腫瘍を処置する技術を提供する。

10

【0088】

一部の実施形態では、本発明は、細胞環境 (cellular milieu) から捕捉可能な脂質の存在またはレベルをモジュレートすることによって、脂質捕捉を標的化する技術を提供する。例えば、本明細書に記載の通り、脂質を捕捉する腫瘍細胞、例えば Ras 関連腫瘍細胞は、1つの脂肪酸の尾部を有するリン脂質 (リゾリン脂質) を優先的に蓄積する傾向がある。本開示は、例えば Ras 駆動性腫瘍を含めた Ras 駆動性細胞が、それらによるリゾリン脂質の捕捉の成功を低減する、例えば細胞環境 (例えば血液) におけるこのようなリゾリン脂質のレベルを制限することを含む治療レジメンに対して感受性を示し得ることを実証する。

【0089】

20

また本開示は、具体的には、ホスファチジルグリセロール脂質ならびに／またはより高い不飽和度および／もしくはより長い炭素鎖を有する脂肪酸が、腫瘍 (例えば Ras 関連腫瘍) において、それに隣接する良性腫瘍よりも高いレベルでしばしば検出可能であったことを実証する。本開示は、例えば Ras 駆動性腫瘍を含めた Ras 駆動性細胞が、それらによるこのような脂質 (例えば、ホスファチジルグリセロール脂質ならびに／またはより高い不飽和度および／もしくはより長い炭素の尾部を有する脂肪酸) の捕捉の成功を低減する治療レジメンに対して感受性を示し得ることを実証する。本開示は、例えば Ras 駆動性腫瘍を含めた Ras 駆動性細胞が、それらによるこのような脂質の捕捉の成功を低減する、例えば細胞環境 (例えば血液) におけるそれらのレベルを制限することを含む治療レジメンに対して感受性を示し得ることを実証する。

30

【0090】

一部の実施形態では、本発明は、1つまたは複数の脂質の捕捉の成功に関与し、かつ／またはそれに必要な1つまたは複数の作用物質のレベルおよび／または活性を阻害する状態および／または薬剤に、細胞 (例えば、腫瘍細胞および／または腫瘍) を曝露することによって、脂質捕捉を標的化する技術を提供する。あるいはまたはさらには、一部の実施形態では、本発明は、1つまたは複数の脂質の捕捉の成功に干渉する (例えば直接阻害によって、競合によって、および／または転換などによって) 1つまたは複数の作用物質のレベルおよび／または活性を増強する状態および／または薬剤に、細胞 (例えば、腫瘍細胞および／または腫瘍) を曝露することによって、脂質捕捉を標的化する技術を提供する。

40

【0091】

一部の実施形態では、関連性のある薬剤は、細胞脂質捕捉機構の構成成分と直接的に相互作用する。一部の実施形態では、関連性のある薬剤は、細胞脂質捕捉機構の構成成分と直接的に相互作用しない。

【0092】**感受性腫瘍**

とりわけ、本開示は、ある特定の Ras 関連腫瘍が脂質捕捉を利用し、かつ／またはそれに依存することを実証する。したがって本発明によれば、このような腫瘍は、脂質生合成を阻害または妨害する治療様式に応答する可能性が相対的に低く、脂質捕捉を阻害または妨害する治療様式に応答する可能性が相対的に高いようである。

50

【0093】

Ras 駆動性細胞によるリゾリン脂質の取込みおよび利用は、より網羅的な「捕捉剤」の存在様式の重要部分である。発癌性 Ras は、自己貪食およびマクロピノサイトーシスの両方を上方調節し、これらは共にバルク材料のエンドサイトーシス小胞への取り込みに関与する。自己貪食は、細胞内内容物を消費し（細胞の喰殺）、マクロピノサイトーシスは細胞外内容物を消費する。これらは共に、高分子分解を介して栄養を提供することができ、マクロピノサイトーシスは、リゾ脂質取込みに直接的に寄与することが可能である。

【0094】

マクロピノサイトーシスの潜在的に可能な役割に関係なく、捕捉は、Ras 駆動性がんの代謝の顕著な特徴である。PI3K-Akt 経路によって駆動された腫瘍は、活動的に生合成に従事し、代謝的に脆弱になるが、その代わり、主に発癌性 Ras によって駆動された腫瘍が、細胞外高分子を利用して新しい高分子および脂質の生成に必要な基質を得ることによって急速成長を維持する能力を備えることを、本開示は実証する。この観察は、治療的な意味を有しており、SCD1 などの同化酵素の阻害剤に対して Ras 駆動性腫瘍が比較的頑強になる。同時に、この観察は、Ras 駆動性がんに対する治療標的としての捕捉経路酵素を暗示している。

【0095】

Ras は、低分子量 GTPase と呼ばれる、細胞内のシグナルの伝達に関与する（細胞シグナル伝達）関係するタンパク質のファミリーである。例示的な Ras タンパク質として、H-Ras、N-Ras および K-Ras が挙げられるが、それらに限定されない。すべての Ras タンパク質は、「オン」および「オフ」状態の2つのシグナル伝達スイッチとして機能する。Ras は、典型的に、「オフ」状態（または不活性化状態）では、ヌクレオチドのグアノシン二リン酸（GDP）に結合し、「オン」状態（または活性化状態）では、グアノシン三リン酸（GTP）に結合する。普通は、Ras は、活性な GTP 結合形態と不活性な GDP 結合形態の間の循環によって調節される。本明細書で使用される場合、用語「慢性的に活性化された Ras」は、活性な状態で構成的もしくは永久的にロックされている、または野生型 Ras と比較して失活速度が低下した Ras-GTPase 形態を指す。

【0096】

典型的に、慢性的に活性化された Ras は、GTP 加水分解速度を防止または低減する変異を含有する。一部の実施形態では、慢性的に活性化された Ras は、P-ループにおける残基 G12 および／または触媒残基 Q61 において見出される変異によって引き起こされる。例えば、H-Ras の残基 12 におけるグリシンからバリンへの変異によって、慢性的に活性化された Ras が生じる。別の非限定的な例として、残基 61 は、GTP 加水分解の遷移状態の安定化に関与している。一部の実施形態では、慢性的に活性な Ras は、N-Ras において Q61K 変異を含有し、それによって固有の Ras-GTP 加水分解速度が低減する。別の非限定的な例として、コドン 12 の変異（Gly から Ala、Arg、Asp、Cys、Ser、または Val）およびコドン 13 の変異（Gly から Asp）によって、慢性的に活性化された K-Ras が生じる。

【0097】

Ras 活性化に関連することが公知の特定の Ras 対立遺伝子には、例えば H-Ras V12G、K-Ras G12D、および K-Ras G12V が含まれる。

【0098】

慢性的に活性化された Ras は、様々ながんに関与するとされている。例えばいくつかの例を挙げれば、以下のがんは、慢性的に活性化された Ras に関連することが公知である：肺がん K-Ras、膵臓（K-Ras）、非小細胞肺腺癌（K-Ras）、結腸直腸（K-Ras）、甲状腺（K-Ras、H-Ras および N-Ras）、セミノーマ（K-Ras および N-Ras）、骨髓異形成症候群（K-Ras および N-Ras）、急性骨髄性白血病（N-Ras）、慢性骨髄性白血病（N-Ras）、黒色腫（N-Ras）、膀胱（H-Ras）、肝臓（N-Ras）および腎臓（H-Ras）。

【0099】

以下の表は、必ずしも完全ではないが、より包括的な R a s 関連がんの一覧を提示している。

【表1】

表1

例示的な Ras 関連がん

欠損または変異	腫瘍タイプ	頻度(%)
RAS - K	膵臓	90
RAS - K	肺腺癌(非小細胞)	35
RAS - K	結腸直腸	45
RAS - H, K, N	甲状腺(濾胞性)	55
RAS - H, K, N	甲状腺(未分化乳頭)	60
RAS - K, N	セミノーマ	45
RAS - N, K	骨髄異形成症候群	40
RAS - N	急性骨髄性白血病	30
RAS - N	黒色腫	15
RAS - H	膀胱	10
RAS - N	肝臓	30
RAS - H	腎臓	10
欠損または変異	腫瘍タイプ	頻度(%)
RAS - K	肺腺癌	33
RAS - K	結腸腺癌	44、40、47(異なる方法)
RAS - K	結腸腺腫	50
RAS - K	結腸腺腫(家族性腺腫性ポリポーシス)	13, 7
RAS - K	膵臓(腺癌)	84、93、75(異なる方法)
RAS - H, K, N	甲状腺(濾胞癌)	53
RAS - H, K, N	甲状腺(未分化癌)	60
RAS - K, N	セミノーマ	43
RAS - N, K	骨髄異形成症候群	5, 38, 40, 41, 9
RAS - N	急性骨髄性白血病	50, 63, 19, 27, 19, 56, 70, 28, 27, 26, 26, 11
RAS - N	慢性骨髄性白血病	17(慢性)、50(急性)
RAS - N	黒色腫	8, 19
RAS - H	膀胱癌	7、7、17(異なる方法)
RAS - N	肝臓癌	30
RAS - H	腎臓癌	16, 14

【0100】

標的化剤

原則として、レベル、形態および／または活性が、脂質捕捉の特色と相関し、かつ／またはそれをモジュレートする（例えば阻害するまたは増強する）任意の薬剤は、少なくとも本明細書に記載のある特定の実施形態では、脂質捕捉を標的化する薬剤であり得る。

【0101】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、小分子であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、ポリペプチドであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、核酸であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、グリカンであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、脂質であるか、またはそれを含む。

【0102】

一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、抗体薬剤（例えば、脂質捕捉機構の構成成分に結合する）であるか、またはそれを含む。

10

【0103】

一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤は、核酸薬剤（例えば、アンチセンス薬剤または siRNA 薬剤）（例えば、脂質捕捉機構の構成成分に結合し、かつ／またはその構成成分をコードするもしくはこのような構成成分に相補的な遺伝子もしくは遺伝子産物に結合する）であるか、またはそれを含む。

【0104】

一部の実施形態では、標的化薬剤は、検出可能な部分であり、またはそれに関連する。一部の実施形態では、標的化薬剤は、治療部分に関連する。

【0105】

脂質捕捉を標的化する薬剤の同定および／または特徴付け

20

一部の実施形態では、本開示は、脂質捕捉を標的化する薬剤の同定および／または特徴付けのための方法論を提示する。

【0106】

例えば、本明細書に記載の通り、本発明は、例えば細胞の脂肪酸含量を決定することによって、ならびに／または様々な脂質および／もしくは代謝産物の測定を行うことによって、細胞、例えば腫瘍細胞による脂質捕捉を評価する技術を提供する。

【0107】

一部の実施形態では、提供される系は、脂質捕捉を標的化する薬剤を同定し、および／または特徴付けるために利用することができる。

【0108】

30

例えば一部の実施形態では、全体的な脂質レベル、および／または1つもしくは複数の特定の脂質もしくは脂質タイプのレベルは、細胞中で、脂質が存在しない場合および／または関連性のある対照と比較して、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤の存在下で変わる。一部の実施形態では、脂質タイプの分布（例えば、特定の脂質種および／または脂質タイプの相対量）は、細胞（例えば、腫瘍細胞または腫瘍）中で、脂質が存在しない場合および／または関連性のある対照と比較して、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤の存在下で変わる。

【0109】

一部の実施形態では、腫瘍体積は、脂質が存在しない場合および／または関連性のある対照と比較して、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤の存在下で低減される。

40

【0110】

一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する薬剤としてのその実用性が評価されるべき、複数の試験薬剤が提供される。このような一部の実施形態では、このような複数のメンバーは、適切な対照に対して、本明細書に記載の通りアッセイされる。このような試験薬剤は、その存在またはレベルが、適切な参照に対して本明細書に記載の脂質捕捉の特色の関連性のある変化と相関する場合に、脂質捕捉を標的化する薬剤と指定され得る。

【0111】

一部の実施形態では、試験薬剤は、本明細書に記載の通り、1つまたは複数のアッセイ

50

または評価に個々に晒すことができる。一部の実施形態では、試験薬剤は、一緒にプールし、次に本明細書に記載の通り、1つまたは複数のアッセイまたは評価に晒すことができる。次に、こうして晒したプールを、さらなるアッセイまたは評価のために分割することができる。

【0112】

一部の実施形態では、ハイスループットスクリーニング法を使用して、多数の潜在的に可能な試験化合物を含有する化学的ライブラリーもしくはペプチドライブラリー、または他のコレクションをスクリーニングする。次に、このような「化学的ライブラリー」を、1つまたは複数のアッセイでスクリーニングして、所望の特徴的な活性を呈するライブラリーメンバー（特定の化学種またはサブクラス）を同定する。こうして同定された化合物は、通常の「リード化合物」として働くことができ、または潜在的に可能なもしくは実際のモジュレーターとして（例えば治療剤として）それら自体使用することができる。

10

【0113】

脂質捕捉を標的化することによる処置に感受性の腫瘍の検出

本明細書に記載の通り、本発明は、例えば脂質生合成を標的化する治療または脂質捕捉を標的化する治療などの特定のタイプの治療に応答する可能性が高いまたは低い腫瘍を検出および／または分類するための様々な方法論を提供する。

【0114】

一部の実施形態では、腫瘍は、例えば適切な対照（例えば、隣接する非腫瘍組織の細胞）に関連性のある腫瘍細胞に存在する脂質のレベルおよび／またはタイプを決定することによって、検出および／または分類される。

20

【0115】

一部の実施形態では、腫瘍は、脂質捕捉状態と相関する特色のレベル、量またはタイプを決定することによって、検出および／または分類される。例えば本明細書に記載の通り、本開示は、Ras 関連腫瘍が脂質捕捉腫瘍であることを実証する。したがって一部の実施形態では、Ras 活性の1つもしくは複数の特徴、ならびに／またはその存在、形態もしくはレベルが脂質捕捉活性と相関する1つもしくは複数の腫瘍関連性マーカーの決定および／または検出を介して、特定のタイプの治療に応答する可能性が高いまたは低い腫瘍が同定され、かつ／または特徴付けられる。

【0116】

一部の実施形態では、腫瘍は、特定のがん関連性Ras 対立遺伝子（例えば、H-Ras V12G、K-Ras G12D、および／またはK-Ras G12V）を検出および／または定量することによって、検出および／または分類される。

30

【0117】

脂質捕捉を標的化することによる腫瘍の処置

哺乳動物細胞の成長は、膜構造の複製を必要とする。このことに基づいて、脂肪酸シターゼおよびアセチルCoAカルボキシラーゼを含めた脂肪酸シターゼ酵素の阻害剤を用いたがんの処置に関心が集まっている。このような酵素は、「非必須」脂肪酸を生成する。しかし、脂質構造物の複製は、オメガ-3脂肪酸およびオメガ-6脂肪酸などの多価不飽和脂肪酸を含めた必須脂肪酸も必要とする。

40

【0118】

本明細書に記載の通り、腫瘍成長のために不飽和脂肪酸が重要であることを指摘する少なくとも3つの証拠がある。1つの証拠は、良性的隣接組織と比較したヒト膵臓がんの脂肪酸組成（全組成、膜脂質およびトリグリセリドをけん化することによって決定される）の測定を含む。膵臓がんは、多価不飽和脂肪酸の尾部を有するホスファチジルグリセロールリン脂質が高度に富化されていることが観察された（図11参照）。別の証拠は、Ras 駆動性肺がんの成長に対する異なる治療食の影響を測定することを含むものであった。Ras 駆動性肺がん株A549に由来する異種移植腫瘍細胞の成長は、飽和脂肪酸または炭水化物（飽和脂肪酸に代謝され得る）が豊富な治療食を給餌したマウスと比較して、不飽和脂肪酸が豊富な治療食を給餌したマウスの方が速いことが観察された（図12参照

50

）。第3の証拠は、培養がん細胞による血清からの脂肪酸の取込みの研究を含んでいた（図1～10参照）。これらのデータはともに、いくつかのまたはすべての不飽和脂肪酸の摂取を制限することによるがんの処置、例えば米国においてがんによる一般的な死亡原因の一つであるRas 駆動性腫瘍の処置を示している。特に、本明細書に提示の証拠は、オメガ6脂肪酸の取込みを制限することの重要性を指摘する。

【0119】

これらの観察は、現在の臨床診療とは完全に反する。がんを有する患者にとって、食欲が低下し、体重が減少することは非常に一般的である。したがって栄養士は、消耗および悪液質を防止する一助にするために、脂肪サプリメントを頻繁に処方していた。これらのサプリメントは、典型的に、不飽和必須脂肪酸が豊富な魚油に基づくものである。このような脂肪酸は、実際、腫瘍成長を促進し得る。したがって、本開示の一態様は、オメガ6脂肪酸、またはより一般的には多価不飽和脂肪酸、またはさらにより一般的にはすべての不飽和脂肪酸が枯渇したサプリメントを含む。このようなサプリメントは、心血管の安全性の観点から問題があるとみなされるため、現在存在していない。それにもかかわらず、このような心血管の課題は、がん患者にとって、がんを最小限に抑えるためのあらゆる可能な食事および補給ステップを取り入れることと比較して懸念が小さい。

10

【0120】

一般に、本開示は、脂質捕捉を標的化することによって、ある特定の腫瘍、特にRas 関連腫瘍を処置することの望ましさおよび有効性を実証する。当業者であれば、このような標的化を果たすために、様々な手法のいずれかを利用できることが理解されよう。一部の実施形態では（例えば、本明細書に記載のある特定の食事管理の実施形態では）、例えば、治療食における脂質摂取を制御することによって、ある特定の脂質が捕捉に利用されることが制限される。

20

【0121】

一部の実施形態では、脂質捕捉機構の特定の構成成分は、例えば、このような構成成分と直接的に相互作用し、またはその他の方法で構成成分のレベルおよび／もしくは活性をモジュレートする薬剤を使用することによって標的化される。

【0122】

一部の実施形態では、全般的な脂質捕捉手法が履行される。一部の実施形態では、特定の脂質または脂質タイプの捕捉を標的化するためのステップが行われる。一部の特定の実施形態では、少なくともリゾリン脂質捕捉が標的化される。一部の実施形態では、少なくともホスファチジルグリセロール脂質ならびに／またはより高い不飽和度および／もしくはより長い炭素鎖を有する脂肪酸の捕捉が標的化される。様々な実施形態では、本明細書に記載の通り、食事管理によるものを含めた脂質捕捉を標的化する治療様式は、少なくとも2週間、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間、8週間、9週間、10週間、11週間、12週間、13週間、14週間、15週間、16週間、17週間、18週間、19週間、20週間、21週間、22週間、23週間、24週間、25週間、26週間の期間にわたって、または治療エンドポイントが観察されるまで、例えば腫瘍の縮小が観察されるまで投与される。

30

【0123】

食事管理

とりわけ、本開示は、食事による脂肪酸摂取をモジュレートすることによって、ある特定の腫瘍を処置することを包含する。

40

【0124】

一態様では、本開示は、具体的には、例えば脂質摂取の食事管理によって、血清中の捕捉脂質のレベルおよび／またはタイプを制御することによって、Ras 駆動性細胞（例えばRas 関連腫瘍）による脂質捕捉の成功を低減するための様式を提供する。一部の実施形態では、脂質摂取は、好適な捕捉脂質の摂取を制限することによって制御される。一部の実施形態では、脂質摂取は、他の脂質と比較して、好適な捕捉脂質の相対的な摂取を調節することによって制御される。一部の特定の実施形態では、脂質摂取は、脂質を含む、

50

特に目的の細胞または腫瘍にとって好適な捕捉脂質ではない脂質を含有する栄養サプリメントを提供および／または使用することによって制御される。

【0125】

一部の特定の実施形態では、脂質摂取は、飽和脂肪酸が豊富な治療食であるが多価不飽和脂肪酸が少ない治療食を、それを必要としている患者に投与することによって制御される。一部の実施形態では、このような治療食は、過剰の完全飽和した脂肪酸を含み、かつ／または多価不飽和脂肪酸を実質的に含まない。一部の実施形態では、このような治療食は、完全飽和した脂肪酸を提供する（例えば、このような完全飽和した脂肪酸からなるまたはそれを含む）栄養サプリメントの摂取を含む。

【0126】

一部の実施形態では、所望の治療食は、タンパク質が豊富なサプリメントを、高レベル（2000カロリーの治療食に基づいて、1日当たりの推奨摂取量である約15gのおよそ100%またはそれを超える）の飽和脂肪酸を含むが、低レベル（2000カロリーの治療食に基づいて、1日当たりの推奨摂取量である約20gのおよそ0～50%、例えば10g未満、8g未満、6g未満、2g未満、1g未満、または0.5g未満）の多価不飽和脂肪酸を含む追加の脂肪補給と組み合わせることによって達成することができる。栄養障害を防止するための多価不飽和脂肪酸の最小量は、人によって変わり、投与は、臨床医によって、潜在的な副作用、例えば乾燥、鱗状皮膚、感染に対する感受性、不十分な創傷治癒、視覚障害、および神経学的異常の出現を評価された後に修正される。

【0127】

脂肪補給を上記のタンパク質サプリメントと組み合わせる代替として、一部の実施形態では、追加のタンパク質補給なしに脂肪サプリメントを使用することができる。

【0128】

様々な実施形態では、本明細書に記載の有用な食事レジメンの一部として使用できる栄養サプリメントは、脂質を含み、この脂質の大部分は脂肪酸の尾部を含有しており、サプリメントにおける多価不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比は、1を超える。本明細書で使用される場合、「大部分」は、サプリメントに存在する少なくとも50.1%の脂質が、脂肪酸の尾部を有することを意味する。

【0129】

例えば、それに限定されるものではないが、本開示の一実施形態は、コーティングおよび内部の高カロリー物質を含む、カプセル剤または丸剤の形態の栄養サプリメントまたは代用食品を含み、このコーティングは、当技術分野で公知の任意の丸剤またはカプセル剤のコーティングであり、内部の高カロリー物質は、脂肪酸および／または脂質を含む。一部の実施形態では、脂肪酸および脂質の組成は、例えば代替の脂肪酸もしくは脂質を含む、または脂肪酸もしくは脂肪を含まない、比較できるサプリメント（例えば、他の点では類似または同一のサプリメント）を取り入れることと比較して、サプリメントを取り入れる個体におけるがんの成長を緩和するように選択される。

【0130】

様々な態様では、提供される栄養サプリメント、代用食品、および／または食事レジメンは、（多価）不飽和脂肪酸に対する飽和脂肪酸の比が1、2、3、4、5、8、10、15、20、25、30、35、40、45、または50を超える脂肪酸を含むように選択される、設計される、かつ／または製造される。一部の実施形態では、含まれる脂肪酸は、動物源および／または植物源から得られる。当業者には理解される通り、このような様々な供給源は、飽和脂肪酸が豊富な脂質および／または脂質混合物を提供することができる。一部の実施形態では、提供される栄養サプリメント、代用食品、および／または食事レジメンは、健康を維持するための1日当たりの最小必要量を満たし、かつ／または例えばオメガ-3脂肪酸とオメガ-6脂肪酸の特定の所望の比を達成するため（例えば、所望の治療上の利益を達成するため）に、適切なレベルの不飽和（例えば多価不飽和）脂肪酸を含む。様々な態様では、オメガ-6脂肪酸を超える、例えば1、2、3、4、5、7、10、15、20、25または30を超えるモル比のオメガ-3脂肪酸を含むことが望

10

20

30

40

50

ましい。一部の実施形態では、少なくとも一部の含まれた脂肪酸は、多価不飽和脂肪酸が豊富な魚または他の供給源から得られる。

【0131】

一部の実施形態では、提供される栄養サプリメント、代用食品、および／または食事レジメンに含まれる脂肪酸は、遊離脂肪酸形態であり、一部の実施形態では、例えばグリセリドおよび／またはリン脂質（例えば、リゾリン脂質）の構成成分として（例えばその文脈において）提供される。

【0132】

様々な実施形態では、供給源から得られた1つまたは複数の脂肪酸は、本明細書に記載の栄養サプリメント、代用食品、および／または食事レジメンに含まれる前に水素化される。あるいはまたはさらには、一部の実施形態では、第1の供給源に由来する1つまたは複数の脂肪酸を、第2の供給源に由来する1つまたは複数の脂肪酸と組み合わせて、本発明による栄養サプリメント、代用食品、および／または食事レジメンに使用するための脂肪酸組成物を提供する。

10

【0133】

一部の実施形態では、本発明に従って利用される栄養サプリメント、代用食品および／または食事レジメンの総脂肪含量は、1日当たりの推奨摂取量である約15g（2000カロリーの治療食に基づく）の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%もしくは100%またはそれを超える飽和脂肪酸、および1日当たりの推奨摂取量であるおよそ20g（2000カロリーの治療食に基づく）のおよそ0%、10%、20%、30%、40%または50%の多価不飽和脂肪酸である。

20

【0134】

一部の実施形態では、脂肪酸摂取の所望のレベルは、本明細書に記載の通り、1～5単位用量の栄養サプリメントまたは代用食品を消費することによって達成される。例えば、一部の実施形態では、利用される栄養サプリメントまたは代用食品は、重量比が10:1の飽和脂肪酸と多価不飽和脂肪酸を含有する（例えば、飽和脂肪酸10gおよび多価不飽和脂肪酸1g、または同様に、飽和脂肪酸が豊富な脂質10gおよび多価不飽和脂肪酸が豊富な脂質1g）。一部の実施形態では、このような栄養サプリメントまたは代用食品は、他の方法では低脂肪の食事レジメンに含まれ、このような治療食は、必要に応じて低タンパク質の場合もある。

30

【0135】

一部の実施形態では、本発明に従って利用される栄養サプリメント、代用食品および／または食事レジメンは、1.0重量%未満、0.9重量%未満、0.8重量%未満、0.7重量%未満、0.6重量%未満、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満、または0.05重量%未満の濃度のアラキドン酸を有する。

【0136】

一部の実施形態では、本発明に従って利用される栄養サプリメント、代用食品および／または食事レジメンは、少なくとも30重量%、少なくとも40重量%、少なくとも50重量%、少なくとも60重量%、または少なくとも70重量%が脂質である。

40

【0137】

一般に、本発明に従って利用される栄養サプリメントおよび／または代用食品は、当技術分野で公知の任意の形態、例えば粉末、ゲル、懸濁液、ペースト、固体、液体、液体濃縮物、復元可能な粉化乳代用物、またはすぐに使用できる生成物で、製造、提供、および／または利用することができる。一部の実施形態では、このような栄養サプリメントおよび／または代用食品は、特定のカロリー含量に標準化され、すぐに使用できる生成物として提供され、かつ／または濃縮形態で提供される。様々な実施形態では、組成物は、5μm～1500μmの範囲の粒径を有する粉末形態で存在する。

【0138】

脂肪酸は、例えば所望の感覚性および安定性の特性を得るために選択された、提供され

50

たおよび／または製造された、精製され、封入され、かつ／または化学的もしくは酵素的に改変された形態で、本発明に従って利用される。一部の実施形態では、封入された脂肪酸は、耐水溶性であるが、小腸に到達すると放出される。一部の実施形態では、このような結果は、例えば腸溶コーティング、例えば架橋アルギン酸を使用することによって、および／または当技術分野で公知のかつ／もしくは当技術分野で日常的に実施される他の手法によって達成することができる。

【0139】

一部の実施形態では、利用される栄養サプリメント、代用食品および／または食事レジメンは、タンパク質源を含む。一部の実施形態では、タンパク質源は、限定されるものではないが、乳（例えば無脂乳）、ホエイタンパク質、カゼイン、ダイズタンパク質、加水分解タンパク質、およびアミノ酸を含めた、当技術分野で公知の任意のタンパク質源であり得る。一部の実施形態では、本開示の実施において有用なウシ乳タンパク質源には、乳タンパク質粉末、乳タンパク質濃縮物、乳タンパク質単離物、無脂乳固形分、無脂乳、乾燥無脂乳、ホエイタンパク質、ホエイタンパク質単離物、ホエイタンパク質濃縮物、スイートホエイ、酸ホエイ、カゼイン、酸カゼイン、カゼイン酸塩（例えば、カゼイン酸ナトリウム、カゼイン酸ナトリウムカルシウム（sodium calcium caseinate）、カゼイン酸カルシウム）およびそれらの組合せが含まれるが、それらに限定されない。

【0140】

様々な実施形態では、タンパク質は、無傷のタンパク質として、本発明に従って提供される、製造されるおよび／または利用される。様々な実施形態では、タンパク質は、例えば約4%～10%の加水分解度で、無傷のタンパク質と部分的に加水分解されたタンパク質の両方の組合せとして提供される、製造されるおよび／または利用される。様々な実施形態では、タンパク質は、より完全に加水分解されている。様々な実施形態では、本発明に従って提供される、製造されるおよび／または利用されるタンパク質源は、個々のアミノ酸および／または短鎖オリゴペプチドからなるか、またはそれらを含む。

【0141】

様々な実施形態では、所望の食事レジメンを支持するために本発明に従って利用される組成物（例えば、栄養サプリメントおよび／または代用食品）は、遊離形態のおよび／または脂質構造物の一部としての、様々な供給源に由来する飽和および不飽和の脂肪酸、糖、水、グルコース、ゼラチン、クエン酸、天然フレーバー、光沢剤（限定されるものではないが、パーム油、白色蜜蝋、カルナウバワックス、乳化剤、グリセロールエステルを含む）、酒石酸、パルミチン酸アスコルビル、リンゴ酸、添加着色料（限定されるものではないが、クルクミン、パプリカ、および他の着色剤を含む）を含む。

【0142】

様々な実施形態では、このような例示的な組成物は、遊離形態のおよび／または脂質構造物の一部としての、当技術分野で公知の様々な供給源に由来する飽和脂肪酸、ゼラチン、グリセリン、水、天然レモン油、保存剤としての混合天然トコフェロールを含む。

【0143】

組合せ治療

一部の実施形態では、本明細書に記載の通り脂質捕捉を標的化する様式は、がん、例えばRas関連がんの処置における1つまたは複数の他の治療と組み合わせられる。

【0144】

様々な多価不飽和脂肪酸、特に ω -6脂肪酸であるアラキドン酸は、乳房および膵臓の腫瘍成長、ならびに他のタイプのがんの成長の促進に関与するとされている。多価不飽和脂肪酸が腫瘍成長を促進する正確な機序は、未知のままであるが、膵臓がんでは、アラキドン酸を代謝する酵素シクロオキシゲナーゼ-2に依存し得ることが示された（Funahashiら、Pancreas、2008年）。これにより、NSAIDの使用が、膵臓がんおよび潜在的に他のがんの発生率が低いことと関連し得る理由を説明することができる（Bradleyら、B. J. Cancer、2010年）。したがって、飽和

10

20

30

40

50

脂肪酸を高レベルで（１日当たりの推奨摂取量の１００％またはそれを超える）含有するが、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸および潜在的に他の多価不飽和脂肪酸を低レベルで（１日当たりの推奨摂取量の０～５０％）含有するようにモジュレートされた治療食は、NSAIDクラスの薬物または他のシクロオキシゲナーゼ阻害剤と協同する。

【０１４５】

様々な実施形態では、脂質捕捉を標的化するために提供される様式は、化学療法レジメン中にがん患者に施行される。一部の実施形態では、このような化学療法レジメンは、当技術分野で公知の任意の化学療法剤の投与を含み得る。化学療法剤の例として、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド（CYTOXAN（商標））；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）；エチレンイミンおよびメチルメラミン（methyamelamines）（アルトレタミン、トリエチレンメラミン（triethylenemelamine）、トリエチレンホスホルアミド（trietylenephosphoramidate）、トリエチレンチオホスホアミド（triethylenethiophosphoramidate）およびトリメチロロメラミン（trimethylolomelamine）を含む）；アセトゲニン（acetogenin）（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリストアチン（callystatin）；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビセレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189およびCBI-TMIを含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン（pancratistatin）；サルコジクチン（sarcodictyin）；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン（chlomaphazine）、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビチン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア（nitrosourea）、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えばエンジン抗生物質（例えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマ１およびカリケアマイシンシータⅠ、例えば、Angew Chem. Intl. Ed. Engl. 33巻：183～186頁（1994年）参照；ジネマイシン（dynemicin）（ジネマイシンAを含む）；エスペラマイシン；ならびにネオカルチノスタチン発色団および関係する色素タンパク質エンジン抗生物質発色団（chromophore）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabycin）、カルミノマイシン（caminomycin）、カルチノフィリン（carzinophilin）；クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン（モルホリノードキソルビシン、シアノモルホリノードキソルビシン、２-ピロリノ（pyrrolino）ードキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン（nitomycin）、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；代謝拮抗物質、例えばメトトレキサートおよび５-フルオロウラシル（５-FU）；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビン、６-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジ

10

20

30

40

50

ン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FU；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤（anti-adrenal）、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充物（replenisher）、例えばフォリン（frolinic）酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキサート（edatraxate）；デホファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジコン；エルフォミチン（elfomithine）；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサマイトシン（ansamitocin）；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン（sizofuran）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラクリン（verracurin）A、ロリジン（roridin）Aおよびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ara-C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばパクリタキセル（TAXOL（商標）、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ）およびドセタキセル（doxetaxel）（TAXOTERE（登録商標）、Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル；ゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例えばシスプラチンおよびカルボプラチン；ビンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベルビン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロナート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（difluoromethylomithine）（DMFO）；レチノイン酸；カペシタビン；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体が挙げられる。この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば抗エストロゲン薬（例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼを阻害する4（5）-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン（Fareston）を含む）；ならびに抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン；siRNAならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体も含まれる。

【0146】

医薬組成物

本発明の方法の様々な実施形態によれば、食事レジメンまたはサプリメントの一部として摂取するための、脂質捕捉を標的化する薬剤および／または脂質は、被験体に単独で、または本明細書に記載の通り組成物もしくは医薬の構成成分として投与することができる。一部の実施形態では、提供される薬剤または脂質は、医薬組成物を調製するための生理的に許容される担体または賦形剤を用いて製剤化することができる。一部の実施形態では、このような医薬組成物に利用される担体および／または組成物は、それら自体が無菌であり得る。一部の実施形態では、医薬組成物は、特定の投与モードに合わせて製剤化される。組成物を製剤化する方法は、当技術分野で公知である（例えば、Remington's Pharmaceuticals Sciences、第17版、Mack Publishing Co.、（Alfonso R. Gennaro編）（1989年）参照）。

【0147】

適切な薬学的に許容される担体には、水、塩類溶液（例えばNaCl）、食塩水、緩衝食塩水、アルコール、グリセロール、エタノール、アラビアゴム、植物油、ベンジルアルコール、ポリエチレングリコール、ゼラチン、炭水化物、例えばラクトース、アミロースまたはデンプン、糖、例えばマンニトール、スクロース等、デキストロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ケイ酸、粘性パラフィン、香油、脂肪酸エステル、ヒドロキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン等、ならびにその組合せが含まれるが、それらに限定されない。一部の実施形態では、医薬調製物は、所望に応じて、活性化合物と有害に反応しない、または活性化合物の活性に干渉しない助剤（例えば、滑沢剤、保存剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響を及ぼす塩、バッファ、着色剤、香味剤および／または芳香物質等）と混合することができる。好ましい一実施形態では、静脈内投与に適した水溶性の担体が使用される。

10

【0148】

組成物または医薬は、所望に応じて、例えば特に脂肪酸および／または脂質を送達するための担体として、タンパク質（特にアルブミン）、ナノ粒子、微粒子、リポソーム、およびミセルの1つまたは複数を含むことができる。

【0149】

組成物または医薬は、所望に応じて、（典型的に微量の）湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤を含むことができる。組成物は、液体溶液剤、懸濁液剤、エマルジョン剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放製剤、または散剤であってもよい。また組成物は、トリグリセリドなどの従来の結合剤および担体を用いて、坐剤として製剤化することができる。経口製剤は、標準担体、例えば医薬品グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン（pyrrolidone）、サッカリン（saccharine）ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等を含むことができる。

20

【0150】

一部の実施形態では、本発明に従って提供される、製造されるおよび／または利用される、利用される組成物または医薬は、治療剤（例えば、化学療法剤）と1つまたは複数の脂肪酸の両方を含む。このような一部の実施形態では、組成物または医薬は、本明細書の他所に記載の脂肪酸のタイプおよび／または量を含む。

30

【0151】

組成物または医薬は、通常の手順に従って、人間への投与に適合された医薬組成物として製剤化することができる。例えば、好ましい一実施形態では、静脈内投与のための組成物は、典型的に、無菌の等張水性緩衝液中の溶液である。また必要な場合、組成物は、可溶化剤、および注射部位の疼痛を和らげるための局所麻酔剤を含むことができる。一般に成分は、例えば活性剤の量を示した密封容器、例えばアンプルまたは小袋に入れた凍結乾燥させた乾燥粉末または水を含まない濃縮物として単位剤形で、別個にまたは一緒に混合して供給される。組成物を注入によって投与すべき場合、組成物は、無菌の医薬グレードの水、食塩水またはデキストロース／水を含む注入瓶を用いて分注され得る。組成物が注射によって投与される場合、成分を投与前に混合できるように、注射のための滅菌水または食塩水のアンプルを提供することができる。

40

【0152】

一部の実施形態では、本明細書に記載の薬剤は、中性形態または塩形態として提供することができる。薬学的に許容される塩には、遊離アミノ基を用いて形成された塩、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等から得られた塩、および遊離カルボキシル基を用いて形成された塩、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等から得られた塩が含まれる。

【0153】

本明細書に記載の組成物は、任意の適切な経路によって投与することができる。一部の

50

実施形態では、組成物は、皮下投与される。本明細書で使用される場合、用語「皮下組織」は、皮膚直下の緩い不規則な結合組織の層と定義される。例えば皮下投与は、限定されるものではないが、大腿部領域、腹部領域、殿部領域、または肩甲骨領域を含めた領域に組成物を注射することによって実施することができる。一部の実施形態では、組成物は、静脈内投与される。一部の実施形態では、組成物は、経口投与される。一部の実施形態では、組成物は、心臓または筋肉（例えば、筋肉内）、腫瘍（腫瘍内）、神経系（例えば、脳への直接注射；脳室内；髄腔内）などの標的組織への直接投与によって投与される。あるいはまたはさらには、組成物は、吸入、非経口、皮内、経皮的、または経粘膜（例えば、経口または経鼻）によって投与することができる。2つ以上の経路を、所望に応じて同時に使用することができる。

10

【0154】

一部の実施形態では、組成物は、治療有効量で、かつ／または特定の所望の転帰と関連する投与レジメンに従って投与される。

【0155】

本発明に従って投与される特定の用量または量は、例えば、所望の転帰の性質および／もしくは程度、投与経路および／もしくは投与のタイミングの詳細、ならびに／または1つもしくは複数の特徴（例えば、体重、年齢、個人歴、遺伝的特徴、生活習慣パラメータ、またはそれらの組合せ）に応じて変わり得る。このような用量または量は、当業者によって決定され得る。一部の実施形態では、適切な用量または量は、標準臨床技術に従って投与される。あるいはまたはさらには、一部の実施形態では、適切な用量または量は、投与される望ましいまたは最適な投与量範囲または量を同定する一助にするために、1つまたは複数の *in vitro* または *in vivo* アッセイを使用して決定される。

20

【0156】

様々な実施形態では、薬剤または脂質は、治療有効量で投与される。このような一部の実施形態では、「治療有効量」は、例えば、特定の組成物に含まれている薬剤または脂質の総量を考慮して決定され得る。一部の実施形態では、治療有効量は、被験体に有意義な利益をもたらす（例えば、基礎をなす疾患または状態を処置する、モジュレートする、治療させる、防止する、かつ／または寛解させる）のに十分な量である。一部の特定の実施形態では、投与される適切な用量または量は、*in vitro* または動物モデル試験系から得られる用量応答曲線から推定することができる。

30

【0157】

一部の実施形態では、提供される組成物は、医薬製剤として提供される。一部の実施形態では、医薬製剤は、特定の腫瘍または腫瘍の発生率またはリスク低下の達成に関連する投与レジメンに従って投与するための単位投与量であるか、またはそれを含む。

【0158】

一部の実施形態では、医薬製剤として提供される組成物を含めた提供される組成物は、限定されるものではないが、水、食塩水、リン酸緩衝食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、血清含有溶液、ハンクス溶液、他の生理的平衡水溶液、油、エステルおよびグリコールなどの液体担体を含む。

【0159】

一部の実施形態では、本明細書に記載の薬剤または脂質を含む製剤は、単回投与として投与される。一部の実施形態では、このような製剤は、一定間隔で投与される。ある「間隔」による投与は、本明細書で使用される場合、治療有効量が周期的に投与されることを示す（1回限りの投与とは区別される）。間隔は、標準臨床技術によって決定され得る。一部の実施形態では、製剤は、隔月、毎月、月2回、3週間毎、隔週、毎週、週2回、週3回、毎日、1日2回、または6時間毎に投与される。単一の個体のための投与間隔は、固定された間隔である必要はなく、個体の必要に応じて経時的に変わり得る。

40

【0160】

本明細書で使用される場合、用語「隔月」は、2カ月当たり1回（すなわち、2カ月毎に1回）の投与を意味し、用語「毎月」は、1カ月当たり1回の投与を意味し、用語「3

50

週間毎」は、3週間当たり1回（すなわち、3週間毎に1回）の投与を意味し、用語「隔週」は、2週間当たり1回（すなわち、2週間毎に1回）の投与を意味し、用語「毎週」は、1週間当たり1回の投与を意味し、用語「毎日」は、1日当たり1回の投与を意味する。

【0161】

一部の実施形態では、本明細書に記載の薬剤または脂質を含む製剤は、一定間隔で無制限に投与される。一部の実施形態では、このような製剤は、規定された期間中、一定間隔で投与される。一部の実施形態では、製剤は、一定間隔で、5年間、4年間、3年間、2年間、1年間、11カ月間、10カ月間、9カ月間、8カ月間、7カ月間、6カ月間、5カ月間、4カ月間、3カ月間、2カ月間、1カ月間、3週間、2週間、1週間、6日間、5日間、4日間、3日間、2日間または1日間投与される。

10

【実施例】

【0162】

以下の実施例は、例示的に提示され、いかなる方式でも本発明の範囲を制限しない。

（実施例1）

低酸素状態の細胞およびRas形質転換細胞は、リゾリン脂質由来の不飽和脂肪酸を捕捉することによって成長を支持する

材料および方法

【0163】

細胞培養、SCD1阻害、および脂質補給。細胞株を、以下を除外してATCCから得た：不死化ベビーマウス腎臓（iBMK）細胞株は、Bax^{-/-}/Bak^{-/-}マウス由来の初代腎臓上皮細胞から導出したもので、E1Aおよびドミナントネガティブp53発現によって不死化し、対照ベクター、ヒト発癌性H-Ras^{V12G}、またはmyrAKTをトランスフェクトした（31）、ヒト膵臓ネスチン発現（HPNE）細胞（A. Maitraからの厚意による寄贈）を、hTERT遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクター（pBABEpuro）を形質導入することによってヒト膵管から成長させ、対照ベクターまたはヒト発癌性K-Ras^{G12D}をトランスフェクトした。細胞株を、25mMグルコースおよび4mMグルタミンを含み、10%ウシ胎児血清（HyClone）、25IU/mlペニシリン、および25μg/mlストレプトマイシン（MP Biomedicals）を補充したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Mediatech）中で慣用的に継代し、80%コンフルエンスで分割した。代謝実験は、10%透析血清（DFBS、HyClone）を含有するDMEM3mlを入れた6cmの培養皿で実施した。同位体標識化のために、グルコースおよびグルタミンを、それらのU-¹³C-標識化形態（Cambridge Isotope Labs）で置き換えた。低酸素状態の実験は、低酸素状態のグローブボックス内で実施した（示されている通り0.5%または1%O₂、5%CO₂および94~94.5%N₂、37℃）（Coy Laboratory Products）。細胞および培地を、実験開始前に、低酸素中で終夜平衡化した。CAY10566を、Cayman Chemicalから得た。脂質サプリメントをAvanti Polar Lipidsから得た。LPC（18:1）およびLPC（18:0）をリン酸緩衝食塩水（PBS）に溶解し、MG（18:1）をメタノールに溶解し、PC（16:0~18:1）を1:9クロロホルム:メタノールに溶解した。有機溶媒は、培地中<0.1%v/vであった。

20

30

40

【0164】

細胞増殖アッセイおよび腫瘍異種移植研究。細胞増殖を、Packed Cell Volume管（PCV、Techno Plastic Products AG）またはxCELLigence系（Roche）のいずれかを用いて決定した。動物研究を、IACUC承認プロトコルの下で、研究における動物の適切な人道的使用のための指針に従って実施した。同種移植を作成するために、1×10⁷個のiBMK細胞を、マトリゲル（BD Biosciences）に入れてnu/nu胸腺欠損雌性マウスに移植した。触知できる腫瘍が確立された後、マウスを無作為化して、0.5%メチルセルロース中

50

2. 5 mg/kg BID の CAY10566 p. o. またはビヒクル対照を投与した。異種移植腫瘍を隔週で測定し、腫瘍体積を、体積 = (長さ × 幅² × π / 6) として算出した。

【0165】

脂質および代謝産物の測定。細胞からのけん化脂肪酸の分析のために、培地を吸引し、細胞を室温の PBS 2 ml で 2 回すすぎ、0.1 M の HCl を含む 50 : 50 の MeOH / H₂O 溶液 1 ml を -20 °C で添加し、得られた液体および細胞残屑を集めて微量遠心管に入れた。培地からの類似の測定を行うために、培地 0.5 ml を、0.2 M の HCl を含む MeOH 0.5 mL と混合した。クロロホルム (0.5 mL) を添加し、混合物を 1 分間ボルテックスし、次に 16,000 × g で 5 分間遠心分離し、クロロホルム層をガラスバイアルに移した。抽出物を N₂ の下で乾燥させ、0.3 M の KOH を含有する 90 : 10 の MeOH / H₂O に入れて復元し、80 °C で 1 時間インキュベートして、脂肪酸をけん化し、ギ酸 0.1 ml で酸性にし、ヘキサン 1 ml で 2 回抽出し、N₂ の下で乾燥させ、LC-MS 分析のために 1 : 1 : 0.3 の MeOH : クロロホルム : H₂O (細胞には充填体積 2 μl 当たり溶媒 1 ml、培地試料には溶媒合計 2 ml) に入れて復元した。分離を、陰イオンモードフルスキャン LC-MS にカップルさせた C8 カラムによる逆相イオン対クロマトグラフィーによって、1 Hz スキャン時間および 100,000 分解能 (独立型 orbitrap、Thermo Fischer Scientific) で行った。

【0166】

培地の脂質分析のために、上記の通り、培地 0.5 ml から乾燥クロロホルム抽出物を得、1 : 1 : 0.3 の MeOH : クロロホルム : H₂O 0.3 ml で復元し、上記の通り LC-MS によって分析した。遊離 (非エステル化) 脂肪酸の分析のために、培地 1 ml を酢酸エチル 1 ml で 3 回抽出し、抽出物を乾燥させ、1 : 1 : 0.3 の MeOH : クロロホルム : H₂O 0.5 ml で復元した。水溶性代謝産物の分析のために、培地を細胞から吸引し、代謝を -80 °C において 80 : 20 の MeOH / H₂O ですぐにクエンチした。次に、得られた液体および細胞残屑を集めて微量遠心管に入れ、80 % の MeOH で -80 °C において 3 回抽出し、抽出物を N₂ の下で乾燥させ、H₂O に入れて復元し (50 μl / μl 細胞体積)、C18 カラムを使用することを除いて、上記の通り LC-MS によって分析した。培地のグルコースおよび乳酸濃度を、YSI 7200 電気化学分析器 (YSI) で測定した。酸素の消費を、Seahorse XF24 フラックスアナライザー (Seahorse Bioscience) を使用して決定した。

【0167】

結果

細胞の脂肪酸源を、¹³C-標識グルコースおよび ¹³C-標識グルタミンで確かめることができる。哺乳動物細胞は、取込みまたは de novo 合成のいずれかによって脂肪酸を獲得する (図 1A)。脂肪酸シンターゼによって飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (C16 : 0) が生成され、それが不飽和化および/または伸長されると、多様な脂肪酸を生じることができる。このような脂肪酸への代謝経路は、¹³C-標識グルコースおよび ¹³C-標識グルタミン (アセチル-CoA を標識化するため) を均一に供給し、その後けん化された脂肪酸を質量分析にかけることによって確かめることができる。パルミチン酸については、このような分析により、血清由来の脂肪酸ならびに de novo 脂質生成から生じた標識化形態の移入に起因して、非標識化分率 (M⁰ ピーク) が明らかになる。これらの標識化形態には、U-¹³C-パルミチン酸 (M⁺¹⁶)、および不完全なアセチル-CoA の標識化に起因して生じる部分的に標識化された形態が含まれ (図 1B)、相対的に豊富な部分的および完全に標識化された形態は、細胞質アセチル-CoA の標識化分率を決定するのに十分である。この手法を、多様な起源を有する 5 種類のがん細胞系に適用することによって、過去の知見と一致して、酸素正常状態では、de novo 脂質生成が細胞の C16 : 0 プールの 75 ~ 90 % を占めることが実証される (図 1C) (30)。

【0168】

酸素正常状態では、グルコースは、脂質を生成するアセチル-C o Aの主な供給源である。それとは対照的に、低酸素状態（0.5～1% O₂）では、ピルビン酸デヒドロゲナーゼは活性が低い。このような条件下では、グルタミン駆動性の還元的カルボキシル化によって、高い分率のクエン酸、したがってアセチル-C o Aが生成される（図1D）。このことと一致して、U-¹³C-グルコースまたはU-¹³C-グルタミントレーサーが別個に供給される場合、酸素正常状態では、グルコース由来の炭素が主なアセチル-C o A供給源になる一方、低酸素状態ではグルタミン由来の炭素の方が寄与が大きいことが決定付けられた（図1E）。

【0169】

低酸素状態の細胞は、脂肪酸を移入することによってSCD1を迂回する。哺乳動物細胞において最も豊富な脂肪酸は、ステアロイル-C o Aデサチュラーゼ1（SCD1）の主生成物であるオレイン酸（C18：1）である。SCD1によって触媒される反応は、酸素依存性であり、したがって低酸素状態では緩徐になる可能性があるものと仮定された（図2A）。脂肪酸合成、伸長、および不飽和化に対する低酸素状態の効果を調査するために、本発明者らは、低酸素状態の細胞に、U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミンを同時に供給し、酸素正常状態と比較して脂肪酸標識化が低減し、非標識化（M⁰）ピークの増加が、血清からの脂肪酸の移入の増強を示すことを観察した（図2B、S1）。SCD1活性の低下と一致して、標識化の低減は、一価不飽和脂肪酸C18：1について特に顕著であった（図2B、S1）。このC18：1標識化の低減は、細胞脂質組成が飽和脂肪酸の方向に全体的に変化したことにも関連している（C18：1／C18：0比、または「不飽和化指数」の低下、図2C）。したがって細胞脂質組成は、それ自体が低酸素状態の影響を受けるが、このことは、SCD1活性の低下を完全に代償するには移入が不十分であることを示している。

【0170】

U-¹³C-グルコースおよびU-¹³C-グルタミンが供給された細胞では、C16：0のC18：0への伸長では、通常、標識化炭素が付加する。したがって、低酸素状態で中程度に増加している非標識化C18：0（図2D）への唯一の主な経路は、血清からの移入である。それとは対照的に、非標識化C18：1は、直接的な取込みに加えて、非標識化C18：0の不飽和化から生じ得る（図2A）。SCD1活性が低酸素状態で低下することを確認するために、標識化データ（Lは、標識化される所与の脂肪酸の分率に等しい）を使用して、SCD1によって生成されるC18：1の分率であるDを算出した。移入分率Iは、1-Dに等しい。血清脂肪酸は標識化されないので、標識化C18：1への唯一の経路は、標識化C18：0の不飽和化である。

$$L_{C18:1} = (D) (L_{C18:0}) \quad (\text{方程式1})$$

$$D = L_{C18:1} / L_{C18:0} \quad (\text{方程式2})$$

【0171】

低酸素状態では、Dは実際に低下し、したがってC18：1の移入は増加することが決定付けられた（図2E）。

【0172】

発癌性Rasは、低酸素状態の代謝を繰り返す。低酸素状態の効果に加えて、denovo脂質生成と脂肪酸の移入との間の平衡に対する特異的な癌遺伝子の寄与について調査した。発癌性AktおよびRasは、低酸素状態と同様に、形質転換細胞におけるグルコースの取込みの増加に関与するとされている。PI3K-Akt経路は脂質生成を促進することが示されているが、脂肪酸代謝に対するRasの影響は、以前には十分に研究されていなかった。したがって、以下の同質遺伝子の細胞モデル系における脂肪酸代謝を調査した：癌遺伝子を含まない（CTL）、膜を標的化し、したがって活性化されたAkt（myrAkt）を含む、または発癌性H-Ras（H-Ras^{V12G}）を含む、不死化ベビーマウス腎臓（iBMK）細胞。myrAktの導入により、不飽和化指数（C18：1／C18：0）の増加および移入から生じる一価不飽和脂肪酸の分率の低下によ

て証拠付けられる通り、一価不飽和の（しかし飽和していない）脂肪酸の *de novo* 合成が増加した（図3 Aおよび3 B、図S 2）。それとは対照的に、発癌性H-Ras^{V12G}は、不飽和化指数の低下を引き起こすが、これは、RasおよびAktの活性化が、基本的に異なる細胞脂質組成をもたらすことを示していた。さらに、発癌性H-Ras^{V12G}は、移入によって獲得される細胞の脂肪酸の分率を増加させた。このことは、C18:1について最も顕著であったが、これはSCD1フラックスの低下を暗示していた。Ras駆動性細胞による血清由来の脂肪酸の利用の増加を、培地からの脂肪酸の取込みを直接測定することによって確認した（図3 C）。

【0173】

一価不飽和脂肪酸の取込みに対する発癌性Rasの影響の普遍性を調査するために、癌遺伝子を有していない（CTL）または発癌性K-Ras（K-Ras^{G12D}）を有しているヒト膵臓ネスチン発現（HPNE）細胞を使用した。HPNE細胞における発癌性K-Ras^{G12D}の発現により、iBMK細胞における発癌性H-Ras^{V12G}と同様に、不飽和化指数がより低下し、細胞脂質への血清C18:1の取込みがより増加し、血清C18:1の取込みがより急速になった（図3 D～F）。

【0174】

次に本発明者らは、低酸素状態の影響を受ける他の代謝パラメータ、すなわちグルコースの取込み、乳酸排出、酸素消費、およびグルタミン代謝に対する、Ras対Aktの影響を調査した。iBMK細胞では、発癌性RasとAktの両方によって、グルコースの取込みの増加、および乳酸へのグルコース由来炭素のシャントの増加が引き起こされた（図3 G）。しかしAkt形質転換細胞は、対照細胞と比較できるレベルで酸素消費を維持した一方、Ras形質転換細胞は、U-¹³C-グルタミンを供給された細胞における¹³C₅-標識クエン酸の増加によって証拠付けられた通り、酸素消費の有意な低下、およびクエン酸合成への還元的カルボキシル化フラックスの寄与の割合の増加を呈した（図3 H～I）（33）。類似の結果が、K-Ras^{G12D}形質転換HPNE細胞に観察された（図3 J～L）。まとめると、これらの結果は、発癌性Rasが、一般に脂肪酸代謝、特にSCD1フラックスの調節に関してAktとは逆効果を有していること、および、それが低酸素状態の細胞の代謝表現型を繰り返すことを実証している。したがってとりわけ、本開示は、脂肪酸代謝を標的化する治療様式、特にSCD1を標的化する治療様式が、他のがん（例えば、Akt関連腫瘍）を処置するために使用される場合には有用および/または有効であり得るとしても、ある特定のRas関連腫瘍の処置に関して、有効でない可能性があること、少なくとも単独では有効でない可能性があることを実証する。その異なる一面では、本開示は、脂質の移入を標的化する治療様式が、ある特定のRas関連腫瘍の処置に特に有効であり得ることを実証する。

【0175】

発癌性Rasは、SCD1阻害に対する耐性を付与する。SCD1阻害によって、in vitroおよび異種移植の両方で、がん細胞の成長を阻止することができる。しかし、A549肺がん細胞を用いる実験では、C18:1標識化を完全に阻止した（図4 A）SCD1阻害剤の用量（200 nMのCAY10566）は、リアルタイムの細胞増殖アッセイ（10%血清、図4 B）において、または標準細胞培養条件における成長の最初の48時間、細胞成長は損なわれなかった（図S 3）。血清脂質によって支持された持続的細胞成長と一致して、2%血清に切り替えると、細胞はSCD1阻害に対して感受性になった（図4 B）。A549細胞は、発癌性K-Rasを自然に発現し、RasはC18:1の取込みを促進するので、構成的なRas活性化は、SCD1阻害に対する耐性を誘導する可能性があることと仮定された。このことを調査するために、SCD1阻害剤の存在下で、H-Ras^{V12G}またはmyrAktを有するiBMK細胞を成長させた。阻害剤は、両方の細胞株においてSCD1を完全に阻止した（図S 4）。それにもかかわらず、10%血清では、myrAkt細胞の成長が著しく損なわれた一方、H-Ras^{V12G}細胞は、ほぼ普通に集団倍加数3で成長した（図4 C、図S 3）。再びこれらのデータによって、本明細書で実証された通り、脂肪酸代謝を標的化する治療様式、特にSCD1を標

10

20

30

40

50

的化する治療様式が、他のがん（例えば、A k t 関連腫瘍）を処置するために使用される場合には有用および／または有効とあり得るとしても、ある特定の R a s 関連腫瘍の処置に関して、有効でない可能性があること、少なくとも単独では有効でない可能性があることが確認される。

【0176】

S C D 1 阻害に対する頑強性を *i n v i v o* で決定するために、胸腺欠損ヌードマウスに、*m y r A k t* または *H - R a s^{V12G}* を有する *i B M K* 細胞を注射した。触知できる腫瘍が確立された後、マウスを、ビヒクルまたは S C D 1 阻害剤（2.5 mg/kg の C A Y 1 0 5 6 6 p. o. B I D）で処置した。A k t 駆動性腫瘍に対する S C D 1 阻害の効果は、R a s 駆動性腫瘍に対する効果よりも大きく（図 4 D、E）、治療の 13 日または 14 日後の平均腫瘍体積は、未処置腫瘍に対してそれぞれ 0.51 + / - 0.04 および 0.67 + / - 0.05 であった（R a s と A k t の比較について $p = 0.01$ 、両側 T 検定による）。したがって、発癌性 R a s（少なくとも活性化 A k t に対して）は、*i n v i t r o* および同種移植の両方で、S C D 1 阻害に対する耐性を付与する。

【0177】

移入脂肪酸は、リゾリン脂質を起源とする。本明細書に記載の結果により、とりわけ、発癌性 R a s が外因性脂肪酸の移入を増加させ、S C D 1 阻害に対する耐性を付与することが実証される。遊離（非エステル化）脂肪酸は、十分な大量で補給されると S C D 1 阻害中に細胞増殖を助けることが示されているが、血清におけるそれらのレベルは、観察された脂肪酸の取込みおよび関連する細胞成長の原因になるには不十分である（表 2）。

【0178】

表 2

培地（10%血清）における全脂肪酸および遊離（非エステル化）脂肪酸の濃度、ならびに A 5 4 9 細胞および *i B M K - H - R A S^{V12G}* 細胞における脂肪酸の総濃度。培地の遊離脂肪酸は、培地の全脂肪酸の 5%未満を構成する。

【表 2】

A	培地の全脂肪酸	培地の遊離脂肪酸	A549 の全脂肪酸	iBMK-H-Ras ^{V12G} の全脂肪酸
	μM		nmol/ μl 細胞	
16:0	22.3 $\pm$ 1.5	0.85 $\pm$ 0.08	8.7 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 0.6
16:1	5.1 $\pm$ 0.5	n.a	3.3 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.6
18:0	12.2 $\pm$ 0.3	0.25 $\pm$ 0.08	2.8 $\pm$ 0.3	4.4 $\pm$ 0.08
18:1	20.9 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.04	10.5 $\pm$ 0.3	8.1 $\pm$ 0.2

【0179】

どの脂質が捕捉脂肪酸の供給源であるかを同定するために、グリセロリン脂質レベルを、新鮮な培地および使用済み培地において質量分析によってプロファイルした（図 5 A）。典型的なグリセロリン脂質（すなわち、1つの頭部および2つの脂肪酸の尾部を有するグリセロール）のレベルは、実質的に変化しなかった。しかし、ただ1つの脂肪酸の尾部を有するグリセロリン脂質は、ほぼすべて枯渇したことが観察された（リゾリン脂質、図 5 B）。選択的なリゾリン脂質の枯渇は、試験したすべての細胞株で観察された（図 5 A）。

【0180】

リゾ脂質は、R a s 駆動性細胞の成長を支持する。リゾ脂質の取込みの定量的分析によ

って、LPC (18 : 1) が、一価不飽和脂肪酸に対する細胞の需要を満たすのに重要な役割を果たすことが示唆される：SCD1 阻害剤で処理された iBMK-H-Ras^{V12G} 細胞では、48 時間にわたる LPC (18 : 1) の取込みは、この時間に組み込まれた細胞の全 C18 : 1 と匹敵し (図 3C、S3、S5)、血清 LPC (18 : 1) の枯渇は、成長阻害と同時に生じた (図 S3、S5)。

【0181】

栄養としての LPC (18 : 1) をさらに評価するために、iBMK 細胞の培地に、100% 血清 (すなわち生理的条件) に見出された濃度の半分である 20 μM の LPC (18 : 1) を入れた。不飽和化指数 (C18 : 1 / C18 : 0) は、最初、iBMK-H-Ras^{V12G} 細胞よりも iBMK-myrakt 細胞において 2 倍を超えて高く、LPC (18 : 1) を添加すると、iBMK-H-Ras^{V12G} 細胞において有意にかつ選択的に増加した (図 5C)。これは、移入に由来する C18 : 1 の分率と一致する一方で、この分率は LPC (18 : 1) を添加した両方の細胞株で増加しており、iBMK-H-Ras^{V12G} 細胞においては 2 倍を超えて増加した (図 5D)。SCD1 阻害中の LPC (18 : 1) の補給は、C18 : 1 の移入に関する SCD1 への差別的な依存性と一致して、iBMK-H-Ras^{V12G} 細胞については増殖を完全に回復させたが、iBMK-myrakt 細胞については部分的に回復させただけであった (図 5E、F)。同様に、完全な救助が、Ras 駆動性 A549 ヒトがん細胞株について観察された (図 5G)。

【0182】

血清脂質消費の分析によって、リゾ脂質が、血清グリセリン脂質よりも利用しやすい栄養供給源をもたらすことが示唆された。このことと一致して、SCD1 阻害剤で処理した細胞では、PC (16 : 0、18 : 1) を補給しても細胞成長は回復しなかった (図 5E)。それについて考えられる説明として、飽和の尾部 (C16 : 0) の存在も挙げられる。実際、飽和リゾ脂質 LPC (18 : 0) を補給すると、SCD1 阻害単独よりも強い成長阻害が引き起こされた。しかし、PC (16 : 0、18 : 1) ではなく LPC (18 : 1) による成長回復が、リゾ脂質の一価不飽和脂肪酸の尾部を細胞がより多く利用することを反映する限り、LPC (18 : 1) および LPC (18 : 0) と同時のインキュベーションによって成長が回復した。リゾ脂質が脂肪酸捕捉に好ましい基質であることと一致して、オレオイルモノアシルグリセロールである MG (18 : 1) も、細胞増殖を回復させた。したがって、リゾ脂質捕捉は、細胞による一価不飽和脂肪酸の必要性を満たすことができる。

【0183】

とりわけこれらの知見によって、このような腫瘍による、ある特定のタイプの脂質、特に腫瘍細胞によって捕捉され得る脂質の利用を剥奪し、または制限することによって (例えば、食事管理または他の手段によって)、少なくともいくつかの Ras 関連腫瘍の処置は、十分な利益が得られる可能性があることが実証される。一部の実施形態では、このような利用の剥奪または制限は、好適な捕捉脂質への曝露を低減すること、および/または代替の非好適な捕捉脂質への曝露を増加させることを含む。例えば、一部の実施形態では、多価不飽和脂質の利用が制限され、一部の特定の実施形態では、リゾ脂質、例えば有利にはグリセリン脂質の利用が制限される。

【0184】

一部の特定の実施形態では、脂質利用は、食事摂取の管理によって制限される。

【0185】

一部の実施形態では、関連性のある有用な食事管理は、例えば多価不飽和脂肪酸に関して、および、一部の実施形態では、このような多価不飽和脂肪酸の実質的な排除に関して、過剰の完全飽和した脂肪酸を摂取することを含む。一部の実施形態では、関連性のある有用な食事管理は、リゾ脂質、例えば有利にはグリセリン脂質を回避することを含む。

【0186】

議論

10

20

30

40

50

腫瘍は、それらの細胞膜を複製し、それによって成長するために脂肪酸を必要とする。がん細胞は、それらの非必須脂肪酸の大部分を *de novo* 合成することが一般に想定される。この想定は、主に、10% 血清および酸素正常状態で実施された細胞培養実験に基づくものである。この想定は、最も重要な発癌経路の1つである *PI3K-Akt-mTOR* のグルコース依存性の脂質生成促進効果によって裏付けられる。また、*Ras* は *Akt* を活性化するので (3、36)、グルコース依存性の脂質生成促進の役割を有している可能性があると考えられている。

【0187】

しかし本明細書で実証される通り、本発明者らは、このような想定における問題の源を同定した。例えば本発明者らは、*Ras* が、グルコース依存性の *de novo* 脂質生成を誘導しないが、その代わりに血清脂肪酸の捕捉を刺激することを実証する。このような捕捉は、本発明者らが研究したあらゆる細胞に固有の特性であり、*Ras* 活性化、低酸素状態、および培地への生理的濃度のリゾリン脂質 (すなわち、ただ1つの脂肪酸の尾部を有するリン脂質) の添加によって、さらに増加する。捕捉が増強されると、*Ras* 駆動性細胞は、主な哺乳動物デサチュラーゼである *SCD1* の薬理的阻害に耐性になることができる。さらに、捕捉が増強されると、電子アクセプターとして酸素分子を必要とする *SCD1* を回避することによって、*Ras* 駆動性腫瘍を低酸素状態で容易に成長させる可能性がある。

【0188】

Ras 活性化および低酸素状態の両方により、脂肪酸捕捉が誘導されることに加えて、グルタミンから生成されたアセチル-CoA 単位の分率も増加する。さらに、*Ras* 活性化によって、酸素の消費が低減する。いかなる特定の理論にも拘泥するものではないが、本開示は、低酸素状態と *Ras* 活性化との間の代謝的類似点の1つの可能な原因が、*Ras* と低酸素状態の両方が *HIF* を活性化し (または別のシグナル伝達タンパク質に共に集中する) (37)、それによって観察された代謝の共通性をもたらす可能性があることであると提唱する。別の原因は、*Ras* 活性化が、低酸素状態と同様に、酸化リン酸化を直接的に損ない、*NADH* (または別の代謝産物) を増加させ、それによって脂質の代謝変化をもたらすことである。後者の可能性の裏付けとして、近年、*Ras* はミトコンドリアに移動し、複合体 I を阻害することが示されている (21)。

【0189】

脂肪酸捕捉経路の非常に重要な基質が、血清リゾリン脂質である。2つの尾部を有する標準的なリン脂質とは対照的に、リゾリン脂質は、細胞が容易に利用できる脂肪酸源を提供する。例えば、2つの脂肪酸の尾部を有する対応するホスファチジルコリン種ではなく、オレオイルリゾホスファチジルコリンは、*SCD1* 阻害から細胞を助ける。遊離オレイン酸 (C18:1) も、*SCD1* 阻害から細胞を助けることができるが、リゾリン脂質は、血清において遊離脂肪酸よりも豊富であり、したがってより重要な生理的供給源である可能性がある。例えば、血清オレイン酸の約20%は、5%が遊離脂肪酸形態であるのと比較して、オレオイルリゾホスファチジルコリンの形態である。

【0190】

細胞がリゾリン脂質を捕捉する機序は、完全には確立されていない。興味深いことに、モノアシルグリセロールから遊離脂肪酸を生成する酵素であるモノアシルグリセロールリパーゼ (*MAGL*) は、侵襲性がん細胞において高度に発現し、その過剰発現は、腫瘍原性を増強する (26)。またモノアシルグリセロールリパーゼの発現は、*H-Ras* および *K-Ras-HIF* 経路によって増加する (27、28)。*MAGL* とがんとの関連は、腫瘍形成を促進する脂質メッセンジャー、例えばリゾホスファチジン酸および *PGE2* のレベルを増強することによるものであると既に仮定されているが、本開示は、その関連がリゾリン脂質捕捉にも寄与し得ることを提唱する。

【0191】

本開示は、*Ras* 駆動性細胞によるリゾリン脂質の取込みおよび利用は、より網羅的な「捕捉剤 (*scavenger*)」ライフスタイルの一部であり得ることを教示する。発

10

20

30

40

50

癌性 R a s は、自己貪食およびマクロピノサイトーシスの両方を上方調節し、これらは共にエンドサイトーシス小胞へのバルク材料の取り込みに関与する（22～24）。自己貪食は、細胞内内容物を消費し（細胞の喰殺）、マクロピノサイトーシスは細胞外内容物を消費する。これらは共に、高分子分解を介して栄養を提供することができ、マクロピノサイトーシスは、リゾ脂質取込みに直接的に寄与する可能性がある。

【0192】

マクロピノサイトーシスの潜在的に可能な役割に関係なく、捕捉は、R a s 駆動性がんの代謝的な顕著な特徴である。P I 3 K-A k t 経路によって駆動された腫瘍は、抑制なく生合成に従事し、代謝的に脆弱になるが（38）、その代わり、主に発癌性 R a s によって駆動された腫瘍が、細胞外高分子を利用して新しい高分子および脂質の生成に必要な基質を得ることによって急速成長を維持する能力を備えることを、本開示は教示する。この知見は、治療的な意味があり、S C D 1 などのタンパク同化酵素の阻害剤に対して R a s 駆動性腫瘍が比較的頑強になる。同時に、この知見は、捕捉経路酵素が R a s 駆動性がんの治療標的となり得ることを教示している。したがって本発明は、高分子捕捉の1つまたは複数の特色の破壊によることを含む、R a s 関連がんの処置に有効な治療様式を同定し、かつ／または特徴付ける様々な方法を提供する。本発明はまた、このような治療様式を用いて R a s 関連がんを処置する方法を提供する。

10

【0193】

（実施例2）

良性の隣接組織と比較した膵臓の腫瘍組織の脂肪酸含量

20

本発明の実施例は、膵管腺癌腫瘍および良性の隣接組織のペア試料における脂質の存在量の分析を記載する。

【0194】

具体的には、膵管腺癌腫瘍および良性の隣接組織のペア被検物を、20人の患者から外科的切除によって獲得した。試料収集プロトコルは、代謝変化を最小限に抑えるように設計した：外科手術中、切除の直前まで組織および腫瘍の灌流を維持するように努め、その後、腫瘍および良性の隣接組織の試料を液体窒素に急速に浸し、 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ で保存し、平行して抽出し、L C-M Sによって分析した。

【0195】

ヒト膵臓の腫瘍組織における脂質存在量の相対比を、同じ患者から得た良性の隣接組織と比較した。結果は、図11に提示されている。エラーバーが重複しているが、図11は、各タイプの組織において有意に観察された種の顕著な分離を示している。さらに図11は、とりわけ、ホスファチジルグリセロール脂質が、良性の隣接組織ではなく腫瘍組織に検出されたことを示している。また、より高い不飽和度を有する脂肪酸は、良性の隣接組織よりも腫瘍組織に見出される可能性はるかに高い傾向があった。より長い鎖の脂肪酸は、良性組織と比較して腫瘍により一般的であるようであり、例えば、図11に示した結果をもたらした研究では、40を超える長さの炭素を有する種は、良性組織において優勢には観察されなかった。これらの観察を組み合わせると、より高い不飽和度を有する脂肪酸を含有するホスファチジルグリセロール脂質は、良性の隣接組織と比較して腫瘍組織に高度に存在していたが、リゾリン脂質は、相対的に枯渇していた。

30

40

【0196】

したがって、一部の実施形態では、本発明は、腫瘍細胞による、ホスファチジルグリセロール脂質ならびに／または高い不飽和度および／もしくはより長い炭素鎖（例えば40超）を有する脂肪酸の利用を取り除くことによって、R a s 関連がんを処置する方法および技術を提供する。本発明はまた、このようなホスファチジルグリセロール脂質ならびに／または高い不飽和度および／もしくはより長い鎖を有する脂肪酸が、腫瘍細胞への捕捉（例えば移入）を妨害する薬剤を同定し、かつ／または特徴付けることによって、R a s 関連腫瘍の処置に有効な治療様式を同定し、かつ／または特徴付ける方法を提供する。

【0197】

一部の特定の実施形態では、腫瘍細胞による、それらの好ましい捕捉可能な脂肪酸（す

50

なわちホスファチジルグリセロール脂質、高い不飽和度を有する脂肪酸、および／またはより長い鎖の脂肪酸、特に高い不飽和度を有する脂肪酸を含有するホスファチジルグリセロール脂質)の利用に、食事管理によって影響を与えることができる。例えば、一部の実施形態では、R a s 関連腫瘍に罹患しているまたは罹患しやすい被験体には、ホスファチジルグリセロール脂質および／または高い不飽和度を有する脂肪酸および／またはより長い鎖の脂肪酸が少ない治療食が投与される。一部の実施形態では、R a s 関連腫瘍に罹患しているまたは罹患しやすい被験体には、他の脂質供給源と比較して(例えば、完全飽和した脂肪酸と比較して)、ホスファチジルグリセロール脂質および／または高い不飽和度を有する脂肪酸および／またはより長い鎖の脂肪酸が相対的に少ない治療食が投与される。

10

【0198】

多くの実施形態では、腫瘍細胞によるそれらの好ましい捕捉可能な脂肪酸の利用を制限することは、例えば完全飽和した脂肪酸からなるまたはそれを含む代替の脂質供給源を提供することを含む。一部の実施形態では、被験体には、過剰の完全飽和した脂肪酸を含む治療食が投与される。一部の実施形態では、被験体には、多価不飽和脂肪酸に対して、および／または特にホスファチジルグリセロール脂質と比較して、過剰の完全飽和した脂肪酸を含む治療食が投与される。

【0199】

(実施例3)

食事管理の効果

20

本発明の実施例は、R a s 関連腫瘍の成長に対するある特定の食事プログラムの効果を実証する。

【0200】

具体的には、対照、高い総脂肪、高スクロース、または高飽和脂肪の治療食を給餌された胸腺欠損ヌードマウスにおける異種移植A549(R a s 駆動性肺がん)細胞の成長の特徴を決定した。結果を、図12に提示する。図から分かる通り、腫瘍は、豊富な不飽和脂肪酸を含有する治療食(対照治療食および高い総脂肪治療食)を給餌されたマウスにおいて最も急速に成長し、飽和脂肪酸が高度に富化された治療食を給餌されたマウスでは、腫瘍成長は緩慢である。

【0201】

30

したがって本開示は、食事による脂肪酸摂取の管理が、ある特定の腫瘍、特にある特定のR a s 関連腫瘍の成長に影響を及ぼし得ることを教示する。一部の実施形態では、このような腫瘍に提供される処置様式は、関連性のあるがんに罹患しているまたは罹患しやすい被験体の治療食において不飽和脂肪酸を制限すること、および／またはその治療食に飽和脂肪酸を補充することを含む。

【0202】

参考文献

【化 1】

1. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 1854-61.
2. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324(5930):1029-1033.
3. Shaw RJ & Cantley LC (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441424-430. 10
4. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev* 15807-826.
5. Luyimbazi D *et al.* (2010) Rapamycin regulates stearyl CoA desaturase 1 expression in breast cancer. *Mol Cancer Ther* 9(10):2770-2784.
6. Menendez JA & Lupu R (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 7763-777.
7. Kim J-W, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang C (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3(3):177-185. 20
8. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3(3):187-197.
9. Metallo CM *et al.* (2011) Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481(7381):380-384. 30
10. Wise DR *et al.* (2011) Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(49):19611-19616.
11. Mullen AR *et al.* (2011) Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481(7381):385-388.

【化 2】

12. Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res* 49:186-199.
13. Hess D, Chisholm JW, Igal RA (2010) Inhibition of stearoylCoA desaturase activity blocks cell cycle progression and induces programmed cell death in lung cancer cells. *PLOS One* 5(6):e11394. 10
14. Green CD & Olson LK (2011) Modulation of palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in pancreatic β -cells by stearoyl-CoA desaturase and Elovl6. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300:E640-E649.
15. Hardy S, Langelier Y, Prentki M (2000) Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res* 60:6353-6358.
16. Miyazaki M *et al.* (2009) Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 380:818-822. 20
17. Roongta UV *et al.* (2011) Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 9(11):1551-1561.
18. Igal AR (2011) Roles of stearoylCoA desaturase-1 in the regulation of cancer cell growth, survival and tumorigenesis. *Cancers* 3:2462-2477.
19. Mason P *et al.* (2012) SCD1 inhibition causes cancer cell death by depleting mono-unsaturated fatty acids. *PLOS One* 7(3):e33823. 30
20. Ying H *et al.* (2012) Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149:656-670.
21. Hu Y *et al.* (2012) K-ras^{G12V} transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell Res* 22:399-412.
22. Guo JY *et al.* (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 25(5):460-470. 40

【化 3】

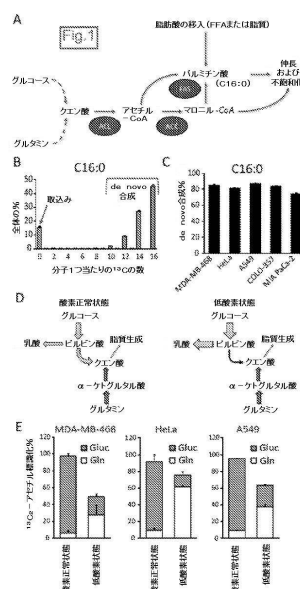
23. Yang S *et al.* (2011) Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev* 25(7):717-729.
24. Bar-Sagi D & Feramisco J.R. (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by Ras proteins. *Science* 233(4768):1061-1068.
25. Kalaany NY & Sabatini DM (2009) Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. *Nature* 458725-732. 10
26. Nomura DK *et al.* (2010) Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. *Cell* 14049-61.
27. Chun SY *et al.* (2010) Oncogenic KRAS modulates mitochondrial metabolism in human colon cancer cells by inducing HIF-1 α and HIF-2 α target genes. *Mol Cancer* 9293-304.
28. Joyce T, Cantarella D, Isella C, Medico E, Pintzas A (2009) A molecular signature for epithelial to mesenchymal transition in a human colon cancer cell system is revealed by large-scale microarray analysis. *Clin Exp Metastasis* 26569-587. 20
29. Kamphorst JJ, Fan J, Lu W, White E, Rabinowitz JD (2011) Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry analysis of fatty acid metabolism. *Anal Chem* 83(23):9114-9122.
30. Kannan R, Lyon I, Baker N (1980) Dietary control of lipogenesis in vivo in host tissues and tumors of mice bearing Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res* 404606-4611.
31. Degenhardt K & White E (2006) A mouse model system to genetically dissect the molecular mechanisms regulating tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 12(18):5298-5304. 30
32. Degenhardt K, Chen G, Lindsten T, White E (2002) BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. *Cancer Cell* 2193-203.
33. Gaglio D *et al.* (2011) Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Mol Syst Biol* 7523-538.
34. Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, Conron M, Dobrovic A (2006) High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 6295-307. 40

【化 4】

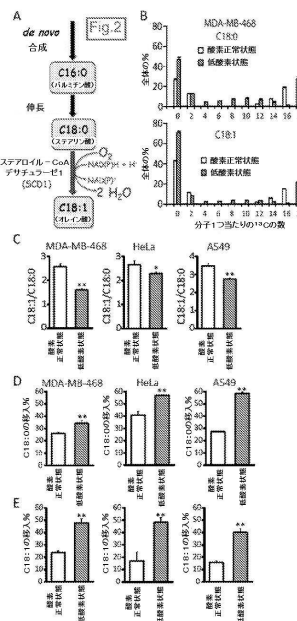
35. Sasagawa T, Okita M, Murakami J, Kato T, Watanabe A (1998) Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* 34(1):17-21.
36. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 16(10):2783-2793.
37. Sheta EA, Trout H, Gildea JJ, Harding MA, Theodorescu D (2001) Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1alpha via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene* 20(52):7624-7634.
38. Schulze A & Harris AL (2012) How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 491:364-373.
39. Lu W *et al.* (2010) Metabolomic analysis via reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to a stand alone orbitrap mass spectrometer. *Anal Chem* 82:3212-3221.

10

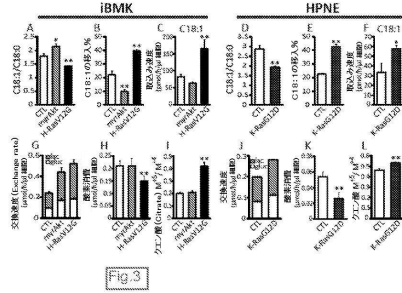
【図 1】



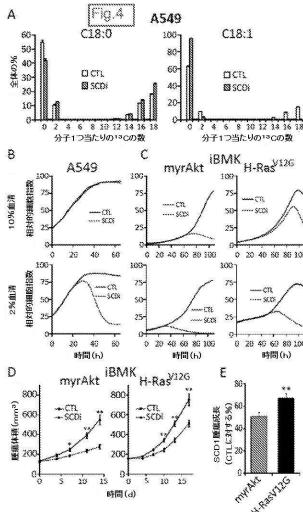
【図 2】



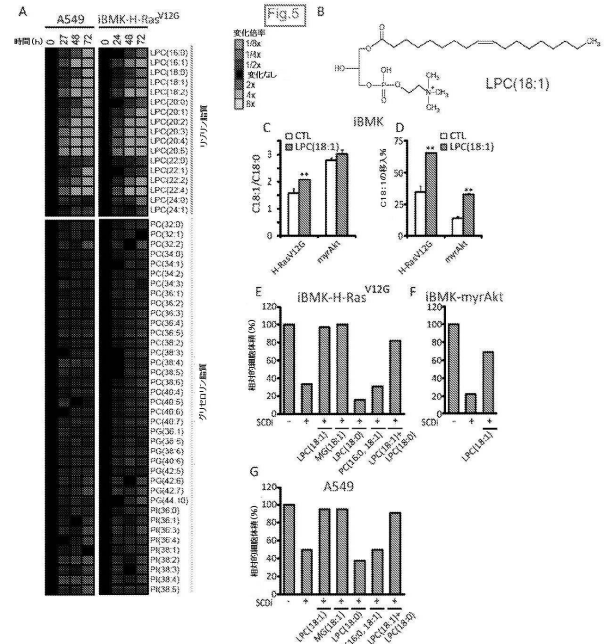
【図 3】



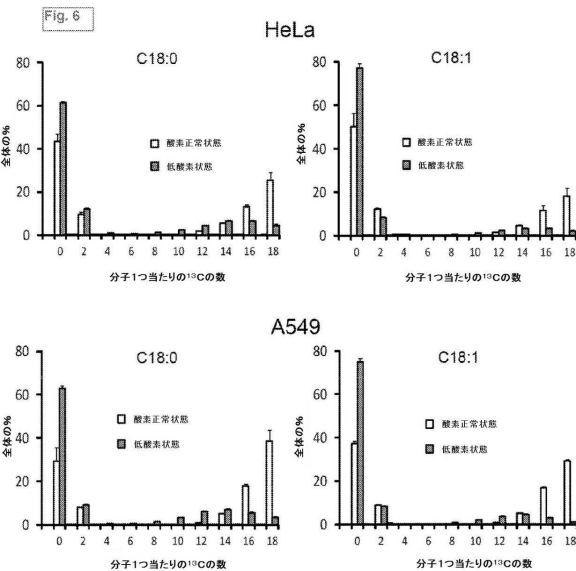
【図 4】



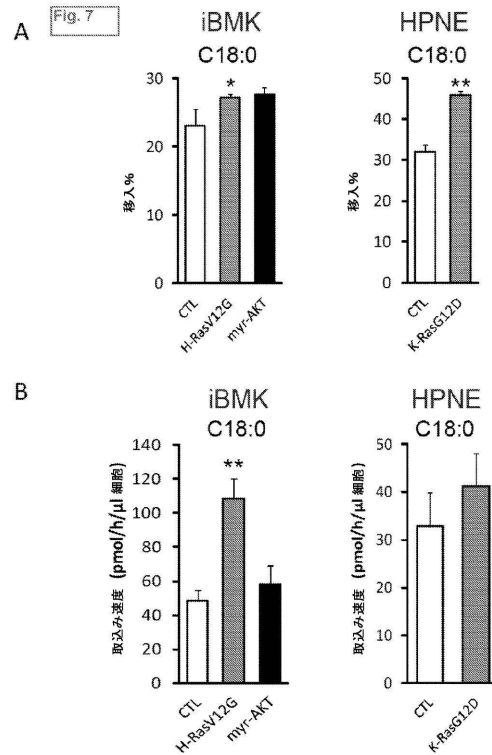
【図 5】



【図 6】

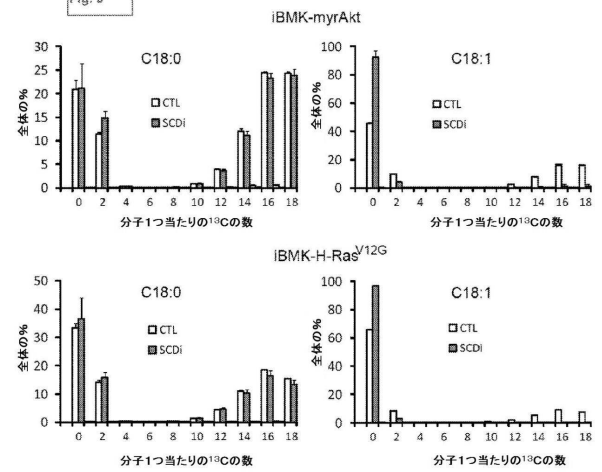


【図 7】



【図 9】

Fig. 9



【図 1 1】

A

Fig. 10

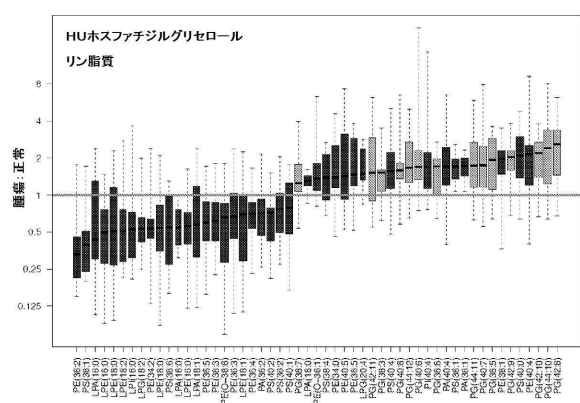
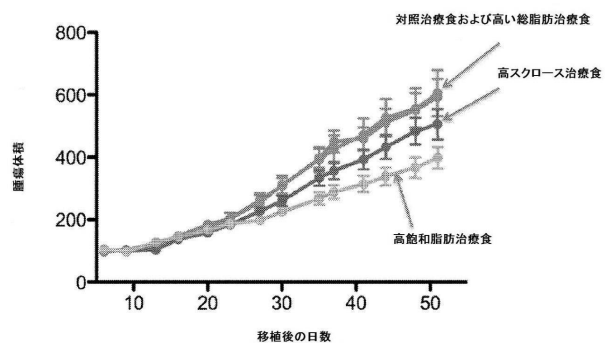


Figure 12:



フロントページの続き

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ラビノウィッツ, ジョシュア

アメリカ合衆国 ニュージャージー 08540, プリンストン, グリーンホルム ストリート 2

(72)発明者 カンプホルスト, ジュー

イギリス国 ジー61 2ピーピー グラスゴー, ペアーズデン, グレンダーユエル アベニュー 21

(72)発明者 トンプソン, クレッグ

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275, メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター 気付

(72)発明者 クロス, ジャスティン

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275, メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター 気付

審査官 参鍋 祐子

(56)参考文献 国際公開第2012/165345 (WO, A1)

国際公開第2012/172411 (WO, A1)

BMC Proceedings, 2012年, Vol.6(Suppl 3), p.25

Carcinogenesis, 2011年, Vol.32(8), pp.1251-1258

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/92

G01N 33/15

C12Q 1/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)