

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6953305号
(P6953305)

(45) 発行日 令和3年10月27日(2021.10.27)

(24) 登録日 令和3年10月1日(2021.10.1)

(51) Int.Cl.	F 1	
GO 1 N 33/68	(2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A
GO 1 N 33/50	(2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
GO 1 N 33/15	(2006.01)	GO 1 N 33/15 Z
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53 D
C 12 Q 1/32	(2006.01)	C 12 Q 1/32

請求項の数 24 (全 61 頁)

(21) 出願番号	特願2017-502940 (P2017-502940)
(86) (22) 出願日	平成27年3月27日 (2015.3.27)
(65) 公表番号	特表2017-520774 (P2017-520774A)
(43) 公表日	平成29年7月27日 (2017.7.27)
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/023038
(87) 国際公開番号	W02015/148950
(87) 国際公開日	平成27年10月1日 (2015.10.1)
審査請求日	平成30年3月26日 (2018.3.26)
(31) 優先権主張番号	61/972,091
(32) 優先日	平成26年3月28日 (2014.3.28)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	500213834 メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター
	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
(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-2-ヒドロキシグルタル酸及びストレス誘発性代謝

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における組織低酸素を診断するための診断情報を提供するためのシステムであって、
前記対象から得られた細胞試料中の L-2-ヒドロキシグルタル酸 ((S)-2-ヒドロキシグルタル酸または「L-2HG」) のレベルを測定するための手段を含み、
測定レベルが正常酸素状態に相関する基準レベルから有意差を示すときに、前記対象が組織低酸素と診断される、システム。

【請求項 2】

対象における低酸素誘発性傷害を診断するための診断情報を提供するためのシステムであって、
前記対象から得られた細胞試料中の L-2HG のレベルを測定するための手段を含み、
測定レベルが正常酸素状態に相関する基準レベルから有意差を示すときに、前記対象が低酸素誘発性傷害と診断される、システム。

【請求項 3】

前記対象から得られた細胞試料中の H3K9me3 のレベルを測定するための手段をさらに含み、
H3K9me3 の測定レベルが正常酸素状態を表す基準レベルから有意差を示すときに、
前記対象が組織低酸素または低酸素誘発性傷害と診断される、請求項 1 または 2 に記載のシステム。

【請求項 4】

前記低酸素誘発性傷害が、敗血症性ショック、虚血性脳卒中、心筋梗塞、貧血症、肺疾患、気道閉塞、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、気胸症、肺気腫、先天性心臓欠陥、アテローム性動脈硬化症、血栓症、肺塞栓症、肺水腫、喘息、膿胞性線維症、癌、または外科的処置中であるかまたはこれを含む、低酸素に関連する疾患、障害または病態を含む、請求項2に記載のシステム。

【請求項 5】

前記組織低酸素が慢性低酸素と関連する、請求項1、および、請求項1を引用する場合の請求項3のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 6】

前記低酸素誘発性傷害が慢性低酸素と関連する、請求項2および4、ならびに、請求項2を引用する場合の請求項3のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 7】

前記細胞試料が、組織試料から得られる、請求項1～4のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 8】

前記組織試料が、心臓の組織、動脈、脳、腫瘍、またはそれらの組み合わせを含む、請求項7に記載のシステム。

【請求項 9】

前記細胞試料が、血液、尿、血清、リンパまたは脳脊髄液から得られる、請求項1～4、7および8のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 10】

前記細胞試料が、血液試料から得られる、請求項9に記載のシステム。

【請求項 11】

前記血液試料が、静脈血試料である、請求項10に記載のシステム。

【請求項 12】

L-2HGに特異的に結合する抗体を含む、組織中の低酸素を検出するための組成物であって、前記抗体が検出可能な部分を含む、組成物。

【請求項 13】

低酸素の前記検出が、対象から得られた細胞試料中で実行されることを特徴とする、請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

L-2HGの前記レベルが、ガスクロマトグラフィー質量分析、液体クロマトグラフィー質量分析または酵素アッセイによって測定される、請求項1～4のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 15】

L-2HGの前記レベルの測定が、質量分析の使用を含む、請求項1～4および14のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 16】

前記測定が、ガスクロマトグラフィー質量分析の使用を含む、請求項1～4、14および15のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 17】

2-ヒドロキシグルタル酸をキラル誘導化試薬と反応させるステップをさらに含む、請求項1～4および14～16のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 18】

前記基準レベルが、正常酸素状態の個体対象に由来する、請求項1～4のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 19】

前記正常酸素状態の個体対象が前記対象である、請求項18に記載のシステム。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記基準レベルが、正常酸素状態の対象の集団に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 1】

前記基準レベルが、急性的に低酸素の対象に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 2】

前記基準レベルが、急性的に低酸素の対象の集団に由来する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 3】

前記組織低酸素が慢性低酸素と関連し、そして、前記試料において測定された前記 1 つまたは複数のバイオマーカーの前記レベルと前記基準レベルとの間の前記差が、前記対象における慢性低酸素の重症度と相関する、請求項 1 1 および、請求項 1 を引用する場合の請求項 3 および請求項 1 4 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のシステム。 10

【請求項 2 4】

前記低酸素誘発性傷害が慢性低酸素と関連し、そして、前記試料において測定された前記 1 つまたは複数のバイオマーカーの前記レベルと前記基準レベルとの間の前記差が、前記対象における慢性低酸素の重症度と相関する、請求項 2 および 4 、ならびに、請求項 2 を引用する場合の請求項 3 および 1 4 ~ 2 2 のいずれか一項に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0 0 0 1】

関連出願

本特許出願は、任意の及び全ての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる、2014年3月28日に出願された米国仮特許出願第 61/972,091 号の利益及びそれに対する優先権を主張する。

【0 0 0 2】

政府支援

合衆国法典第 35 卷第 202 条 (c) (6) に従い、本明細書に記載または特許請求する 1 つまたは複数の発明に関し、出願人は、本発明が、アメリカ国立衛生研究所による補助金交付番号 R01 CA168802-02 の下に政府支援を伴って作成されたことを述べる。米国政府は、本発明にある特定の権利を有する。 30

【背景技術】

【0 0 0 3】

ストレス、例えば、低酸素、感染、飢餓、温度、毒性等は、細胞の代謝に著しい影響を及ぼし、主要な疾患に寄与する。例えば、大半の細胞は、生存及びそれらの機能を実行するため酸素を必要とし、低酸素は細胞の代謝経路に影響を及ぼし、しばしば低酸素誘発性傷害を引き起こす。ストレスに対する細胞応答の研究における新たな発展は、ストレス誘発性傷害を必然的に含む障害へに対するより良好な処置に導くだろう。ストレスに関する疾患を処置するための組成物またはシステムの開発を目的とした多くの努力がある。

【発明の概要】

40

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

本開示は、L-2HG が組織低酸素において重要な役割を担うという認識を包含する。本開示は、他の出願のなかでも、L-2HG を、組織低酸素を診断するためのバイオマーカーとして使用することができるることを実証する。いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、対象から採取された試料から細胞の L-2HG を測定することにより、組織低酸素を診断するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象からの L-2HG のレベルを、正常酸素状態の対照対象からのものと比較することができることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象からの L-2HG のレベルを、急性低酸素または慢性低酸素を有する患者からのものと比較することができることを記載

50

する。いくつかの実施形態では、本開示は、これらの異なる試料からの L - 2 H G の比較が、対象における低酸素を診断するために使用され得ることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、試料の低酸素状態は、L - 2 H G レベルを測定することにより確認され得ることを記載する。

【 0 0 0 5 】

あるいはまたは加えて、本開示は、患者において低酸素誘発性傷害を診断することを記載する。症候性または亜症候性 (s u b - s y m p t o m a t i c) でない低酸素誘発性傷害は、臨床的に診断することがしばしば難しい。本開示に従って試料から L - 2 H G レベルを測定することは、対象における低酸素誘発性傷害についての指標を与える。いくつかの実施形態では、本開示は、例えば、対象から採取した試料からの細胞の L - 2 H G を測定することにより組織低酸素を診断するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、試料は、例えば、血液試料または生検試料であり得る。いくつかの実施形態では、本開示は、対象からの L - 2 H G のレベルを、正常酸素状態の対照対象からのものと比較することができることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象からの L - 2 H G のレベルを、急性低酸素または慢性低酸素を有する患者からのものと比較することができることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、これらの異なる試料からの L - 2 H G の比較が、対象における低酸素誘発性傷害を診断するために使用され得ることを記載する。

【 0 0 0 6 】

本開示は、L - 2 H G が、低酸素または低酸素誘発性傷害を診断するための単一の代謝産物として使用され得ることを記載する。あるいはまたは加えて、本開示は、それにより L - 2 H G を、診断のためにより広範なセットのバイオマーカーに統合することができる方法を代替的にまたは追加的に記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、診断においてバイオマーカーセットの一部として L - 2 H G を使用する方法を記載する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示は、対象からの試料中の少なくとも 2 つのバイオマーカーを測定する方法を記載し、ここで少なくとも 2 つのバイオマーカーのうちの 1 つは L - 2 H G である。

【 0 0 0 7 】

本開示は、L - 2 H G が、低酸素に関連する診断及び治療のための新規及び信頼できる因子であることを記載する。あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 H G 代謝を制御するある特定の酵素、例えば、LDHA、MDH1、MDH2、及び L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼが、L - 2 H G を制御するメカニズムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、これらの酵素の調節は、予測可能な様式で L - 2 H G のレベルに影響を与えることを実証する。いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素に関連する診断及び治療のためにこれらの酵素を調節するためのシステムを記載する。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、本開示は、試料中の酸素レベルの測定に従い、低酸素の診断を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素が他の方法を介して診断することができることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、慢性低酸素における L - 2 H G の使用を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、急性低酸素における L - 2 H G の使用を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、慢性または急性のいずれかの、低酸素の根本的原因により引き起こされた低酸素における L - 2 H G の使用を記載する。

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、本発明に従って、本明細書に記載するような 1 つまたは複数の低酸素マーカーが、例えば、低酸素または低酸素に関連する疾患、障害、もしくは病態を、診断するまたは処置する文脈において、検出または測定される。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、低酸素に関連する疾患、障害または病態は、例えば、敗血症

10

20

30

40

50

性ショック、虚血性脳卒中、心筋梗塞、貧血症、肺疾患、気道閉塞、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、気胸症、肺気腫、先天性心臓欠陥、アテローム性動脈硬化症、血栓症、肺塞栓症、肺水腫、喘息、膿胿性線維症、癌、ならびに外科的処置中であるか、これを含む。

【0011】

本開示は、低酸素または低酸素誘発性傷害の処置において有用である薬剤を同定するまたは特徴づけるためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、ある特定の新規パラメータが低酸素において重要な役割を担う可能性があることを記載する。例えば、いくつかの実施形態では、このパラメータは、L-2HGのレベルまたは動態であるかまたはこれからなる。いくつかの実施形態では、このパラメータは、-ケトグルタル酸のレベルまたは動態であるかまたはこれからなる。いくつかの実施形態では、このパラメータは、LDHAのレベルまたは活性であるかまたはこれからなる。いくつかの実施形態では、このパラメータは、MDH1のレベルまたは活性であるかまたはこれからなる。いくつかの実施形態では、このパラメータは、MDH2のレベルまたは活性であるかまたはこれからなる。いくつかの実施形態では、このパラメータは、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのレベルまたは活性であるかまたはこれからなる。

10

【0012】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGを使用することにより低酸素または低酸素誘発性傷害の処置において有用である薬剤を同定するまたは特徴づけるためのシステムを記載する。例えば、細胞、組織または生体中のL-2HGのレベルは、薬剤が不在のときまたは組織もしくは生体中のL-2HGレベルへの影響が知られている基準薬が存在するときと比較して、薬剤が存在するときに測定することができる。いくつかの実施形態では、薬剤が存在するときに測定されたL-2HGレベルが、それが不在のときのものより高い場合、L-2HGを増加させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものと類似する場合、L-2HGを増加させないと知られている基準薬が存在するときに測定されたものを超える場合に、薬剤は、低酸素誘発性傷害の処置において有用であると同定されるまたは特徴づけられる。

20

【0013】

本開示は、例えば低酸素または低酸素誘発性傷害を診断することまたは処置することを伴う、L-2HGレベルに対して比較することができるパラメータを記載する。一例をあげると、いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGレベルが正常酸素状態の基準対象のものと比較して上昇している対象へ低酸素治療を施すことによる低酸素の処置を記載する。いくつかの実施形態では、L-2HGのレベルの上昇は、正常酸素状態の対象について観察されるものと比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍であるか、またはさらに高い。

30

【0014】

いくつかの実施形態では、本開示は、患者集団を（例えば、低酸素治療での処置に対するそれらの候補性に関して）層別化するため、または1つまたは複数の対象に施したときの特定の治療の有効性をモニターするまたは調節するための技術を提供する。

40

【0015】

いくつかの実施形態では、低酸素治療は、例えば、酸素補充療法、赤血球濃厚液の輸血、カフェイン、ビタミン療法、機械的換気、陽圧療法、身体運動、または外科的介入であつてよいかまたはこれを含んでよい。

【0016】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載するような低酸素マーカーは、患者試料中で測定される。いくつかの実施形態では、試料は、例えば、心臓、動脈、脳、腫瘍、またはそれらの組み合わせからの組織試料であつてよいかまたはこれを含んでよい。いくつかの実施形態では、試料は、血液、尿、血清、リンパまたは脳脊髄液であつてよいかまたはこ

50

れを含んでよい。いくつかの実施形態では、試料は、静脈血試料であってよいかまたはこれを含んでよい。

【0017】

いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素または低酸素誘発性傷害を処置するための新規システムを記載する。いくつかの実施形態では、傷害は、低酸素に関連する疾患、障害もしくは病態を有する患者からの症状であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、傷害は、虚血性組織傷害であるかまたはこれを含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、本開示は、組織中のまたは系統的にL-2HGレベルを調節する治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象においてL-2HGのレベルを増加させる治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象においてL-2HGのレベルを低減させる治療を記載する。

10

【0019】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HG代謝を調節する薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、組織への送達を達成する経路を介した対象への組成物の投与を含む治療を記載する。

【0020】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGであるかまたはこれを含む薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGのアンタゴニストであるかまたはこれを含む薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、本開示は、限定されないが、-ケトグルタル酸、-ケトグルタル酸の細胞透過性変異体（例えば、-ケトグルタル酸ジメチル）、グルタミン、またはグルタミン酸塩を含む組成物を投与することを含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、-ケトグルタル酸のアンタゴニストであるかまたはこれを含む薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。

【0022】

いくつかの実施形態では、本開示は、LDHA、MDH1、MDH2、及びL-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択される1つまたは複数の分子の発現または活性に影響を及ぼす薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、組織への送達を達成する経路を介した対象へのLDHAの阻害剤の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターの投与を含む治療を記載する。

30

【0023】

いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素病態を適用することを必然的に含む用途を記載する。例えば、低酸素は、幹細胞または前駆細胞の多能性を維持するなどのいくつかの状況では望ましい可能性がある。いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素の恩恵を受けることができる対象において組織低酸素を促進するためのシステムを記載する。

【0024】

40

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGレベルが正常酸素状態の対象と比較して低い対象において組織低酸素を促進するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGレベルが正常酸素状態の基準対象と比較して、最大で50%である対象において組織低酸素を促進するためのシステムを記載する。いくつかの他の実施形態では、本開示は、L-2HGレベルが正常酸素状態の基準対象と比較して、最大で40%、最大で30%、最大で20%、最大で10%、または最大で5%である対象において組織低酸素を促進するためのシステムを記載する。

【0025】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞、組織または生体の多能性または自己複製を維持するまたは促進するための組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態で

50

は、これらの組成物またはシステムは、インビポで使用するためのものである。いくつかの実施形態では、これらの組成物及びシステムは、インビトロで使用するためのものである。

【0026】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞の多能性または自己複製を維持するまたは促進するための組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、細胞は、幹細胞または前駆細胞である。いくつかの実施形態では、これらの組成物またはシステムは、細胞中の L - 2 HG のレベルを調節することを含む。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞を L - 2 HG と接触させることを含む、L - 2 HG のレベルを調節するための組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性または発現を阻害するための組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、LDHA 活性または発現を促進するための組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、MDH1 または MDH2 活性または発現を促進するための組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG を細胞に送達するための方法を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞中の - ケトグルタル酸を枯渇させるための方法を記載する。いくつかの実施形態では、細胞または組織の多能性または自己複製を維持するまたは促進するために使用することができる方法は、細胞培養または組織培養に適用される。

10

【0027】

いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG の枯渇が細胞分化を促進することを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、幹細胞分化を促進するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、これらのシステムは、幹細胞または前駆細胞を有効量の LDHA の阻害剤と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、これらのシステムは、幹細胞または前駆細胞を有効量の L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、癌幹細胞である。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG 代謝における LDHA の重要性を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、LDHA 活性の阻害に有用な薬剤を同定するまたは特徴づけるための方法を記載する。いくつかの実施形態では、本方法は、薬剤を、LDHA を発現する細胞を含有する試料または LDHA を含有する無細胞溶液と接触させること、その後薬剤が存在するときの試料中の L - 2 HG のレベルを、それが不在のとき、または試料中の L - 2 HG に及ぼすその効果が知られている基準薬が存在するときと比較して測定すること、及び薬剤が存在するときの測定された L - 2 HG レベルが、それが不在のときのものより低い場合、L - 2 HG を低減させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものと類似する場合、または L - 2 HG を増加させないと知られている基準薬が存在するときに測定されたものより低い場合に、LDHA 活性の阻害において薬剤が有用であると決定することを含む。

30

【0029】

いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG 代謝における L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの重要性を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の促進に有用な薬剤を同定するまたは特徴づけるための方法を記載する。いくつかの実施形態では、本方法は、薬剤を、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼを発現する細胞を含有する試料または L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼを含有する無細胞溶液と接触させること、薬剤が存在するときの試料中の L - 2 HG のレベルを、それが不在のときまたは試料中の L - 2 HG に及ぼすその効果が知られている基準薬が存在するときと比較して測定すること、及び薬剤が存在するときの測定された L - 2 HG レベルが、それが不在のときのものより高い場合、L - 2 HG を増加させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものに類似する場合、または L - 2 HG を低減させないと知られている基準薬が存在するときに

40

50

測定されたものより高い場合に、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の促進において薬剤が有用であると決定することを含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HG代謝が、細胞のエピジェネティックな変化に密接につながっているという新規知見を記載する。例えば、本開示は、L-2HG蓄積がヒストンのメチル化を促進することを記載する。いくつかの実施形態では、ヒストンのメチル化は、ヒストン3リジン9のトリメチル化(H3K9me3)を含む。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞を、L-2HGを含む組成物、LDHAのアクチベーター、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、またはそれらの組み合わせと接触させることを含む、細胞中でヒストンのメチル化を促進するためのシステムを記載する。一方で、いくつかの他の実施形態では、本開示は、細胞を、-KGを含む組成物、LDHAの阻害剤、またはL-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターと接触させることを含む、細胞中でヒストンのメチル化を阻害するためのシステムを記載する。

10

【0031】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGを、癌表現型を区別するために使用することができるという新規知見を代替的にまたは追加的に記載する。例えば、本開示は、L-2HG代謝が、IDH1/2変異を伴わない腫瘍の高く相関する領域であるH3K9me3染色に影響を与えることを実証する。いくつかの実施形態では、本開示は、腫瘍異質性を同定するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、これらのシステムは、以下のパラメータ、すなわちL-2HGレベル、-ケトグルタル酸、LDHAの発現または活性、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの発現または活性、またはH3K9me3の少なくとも1つを測定することを含む。いくつかの実施形態では、腫瘍は膠芽腫を有する患者からのものである。

20

【0032】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGを、低酸素をイメージングするために使用することができるという新規知見を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGと反応する薬剤を含む組成物を試料または対象に投与するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、薬剤は、L-2HGに特異的に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は、イメージング技術によるその視覚化を可能にする別の部分とコンジュゲートする。

30

【0033】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGを正確に検出することができる組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGとR-2HGを区別できる組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、ガスクロマトグラフィー質量分析、液体クロマトグラフィー質量分析または酵素アッセイを含む組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、2HGをキラル誘導化試薬と接触させることにより2-ヒドロキシグルタル酸を処理するための組成物またはシステムを記載する。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

40

(項目1)

対象において組織低酸素を診断する方法であって、

(1) 前記対象からの試料中のL-2-ヒドロキシグルタル酸((S)-2-ヒドロキシグルタル酸または「L-2HG」)のレベルを測定し；

(2) 前記測定レベルと正常酸素状態に相関する基準レベルとを比較するステップを含み、組織低酸素は、前記測定レベルが前記基準レベルから有意差を示すときに診断される、前記方法。

(項目2)

対象において低酸素誘発性傷害を診断する方法であって：

(1) 前記対象からの試料中のL-2HGのレベルを測定し；

50

(2) 前記測定レベルと正常酸素状態に相關する基準レベルとを比較するステップを含み、低酸素誘発性傷害は、前記測定レベルが前記基準レベルから有意差を示すときに診断される、前記方法。

(項目3)

(1) 前記対象からの試料中の少なくとも2つのバイオマーカーを測定し、ここで前記少なくとも2つのバイオマーカーの1つはL-2HGであり；及び

(2) 前記測定レベルと低酸素または正常酸素状態を表す基準レベルとを比較するステップをさらに含み、組織低酸素または低酸素誘発性傷害は、前記測定レベルが前記基準レベルから有意差を示すときに診断される、項目1または2に記載の方法。

(項目4)

低酸素誘発性傷害の処置において有用な薬剤を同定するまたは特徴づける方法であって、前記方法が：

(1) 薬剤を対象となる細胞、組織または生体と接触させ；

(2) 前記薬剤が存在するときの前記組織中のL-2HGのレベルを、それが不在のとき、または前記組織または生体中のL-2HGレベルに及ぼすその効果が知られている基準薬が存在するときと比較して測定し；

(3) 前記薬剤が存在するときの前記測定されたL-2HGレベルが、それが不在のときのものより高い場合、L-2HGを増加させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものと類似する場合、またはL-2HGを増加させないと知られている基準薬が存在するときに測定されたものを超す場合に、低酸素誘発性傷害の前記処置において前記薬剤が有用であると決定するステップを含む、前記方法。

(項目5)

前記傷害が、敗血症性ショック、虚血性脳卒中、心筋梗塞、貧血症、肺疾患、気道閉塞、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、気胸症、肺気腫、先天性心臓欠陥、アテローム性動脈硬化症、血栓症、肺塞栓症、肺水腫、喘息、膿胞性線維症、癌、または外科的処置中であるかまたはこれを含む、低酸素に関連する疾患、障害または病態を含む、項目2または4に記載の方法。

(項目6)

対象において組織低酸素またはその根本的原因を処置する方法であって、前記方法が、そのL-2HGレベルが正常酸素状態の基準対象と比較して少なくとも2倍である対象に、低酸素治療を施すことを含む、前記方法。

(項目7)

L-2HGの前記レベルが、正常酸素状態の対象と比較して、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、または少なくとも10倍に上昇している、項目6に記載の方法。

(項目8)

前記低酸素治療が、酸素補充療法、赤血球濃厚液の輸血、カフェイン、ビタミン療法、機械的換気、陽圧療法、身体運動、または外科的介入を含む群から選択される、項目6に記載の方法。

(項目9)

前記低酸素が慢性である、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記治療が、慢性低酸素または慢性低酸素の根本的原因に向けられている、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

慢性低酸素の前記根本的原因が、慢性閉塞性肺障害、気道閉塞、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、気胸症、肺気腫、先天性心臓欠陥、アテローム性動脈硬化症、血栓症、肺塞栓症、肺水腫、喘息、及び膿胞性線維症を含む群から選択される、項目10に記載の方法。

(項目12)

L-2HGの前記測定が、組織試料から得られる、先行項目のいずれか一項に記載の方

10

20

30

40

50

法。

(項目 13)

前記組織試料が、心臓の組織、動脈、脳、腫瘍、またはそれらの組み合わせを含む、項目 13 に記載の方法。

(項目 14)

前記試料が、血液、尿、血清、リンパ及び脳脊髄液を含む群から選択される、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 15)

L - 2 HG の前記測定が、血液試料から取得される、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 16)

前記血液試料が、静脈血試料である、項目 16 に記載の方法。

(項目 17)

虚血性組織傷害を処置する方法であって、虚血性組織傷害を有する対象に、L - 2 HG のレベルを調節する治療を施すことを含む、前記方法。

(項目 18)

前記治療が、前記対象における L - 2 HG の前記レベルを増加させる、項目 6 または 17 に記載の方法。

(項目 19)

前記治療が、前記対象における L - 2 HG の前記レベルを低減させる、項目 6 または 17 に記載の方法。

20

(項目 20)

前記治療が、前記組織への送達を達成する経路を介した前記対象への L - 2 HG を含む組成物の投与を含む、項目 18 に記載の方法。

(項目 21)

前記治療が、前記組織への送達を達成する経路を介した前記対象への LDHA の阻害剤の投与を含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 22)

前記治療が、LDHA、MDH1、またはMDH2 のレベルまたは活性を調節する薬剤の投与を含む、項目 6 または 17 に記載の方法。

30

(項目 23)

前記薬剤の前記投与が、LDHA、MDH1、またはMDH2 のレベルまたは活性を増加させる、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

前記薬剤の前記投与が、LDHA、MDH1、またはMDH2 のレベルまたは活性を低減させる、項目 22 に記載の方法。

(項目 25)

前記処置が、これらに限定されないが、-ケトグルタル酸、-ケトグルタル酸の細胞透過性変異体（例えば、-ケトグルタル酸ジメチル）、グルタミン、またはグルタミン酸塩を含む組成物を投与することを含む、項目 18 に記載の方法。

40

(項目 26)

前記処置が、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼレベルまたは活性を阻害することを含む、項目 18 に記載の方法。

(項目 27)

前記処置が、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼレベルまたは活性を促進することを含む、項目 19 に記載の方法。

(項目 28)

対象において組織低酸素を促進する方法であって、前記方法が、その L - 2 HG レベルが正常酸素状態の基準対象と比較して最大で 50 % である対象に治療を施すことを含む、前記方法。

50

(項目 29)

L - 2 HG の前記レベルが、正常酸素状態の基準対象と比較して、最大で 40%、最大で 30%、最大で 20%、最大で 10%、または最大で 5% である、項目 28 に記載の方法。

(項目 30)

幹細胞または前駆細胞である細胞の多能性または自己複製を維持するまたは促進する方法であって、前記細胞中の L - 2 HG のレベルを調節することを含む、前記方法。

(項目 31)

L - 2 HG のレベルを調節することが、前記細胞を L - 2 HG と接觸させることを含む、項目 30 に記載の方法。

10

(項目 32)

L - 2 HG のレベルを調節することが、前記細胞中の L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼレベルまたは活性を阻害することを含む、項目 30 に記載の方法。

(項目 33)

癌に罹患している対象において癌を処置する方法であって、1つまたは複数の用量の LDHA の阻害剤、または1つまたは複数の用量の L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの刺激剤の投与を含む治療レジメンを前記対象に投与することを含む、前記方法。

(項目 34)

前記対象が、野生型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 または 2 (IDH1 / 2) を有する、項目 33 に記載の方法。

20

(項目 35)

腫瘍血管新生を阻害する方法であって、腫瘍を、治療有効量の LDHA の阻害剤または L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターと接觸させることを含む、前記方法。

(項目 36)

細胞分化を促進させる方法であって、幹細胞または前駆細胞である細胞を、有効量の LDHA の阻害剤または L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターと接觸させることを含む、前記方法。

(項目 37)

30

前記細胞が癌幹細胞である、項目 36 に記載の方法。

(項目 38)

癌の処置において有用な薬剤を同定するまたは特徴づける方法であって、前記方法が：

(1) 薬剤を、癌細胞を含む系と接觸させ；

(2) 前記薬剤が存在するときの前記系中の L - 2 HG のレベルを、それが不在のとき、または前記組織または生体中の L - 2 HG レベルに及ぼすその効果が知られている基準薬が存在するときと比較して測定し；

(3) 前記薬剤が存在するときの前記測定された L - 2 HG レベルが、それが不在のときのものより低い場合、L - 2 HG を低減させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものと類似する場合、または L - 2 HG を増加させないと知られている基準薬が存在するときに測定されたものより低い場合に、癌の処置において前記薬剤が有用であると決定するステップを含む、前記方法。

40

(項目 39)

前記系が腫瘍であるかまたは腫瘍を含む、項目 38 に記載の方法。

(項目 40)

敗血症性ショックの症状を有する対象を処置する方法であって、前記対象に、治療有効量の LDHA の阻害剤または L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターを投与することを含む、前記方法。

(項目 41)

心筋梗塞の症状を有するまたは心筋梗塞のリスクがある対象を処置する方法であって、

50

前記対象に、治療有効量のLDHAの阻害剤またはL-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターを投与することを含む、前記方法。

(項目42)

虚血性脳卒中の症状を有するまたは虚血性脳卒中のリスクがある対象を処置する方法であって、前記対象に、治療有効量のLDHAの阻害剤またはL-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターを投与することを含む、前記方法。

(項目43)

LDHA活性の阻害において有用である薬剤を同定するまたは特徴づける方法であって、前記方法が：

(1)薬剤を、LDHAを発現する細胞を含有する試料またはLDHAを含有する無細胞溶液と接触させ；

10

(2)前記薬剤が存在するときの前記試料中のL-2HGのレベルを、それが不在のとき、または前記試料中のL-2HGに及ぼすその効果が知られている基準薬が存在するときと比較して測定し；

(3)前記薬剤が存在するときの前記測定されたL-2HGレベルが、それが不在のときのものより低い場合、L-2HGを低減させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものと類似する場合、またはL-2HGを増加させないと知られている基準薬が存在するときに測定されたものより低い場合に、LDHA活性の阻害において前記薬剤が有用であると決定するステップを含む、前記方法。

(項目44)

20

L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の促進において有用である薬剤を同定するまたは特徴づける方法であって、前記方法が：

(1)薬剤を、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼを発現する細胞を含有する試料またはL-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼを含有する無細胞溶液と接触させ；

(2)前記薬剤が存在するときの前記試料中のL-2HGのレベルを、それが不在のとき、または前記試料中のL-2HGに及ぼすその効果が知られている基準薬が存在するときと比較して測定し；

(3)前記薬剤が存在するときの前記測定されたL-2HGレベルが、それが不在のときのものより高い場合、L-2HGを増加させると知られている基準薬が存在するときに測定されたものに類似する場合、またはL-2HGを低減させないと知られている基準薬が存在するときに測定されたものより高い場合に、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性の促進において前記薬剤が有用であると決定するステップを含む、前記方法。

30

。

(項目45)

細胞におけるヒストンのメチル化を促進する方法であって、前記細胞を、L-2HG、LDHAのアクチベーター、L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼの阻害剤、またはそれらの組み合わせと接触させることを含む、前記方法。

(項目46)

40

細胞におけるヒストンのメチル化を阻害する方法であって、前記細胞を、LDHAの阻害剤、またはL-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターと接触させることを含む、前記方法。

(項目47)

前記ヒストンのメチル化が、ヒストン3リジン9のトリメチル化(H3K9me3)を含む、項目45または46に記載の方法。

(項目48)

組織における低酸素の異質性について試験する方法であって、

(1)前記組織の1つの領域内のL-2HGのレベルを測定し；

(2)L-2HGの前記測定レベルを、前記組織の少なくとも1つの異なる領域と比較するステップを含み、前記測定レベルがステップ(1)にて前記領域から測定された前記レ

50

ペルから有意差を示すときに組織低酸素の異質性が診断される、前記方法。

(項目 49)

組織における低酸素の異質性について試験する方法であって、

(1) 前記組織の1つの領域内のH3K9me3のレベルを測定し；

(2) H3K9me3の前記測定レベルを、前記組織の少なくとも1つの異なる領域と比較するステップを含み、前記測定レベルがステップ(1)にて前記領域から測定された前記レベルから有意差を示すときに組織低酸素の異質性が診断される、前記方法。

(項目 50)

前記組織が、腫瘍由来である、項目48または49に記載の方法。

(項目 51)

10

腫瘍が、膠芽腫を有する対象由来である、項目50に記載の方法。

(項目 52)

組織中の低酸素をイメージングする方法であって、L-2HGと反応する薬剤を含む組成物を投与することを含む、前記方法。

(項目 53)

低酸素の前記イメージングが、対象で実行される、項目52に記載の方法。

(項目 54)

前記薬剤が、L-2HGに特異的に結合する、項目52に記載の方法。

(項目 55)

20

前記薬剤が、臨床イメージング法によるその視覚化を可能にする部分を含む、項目54に記載の方法。

(項目 56)

L-2HGの前記レベルが、ガスクロマトグラフィー質量分析、液体クロマトグラフィー質量分析または酵素アッセイによって測定される、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 57)

L-2HGの前記レベルの測定が、質量分析の使用を含む、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 58)

30

前記測定が、ガスクロマトグラフィー質量分析の使用を含む、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 59)

2-ヒドロキシグルタル酸をキラル誘導化試薬と反応させるステップをさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 60)

前記基準レベルが、正常酸素状態の個体対象に由来する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 61)

前記正常酸素状態の個体対象が前記対象である、項目60に記載の方法。

(項目 62)

40

前記基準レベルが、正常酸素状態の対象の集団に由来する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 63)

前記基準レベルが、急性的に低酸素の対象に由来する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 64)

前記基準レベルが、急性的に低酸素の対象の集団に由来する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 65)

前記試料において測定された前記1つまたは複数のバイオマーカーの前記レベルと前記

50

基準レベルとの間の前記差が、前記対象における慢性低酸素の重症度と相関する、先行項目のいずれか一項に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】低酸素に応答したL-2-ヒドロキシグルタル酸(L-2HG)の産生を示すGC-MSヒストグラム及びウェスタンプロット画像を示す。(A)のパネルは、異なる細胞型での2HGレベルを示す棒グラフである。指定の細胞を、21%または0.5%酸素(O_2)中で24~48時間培養した。総細胞内2HGをガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)によって測定し、入力を統制するために総タンパク質に対して正規化した。21% O_2 における各細胞型の2HGレベルを、倍率変化を示すために任意に1と設定した。グラフは、3重の試料の平均+/-標準偏差を示す。(B及びC)のパネルは、ウェスタンプロット及び異なるタンパク質の発現を示すこれらのプロットの定量化である。SF188細胞を、非標的shRNA(対照)、D2HGDH(D2、D3、D4、D5)を標的とするshRNA、またはL2HGDH(L2、L3、L4)を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスに安定定期に感染させた。細胞を21%または0.5% O_2 中で48時間培養し、2HGを(A)のように測定した。ウェスタンプロットは、HIF1、D2HGDH、L2HGDH、及びS6タンパク質(負荷対照)の発現を示す。(D)のパネルは、時間の関数としてイオンの濃縮を示すGC-MSヒストグラムである。低酸素のSF188細胞からの代謝産物を、4つの画分に分け、次いで、D-2HG、L-2HG、D-2HG及びL-2HGの混合物の基準標準物質でスパイクするか、またはスパイクしないままにした。キラル誘導体化を行って、GC-MSによる2HGエナンチオマーの分離を可能にした。この図の各パネルでは、3つ以上の独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。図6も参照されたい。

【図2】低酸素誘発性L-2HGがグルタミン由来の-ケトグルタル酸を起源とすることを示すGC-MSヒストグラムの定量化結果を示す。(A及びB)のパネルは、指定の時間で ^{13}C により標識された細胞内2HGの割合を示す線図である。同位体追跡を、[U- ^{13}C]グルコースまたは[U- ^{13}C]グルタミンのいずれかを含有する培地内で培養されたSF188細胞において行った。同様の標識パターンが、RCC4及びCS-1細胞で観察された(データは示さず)。(C)のパネルは、正規化2HGを示す棒グラフである。SF188細胞を、ビヒクル(DMSO)または5mMのジメチル- -KGの存在下、21%または0.5% O_2 中で48時間培養した。総細胞内2HGをGC-MSにより評価した。グラフは、3重の試料の平均+/-標準偏差を示す。3つの独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。(D及びE)のパネルは、異なる条件における2HGイオンを示すGC-MSヒストグラムである。SF188細胞を、(C)のように培養し、次いで代謝産物のキラル誘導体化を行って、GC-MSによる2HGエナンチオマーの分離を可能にした。(D)のパネルは、同じ目盛りで2HGについてGC-MSヒストグラムのオーバーレイを示す。(E)のパネルは、異なる目盛りで2HGについて個別のGC-MSヒストグラムを示す。(D)及び(E)についてのグラフの線のスタイルは、(C)に示すものと同じである。(図1D)のように、L-2HG(左)は、D-2HG(右)よりも短い保持時間で溶出する。5つの独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。

【図3】低酸素誘発性L-2HGがLDHAによる無差別な基質使用を介して生じることを示すウェスタンプロット画像を示す。(A、B、C)のパネルは、siRNA実験後に示された様々なタンパク質のウェスタンプロット画像及び定量化である。SF188細胞を、(A)IDH1(IDH1-a、-b)またはIDH2(IDH2-a、-b)、(B)MDH1(MDH1-a、-b)またはMDH2(MDH2-a、-b)、または(C)LDHA(LDHA-a、-b、-c、-d)を標的とするsiRNAでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を21%または0.5% O_2 にさらに24~48時間移し、その後、細胞内2HGを測定した。ウェスタンプロットは、標的ノックダウン有効性を確かにし、HIF1の低酸素誘発性発現を示す。S6タンパク

10

20

30

40

50

質または - チューブリンのいずれかの発現を、負荷対照として示す。各パネルについて、3つの独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。図7も参照されたい。パネル(D)は、低酸素誘発性L-2HGの酵素源をまとめた概略図である。

【図4】LDHAの活性部位が、L-2HGへの還元を受け入れられる幾何学における-KGの結合を立体的に受け入れることを示す構造モデルレンダリングを示す。(A及びC)のパネルは、NADHを有するLDHAの活性部位にドッキングしたピルベート及び-KGのポーズの構造モデルである。(B及びD)のパネルは、NAD⁺を有するLDHAの活性部位にドッキングしたL-乳酸塩及びL-2HGのポーズの構造モデルである。影付きの雲状部分は、基質結合性ポケット内で予測される空の空間を表す。予測される水素結合を青色で示す。線として示す残基は、Arg 168(パネルの右上角の細い灰色の線)、Thr 247(パネルの左上角の太い灰色の線)、His 192(底部中央の細い灰色の線)、Arg 105(背景中央の淡灰色の線)、Asn 137(上部中央の細い灰色の線)、及びGln 99(淡灰色と黒色の間の上部中央の太い灰色の線)である。ドッキングは、PDBアクセションコード1I10(Readら、2001)を使用した。四角は、対応する-Hidroキシル酸のL-(S)-エナンチオマーを產生するように還元反応を拘束する、NADHのヒドリド基に関連して、各基質のカルボン酸頭部基及び隣接するカルボニル基の空間的立体配置を強調する。

【図5】L-2HGが、低酸素に応答してヒストン3リジン9のトリメチル化を増強させることを示す免疫組織化学染色及びウェスタンプロット画像を示す。(A)のパネルは、指定のタンパク質について染色されたヒト膠芽腫検体の免疫組織化学画像である。HIF 1発現及びH3K9me3レベルを、生検において捉えた低酸素性領域を有する(n=26)または有さない(n=21)ヒト膠芽腫検体における免疫組織化学により評価した。パネル(B)は、HIF 1を発現しない(-)または発現する(+)生検内のH3K9me3染色強度(画素単位)の定量化を示す。値は、平均+/-標準偏差を表し; *p=0.01は、対応のない両側スチュードントのt検定により決定した。(C、D及びE)のパネルは、指定の条件下のH3K9me3のウェスタンプロット画像及び定量化結果である。空のレンチウイルスベクター(ベクター)またはL2HGDHをコードするレンチウイルスベクターに安定的に感染したSF188膠芽腫細胞を、48時間21%または0.5%O₂内で培養し、その後ヒストン抽出を行い、ウェスタンプロットによりH3K9me3を評価した。(D)非標的shRNA(対照)またはL2HGDH(L1、L3)を標的とするshRNAを発現するレンチウイルスに安定的に感染したSF188膠芽腫細胞を、21%または0.5%O₂内で培養し、その後ヒストン抽出を行い、ウェスタンプロットによりH3K9me3を評価した。(E)のパネルでは、バルクヒストンを、-KG(1mM)との反応混合物中で精製したヒトKDM4Cと、ならびに指定濃度のL-2HGまたはD-2HGとインキュベートした。H3K9me3を、総H3を負荷対照として使用して、ウェスタンプロットにより評価した。(C)、(D)、及び(E)のパネルは、3つの独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。

【図6】低酸素に応答したL-2HGの選択的產生を示すGC-MSヒストグラムを示す。パネル(A)は、R(-)-2-ブタノール及び酢酸無水物での連続的な誘導体化後のL-2-ヒドロキシグルタル酸を示す概略図である(詳細については実験手法を参照されたい)。(B及びC)のパネルは、GC-MSからのヒストグラムである。正常酸素状態(21%O₂)または低酸素(0.5%O₂)で培養された(B)HEK293T細胞または(C)SV40-不死化MEFからの代謝産物を、(A)のようにキラル誘導体化に供して、GC-MSによる2HGエナンチオマーの分離を可能にした。図1Dに実証するように、L-2HG(左)は、D-2HG(右)よりも短い保持時間で溶出する。2つ以上の独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。

【図7】低酸素誘発性L-2HGの酵素源を示すウェスタンプロット画像を示す。上のパネルは、そのパネルの左側に指定された条件下のタンパク質のウェスタンプロット画像であり、下のパネルは、そのウェスタンプロットの定量化である。HEK293T細胞を、(A)IDH1(IDH1-a、-b)またはIDH2(IDH2-a、-b)、(B)

10

20

30

40

50

LDHA (LDHA-a、-b、-c、-d)、または(C)LDHA (LDHA-b、-d)及びMDH2 (MDH2-a、-b)の両方を標的とするsiRNAでトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞を21%または0.5%O2へとさらに24~48時間移し、その後細胞内2HGを測定した。ウェスタンプロットは、負荷対照としてS6タンパク質または-チューブリンのいずれかの発現で標的ノックダウン有効性を確かにする。各パネルについて、2つ以上の独立した実験のうちの1つからの代表的なデータを示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

定義

10

本出願では、文脈から別様に明確でない限り、(i)「a」という用語は、「少なくとも1つ」を意味すると理解されてよく；(ii)「または」という用語は、「または」を意味すると理解されてよく；(iii)「含む(comprising)」及び「含む(including)」という用語は、それら単独かまたは1つまたは複数の追加の構成要素またはステップと一緒に提示される、個条書きされた構成要素またはステップを包含すると理解されてよく；(iv)「約」とび「およそ」という用語は、当業者に理解されるであろう標準的な変動を許可すると理解されてよく；(v)範囲が提供される場合、端点を含む。

【0036】

20

活性化剤：本明細書で用いるとき、「活性化剤」という用語、またはアクチベーターは、薬剤無し（または異なるレベルでの薬剤）で観察されるものと比較して、その存在またはレベルが標的のレベルまたは活性の上昇と相關する薬剤を指す。いくつかの実施形態では、活性化剤は、その存在またはレベルが、特定の（例えば、既知の活性化剤、例えば陽性対照、の存在下などの適切な基準条件下で観察される）基準レベルまたは活性と同等またはそれより大きい標的のレベルまたは活性と相關するものである。

【0037】

投与：本明細書で用いるとき、「投与」という用語は、対象または系への組成物の投与を指す。動物対象（例えば、ヒト）への投与は、任意の適切な経路によるものであってよい。例えば、いくつかの実施形態では、投与は、（気管支注入によるものを含む）気管支、口腔、経腸、皮間(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、脳室内、経粘膜、経鼻、経口、直腸、皮下、舌下、局所、気管（気管内注入を含む）、経皮、腔及び硝子体であってよい。

30

【0038】

薬剤：「薬剤」という用語は、本明細書で用いるとき、例えば、ポリペプチド、核酸、多糖類、脂質、小分子、金属、またはそれらの組み合わせを含む任意の化学クラスの化合物または実体を指してよい。いくつかの実施形態では、薬剤は、自然に見いだされるまたは自然から獲得されるという点で自然産物であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、薬剤は、ヒトの手の作用を通して設計され、操作され、もしくは産生されるかまたは自然に見いだされるものではない点で人工である1つまたは複数の実体であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、薬剤は、単離されたまたは純粋な形態において活用されてよく、いくつかの実施形態では、薬剤は、粗形態で活用されてよい。いくつかの実施形態では、潜在的な薬剤は、コレクションまたはライブラリーとして提供され、例えばそれらは、それらの中の活性剤を同定または特徴づけるためにスクリーニングされてよい。本発明に従って活用されてよい薬剤のいくつかの特定の実施形態には、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、ペプチド模倣物等が含まれる。いくつかの実施形態では、薬剤は、ポリマーであるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、薬剤は、ポリマーではないかまたは実質的にいずれのポリマーも含まない。いくつかの実施形態では、薬剤は、少なくとも1つのポリマー部分を含有する。いくつかの実施形態では、薬剤は、任意のポリマー部分を欠くか実質的に含まない

40

50

。

【0039】

動物：本明細書で用いるとき、「動物」という用語は、動物界の任意の成員を指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階のヒトを指す。いくつかの実施形態では、「動物」は、任意の発達段階の非ヒト動物を指す。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、哺乳類（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、靈長類、またはブタ）である。いくつかの実施形態では、動物には、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、または蠕虫類が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子操作された動物、またはクローンであってよい。

10

【0040】

アンタゴニスト：本明細書で用いるとき、「アンタゴニスト」という用語または阻害剤は、i) 別の薬剤の効果を阻害する、低減するもしくは低下させる；または ii) 1つまたは複数の生物学的事象を阻害する、低減する、低下させる、もしくは遅らせる薬剤を指す。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、または関連する阻害活性を示す任意の他の実体を含む、任意の化学クラスの薬剤であってよいかまたはこれらを含んでよい。アンタゴニストは、直接（その場合その影響をその標的に直接及ぼす）または間接（その場合その標的に結合する以外で；例えば、標的のレベルまたは活性が変化するように、例えば、標的の制御因子と相互作用することによって、その影響を及ぼす）であってよい。

20

【0041】

おおよそ：本明細書で用いるとき、「おおよそ」及び「約」という用語は、それぞれ、関連する文脈に適切であると当業者により理解されるであろう通常の統計学的変動を包含すると意図される。ある特定の実施形態では、「おおよそ」または「約」という用語は、別段の記載がない限り、または文脈からそうでないと明確でない限り（例えば、かかる数字があり得る値の100%を超す場合）、それぞれ、記した値のいずれかの方向（より多いまたはより少ない）において25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満内に入る値の範囲を指す。

30

【0042】

と関連する：本用語が本明細書で用いられるとき、一方の存在、レベルまたは形態が他方のものと相關する場合に、2つの事象または実体はお互いに「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、レベルまたは形態が、疾患、障害、または病態の（例えば、関連する集団にわたる）発生率または感受性と相關する場合に、特定の疾患、障害、または病態と関連するとみなされる。いくつかの実施形態では、2つ以上の実体は、物理的にお互いに近接し、近接したままであるようにそれらが直接的または間接的に相互作用する場合、お互いに物理的に「関連」する。いくつかの実施形態では、お互いに物理的に関連する2つ以上の実体は、お互いに共有結合する；いくつかの実施形態では、お互いに物理的に関連する2つ以上の実体は、お互いに共有結合しないが、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、磁気、及びこれらの組み合わせにより、非共有結合的に関連する。

40

【0043】

生物学的に活性：本明細書で用いるとき、「生物学的に活性」という語句は、生物系内（例えば、細胞内（例えば、培養物内、組織内、生体内に、単離された）、細胞培養物内、組織内、生体内、等）における活性を有する物質を指す。例えば、生体に投与されたとき、その生体上に生物学的効果を有する物質が、生物学的に活性であるとみなされる。しばしば生物学的に活性な物質の一部または断片のみが、活性を提示するために要求される（例えば、必要及び十分である）ことが当業者により理解されるだろう；そのような環境では、その部分または断片は「生物学的に活性な」部分または断片であるとみなされる。

【0044】

50

併用療法：本明細書で用いるとき、「併用療法」という用語は、対象が、2つ以上の治療レジメン（例えば、2つ以上の治療剤）に同時に曝露される状況を指す。いくつかの実施形態では、2つ以上の薬剤は、同時に投与されてよい；いくつかの実施形態では、かかる薬剤は、順次投与されてよい；いくつかの実施形態では、かかる薬剤は、重複する投与レジメンにおいて投与される。

【0045】

同等：「同等」という用語は、本明細書で用いるとき、お互いに同一ではないがその間での比較を可能にし、結論を観察された差異または類似性に基づいて合理的に引き出し得るのに十分に類似する2つ以上の薬剤、実体、状況、条件のセット等を指す。いくつかの実施形態では、条件、環境、個体または集団の同等のセットは、複数の実質的に同一の特性及び1つまたは少數の異なる特性によって特徴づけられる。当業者は、2つ以上のかかる薬剤、実体、状況、条件のセット等が同等であるとみなされるには、任意の所与の環境においてどの程度の同一性が必要とされるかを、文脈において、理解するだろう。例えば、当業者は、異なる環境、個体、または集団のセットでまたはその下で、それらにより得られた結果または観察された現象における差異が、変動したそれらの特性における変動性により引き起こされるまたはそれを示すという、合理的な結論を保証するのに十分な数及びタイプの実質的に同一の特性により特徴づけられるとき、環境、個体、または集団のセットがお互いに同等であると理解するだろう。

【0046】

に対応する：本明細書で用いるとき、「に対応する」という用語は、しばしば、適切な基準薬において存在するものと（例えば、3次元空間でまたは別の要素または部分に対して）位置を共有する対象となる薬剤の構造要素または部分を示すのに使用される。例えば、いくつかの実施形態では、本用語は、ポリペプチド内のアミノ酸残基または核酸内のヌクレオチド残基などのポリマー内の残基の位置／同一性を指すために使用される。当業者は、簡潔さを目的として、そのようなポリマー内の残基が基準に関連するポリマーに基づく規範的な番号付けシステムを使用してしばしば示される、ゆえに、基準ポリマー内の190位の残基に「に対応する」第一のポリマー内の残基は、例えば、必ずしも実際に第一ポリマーの190番目の残基である必要はなく、基準ポリマーの190番目の位置で見いだされた残基に対応するということを理解するだろう；当業者は、ポリマー配列比較用に特異的に設計された1つまたは複数の市販のアルゴリズムの使用を通すことを含む、「対応する」アミノ酸を同定する方法を容易に理解する。

【0047】

誘導体：本明細書で用いるとき、「誘導体」という用語は、基準物質の構造類似体を指す。つまり、「誘導体」は、基準物質との著しい構造類似性を示す、例えばコアまたはコンセンサス構造を共有するが、同時にある特定の別々の方法で異なる物質である。いくつかの実施形態では、誘導体は、化学的の操作により基準物質から生成されることができる物質である。いくつかの実施形態では、誘導体は、基準物質を生成するものと実質的に類似する（例えば、複数のステップを共有する）合成プロセスの遂行を通して生成されることができる物質である。

【0048】

設計された：本明細書で用いるとき、「設計された」という用語は、（i）その構造が人の手により選択されるまたはされた；（ii）人の手を要するプロセスにより產生された；または（iii）自然物質または他の既知の薬剤と異なる薬剤を指す。

【0049】

決定する：本明細書に記載の多くの方法が「決定する」ステップを含む。当業者は、本明細書を読むと、そのような「決定すること」が、例えば、本明細書に明確に言及される特定の技術を含む、当業者に利用可能な任意の様々な技術を活用することができるまたはこれらの使用を通して達成されることを理解するだろう。いくつかの実施形態では、決定することは、身体的試料の操作を必然的に含む。いくつかの実施形態では、決定することは、データまたは情報の考慮または操作、例えば、関連分析を実施するのに

10

20

30

40

50

適合したコンピュータまたは他の処理装置を活用することを必然的に含む。いくつかの実施形態では、決定することは、供給源から関連情報や材料を受け取ることを必然的に含む。いくつかの実施形態では、決定することは、試料または実体の1つまたは複数の特性を同等の基準と比較することを必然的に含む。

【0050】

診断情報：本明細書で用いるとき、「診断情報」または「診断において使用するための情報」は、患者が疾患、障害もしくは病態を有するかどうかの決定、または表現型カテゴリー、もしくは疾患、障害もしくは病態の予後に関して有意性を有する、または疾患、障害もしくは病態の処置（一般的な処置または任意の特定の処置のいずれか）への可能性の高い応答、任意のカテゴリーへの疾患、障害もしくは病態の分類において有用である情報である。同様に、「診断」は、対象が疾患、障害もしくは病態（癌など）を有するまたは発症する可能性が高いかどうか、対象において顕在化した疾患、障害もしくは病態の状態、ステージ付けまたは特徴、腫瘍の特性または分類に関する情報、予後に関する情報または適切な処置を選択するのに有用である情報を含むが、これに限定されない、任意の種類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、または他の処置法、例えば、外科手術、放射線等の選択、治療を控えるか送達するかに関する選択、投与レジメン（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み合わせの頻度またはレベル）に関連する選択、等を含んでよい。

10

【0051】

分化：「分化」という用語は、特殊化されていない（「未拘束の（uncommitted）」）または比較的特殊化されていない細胞が、例えば、神経細胞または筋細胞などの特殊化された細胞の特性を獲得するプロセスである。分化細胞または分化を誘導された細胞は、細胞の系統内により特殊化された状況を呈している細胞である。分化のプロセスに適用した際の「拘束された（committed）」という用語は、通常の環境下で特定の細胞型または細胞型の小集合に分化し続けるだろう分化経路の点に進行しており、かつ、通常の環境下では、異なる細胞型に分化するまたはより分化されていない細胞型に戻ることができない細胞を指す。脱分化は、細胞が細胞の系統内で比較的特殊化されて（または拘束されて）いない位置に戻るプロセスを指す。本明細書で用いるとき、細胞の系統は、細胞の遺伝、つまりその細胞がどの細胞から由来したか、またどの細胞を生じさせることができるかを規定する。細胞の系統は、発生及び分化の遺伝スキーム内にその細胞を位置付けるものである。系統特異的マーカーとは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、対象とする系統への未拘束の細胞の分化を評価するために使用することができる。

20

【0052】

投与レジメン：（または「治療レジメン」）は、本明細書で用いるとき、典型的には期間を空けて、対象に個別に投与される単位用量（典型的には、1つより多い）のセットである。いくつかの実施形態では、所与の治療剤は、推奨される投与レジメンを有し、これには1つまたは複数の用量が必然的に含まれ得る。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、そのそれぞれがお互いに同じ長さの期間で離れている複数の用量を含む；いくつかの実施形態では、投与レジメンは、複数の用量及び個別の用量を離す少なくとも2つの異なる期間を含む。いくつかの実施形態では、治療剤は、所定の期間にわたって連続的に（例えば、注入により）投与される。いくつかの実施形態では、治療剤は1日1回（QD）または1日2回（BID）投与される。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、そのそれぞれがお互いに同じ長さの期間で離れている複数の用量を含む；いくつかの実施形態では、投与レジメンは、複数の用量及び個別の用量を離す少なくとも2つの異なる期間を含む。いくつかの実施形態では、投与レジメン内の全ての用量は、同じ単位用量の量のものである。いくつかの実施形態では、投与レジメン内の異なる用量は、異なる量のものである。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、第一用量の量の第一用量、その後第一用量の量とは異なる第二用量の量の1つまたは複数の追加の用量を含む。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、第一用量の量の第一用量、その後、第一用量の量と同じ第二

30

40

50

用量の量の1つまたは複数の追加の用量を含む。いくつかの実施形態では、投与レジメンは、適切な母集団全体に投与されたとき、所望のまたは有益な転帰と相關する（つまり、治療的投与レジメンである）。

【0053】

低酸素：「低酸素」または「低酸素病態」という用語は、本明細書で用いるとき、哺乳類の1つまたは複数の組織における酸素が生理学的なレベルを下回る、例えば、最適レベル未満である状態または病態を指す。いくつかの実施形態では、低酸素は、ストレス、例えば、有酸素運動、体重圧、麻酔、外科手術、貧血症、急性呼吸窮迫症候群、慢性疾病、慢性疲労症候群、外傷、火傷、皮膚潰瘍、癌に起因する悪液質及び他の異化状態等から生じ得る。いくつかの実施形態では、低酸素は、血管の狭窄または遮断に起因する血流の減少のためにその組織が酸素欠乏である「虚血」または「虚血性病態」であるかまたはこれを含む。虚血または虚血性病態は、冠動脈疾患、アルコール性心筋症を含む心筋症、血管形成術、ステント留置、バイパス手術または心臓修復手術（「開心術」）などの心臓手術、臓器移植、組織への長期重圧（褥瘡または床ずれ）、移植された臓器または組織に損傷を引き起こし得る虚血再灌流傷害、等により引き起こされるものを含む。本開示により提供される技術は、例えば、低酸素に起因する1つまたは複数の症状を、その根本的原因にかかわらず、診断する及び／または処置するのに有効であることができる。例えば、いくつかの実施形態では、本明細書に記載の処置は、たとえそれらが根本的病態（例えば、数例をあげると、ウイルス性または細菌性感染、細菌または他の毒素への暴露、低い赤血球数、加齢、癌、運動の継続）の1つまたは複数の態様を処置しないとしても、例えば、低酸素症に罹患している対象のエネルギーレベル、強さ及び／または健康状態を増加させ得る。いくつかの実施形態では、「低酸素」または「低酸素病態」という用語は、血液中の酸素含有率が低い病態を指す。特定の実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、およそ80mmHg未満の動脈PO2値及びおよそ30mmHg未満の静脈PO2値により定義されてよい。いくつかの実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、およそ60mmHg未満の動脈PO2値により定義されてよい。ある特定の実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、およそ50mmHg未満の動脈PO2値により定義されてよい。特定の実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、およそ50～20mmHg間の動脈PO2値により定義されてよい。あるいはまたは加えて、「低酸素」または「低酸素の」病態は、動脈血液または組織から酸素が存在しないまたはほとんど完全に存在しないとして定義される無酸素症と区別されてよい。いくつかの実施形態では、低酸素の型及び重症度は、2HGの絶対的または相対的定量化または定性化により定義されてよい。いくつかの実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、約10mmHg未満の組織内PO2レベルにより定義されてよい。いくつかの実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、約5mmHg未満の組織内PO2レベルにより定義されてよい。いくつかの実施形態では、「低酸素」または「低酸素の」病態は、約10mmHg未満の腫瘍内PO2レベルにより定義されてよい。「低酸素」または「低酸素の」病態は、慢性または急性であってよい。「慢性低酸素」は、本明細書で用いるとき、2HG産生において測定可能な増加をもたらす持続的低酸素病態を指してよい。つまり、慢性低酸素は、2HGがベースラインレベルを超えて蓄積することを可能にするのに十分な期間の低酸素病態として定義されてよい。いくつかの実施形態では、慢性低酸素は、30分を超える、1時間を超える、2時間を超える、3時間を超える、4時間を超える、5時間を超える、10時間を超える、12時間を超える、24時間を超える、1日を超える、または一週間またはそれ以上の期間の低酸素病態である。いくつかの実施形態では、慢性低酸素は、血液毛細血管と低酸素性領域との間の組織または腫瘍細胞による酸素の消費及び枯渇により引き起こされる。慢性低酸素の持続的病態とは対照的に、急性低酸素は一過的である。いくつかの実施形態では、急性低酸素は、組織または腫瘍において血管または微小血管の一時的な停止があるときに生じる。いくつかの実施形態では、急性低酸素は、赤血球細胞

10

20

30

40

50

レベルにおける増減の結果として生じる。

【0054】

低酸素に関連する疾患：「低酸素に関連する疾患、障害または病態」という用語は、低酸素を伴う（例えば、その発生率または重症度が、低酸素の1つまたは複数の態様と相関する及び／またはそれを特徴とする）疾患、障害または病態である。いくつかの特定の実施形態では、低酸素に関連する疾患、障害または病態は、例えば、敗血症性ショック、虚血性脳卒中、心筋梗塞、貧血症、肺疾患、気道閉塞、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、気胸症、肺気腫、先天性心臓欠陥、アテローム性動脈硬化症、血栓症、肺塞栓症、肺水腫、喘息、膿胞性線維症、癌、ある特定の外科的処置であってよいかまたはこれを含んでよい。いくつかの実施形態では、低酸素に関連する疾患、障害または病態は、ストレス、例えば、有酸素運動、体重圧、麻酔、外科手術、貧血症、急性呼吸窮迫症候群、慢性疾病、慢性疲労症候群、外傷、火傷、皮膚潰瘍、癌に起因する悪液質及び他の異化状態等と関連する。いくつかの実施形態では、低酸素に関連する疾患、障害または病態は、血管の狭窄または遮断に起因する血流の減少のためにその組織が酸素欠乏である「虚血」または「虚血性病態」であるかまたはこれを含む。虚血または虚血性病態は、冠動脈疾患、アルコール性心筋症を含む心筋症、血管形成術、ステント留置、バイパス手術または心臓修復手術（「開心術」）などの心臓手術、臓器移植、組織への長期重圧（褥瘡または床ずれ）、移植された臓器または組織に損傷を引き起こし得る虚血再灌流傷害、等により引き起こされるものを含む。

10

【0055】

マーカー：マーカーは、本明細書で用いるとき、その存在またはレベルが特定の状態または事象の特徴である実体または部分を指す。いくつかの実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、疾患、障害、または病態の存在またはステージの特徴であり得る。一例をあげると、いくつかの実施形態では、本用語は、代謝産物、例えば、特定の低酸素誘発性傷害等の特徴である、L-2HGを指す。別の例をあげると、いくつかの実施形態では、本用語は、遺伝子発現産物、例えば、特定の低酸素誘発性傷害の特徴である、LDHAを指す。いくつかの実施形態では、マーカーは、特定の腫瘍、腫瘍サブクラス、腫瘍のステージ、等と関連し得る。あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態では、特定のマーカーの存在またはレベルは、例えば、腫瘍の特定のクラス、例えば、膠芽腫の特徴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不在の統計学的有意性は、特定のマーカーに依存して変動し得る。いくつかの実施形態では、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高い可能性をそれが反映するという点で非常に特異的である。そのような特異性は、感受性と引き換えになり得る（つまり、腫瘍がマーカーを発現すると予期され得る腫瘍であったとしても陰性の結果が起こる可能性がある）。逆に、感受性の程度が高いマーカーは、感度が低いものよりもあまり特異的ではない可能性がある。本発明に従って、有用なマーカーは、100%の精度で特定のサブクラスの腫瘍を区別する必要はない。

20

【0056】

質量分析：質量分析は、気相イオンの質量対電荷比に変換することができるパラメータを測定する気相イオン分光計を用いた方法を指す。質量分析計は、一般に、イオン源及び質量分析器を含む。質量分析計の例は、飛行時間型、磁場型、四重極フィルター型、イオントラップ型、イオンサイクロトロン共鳴型、静電場分析器型及びこれらの複合型である。

30

【0057】

代謝産物：本明細書で用いるとき、「代謝産物」は、食事及び栄養素の消化、尿及び糞を通した老廃物の排出、呼吸、血液循環、及び体温調節などのエネルギーを生成するまたは使用する体内での物理的または化学的プロセス中に產生されるまたは使用される任意の物質を指す。「代謝前駆体」という用語は、それから代謝産物が作られる化合物を指す。「代謝産生物」という用語は、代謝経路の一部である任意の物質を指す（例えば、代謝物、代謝前駆体）。

40

50

【0058】

調節物質：「調節物質」という用語は、対象となる活性が観察される系内のその存在またはレベルが、調節物質が不在のときにそれ以外は同等の条件下で観察されるものと比較して、その活性のレベルまたは特性における変化と相關する実体を指すために使用される。いくつかの実施形態では、調節物質は、アクチベーターであり、調節物質が不在のときにそれ以外は同等の条件下で観察されるものと比較して、その活性がその存在において増加する。いくつかの実施形態では、調節物質は、アンタゴニストまたは阻害剤であり、調節物質が不在のときのそれ以外は同等の条件と比較して、その活性がその存在において低下する。いくつかの実施形態では、調節物質は、その活性が対象となるものである標的実体と直接相互作用する。いくつかの実施形態では、調節物質は、その活性が対象となるものである標的実体と間接的に（つまり、標的実体と相互作用する中間剤と直接的に）に相互作用する。いくつかの実施形態では、調節物質は、対象となる標的実体のレベルに影響を与える；あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態では、調節物質は、標的実体のレベルに影響を与えることなく対象となる標的実体の活性に影響を与える。いくつかの実施形態では、調節物質は、対象となる標的実体のレベル及び活性の両方に影響を与え、ゆえに活性において観察される差異は、レベルにおいて観察される差異により完全に説明されないかまたはそれに比例しない。

10

【0059】

正常酸素状態の：本明細書で用いるとき、「正常酸素状態の」という用語は、慢性的にまたは急性的に低酸素ではない血清または組織 $P O_2$ レベルを指す。本用語が「個体」または「対象」を修飾するように使用されるときは、本用語は、慢性または急性低酸素を有さない個体または個体の群を指す。例えば、特定の実施形態では、正常酸素状態の個体は、およそ $80 \sim 100 \text{ mm Hg}$ 間の動脈 $P O_2$ またはおよそ $30 \sim 50 \text{ mm Hg}$ 間の静脈 $P O_2$ を有する。「正常酸素状態」または「正常酸素状態の」は、インビボまたはインビトロでおおよそ 21% の大気酸素分圧により代替的にまたは追加的に定義されてよい。いくつかの実施形態では、正常酸素状態のレベルは、慢性または急性低酸素を有さない個体の集団全体にわたってまたはその中で提示されるレベルを考慮することで確立される。例えば、いくつかの実施形態では、正常酸素状態のレベルは、そのような集団全体にわたるまたはその中のレベルの平均、中央値、または平均値を表し、典型的に統計学的有意性を示す。いくつかの実施形態では、「正常酸素状態の」病態は、約 10 mm Hg を超える組織内 $P O_2$ レベルにより定義されてよい。いくつかの実施形態では、

20

【0060】

栄養素：本明細書で用いるとき、「栄養素」という用語は：細胞、組織または生体の健康に寄与するアミノ酸及びペプチド、ビタミン、ヌクレオチド、脂肪酸、炭水化物、ミネラル及び他の物質または材料を指す。

30

【0061】

医薬組成物：本明細書で用いるとき、「医薬組成物」という用語は、1つまたは複数の薬学的に許容され得る担体と一緒に製剤化された活性剤を指す。いくつかの実施形態では、活性剤は、適切な母集団に投与されたときに、所定の治療効果を達成する統計学的に有意な可能性を示す治療レジメンにおける投与に適切な単位用量の量で存在する。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、以下、すなわち経口投与、例えば、水薬（水系または非水系液剤または懸濁剤）、錠剤、例えば、口腔、舌下、及び全身吸収を標的とするもの、ボーラス、散剤、顆粒剤、舌に塗布するためのペースト；非経口投与、例えば、皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射によって、例えば、滅菌液剤または懸濁剤、または徐放性製剤として；局所適用、例えば、皮膚、肺、または口腔に適用するクリーム、軟膏、または制御放出性パッチまたは噴霧剤として；腔内にまたは直腸内に、例えば、ペッサリー、クリーム、または泡として；舌下；点眼；経皮；または経鼻、肺、及び他の粘膜表面に適するものを含む固体または液体形態での投与のために特別に製剤化され得る。

40

【0062】

薬学的に許容され得る：「薬学的に許容され得る」という用語は、本明細書で用いると

50

き、健全な医学的判断の範囲内で、過剰な毒性、刺激、アレルギー反応、または他の問題または合併症を伴わず、合理的なベネフィット／リスク比に見合う、ヒトまたは動物の組織との接触における使用に好適である薬剤を指す。

【0063】

薬学的に許容され得る担体：本明細書で用いるとき、「薬学的に許容され得る担体」という用語は、対象化合物のある臓器、または身体の部分から、別の臓器または身体の部分へと運ぶことまたは輸送することに関与する、薬学的に許容され得る材料、組成物またはビヒクル、例えば、材料を封入した液体または固体充填剤、希釈剤、賦形剤、または溶媒を指す。各担体は、製剤の他の成分と適合し、患者にとって有害でないという意味で「許容可能」でなくてはならない。薬学的に許容され得る担体として機能することができる材料のいくつかの例には、ラクトース、グルコース及びスクロースなどの糖類；トウモロコシデンプン及びジャガイモデンプンなどのデンプン；セルロース、及びカルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロース及び酢酸セルロースなどのその誘導体；粉末トラガカント；麦芽；ゼラチン；タルク；ココアバター及び坐剤ワックスなどの賦形剤；落花生油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、トウモロコシ油及びダイズ油などの油；プロピレングリコールなどのグリコール類；グリセリン、ソルビトール、マンニトール及びポリエチレングリコールなどのポリオール；オレイン酸エチル及びラウリン酸エチルなどのエステル；寒天；水酸化マグネシウム及び水酸化アルミニウムなどの緩衝剤；アルギン酸；発熱物質を含まない水；等張食塩水；リンゲル液；エチルアルコール；pH緩衝液；ポリエステル、ポリカーボネートまたはポリ無水物；及び医薬製剤に採用される他の非毒性適合物質が挙げられる。

10

【0064】

予防：「予防」という用語は、本明細書で用いるとき、発症の遅延、または特定の疾患、障害もしくは病態の1つまたは複数の症状の頻度もしくは重症度の低下を指す。いくつかの実施形態では、予防は、疾患、障害または病態の1つまたは複数の症状の発症、頻度、または強度において統計学的に有意な低減が、疾患、障害、または病態に感受性である集団において観察される場合に、薬剤が特定の疾患、障害または病態を「予防する」とみなされるように集団に基づいて評価される。

20

【0065】

前駆細胞：本明細書で用いるとき、「前駆細胞」という用語は、より大きな発生能を有する細胞、つまり、分化により生じることができる細胞と比較してより初期である（例えば、発生経路または進行に沿ってより初期段階である）細胞の表現型を指す。しばしば、前駆細胞は、有意または非常に高い増殖能を有する。前駆細胞は、細胞が発生し分化する発生経路及び環境に依存して、より低い発生能を有する、つまり、分化した細胞型の複数の別個の細胞、または単一の分化した細胞型を生じさせることができる。

30

【0066】

基準：「基準」という用語は、それに対して対象となる薬剤、個体、集団、試料、配列または値が比較される、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本明細書でしばしば使用される。いくつかの実施形態では、基準の薬剤、個体、集団、試料、配列または値は、対象となる薬剤、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または決定される。いくつかの実施形態では、基準の薬剤、個体、集団、試料、配列または値は、歴史的な基準であり、任意選択的に有形的表現媒体において具体化される。典型的には、当業者によって理解され得るように、基準の薬剤、個体、集団、試料、配列または値は、対象となる薬剤、個体、集団、試料、配列または値の決定または特徴づけに活用されるものと同等の条件下で決定されるまたは特徴づけられる。

40

【0067】

応答：本明細書で用いるとき、処置に対する応答は、処置の結果として起こるまたは処置に相關する対象の病態における任意の有益な変化を指してよい。そのような変化は、病態の安定化（例えば、処置がなければ起こるだろう悪化の予防）、病態の症状の寛解、ま

50

たは病態の治癒への見込みにおける改善等を含んでよい。それは、対象の応答または腫瘍の応答を指してよい。腫瘍または対象応答は、臨床的な判定基準及び客観的な判定基準を含む、広範な判定基準に従って測定されてよい。応答を評価するための技術には、臨床検査、ポジトロン放射断層法、胸部X線CTスキャン、MRI、超音波検査、内視鏡検査、腹腔鏡検査、対象から得られた試料における腫瘍マーカーの存在またはレベル、細胞学的検査、GC-MS、または組織学的検査が含まれるがこれらに限定されない。厳密な応答判定基準は、腫瘍または患者の群を比較するときは、比較される群は、応答率を決定するために同じまたは同等の判定基準に基づいて評価されるということを条件として、任意の適切な様式で選択されることがある。当業者は、適切な判定基準を選択することができるだろう。

10

【0068】

リスク：文脈から理解され得るように、疾患、障害または病態の「リスク」は、特定の個体が疾患、障害、または病態を発症し得る可能性の度合いである。いくつかの実施形態では、リスクは、割合（%）として表現される。いくつかの実施形態では、リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10から最大100%までである。いくつかの実施形態では、リスクは、基準試料または基準試料の群に関連するリスクに対するリスクとして表現される。いくつかの実施形態では、基準試料または基準試料の群は、疾患、障害、または病態の既知のリスクを有する。いくつかの実施形態では、基準試料または基準試料の群は、特定の個体と同等の個体からのものである。いくつかの実施形態では、相対的リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である。

20

【0069】

試料：本明細書で用いるとき、「試料」という用語は、典型的に、本明細書に記載のように、対象となる供給源から得られたまたはそれに由来する生体試料を指す。いくつかの実施形態では、対象となる供給源は、動物またはヒトなどの生体を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は、生物学的組織または液体であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、生物学的試料は、骨髄；血液；血液細胞；腹水；組織または細針生検試料；細胞を含有する体液；浮遊性（free floating）核酸；喀痰；唾液；尿；脳脊髄液、腹水；胸水；糞便；リンパ；婦人科学的流体；皮膚スワブ；腔スワブ；口腔スワブ；鼻スワブ；洗浄液または洗浄物、例えば腺管洗浄物または気管支肺胞（bronchial alveolar）洗浄物；吸引物；擦過物；骨髄検体；組織生検検体；外科的検体；糞便、他の体液、分泌物または排出物；またはそれに由来する細胞等であってよいかまたはこれを含んでよい。いくつかの実施形態では、生体試料は、個体から得られた細胞であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、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これを含む。いくつかの実施形態では、試料は、対象となる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、いくつかの実施形態では、一次生体試料は、生検（例えば、細針吸引または組織生検）、外科手術、体液（例えば、血液、リンパ、糞便等）の収集等からなる群から選択される方法によって得られる。いくつかの実施形態では、文脈から明らかであり得る通り、「試料」という用語は、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、または一次試料に1つまた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または精製などの技術に供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んでよい。

30

【0070】

小分子：本明細書で用いるとき、「小分子」という用語は、低分子量の有機化合物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。いくつかの実施形態では、小分子は、約4kD、3kD、約2kD、または約1kD未満である。いくつかの実施形態では、小分子は、約800ダルトン（D）、約600D、約500D、約400D、約300D、約200D、または約100D未

40

50

満である。いくつかの実施形態では、小分子は、約 2 0 0 0 g / mol 未満、約 1 5 0 0 g / mol 未満、約 1 0 0 0 g / mol 未満、約 8 0 0 g / mol 未満、または約 5 0 0 g / mol 未満である。いくつかの実施形態では、小分子は、ポリマーではない。いくつかの実施形態では、小分子は、ポリマー部分を含まない。いくつかの実施形態では、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）。いくつかの実施形態では、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）。いくつかの実施形態では、小分子は、多糖類ではない。いくつかの実施形態では、小分子は、多糖類を含まない（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）。いくつかの実施形態では、小分子は、脂質ではない。いくつかの実施形態では、小分子は、調節剤である。いくつかの実施形態では、小分子は、生物学的に活性である。いくつかの実施形態では、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）。いくつかの実施形態では、小分子は、治療的である。10

【 0 0 7 1 】

特異的：「特異的」という用語は、活性を有する薬剤または実体を参照して本明細書で用いるとき、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その標的に優先的に結合する場合、その標的に「特異的に」結合するとされる。いくつかの実施形態では、薬剤または実体は、その標的に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。いくつかの実施形態では、薬剤または実体は、競合する代替標的（複数可）と比較して、そ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）、増加した親和性、低減した解離性、または増加した安定性を伴って結合する。20

【 0 0 7 2 】

ストレス誘発性障害：「ストレス誘発性障害」という用語は、生体がその恒常性を乱す環境に置かれたときに生じるものを持む。疾病、疾患、生命を脅かす事象、飢餓、疲労、低酸素等の事象は、全て生体に対するストレス因子であると理解される。いくつかの実施形態では、ストレス誘発性障害は、低酸素により引き起こされる。

【 0 0 7 3 】

幹細胞：「幹細胞」という用語は、自己複製し、分化して後代細胞を産生するという両方の、単一細胞のレベルでのそれらの能力により定義される未分化細胞を含むがこれに限定されない。後代細胞には、自己複製前駆細胞、非再生前駆細胞、及び最終分化細胞が挙げられる。例えば、「幹細胞」は、（1）全能性幹細胞；（2）多能性幹細胞；（3）複能性幹細胞；（4）小能性幹細胞；及び（5）単能性幹細胞を含んでよい。30

【 0 0 7 4 】

対象：「対象」は、哺乳類（例えば、いくつかの実施形態では、出生前のヒト形態を含むヒト）を意味する。いくつかの実施形態では、対象は、関連性のある疾患、障害または病態に罹患している。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害または病態に感受性である。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害または病態の 1 つまたは複数の症状または特徴を呈している。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害または病態のいずれの症状または特徴も呈さない。いくつかの実施形態では、対象は、疾患、障害もしくは病態に対する感受性、または疾患、障害もしくは病態のリスクに特徴的な 1 つまたは複数の特徴を有するものである。対象は、患者であることができ、それは、疾患の診断または処置を提供する医師の診察を受けるヒトを指す。いくつかの実施形態では、対象は、治療を施される個体である。40

【 0 0 7 5 】

実質的に：本明細書で用いるとき、「実質的に」という用語は、対象となる特徴または特性の全てまたはほぼ全ての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、生物学的現象及び化学的現象が、完全であるかもしくは完全に至るまで進行する、または絶対的な結果を達成するまたは回避することは、仮にあるとしてもめったに50

ないことを理解するだろう。ゆえに、「実質的に」という用語は、本明細書では、多くの生物学的現象及び化学的現象に固有の、完全性の潜在的な欠如を捉るために使用される。

【 0 0 7 6 】

感受性である：疾患、障害または病態（例えば、インフルエンザ）に「感受性である」個体は、その疾患、障害または病態を発症するリスクがある。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態に感受性である個体は、その疾患、障害または病態のいずれの症状も呈さない。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態に感受性である個体は、その疾患、障害または病態を有していると診断されていない。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態に感受性である個体は、その疾患、障害または病態の発症に関連する条件に曝露されている個体である。いくつかの実施形態では、疾患、障害または病態を発症するリスクは、集団に基づくリスクである（例えば、疾患、障害または病態に罹患している個体の家族）。

【 0 0 7 7 】

症状が低下する：本発明に従い、特定の疾患、障害または病態の1つまたは複数の症状が大きさ（例えば強度、重症度等）または頻度において低下するとき、「症状が低下する」。明確にする目的で、特定の症状の発症の遅延は、その症状の頻度が低下する1つの形態とみなされる。比較的小さい腫瘍を有する多くの癌患者は、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ことを意図しない。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くても低下する（及び対象の病態が、それによって「改善される」）ように処置を企図する。

【 0 0 7 8 】

治療剤：本明細書で用いるとき、「治療剤」という表現は、一般に、生体に投与されると所望の薬理学的效果を引き出す任意の薬剤を指す。いくつかの実施形態では、薬剤は、適切な集団全体に統計学的に有意な効果があることを実証する場合に、治療剤であるとみなされる。いくつかの実施形態では、適切な集団は、モデル生体の集団であってよい。いくつかの実施形態では、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判定基準によって定義され得る。いくつかの実施形態では、治療剤は、疾患、障害または病態の1つまたは複数の症状または特徴を、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、その重症度を低下させる、またはその発生率を低下させるために使用できる物質である。いくつかの実施形態では、「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いるかまたは承認される必要がある薬剤である。いくつかの実施形態では、「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。

【 0 0 7 9 】

治療有効量：本明細書で用いるとき、それが投与されるものにとって所望の効果を産生する量を意味する。いくつかの実施形態では、本用語は、治療投与レジメンに従って、疾患、障害、または病態に罹患しているまたは感受性である集団に投与されたときに、該疾患、障害、または病態を処置するのに十分な量を指す。いくつかの実施形態では、治療有効量は、疾患、障害、または病態の1つまたは複数の症状の、発生率または重症度を低下させる、またはその発症を遅らせるものである。当業者は、「治療有効量」という用語が、特定の個体において処置の成功が実際に達成されることを要しないことを理解するだろう。むしろ、治療有効量は、そのような処置を必要とする患者に投与されたとき、有意な数の対象において特定の所望の薬理学的な応答を提供する量であってよい。いくつかの実施形態では、治療有効量への言及は、1つまたは複数の特定の組織（例えば、疾患、障害または病態に冒された組織）または液体（例えば、血液、唾液、血清、汗、涙、尿、等）において測定される量への言及であってよい。当業者は、いくつかの実施形態では、治療有効量の特定の薬剤または治療が、製剤化されてよいかまたは単回用量で投与されてよいことを理解するだろう。いくつかの実施形態では、治療的に有効な薬剤は、例えば、投与レジメンの一部として、製剤化されてよいかまたは複数の用量で投与されてよい。

10

20

30

40

50

【0080】

処置：本明細書で用いるとき、「処置」（「処置する」または「処置すること」）という用語は、特定の疾患、障害または病態（例えば、癌）の1つまたは複数の症状、特性または原因を、部分的または完全に軽減する、寛解させる、和らげる、阻害する、その発症を遅延させる、その重症度を低下させる、またはその発生率を低下させる物質（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、障害もしくは病態の徴候を呈さない対象、または疾患、障害もしくは病態の初期徴候だけを呈する対象のものであってよい。あるいはまたは加えて、このような処置は、関連性のある疾患、障害または病態の、1つまたは複数の確立された徴候を呈する対象のものであってよい。いくつかの実施形態では、処置は、関連性のある疾患、障害または病態に罹患していると診断された対象のものであってよい。いくつかの実施形態では、処置は、関連性のある疾患、障害または病態が発症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対象のものであってよい。10

【0081】

単位用量：「単位用量」という表現は、本明細書で用いるとき、医薬組成物の単回用量として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。いくつかの実施形態では、単位用量は、薬剤の単回用量全体を含有する。いくつかの実施形態では、1つより多い単位用量が、全ての単回用量を達成するために投与される。いくつかの実施形態では、意図した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るか、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、許容され得る担体）の体積、固体形態の所定量の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ってよい。単位用量は、治療剤（複数可）の代わりにまたはそれに加えて、様々な構成成分のいずれかを含む製剤内に存在してよいことが理解されるだろう。例えば、許容され得る担体（例えば、薬学的に許容され得る担体）、希釈剤、安定剤、緩衝液、保存剤等が、下記のように、含まれてよい。多くの実施形態では、特定の治療剤の適切な1日の総投与量は、一部または複数の単位用量を含んでよく、例えば担当医によって健全な医学的判断の範囲内で決定されてよいことを、当業者は理解するだろう。いくつかの実施形態では、任意の特定の対象または生体のための特定の有効用量レベルは、処置される障害及び障害の重症度；採用される特定の活性化合物の活性；採用される特定の組成物；対象の年齢、体重、全身健康状態、性別及び食事；採用される特定の活性化合物の投与時間及び排出速度；処置期間；採用される特定の化合物（複数可）と組み合わせてまたは同時に使用される薬物または追加の治療、及び医療分野で周知の類似の因子を含む、様々な因子に依存してよい。20

30

【0082】

ある特定の実施形態の詳細説明

本発明は、なかでも、低酸素と関連する病態を診断または処置するための組成物またはシステムを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞多能性または分化を調節するための組成物またはシステムも記載する。40

【0083】

本発明の様々な態様は、以下の項において詳細に記載される。項の使用は、本発明の限定を意図しない。各項は、本発明の任意の態様に適用されることができる。この出願では、「または」の使用は、別段の指定がない限り、「または」を意味する。

【0084】

低酸素及びストレス誘発性代謝

ストレス、例えば、低酸素、感染、飢餓、温度、毒性等は、細胞の代謝に著しく影響を与え、主要な疾患に寄与する。下記の実施例に示すように、本発明の実施形態は、ストレス誘発性代謝の試験を包含する。いくつかの実施形態では、ストレスは、低酸素により引き起こされる。50

【0085】

低酸素は、様々な疾患プロセスに関与し、未処置のままにされた場合、著しい組織損傷の原因となる。酸素の、定的な不斷の供給が生命を維持させるために不可欠である。低酸素は、血液または組織中の酸素含有率が低い状態であり、酸素供給と需要の不均衡から生じる。低酸素のいくつかの異なるサブタイプが知られている。例えば、貧血性低酸素は、機能的ヘモグロビンの濃度の低減または赤血球細胞の数の減少による。低酸素性低酸素は、肺内での酸素化の欠損メカニズムから生じ、これは低圧の酸素、肺機能の異常、気道閉塞、または心臓における右から左短絡により引き起こされ得る。酸素親和性低酸素は、酸素を還元するヘモグロビンの能力の低下による。組織または細胞の低酸素は、冠動脈血流の中止または動脈血酸素分圧 (PO2) における低下により引き起こされる。

10

【0086】

生命を維持するための酸素の必要性を考慮すると、生体は、多様なメカニズムを進化させて、酸素利用可能度の急性及び慢性の両方の低減；つまり、急性及び慢性低酸素に対応してきた。多細胞生体、特に哺乳類にとって、これらのメカニズムは、赤血球生成、血管新生及び細胞の活性を最小許容可能レベルで維持するように設計された適応性の代謝変化を含む。急性低酸素は、脳卒中、敗血症性ショック、心筋梗塞、及び外科的処置中などの状況において生じる。一方で、慢性低酸素は、貧血症、うっ血性心不全、肺疾患、先天性心疾患、ならびに癌と関連する。

【0087】

しかしながら、低酸素に関連する疾患の上記リストが低酸素に関与するすべての病態の完全なリストではないことが理解されたい。当業者は、本開示の組成物またはシステムが、上記リストにないものを含む任意の低酸素に関連する疾患、障害または病態に適用されることを知っている。

20

【0088】

低酸素条件下でのL-2HG代謝

栄養素及び代謝中間体が、細胞の成長及び増殖を促進することに加えて生理学的攪乱 (physiologic perturbations) に対する細胞の応答に影響を与えることができる事が知られている (Vander Heidenら、2009; Ward及びThompson, 2012)。本開示は、なかでも、L-2HG誘発を、低酸素により強いられたストレスに対する新規の細胞の代謝的応答として同定する。

30

【0089】

本開示は、2HGの以前の知識を大幅に拡張し、L-2HGを細胞の代謝のある特定の機能を制御する新規代謝産物として実証する。栄養素及び代謝産物は、基礎的な細胞のプロセスに影響を与える (Kaelin及びMcKnight, 2013; Vander Heidenら、2009)。-KG及び2HG間の関係は、一つのそのような例として提案されている。例えば、-KGは、ヒストン及びDNAのジメチル化、HIF1安定性の制御、及びコラーゲンの成熟化などの多様な機能に関与するおよそ70種の異なる酵素に対する必須基質として機能する (Loosman及びKaelin, 2013)。これらの酵素的プロセスを -KG利用能につなげることにより、細胞の代謝的適応は、系統分化及び環境的ストレス要因への適応などの重要な細胞の「決断」に密接につながることができる。「癌代謝物」D-2HGによる -KGに依存する酵素活性の阻害は、それによりIDH1/2における発癌性変異が正常な細胞の生理機能を崩壊させる主なメカニズムを表すと思われる (Kaelin及びMcKnight, 2013; Loosman及びKaelin, 2013; Ward及びThompson, 2012)。

40

【0090】

2-ヒドロキシグルタル酸 (2HG) は、D-またはL-立体異性体のいずれでも存在することができるキラル分子である。L-2HGと比べて、D-2HGは、集中的な研究の対象となっている。イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1または2 (IDH1/2) における変異は、「癌代謝物」D-2-ヒドロキシグルタル酸 (D-2HG、(R)-2-ヒドロキシグルタル酸としても知られる) の産生をもたらす。D-2HGは、Jumonji

50

ファミリーヒストンリジン脱メチル化酵素を含む、 α -ケトグルタル酸(α -KG)に依存する酵素の競合阻害剤として機能することにより悪性細胞の分化を妨害する。

【0091】

IDH1/2変異による悪性病変の分子病態におけるD-2HGの役割の解明に焦点をあてた集中的な研究努力とは対照的に、正常な細胞生理学におけるD-2HG及びL-2HGの制御された産生及び排除の潜在的な役割は、あまり注目されていない(Krane andijkら、2012)。癌関連IDH1/2変異は、D-2HGを排他的に産生するが、生化学研究は、L-2-ヒドロキシグルタル酸(L-2HG、(R)-2-ヒドロキシグルタル酸)が、 α -KGに依存する酵素のより強力な阻害剤として機能することを実証している。しかしながら、L-2HGの生物学的源または活性は未知のままである。両方の2-ヒドロキシグルタル酸エナンチオマーの潜在的な生理学的役割は、D2HGDH(D-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ)及びL2HGDH(L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ)として知られる進化的に保存されている「老廃物処理」酵素の存在により示され、それらの唯一の機能は、それぞれD-2HGまたはL-2HGを α -ケトグルタル酸に変換することである。

【0092】

本開示は、なかでも、L-2HG誘発を、低酸素により強いられた環境的ストレスに対する新規の細胞の代謝応答として同定する。例えば、本発明者らは、低酸素におけるL-2HGの産生は、IDH1/2とは独立して起こり、代わりに主にLDHAによる α -KGの無差別酵素的還元を介して生じることを発見した。

【0093】

本開示は、IDH1またはIDH2の機能喪失は、複数のタイプの細胞において低酸素条件ではL-2HGの産生を損なわないことを実証する。ゆえに、IDH1/2酵素は、基質結合の際の立体的拘束のために、 α -KGをL-2-ヒドロキシグルタル酸に還元させることができない可能性が高い。本発明者らは、その主な触媒活性が、 α -KG及びL-2HGに対する構造的類似性を伴った α -ケト酸基質のL-ヒドロキシル酸への還元を必然的に含む代謝酵素の要件を試験した。

【0094】

しかしながら、本開示は、際立って、乳酸脱水素酵素A(LDHA)が、低酸素誘発性L-2HGの産生に必要とされる主要な酵素であることを実証する。本開示は、低酸素誘発性L-2HGへのMDH1及びMDH2からの部分的な寄与を同定する。これらの所見は、LDHA及びMDH2の組み合わせ除去が、低酸素誘発性L-2HGのほぼ全ての抑制も結果もたらしたときに確認された。本開示は、例えば、遺伝子操作(例えば、機能喪失)及び構造生物学を含む、複数連の証拠からL-2HG代謝におけるLDHAの役割を実証する。例えば、本発明者らは、LDHAの活性部位が、L-2HGへの α -KGの還元に対応することができることを発見した。まとめると、本開示からのこれらの知見は、低酸素性細胞が、細胞基質のMDH1及びミトコンドリアのMDH2からの少しの寄与を伴って、LDHAによる乱雑な基質使用を介して細胞質でグルタミン由来の α -KGの還元からL-2HGを産生することができることを示唆する。

【0095】

低酸素誘発性L-2HGは、利用できる酸素が制限されたときに、それにより細胞が α -KGに依存するプロセス(例えば、H3K9me3の脱メチル化)を抑圧し得る分子メカニズムを表す。本発明者らは、L-2HGが、低酸素適応の α -KG依存性逆転を抑制できることを発見した。ゆえに、本開示は、なかでも、低酸素誘発性L-2HGが、それを通して細胞が低酸素適応に反作用し得る α -KGに依存するプロセスの抑圧を維持することができる手段を表すことを実証する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGの低酸素誘発性蓄積がグルタミン依存性であることを実証し、これは、低酸素におけるグルタミン依存性L-2HG産生と持続的なHIF1誘発との間の連結を示す。

【0096】

いくつかの実施形態では、本開示は、環境的ストレス、具体的には低酸素が、L-2H

10

20

30

40

50

Gを制御する細胞のメカニズムを引き起こすことを記載する。それゆえ、本開示は、それにより低酸素がL-2HG代謝に影響を与える分子メカニズムを解明した。

【0097】

低酸素及び低酸素誘発性傷害の診断

本発明は、なかでも、低酸素または低酸素誘発性傷害について診断する新規システムを提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素に関連する疾患、障害または病態を診断するためのシステムを記載する。通常条件下の哺乳類細胞及び体液中でめったに痕跡量で見いだされない代謝産物である、L-2HGが、不十分な酸素供給の条件下で再現性よく有意に上昇し、低酸素または低酸素誘発性傷害のバイオマーカーとして十分に機能することが、本発明に従って決定されている。

10

【0098】

L-2HGが、LDHAの作用を通してクエン酸回路中間体 - -ケトグルタル酸の非カルボキシル化還元から生じることが、本発明に従って決定された。本開示は、MDH1またはMDH2もこのプロセスに寄与することを実証する。通常条件下では、L-2HGを产生するこの反応の程度は最小であり、產生されるL-2HGは、L-2HGを酸化させて - -ケトグルタル酸へと戻すように機能する、L-2HGデヒドロゲナーゼの酵素活性のために実質的に蓄積しない。しかしながら、本明細書に開示するように、低酸素条件後は、 - -ケトグルタル酸の正常な酸化的代謝がヒト細胞中で抑制され、 - -ケトグルタル酸は、L-2HGの蓄積をもたらす還元的代謝を優先的に受ける。

20

【0099】

L-2HG上昇は、低酸素と共に生じ、細胞レベルでの代謝における変化を反映する。血清総2HG(両L-及びD-2HG)が上昇する低酸素とは独立した既知の状況は、生殖細胞系列遺伝子変異を必然的に含む稀な代謝の先天異常、またはIDH1/2遺伝子内の特定の体細胞変異を伴う骨髄性血液悪性腫瘍に限られる。これらの患者は、心肺疾患または組織低酸素を呈する数に対して稀であり、それらの症状は特有であり重複しない。それゆえ、慢性低酸素のL-2HGを試験することに伴う偽陽性のリスクは低い傾向にある。

20

【0100】

実施例の項において論ずるように、L-2HGは、低酸素のバイオマーカーであり、低酸素の診断に使用することができると発見されている。L-2HGレベルは、当業者に公知の任意の方法で検出されてよい。様々な検出方法の非限定的な例を下記に論ずる。本発明は、ガスクロマトグラフィー質量分析(「GC-MS」)、液体クロマトグラフィー質量分析(「LC-MS」)、酵素アッセイ及び免疫系の方法などの方法が、L-2HGレベルの測定に使用されてよいという具体的な見識を提供する。本発明は、キラル誘導体化が、D-2HGとL-2HGを区別するために使用されることがあるということを提供する。

30

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素及び低酸素誘発性傷害を診断するための方法を記載する。ある特定の実施形態では、血液または組織中のL-2HGのレベルを測定することは、組織低酸素に感受性の及び特異的なバイオマーカーとして機能し得、低酸素に関連する疾患、障害または病態の診断またはモニタリングについて潜在的な臨床的な関連を伴う。

40

【0102】

本発明は、なかでも、低酸素が、LDHA、MDH1、MDH2、またはL-2HGデヒドロゲナーゼを含むがこれに限定されない、ある特定のL-2HG関連酵素の発現または活性により診断できることを提供する。これらの酵素が測定される実施形態では、追加のマーカーが当業者に公知の任意の方法によって測定されてよい; 例えば、イムノアッセイ(例えば、ウェスタンプロット法)、ハイブリダイゼーション(例えば、ノーザンプロット法)、RT-PCR、及び質量分析)。例えば、特定の実施形態では、L-2HGレベルは、GC-MSによりアッセイされ、LDHA、MDH1、MDH2、

50

またはL-2HGデヒドロゲナーゼの、核酸またはイムノアッセイをベースとする測定と組み合わせて評価または相関されてよい。

【0103】

いくつかの実施形態では、本開示は、対象からのL-2HGのレベルは、正常酸素状態対照対象からのものと比較することができることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象からのL-2HGのレベルは、急性低酸素または慢性低酸素と診断された患者からのものと比較することができることを記載する。

【0104】

本開示は、患者における低酸素誘発性傷害を診断するためのシステムを代替的にまたは追加的に記載する。症候性または亞症候性でない低酸素誘発性傷害は、臨床的に診断することができるしばしば難しい。しかしながら、試料からL-2HGレベルを測定することは、対象における低酸素誘発性傷害についての指標を与える。

10

【0105】

本開示は、低酸素または低酸素誘発性傷害を診断することまたは処置することを伴う、それに対してL-2HGレベルを比較することができるパラメータを記載する。一例をあげると、いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGレベルが正常酸素状態の基準対象のものと比較して上昇している対象への低酸素治療を施すことによる低酸素の処置を記載する。いくつかの実施形態では、L-2HGのレベルの上昇は、正常酸素状態の対象について観察されるものと比較して、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍であるか、またはさらに高い

20

【0106】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGが、低酸素または低酸素誘発性傷害を診断するために単独で使用され得ることを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、診断においてバイオマーカーセットの一部としてL-2HGを使用する方法を記載する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示は、対象からの試料中の少なくとも2つのバイオマーカーを測定する方法を記載し、ここで少なくとも2つのバイオマーカーのうちの1つはL-2HGである。

【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載するような低酸素マーカーは、患者試料中で測定される。いくつかの実施形態では、試料は、例えば、心臓、動脈、脳、腫瘍、またはそれらの組み合わせからの組織試料であってよいかまたはこれを含んでよい。いくつかの実施形態では、試料は、血液、尿、血清、リンパまたは脳脊髄液であってよいかまたはこれを含んでよい。いくつかの実施形態では、試料は、静脈血試料であってよいかまたはこれを含んでよい。

30

【0108】

当業者は、低酸素性状態が、低酸素性傷害を有する組織、例えば、腫瘍、及び隣接するまたは近接する組織の両方において見出され得ることを理解するだろう。例えば、慢性低酸素は、血液毛細血管及び低酸素性領域間の腫瘍細胞による酸素の消費及び枯渇により引き起こされ得る。ゆえに、組織または対象が低酸素であるかどうかを決定するためのL-2HGレベルの測定のための試料は、腫瘍そのものかまたは近接する組織から得てよい。

40

【0109】

いくつかの実施形態では、本開示は、患者集団を（例えば、低酸素治療での処置に対するそれらの候補性に関して）層別化するため、または1つまたは複数の対象に施したときの特定の治療の有効性をモニターするまたは調節するための技術を提供する

【0110】

いくつかの実施形態では、本開示は、治療的介入の臨床的評価のためのバイオマーカーとしてのL-2HGの使用を記載する。例えば、血液からのL-2HGのクリアランスは、低酸素に関連する疾患、障害または病態に対する治療的介入の妥当性を評価するためのバイオマーカーとして使用することができる。適切な処置の特定もしくは選択、患者が処

50

置に陽性反応を有するかどうかの決定、または処置の最適化は、これらの方法で得られた情報を使用して導くことができる。

【0111】

いくつかの実施形態では、本発明は、対照において、治療の有効性を評価する、治療に対する応答性をモニタリングする、疾患経過の予後、疾患進行の測定のための方法を提供する。例えば、1つまたは複数の時点の対象から得た生体試料について決定された好適なバイオマーカー（例えば、L-2HG、またはLDHAの発現／活性）のレベルは、1つまたは複数の他の時点の対象からのレベルと比較される。

【0112】

L-2HGの調節

10

本明細書で提供する方法及び組成物が、様々な低酸素に関連する疾患、障害または病態のいずれかを処置するために使用されてよいことが企図される。L-2HGが、コラーゲン成熟化に関する酵素の強力な阻害剤であると示されている（Koivunenら、Nature 2012）ため、L-2HGの低酸素性誘発は、虚血性組織傷害後の組織修復及び新血管形成に関与し得る。例えば、本開示は、L-2HG産生の治療的操作、例えば、LDHA活性（低酸素性L-2HGの主な源）の調節、L-2HGの外因性補充等が、心筋梗塞または虚血性脳卒中などの病態において利益となり得ることを記載する。

【0113】

治療的使用は、単独で、またはかかる低酸素に関連する疾患、障害もしくは病態の処置に使用されると知られている他の処置と組み合わせて、L-2HG代謝を調節する薬剤の投与を含む。例えば、いくつかの実施形態では、癌を有する患者については、治療的使用は、単独で、または化学療法等の癌療法と組み合わせて、L-2HG代謝を調節する薬剤の投与を含む。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素または低酸素誘発性傷害を処置するための新規組成物またはシステムを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、低酸素に関連する疾患、障害または病態を処置するための組成物またはシステムを記載する。当業者は、本開示により記載される組成物またはシステムが、任意の低酸素に関連する疾患、障害または病態を処置するために使用されることを知るであろう。

【0115】

30

いくつかの実施形態では、本開示は、組織中のまたは系統的にL-2HGレベルを調節する治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象においてL-2HGのレベルを増加させる治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、対象においてL-2HGのレベルを低減させる治療を記載する。

【0116】

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HG代謝を調節する薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、組織への送達を達成する経路を介した対象への組成物の投与を含む治療を記載する。

【0117】

40

いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGであるかまたはそれを含む薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L-2HGのアンタゴニストであるかまたはそれを含む薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。

【0118】

いくつかの実施形態では、本開示は、限定されないが、-ケトグルタル酸、-ケトグルタル酸の細胞透過性変異体（例えば、-ケトグルタル酸ジメチル）、グルタミン、またはグルタミン酸塩を含む組成物を投与することを含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、-ケトグルタル酸のアンタゴニストであるかまたはそれを含む薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。

【0119】

50

いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG 代謝を調節するための標的剤を記載する。原則として、そのレベル、形態、または活性がL - 2 HG 代謝の特性と相關するまたはそれを調節する（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については、L - 2 HG 標的剤であることができる。いくつかの実施形態では、本開示は、LDHA、MDH1、MDH2、及びL - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼからなる群より選択される1つまたは複数の分子の発現または活性に影響を与える薬剤を含む組成物の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、それへのLDHAの阻害剤の投与を含む治療を記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターの投与を含む治療を記載する。

10

【0120】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、小分子であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、ポリペプチドであるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、核酸であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、グリカンであるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、脂質であるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、（例えば、L - 2 HG 代謝機構の構成成分に結合する）抗体薬であるかまたはこれを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のようにL - 2 HG 代謝を標的とする薬剤は、（例えば、L - 2 HG 代謝機構の構成成分、またはそれをコードするまたは補助する遺伝子または遺伝子産物に結合する）核酸剤（例えば、アンチセンス、s h R N A またはs i R N A 剤）であるかまたはそれを含む。いくつかの実施形態では、標的剤は、検出可能部分であるか、それと関連する。いくつかの実施形態では、標的剤は、治療部分と結合している。

20

【0121】

一般に、本開示は、L - 2 HG 代謝を標的とすることによりある特定の低酸素誘発性傷害を処置することの望ましさ及び有効性を実証する。当業者は、そのような標的を実現するため任意の様々なアプローチが活用されてよいことを理解するだろう。

30

【0122】

本発明のシステムの様々な実施形態に従って、L - 2 HG またはL - 2 HG 代謝を調節する酵素を標的とする薬剤は、単独で、または組成物もしくは医薬品の構成成分として、本明細書に記載のように対象に投与されることができる。

【0123】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する薬剤は、生理学的に許容され得る担体または賦形剤と製剤化されて医薬組成物を調製することができる。いくつかの実施形態では、そのような医薬組成物中で活用される担体、または組成物そのものは、無菌であることができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、投与の特定の様式用に製剤化される。組成物を製剤化するためのシステムは、当該分野で公知である（例えば、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l s S c i e n c e s , 第17版、M a c k P u b l i s h i n g C o . , (A l f o n s o R . G e n n a r o , 編集) (1989) を参照されたい）。

40

【0124】

組成物または医薬品は、必要に応じて、タンパク質（特に、アルブミン）、ナノ粒子、微小粒子、リポソーム、及びミセルのうちの1つまたは複数を、例えば担体として、特に脂肪酸または脂質の送達用に、含有することができる。

【0125】

本明細書に記載の組成物は、任意の適切な経路で投与されてよい。いくつかの実施形態では、組成物は皮下投与される。本明細書で用いるとき、「皮下組織」という用語は、皮

50

膚の直下にある疎性、不規則性結合組織の層として定義される。例えば、皮下投与は、大腿部、腹部、臀部、肩甲部を含むがこれらに限定されない、領域内に組成物を注射することにより実施されてよい。いくつかの実施形態では、組成物は、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、組成物は経口投与される。いくつかの実施形態では、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り投与される。あるいはまたは加えて、組成物は、吸入、非経口、皮内、経皮、または経粘膜（例えば、経口または経鼻）により投与されることができる。必要に応じて、1つより多い経路を同時に使用することができる。

【0126】

10

いくつかの実施形態では、組成物は、治療有効量または特定の所望の転帰と相關する投与レジメンに従って投与される。

【0127】

本開示に従って投与される特定の用量または量は、例えば、所望の転帰の特性もしくは程度、投与の特定の経路もしくは時期、または1つまたは複数の特徴（例えば、体重、年齢、病歴、遺伝的特徴、ライフスタイルパラメータ、またはそれらの組み合わせ）に依存して変動してよい。そのような用量または量は、当業者により決定することができる。いくつかの実施形態では、適切な用量または量は、標準的な臨床技術に従って決定される。あるいはまたは加えて、いくつかの実施形態では、適切な用量または量は、望ましいまたは最適な投与量範囲または投与するべき量の特定を助けるために、1つまたは複数のインピトロまたはインビオアッセイの使用を通して決定される。

20

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する組成物は、医薬製剤として提供される。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、発生率または特定の終末点、例えば、腫瘍、心筋梗塞等の発生率またはリスクの低下の達成と相關する投与レジメンに従って投与するための単位用量の量であるかまたはこれを含む。

【0129】

30

いくつかの実施形態では、L-2HG代謝機構のある特定の構成成分は、例えば、そのような構成成分と直接相互作用する薬剤、またはそうでなければそのレベルまたは活性を調節する、薬剤の使用を通して、標的とされる（例えば、LDHA）。様々な実施形態では、本明細書に記載のようにL-2HG代謝を標的とする治療法は、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、または治療的エンドポイントが観察されるまで、例えば、腫瘍縮小が観察されるで、または心機能が改善するまで、施される。

【0130】

L-2HG調節剤の同定及び／または特徴づけ

いくつかの実施形態では、本発明は、L-2HG薬剤またはプロトコルを同定するまたは特徴づけるための方法及びシステムを提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供する方法及びシステムは、1つまたは複数の候補L-2HG調節剤またはプロトコルを、細胞、組織または生体に投与すること、及びL-2HG応答についてアッセイすることを含む。いくつかの実施形態では、細胞または組織は、インピトロである。いくつかの実施形態では、細胞または組織は、インビオである。いくつかの実施形態では、候補L-2HG調節剤またはプロトコルは、細胞を含まない系に適用される。いくつかの実施形態では、候補L-2HG調節剤またはプロトコルは、プロトコルは、ハイスループットスクリーニング系の成分として適用される。

40

【0131】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する方法及びシステムは、L-2HG増強剤を選択する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供する方法及びシステムは、L-2

50

H G 阻害剤を選択する。

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供する方法及びシステムは、1つまたは複数の候補 L - 2 H G 調節剤またはプロトコルを、細胞、組織または生体に投与すること、及び L - 2 H G 代謝の下流効果についてアッセイすることを含む。いくつかの実施形態では、L - 2 H G 代謝の下流効果は、ヒストン 3 リジン 9 のトリメチル化である。いくつかの実施形態では、L - 2 H G 代謝の下流効果は、ヒストン 3 リジン 2 7 のトリメチル化である。

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、候補 L - 2 H G を増強する薬剤またはプロトコルは、細胞、組織または生体への投与が、測定されたパラメータ、例えば、L - 2 H G において、薬剤（複数可）またはプロトコル（複数可）に曝露されなかった同様の細胞、組織または生体と比較して、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上の増加をもたらす場合に、L - 2 H G を増強する薬剤またはプロトコルであるとみなされる。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、候補 L - 2 H G を阻害する薬剤またはプロトコルは、細胞、組織または生体への投与が、測定されたパラメータ、例えば、L - 2 H G において、薬剤（複数可）またはプロトコル（複数可）に曝露されなかった同様の細胞、組織または生体と比較して、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上の低下をもたらす場合に、L - 2 H G を阻害する薬剤またはプロトコルであるとみなされる。

【 0 1 3 5 】

L - 2 H G 代謝に従って癌表現型を診断する

本明細書で提供する方法及び組成物が、組織における低酸素を検出またはイメージングするために使用されてよいことが企図される。いくつかの実施形態では、組織は、腫瘍である。いくつかの実施形態では、低酸素は、L - 2 H G、L - 2 H G 代謝を制御するある特定の酵素、またはL - 2 H G により影響されたある特定の下流のエピジェネティックな変化、またはそれらの組み合わせにより検出またはイメージングされる。いくつかの実施形態では、低酸素は、L - 2 H G により検出またはイメージングされる。いくつかの実施形態では、低酸素は、L D H A により検出またはイメージングされる。いくつかの実施形態では、低酸素は、H 3 K 9 m e 3 により検出またはイメージングされる。いくつかの実施形態では、低酸素は、少なくとも1つの追加の方法により検出またはイメージングされる。いくつかの実施形態では、この追加の方法は、遺伝子の変異である。

【 0 1 3 6 】

本開示は、L - 2 H G が、癌の細胞生物学において重要な役割を担うエピジェネティックなシグナル伝達を直接調節することを実証する。生化学的に、D - 2 H G 及び L - 2 H G の双方は、J u m o n j i ファミリーヒストンリジン脱メチル化酵素 K D M 4 C を阻害し、それは、トリメチル化ヒストン 3 リジン 9 (H 3 K 9 m e 3) の異常蓄積及び正常な細胞の分化の機能障害をもたらすと報告されている (C h e n ら、2 0 1 3 ; C h o w d h u r y ら、2 0 1 1 ; K a t s ら、2 0 1 4 ; L u ら、2 0 1 2 ; R o h l e ら、2 0 1 3 ; S a s a k i ら、2 0 1 2)。例えば、膠芽腫では、I D H 1 / 2 変異は、腫瘍全体にわたる H 3 K 9 m e 3 の拡散的増加を伴うが、一方で H 3 K 9 m e 3 は、I D H 1 / 2 変異を伴わない腫瘍において領域による変動を示す (V e n n e t i ら、2 0 1 3 a)。これらのデータは、I D H 1 / 2 野生型膠芽腫における H 3 K 9 m e 3 染色の変動性は、低酸素の領域と相關する可能性があることを示す。

【 0 1 3 7 】

本開示では、本発明者らは、H I F 1 発現と H 3 K 9 m e 3 との間の相関関係を、I D H 1 / 2 について野生型であるヒト膠芽腫試料を用いた免疫組織化学により試験し、H I F 1 発現及び H 3 K 9 m e 3 が、高く統計学的に相關することを見出した。これらの

10

20

30

40

50

観察結果は、低酸素誘発性 L - 2 H G が、ヒト膠芽腫の血管性に易感染性の領域において観察された H 3 K 9 m e 3 の増強を媒介し得ることを示す。本発明者らは、低酸素誘発性 L - 2 H G が抑止されたとき、低酸素誘発性 H 3 K 9 m e 3 において実質的な低下があつたことを発見した。逆に、低酸素誘発性 L - 2 H G の結果としての増加を伴う、 L 2 H G D H の除去は、 H 3 K 9 m e 3 の増加をもたらした。本発明者らは、たとえ比較的強くなくても、同様のパターンを H 3 K 2 7 m e 3 で観察した。それゆえ、本開示は、 L - 2 H G が、エピジェネティックな修飾の形成（例えば、 H 3 K 9 、及び H 3 K 2 7 のトリメチル化）を促進することを確立した。

【 0 1 3 8 】

本開示は、膠芽腫を有する患者からの生検を使用することによって、本発明者らは、 L - 2 G H の低酸素性誘発が、この腫瘍型におけるエピジェネティックな異質性の発達に寄与することを発見したことを記載する。低酸素の影響下にある腫瘍細胞は、かかる条件を伴わない腫瘍細胞と比較して異なる表現型を発達させるだろう。ゆえに、 L - 2 H G のレベル、 L - 2 H G を制御する他の因子のレベルまたは活性は、癌表現型を区別するための指標として使用することができる。

【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態では、本開示は、 L - 2 H G 代謝が、 I D H 1 / 2 変異を伴わない腫瘍の高く相關する領域である、 H 3 K 9 m e 3 染色に影響を与えることを実証する。いくつかの実施形態では、本開示は、 L D H A 、 - ケトグルタル酸、または H 3 K 9 m e 3 の発現または活性を使用して腫瘍表現型を区別するまたは腫瘍異質性を同定するためのシステムを記載する。いくつかの実施形態では、腫瘍は膠芽腫を有する患者からのものである。

【 0 1 4 0 】

癌は、様々な既知の技術のいずれかを使用して本明細書に記載のような変異を検出するためにスクリーニングされてよい。いくつかの実施形態では、その特定の変異または発現は、核酸レベルで（例えば、 D N A または R N A において）検出される。いくつかの実施形態では、かかる変異、またはその発現は、タンパク質レベル（例えば、癌細胞からのポリペプチドを含む試料において、その試料はポリペプチド複合体、または細胞、組織もしくは臓器を含むがそれに限定されない他の高次構造であつてよいかまたはこれを含んでよい）で検出される。

【 0 1 4 1 】

いくつかの特定の実施形態では、検出は、核酸配列決定を必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、全エクソーム配列決定を必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、イムノアッセイを必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、マイクロアレイ（ a m i c r o a r r a y ）の使用を必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、超並列（ m a s s i v e l y p a r a l l e l ）エクソーム配列決定配列決定を必然的に含む。いくつかの実施形態では、変異は、ゲノム配列決定により検出され得る。いくつかの実施形態では、検出は、 R N A 配列決定を必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、標準的な D N A または R N A 配列決定を必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、質量分析を必然的に含む。

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、検出は、次世代配列決定（ D N A 及び / または R N A ）を必然的に含む。いくつかの実施形態では、検出は、ゲノム配列決定、ゲノム再配列決定、標的配列決定パネル、トランスクリプトームプロファイリング（ R N A - S e q ）、 D N A - タンパク質相互作用（ C h I P - 配列決定）、及び / またはエピゲノム特徴づけを必然的に含む。

【 0 1 4 3 】

いくつかの実施形態では、検出は、 E L I S A 、ウェスタン転写（ T r a n f e r ）、イムノアッセイ、質量分析、マイクロアレイ分析等の技術を使用することを必然的に含む。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 4 】

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、一般に、この発明が属する分野の当業者に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様またはそれに相当する方法及び材料を、本発明の実施または試験において使用することができるが、好適な方法及び材料を本明細書に記載する。

【 0 1 4 5 】**細胞多能性及び自己複製を調節するシステム及びプロトコル**

本開示は、なかでも、L - 2 HG の低酸素誘発性レベルは、増強された抑圧的なヒストンのメチル化をもたらすことを実証する。IDH1 / 2 変異によるD - 2 HG の発癌性産生が分化に対する癌促進遮断をもたらす一方で、低酸素誘発性 L - 2 HG は、幹 / 前駆細胞分化の生理学的制御因子として機能し得る。低酸素誘発性 L - 2 HG は、少なくとも一部には、様々な幹細胞集団の自己複製を維持するための低酸素性ニッチ及びLDHA両方の重要性について説明し得る。具体的には、本開示は、低酸素性ニッチ内に存在する正常な幹細胞は、分化に必要とされる遺伝子のサイレンシングを維持するのに十分な L - 2 HG を產生し得、ゆえに前駆 / 幹細胞運命を維持し得ることを記載する。

10

【 0 1 4 6 】

L - 2 HG を標的として、幹細胞及び前駆細胞の多能性及び自己複製を維持する。

L - 2 HG の低酸素性誘発は、胚肝細胞、造血幹細胞、または臓器幹細胞を含む、正常な幹細胞の多能性及び自己複製を維持することに関与し得る。ゆえに、L - 2 HG の LDHA 媒介性産生または L - 2 HG の外因性補充を高めるための戦略は、組織操作または他の幹細胞をベースとする治療にとって有益であり得る。

20

【 0 1 4 7 】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞、組織または生体の多能性または自己複製を維持するまたは促進するために使用することができるシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、これらのシステムまたはプロトコルは、幹細胞または前駆細胞の自己複製を維持するまたは促進するための使用することができる。いくつかの実施形態では、これらのシステムまたはプロトコルは、細胞中の L - 2 HG のレベルを調節することを含む。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG のレベルを調節するためのシステムまたはプロトコルであって、細胞を L - 2 HG と接触させることを含む、前記システムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ活性または発現を阻害するためのシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、LDHA 活性または発現を促進するためのシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、MDH1 または MDH2 活性または発現を促進するためのシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG を細胞に送達するためのシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、本開示は、細胞中の - ケトグルタル酸を枯渇させるためのシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、細胞または組織の多能性または自己複製を維持するまたは促進するために使用することができるシステムまたはプロトコルは、細胞培養または組織培養に適用される。

30

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態では、本開示は、幹細胞及び前駆細胞の多能性及び自己複製を促進する薬剤を含む組成物を投与することにより、幹細胞及び前駆細胞の多能性及び自己複製を対象においてインビボで維持するためのシステムまたはプロトコルを記載する。

40

【 0 1 4 9 】

L - 2 HG を標的として、幹細胞及び前駆細胞の分化を促進する。

いくつかの実施形態では、本開示は、L - 2 HG の蓄積が、細胞の多能性をもたらすことを記載する。一方で、他のメカニズムを通した L - 2 HG の枯渇または L - 2 HG の阻害は、細胞分化を促進する。いくつかの実施形態では、本開示は、幹細胞の分化を促進するためのシステムまたはプロトコルを記載する。いくつかの実施形態では、これらのシステムまたはプロトコルは、幹細胞または前駆細胞を、有効量の LDHA の阻害剤と接触さ

50

することを含む。いくつかの実施形態では、これらのシステムまたはプロトコルは、幹細胞または前駆細胞を有効量の L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼのアクチベーターと接触させることを含む。いくつかの実施形態では、細胞は、癌幹細胞である。

【 0 1 5 0 】

本発明の、多能性及び／もしくは自己複製する特徴を維持するためのシステムもしくはプロトコル、または細胞分化を促進するためのシステムもしくはプロトコルは、任意の幹細胞または前駆細胞に好適である。例示的な例として、任意の多能性ヒト E S C またはそれぞれの細胞株は、それぞれの方法において使用してよい。そのような細胞の集団を誘導するための方法は、当該分野で十分に確立されている（参照。例えば、Thomson, J. A. ら、[1998] Science 282, 1145 - 1147 または Cowan, C A. ら、[2004] JV. Engl. J. Med. 350, 1353 - 1356 ）。本方法が、前駆細胞について使用されることを意図する場合、任意の前駆細胞が本発明のこの方法において使用されてよい。好適な前駆細胞の例には、神経前駆細胞、内皮前駆細胞、赤血球前駆細胞、心臓前駆細胞、オリゴデンドロサイト前駆細胞、網膜前駆細胞、または造血前駆細胞が挙げられるが、これらに限定されない。前駆細胞を獲得する方法は、当該分野で周知である。2つの例示的な例として、巨核球前駆細胞を獲得する方法は、米国特許出願 2005 / 0176142 に開示されており、マウス肝臓前駆細胞株を獲得する方法は、Li ら、((2005) Stem Cell Express, doi: 10.1634/stemcells.2005-0108) により記載されている。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態では、選択された L - 2 H G を制御する遺伝子（例えば、LDHA、MDH1 / 2、または L - 2 H G デヒドロゲナーゼ）、またはその機能的断片は、本発明の方法の実施に十分な量で内因的に発現される。他の実施形態では、L - 2 H G を制御する遺伝子、またはその機能的断片は、所望の転写因子をコードする遺伝子を含む1つまたは複数の組換えベクターを用いて細胞に導入されてよい。

【 0 1 5 2 】

他の実施形態では、本開示は、本明細書に前述のように、それぞれの細胞を、L - 2 H G 代謝を調節する薬剤と接触させることをさらに含む。いくつかの実施形態では、薬剤は、L - 2 H G である。いくつかの実施形態では、薬剤は、-KG である。

【 0 1 5 3 】

本発明は、以下の実施例を参考することにより完全に理解されるだろう。しかしながら、それらは、本発明の範囲を制限すると解釈されるべきではない。

【 0 1 5 4 】

本開示における全ての文献の引用は、参考文献により組み込まれる。

【 実施例 】

【 0 1 5 5 】

以下の実施例は、例示のために提供され、いずれにしても本発明の範囲を制限しない。

【 0 1 5 6 】

実施例 1：低酸素性細胞内での L - 2 - ヒドロキシグルタル酸 (Hydroxyglutamate) の蓄積

背景：

特定の代謝産物が細胞応答性に与えることができる潜在的な影響は、様々なヒト癌におけるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 及び 2 (IDH1 / 2) の再発性体細胞変異の同定により例証された (Amary ら、2011; Borger ら、2012; Cairns ら、2012; Ley ら、2008; Parsons ら、2008; Patel ら、2012; Yang ら、2009)。IDH1 / 2 は、-ケトグルタル酸 (-KG) へのイソクエン酸の酸化的脱炭酸を通常触媒する、NADP⁺ 依存性酵素である (Ward 及び Thompson, 2012)。

【 0 1 5 7 】

IDH1 / 2 における癌に関連する変異は、野生型酵素活性の喪失を、D - 2 - ヒドロ

10

20

30

40

50

キシグルタル酸 (D - 2 HG) への - KG の変換を可能にする活性の機能獲得を伴ってもたらす。 (Dangら、2009; Grossら、2010; Wardら、2010)。 D - 2 HG は、Jumonji ヒストンリジン脱メチル化酵素を含む、多くの - KG 依存性酵素を阻害するその能力を介して「癌代謝物」として機能すると提案されている。 (Chowdhuryら、2011; Figuerolaら、2010; Luら、2012; Xuら、2011)。具体的には、エピジェネティックな修飾酵素の D - 2 HG 媒介性阻害は、誘発性増殖因子 / サイトカインに応答して正常な分化に必要とされる遺伝子の発現を弱める抑圧的なクロマチン構造を促進する (Chenら、2013; Figuerolaら、2010; Katsら、2014; Losmanら、2013; Sasakihara、2012)。実際、IDH1 / 2 変異体酵素の小分子阻害剤は、D - 2 HG 産生を遮断し、抑圧的なクロマチンマークを逆転し、増殖因子 / サイトカイン誘発性細胞の分化を回復させることができる (Rohleら、2013; Wangら、2013)。 10

【0158】

留意されたいことには、2 HG は、D - (R) - または L - (S) - エナンチオマーのコンフォメーションのいずれでも存在することができるキラル分子である (Linstnerら、2013)。IDH1 / 2 変異体が D - 2 HG を排他的に産生するが、生化学的証拠は、L - 2 HG はエピジェネティックな修飾因子を含む多くの - KG 依存性酵素を強力に阻害することができることを示す (Chowdhuryら、2011; Koivunenら、2012; Xuら、2011)。 20

【0159】

IDH1 / 2 変異を伴わない正常な細胞は、いまだあまり理解されていない代謝経路を介して D - 2 HG 及び L - 2 HG の両方を少量産生する (Linstnerら、2013)。進化的に保存された D - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ及び L - 2 - ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ (D2HGDH 及び L2HGDH) は、- KG に戻るそれらの変換を触媒することにより、それぞれ D - 2 HG 及び L - 2 HG の蓄積を予防する (Achouriら、2004; Rzemら、2004)。D2HGDH または L2HGDH の同型接合性の生殖細胞系列の機能喪失変異は、D - 2 HG または L - 2 HG の全身的上昇を特徴とする障害である、2 HG 酸性尿をもたらす (Kranenbijkら、2012; Rzemら、2004; Struysら、2005)。2 HG 酸性尿を有する患者は、早期死亡をもたらす重大な発生異常を患う (Kranenbijkら、2012)。L2HGDH の遺伝性変異から生じる L - 2 HG の全身性上昇は、脳腫瘍と関連している (Haliloglouら、2008; Moroniら、2004)。同様に、腎臓癌における再発性 L2HGDH 喪失の最近の特定は、代替的にまたは追加的に、調節解除された L - 2 HG の潜在的な発癌性役割を支持する (Shimら、2014)。 30

【0160】

2 HG 酸性尿は、生理学的 D - 2 HG 及び L - 2 HG レベルが、2 HG 媒介性病理を予防するために D2HGDH 及び L2HGDH により密接に制御されなければならないことを実証する (Kranenbijkら、2012)。これらの知見は、D - 2 HG または L - 2 HG の生理学的産生の制御が、特定の細胞機能を調節し得る可能性を高いた。 40

【0161】

前述の所見は、2 HG、特に、低酸素の条件下などのストレス誘発性代謝における研究下にある L - 2 HG の役割への継続した必要性の証拠を提供する。

【0162】

材料及び方法：

細胞培養：接着細胞株 S F 188、HEK293T、SH - SY5Y、及び SV40 - 不死化 MEF は、高グルコース DMEM 中で維持され、一方で、造血細胞株 32D 及び FL5.12 は、RMP1 中、10% FBS、グルコース 25 mM、グルタミン 4 mM、ペニシリン 100 単位 / ml、及びストレプトマイシン 100 マイクログラム / ml で維持され、培養密度に達するまで 2 ~ 3 日毎に分裂した。低酸素実験については、細胞を、0.5% 酸素の低酸素室 (Coy) 内で、24 ~ 48 時間培養してから、回収した。 si R 50

NA実験については、S F 1 8 8 またはH E K 2 9 3 T細胞を製造業者により説明されるように、Opti-MEM (登録商標) 血清低減培地 (Life Technologies) と混合したs i RNAでリバーストランスクレプトした。L 2 H G D H cDNAを、標準的な方法により、pCDH-CMV-MCS-EF1-Puroベクター (pCDH) (System Biosciences) へとクローニングした。s h RNA (PLKO.1)、空ベクター (pCDH)、またはL 2 H G D H (pCDH) の安定的な発現を伴うS F 1 8 8 細胞株を生成するために、ヘルパーウイルス及びプラスミドでトランスクレプトされた2 9 3 T細胞からの上清を、72時間後に回収し、濾過し、S F 1 8 8 親細胞に一晩適用した。ピューロマイシン耐性細胞を連続培養ピューロマイシン1 μg / mlから選択した。 10

【0163】

s h RNA実験：以下のPLKO.1ベクター中のTRCバージョン1のs h RNA (Sigma)を使用した：shL2HGDH-1 (L1) = クローンID：NM_024884.1-1113s1c1、配列：CCGGGCCACAGATGTTATGGATA TAACTCGAGTTATATCCATAACATCTGTGGTTTTG (配列番号1)；shL2HGDH-2 (L2) = クローンID：NM_024884.1-1370s1c1、配列：CCGGCGGCATTCTTCAATGTGAGAAATCTCGAGATTTCTCACATGAAGAATGCGTTTTG (配列番号2)；shL2HGDH-3 (L3) = クローンID：NM_024884.1-1217s1c1、配列：CCGGGCAACAGTGAAGTATCTTCAACTCGAGTTGAAGATACTTCACTGTTGCTTTTG (配列番号3)；shL2GHDH-4 (L4) = クローンID：NM_024884.1-674s1c1、配列：CCGGGCTTTGTCATTTGCCAGGATCTCGAGATCCTGGGCAAATGACAAAGCTTTTG (配列番号4)；shD2HGDH-2 (D2) = クローンID：NM_152783.2-630s1c1、配列：CCGGGCGTGTCTGGAA TTCTGGTTCTCGAGAAACCAGAATTCCAGACACGCTTTTG (配列番号5)；shD2HGDH-3 (D3) = クローンID：NM_152783.2-1270s1c1、配列：CCGGCGACCAAGAGGAAAGTCAAGATCTCGAGATCTTGACTTTCCCTCTGGTCGTTTTG (配列番号6)；shD2HGDH-4 (D4) = クローンID：NM_152783.2-319s1c1、配列：CCGGGCCCGTTCTCCACGGTGTCTAACACTCGAGTTAGACACCGTGGAGAACGGCTTTTG (配列番号7)；shD2HGDH-5 (D5) = クローンID：NM_152783.2-1066s1c1、配列：CCGGCCTGTCCTGCATTCTCGAGTTCACTCTCGAGATGAACTCGAATGCAGACAGGTTTTG (配列番号8)。 20 30

【0164】

代謝産物抽出及びGC-MS解析：代謝産物を、2マイクロモル重化水素化2-ヒドロキシグルタル酸 (D-2-ヒドロキシグルタル-2,3,3,4,4-d₅酸；重化水素化-D-2HG) を内部標準として補充した1mLの氷冷80%メタノールで抽出した。-80°Cで一晩インキュベートした後、ライセートを回収し、超音波処理し、次いで21,000gで、20分間4で遠心分離して、タンパク質を除去した。抽出物をエバボレーター (Genevac EZ-2 Elite) 内で乾燥させ、30で90分間、50マイクロリットルのメトキシアミン塩酸塩40mg / mLを含むピリジン内でインキュベートすることにより再懸濁した。代謝産物を、80マイクロリットルのMSTFA + 1%TCMS (Thermo Scientific) 及び70マイクロリットルの酢酸エチル (Sigma) の添加により代替的にまたは追加的に誘導体化し、37で30分間インキュベートした。試料を、Agilent 5975C質量選択検出器に結合したAgilent 7890A GCを使用して解析した。GCは、1mL / 分の一定のヘリウムガス流でスプリットレスモードにて操作した。1マイクロリットルの誘導体化代謝 40 50

産物を、H P - 5 M S カラムに注入し、G C オープン温度を 6 0 から 2 9 0 に 2 5 分間にわたり上昇させた。対象の化合物を表すピークを抽出し、MassHunterソフトウェア (Agilent Technologies) を使用して積分し、次いで、内部標準 (重化水素化 - D - 2 H G) ピーク面積及びタンパク質含有率の両方に正規化した。代謝産物レベルの定量化に使用するイオンは、2 H G m / z 2 4 7 及び重化水素化 - 2 H G m / z 2 5 2 であった。ピークを手動で検査し、各代謝産物について既知のスペクトルに対して検証した。

【0165】

キラル誘導体化：いくつかの実験では、細胞を、内部標準を伴わない 8 0 % メタノール中で回収した。メタノールから抽出された代謝産物をエバポレーター (Genevac EZ - 2 Elite) 内で乾燥させ、水中に再懸濁し、A G 1 - X 8 アニオン交換カラム (Bio - Rad) を実行し、3 N H C l で溶出し、4 つの画分に分割し、D - (R) - 2 H G または L - (S) - 2 H G 標準物質 (Sigma) でスパイクするかまたはスパイクしないままにし、エバポレーター内で乾燥させ、R (-) - 2 - ブタノール (Sigma) 、次いで、酢酸無水物 (Sigma) で 9 5 に加熱しながら順次誘導体化し、窒素流下で乾燥させ、酢酸エチルに再懸濁し、上記のように G C - M S により解析した。2 H G は、m / z 1 7 3 と同定した。この方法によるキラル誘導体化は、L - 2 H G が D - 2 H G よりも短い保持時間で溶出されることで、ガスクロマトグラフィーによる L - 2 H G 及び D - 2 H G エナンチオマーの分離を可能にする。

【0166】

結果：

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 または 2 (IDH1 / 2) における体細胞変異は、「癌代謝物」D - 2 - ヒドロキシグルタル酸 (D - 2 H G) の産生を介して癌の病理形成に寄与する。上昇した D - 2 H G は、Jumonji ファミリーヒストンリジン脱メチル化酵素を含む、 - ケトグルタル酸 (- K G) 依存性酵素の競合阻害剤として機能することにより悪性細胞の分化を遮断することができる。2 H G は、D - エナンチオマーまたは L - エナンチオマーのいずれでも存在することができるキラル分子である。癌に関連する IDH1 / 2 変異は、D - 2 H G を排他的に産生するが、生化学的研究は、L - 2 H G が代替的にまたは追加的に、 - K G に依存する酵素の強力な阻害剤として機能することを実証している。

【0167】

以前の報告は、いくつかの細胞型が、酸素制限条件下で増加した総 2 H G レベルを呈することを示した (Albertsら、1998; Wiseら、2011)。実際、本発明者らは、哺乳類細胞は低酸素に応答して 2 H G を蓄積するという一般化できる現象を同定した (図 1 A)。本発明者らは、ガスクロマトグラフィー質量分析 (G C - M S) を使用して正常酸素状態 (2 1 % 酸素) 対低酸素 (0.5 % 酸素) で培養された IDH1 / 2 野生型細胞株における細胞内 2 H G を測定した。全ての事例で、本発明者らは、細胞の種類に応じて 5 ~ 2 5 倍の範囲の、低酸素における 2 H G の実質的な増加を観察した (図 1 A)。重要なことは、G C - M S により代謝産物を測定するための標準的な方法は、エナンチオマーの種を区別せず、ゆえに、これらのアッセイにおいて測定された総 2 H G には D - 2 H G 及び L - 2 H G の両方が含まれる。

【0168】

本発明者らは、次に細胞内 2 H G レベルに及ぼす D 2 H G D H または L 2 H G D H を操作することの効果を調査した。D 2 H G D H または L 2 H G D H を標的とする s h R N A を、代謝経路を研究するために広く使用されている S F 1 8 8 膠芽腫細胞株に安定的に感染させた (De Berardinisら、2007; Wiseら、2008; Wiseら、2011)。酸素の利用可能度にかかわらず、D 2 H G D H の除去は、細胞内 2 H G にほとんど効果を有さなかった (図 1 B)。しかしながら、L 2 H G D H の除去は、低酸素における 2 H G の蓄積を大幅に増加させた。これは、L - 2 H G が酸素制限に応答して蓄積する 2 H G の主要な形態を表すことを示す (図 1 C)。同様の結果が、D 2 H G D H ま

10

20

30

40

50

たは L - 2 H G D H を標的とする s i R N A でトランスフェクトされた H E K 2 9 3 T 細胞を使用して得られた。

【 0 1 6 9 】

低酸素において 2 H G のどちらのエナンチオマーが蓄積するのか直接決定するために、本発明者らは、代謝産物が、 R (-) - 2 - ブタノール、その後酢酸無水物との連続的な反応を受けるキラル誘導体化手法を活用した(図 6 A)。それにより、 G C - M S により D - 2 H G 及び L - 2 H G を区別することを可能にした(W a r d ら、 2 0 1 2 ; W a r d ら、 2 0 1 0)。キラル誘導体化の前に、低酸素性 S F 1 8 8 細胞からの代謝産物抽出物を、未操作のままにするか、または基準として、市販されている標準物質の D - 2 H G 、 L - 2 H G もしくは D - 2 H G 及び L - 2 H G の混合物でスパイクした。この技術は、 L - 2 H G が、低酸素性細胞中に存在する 2 H G の主要なエナンチオマー型であることを実証した(図 1 D)。キラル誘導体化は、 L - 2 H G が、 H E K 2 9 3 T 細胞及び不死化マウス胚纖維芽細胞(M E F)中で低酸素に応答して選択的に産生されたことを、代替的または追加的に実証した(図 6 B 及び 6 C)。

【 0 1 7 0 】

実施例 2 : 低酸素誘発性 L - 2 H G は、グルタミン由来の - K G から生じる
材料及び方法 :

細胞培養及び G C - M S 手法は実施例 1 に記載する。同位体追跡試験では、培地を指示された時間で交換し、その後、 ^{1 2} C - グルコース(S i g m a)及び ^{1 2} C - グルタミン(G i b c o)または各代謝産物の ^{1 3} C バージョンである、 [U - ^{1 3} C] グルコースまたは [U - ^{1 3} C] グルタミン(C a m b r i d g e I s o t o p e L a b s)を補充したグルコース及びグルタミンを含まない D M E M 培地を使用して回収した。試料を、内部標準を伴わない 8 0 % メタノール中で回収した。 ^{1 3} C の濃縮を、 2 H G イオン、 m / z 3 4 9 - 3 6 2 の存在量を定量化することにより評価した。自然同位体の存在量の収集を、 I s o C o r ソフトウェアを使用することにより実施した(M i l l a r d ら、 2 0 1 2)。

【 0 1 7 1 】

結果

グルコース及びグルタミンは、増殖する細胞が取り込み、代謝する 2 つの主要な栄養素を表す(V a n d e r H e i d e n ら、 2 0 0 9)。本発明者らは、低酸素における L - 2 H G の產生に活用される炭素主鎖の源を同定するために、 [U - ^{1 3} C] グルコースまたは [U - ^{1 3} C] グルタミンのいずれかを補充された S F 1 8 8 細胞において代謝フランクス解析を行った(図 2 A 及び 2 B)。正常酸素状態では、比較的少ない総 2 H G (図 1 A)が主にグルタミンから誘導され、グルコースからの寄与は少しであった(図 2 A 及び 2 B)。対照的に、より多い低酸素誘発性 L - 2 H G (図 1 A 及び 1 D)はグルタミンから排他的に誘導された(図 2 A 及び 2 B)。

【 0 1 7 2 】

グルタミンの細胞代謝が - ケトグルタル酸を生成する(W i s e 及び T h o m p s o n , 2 0 1 0)ので、本発明者らは、低酸素誘発性 L - 2 H G が、グルタミン由来の - K G の酵素的還元から生じ得ると理由づけた。本発明者らは、 - K G の細胞透過性形態を細胞に補充することの効果を試験した。正常酸素状態における S F 1 8 8 細胞への細胞透過性ジメチル - - K G の添加により、細胞内 2 H G は中程度に増加し、一方で低酸素では、 2 H G がほぼ 1 0 0 倍増加した(図 2 C)。これは、キラル誘導体化により L - 2 H G であると確認された(図 2 D 及び 2 E)。 L - 2 H G 酸性尿を有する患者からの細胞の以前の試験(S t r u y s ら、 2 0 0 7)と一致して、これらの知見は、低酸素誘発性 L - 2 H G が、グルタミン由来の - K G の酵素的還元から生じることを示す。

【 0 1 7 3 】

考察 :

栄養素及び代謝産物は、根本的な細胞のプロセスに影響を与える(K a e l i n 及び M c K n i g h t , 2 0 1 3 ; V a n d e r H e i d e n ら、 2 0 0 9)。例えば、 -

10

20

30

40

50

K G は、ヒストン及びDNAの脱メチル化、H I F 1 安定性の調節、及びコラーゲンの成熟化などの多様な機能に関与するおおよそ70の異なる酵素の必須基質として機能する (L o s m a n 及びK a e l i n , 2 0 1 3)。これらの酵素的プロセスを - K G 利用能につなげることにより、細胞の代謝的健全性は、系統分化及び環境的ストレス要因への適応などの重要な細胞の「決断」に密接につながることができる。「癌代謝物」D - 2 H G による - K G に依存する酵素活性の阻害は、それによりI D H 1 / 2 における発癌性変異が正常な細胞の生理機能を攢乱させる主なメカニズムを表すと思われる (K a e l i n 及びM c K n i g h t , 2 0 1 3 ; L o s m a n 及びK a e l i n , 2 0 1 3 ; W a r d 及びT h o m p s o n , 2 0 1 2)。同様に、L 2 H G D H またはD 2 H G D H のいずれかの両親対立遺伝子における機能喪失変異をもって産まれた子供は、それぞれL - 2 H G 及びD - 2 H G を蓄積し、これは重度の発育障害をもたらす (K r a n e n d i j k ら、2 ; R z e m ら、2 0 0 4 ; S t r u y s ら、2 0 0 5)。 10

【0174】

実施例3：低酸素誘発性L - 2 H G は、L D H A による無差別な基質使用から生じる
材料及び方法：

細胞培養及びG C - M S 手法を実施例1に記載する。

【0175】

ウェスタンプロット法：細胞ライセートを、1 × R I P A 緩衝液 (C e l l S i g n a l i n g) 中で抽出し、超音波処理し、14,000 gで4 分で遠心分離し、上清を収集した。ヒストン酸抽出については、細胞を、低張性溶解バッファー (A m r e s c o) に1時間溶解した。H₂SO₄を、0.2 N に一晩4 分で回転させながら加え、上清を遠心分離後に回収した。ヒストンを、33%T C A 中に沈殿させ、アセトンで洗浄し、脱イオン化した水中に再懸濁した。清澄化した細胞ライセートまたはヒストン調製物を、総タンパク質濃度に正規化した。試料をS D S - P A G E により分離し、ニトロセルロース膜 (L i f e T e c h n o l o g i e s) に転写し、0.1%T w e e n 2 0 を含有するトリス緩衝生理食塩水 (T B S T) にて調製された5%ミルク中で遮断し、一次抗体を用いて一晩4 分でインキュベートし、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) とコンジュゲートした二次抗体 (G E H e a l t h c a r e , N A 9 3 1 V 及びN A 9 3 4 V) を用いて、その翌日に1時間インキュベートした。E C L (T h e r m o S c i e n t i f i c) を適用した後、S R X - 1 0 1 A (K o n i c a M i n o l t a) を使用してイメージングを行った。インピトロでのヒストン脱メチル化酵素アッセイについては、バルク仔ウシ胸腺ヒストン (S i g m a) を、トリス - H C l 5 0 m M 、p H 8.0、プロテアーゼ阻害剤、- K G 1 m M 、F e S O 4 1 0 0 マイクロモル、及びアスコルビン酸 2 マイクロモルを含有する反応混合物中でG S T タグ付きK D M 4 C (B P S B i o s c i e n c e) とインキュベートした。反応混合物を、37 °C で4時間、様々な濃度のL - 2 H G またはD - 2 H G (S i g m a) の存在下または不在下でインキュベートした。H 3 K 9 m e 3 レベルを、総ヒストンH 3 を負荷対照として使用して、ウェスタンプロットにより解析した。使用された一次抗体は：抗L 2 H G D H (P r o t e i n t e c h , 1 5 7 0 7 - 1 - A P) 、抗D 2 H G D H (P r o t e i n t e c h , 1 3 8 9 5 - 1 - A P) 、抗L D H A (C e l l S i g n a l i n g , 2 0 1 2) 、抗I D H 1 (抗I D H 2 (A b c a m , a b 5 5 2 7 1) 、抗M D H 1 (A b c a m , a b 5 5 5 2 8) 、抗M D H 2 (A b c a m , a b 9 6 1 9 3) 、抗チューブリン (S i g m a , T 9 0 2 6) 、抗S 6 リボソームタンパク質 (C e l l S i g n a l i n g , 2 3 1 7) 、抗H I F 1 (B D B i o s c i e n c e s , 6 1 0 9 5 9) 、抗H 3 (C e l l S i g n a l i n g , 4 4 9 9) 、及び抗H 3 K 9 m e 3 (A c t i v e M o t i f , 3 9 7 6 5) を含んだ。 30

【0176】

s i R N A 実験：以下のs i R N A (T h e r m o S c i e n t i f i c) を使用した：s i I D H 1 - a = J - 0 0 8 2 9 4 - 1 0 、標的配列：G C A U A A U G U U G G C G U C A A A (配列番号9) ; s i I D H 1 - b = J - 0 0 8 2 9 4 - 1 1 、標的配列 40

: G C U U G U G A G U G G A U G G G U A (配列番号 10) ; s i I D H 2 - a = J - 0 0 4 0 1 3 - 0 9 、標的配列 : G C A A G A A C U A U G A C G G A G A (配列番号 11) ; s i I D H 2 - b = J - 0 0 4 0 1 3 - 1 2 、標的配列 : G C G C C A C U A U G C C G A C A A A (配列番号 12) ; s i M D H 1 - a = J - 0 0 9 2 6 4 - 1 0 、標的配列 : G G G A G A A U U U G U C A C G A C U (配列番号 13) ; s i M D H 1 - b = J - 0 0 9 2 6 4 - 1 2 、標的配列 : A G G U U A U U G U U G U G G G U A A (配列番号 14) ; s i M D H 2 - a = J - 0 0 8 4 3 9 - 1 0 、標的配列 : G A U C U G A G C C A C A U C G A G A (配列番号 15) ; s i M D H 2 - b = J - 0 0 8 4 3 9 - 1 2 、標的配列 : C G C C U G A C C C U C U A U G A U A (配列番号 16) ; s i L D H A - a = J - 0 0 8 2 0 1 - 0 5 、標的配列 : G G A G A A A G C C G U C U U A A U U (配列番号 17) ; s i L D H A - b = J - 0 0 8 2 0 1 - 0 6 、標的配列 : G G C A A A G A C U A U A A U G U A A (配列番号 18) ; s i L D H A - c = J - 0 0 8 2 0 1 - 0 7 、標的配列 : U A A G G G U C U U U A C G G A A U A (配列番号 19) ; s i L D H A - d = J - 0 0 8 2 0 1 - 0 8 、標的配列 : A A A G U C U U C U G A U G U C A U A (配列番号 20)

【0177】

結果 :

低酸素誘発性 L - 2 H G の酵素源 (複数可) を決定するために、本発明者らは、 s i R N A により候補代謝酵素を除去した (図 3)。 I D H 1 または I D H 2 のノックダウンは、低酸素性 S F 1 8 8 細胞における L - 2 H G の產生を損なわなかった (図 3 A)。同様に、 I D H 1 、 I D H 2 、または I D H 1 及び I D H 2 を両方一緒に、 s i R N A を媒介する除去に供した H E K 2 9 3 T 細胞は、低酸素に応答する L - 2 H G の產生に対してこれらの酵素への依存性を呈さなかった (図 7 A)。これらの所見は、天然に生じるイソクエン酸の - ヒドロキシル基 (2 H G の - ヒドロキシル基に類似する) が、イソクエン酸デヒドロゲナーゼにより触媒される酵素反応の立体化学のために、 D - (R) - エナンチオマーの立体構造内に常に存在するという事実と一致する (P a t t e r s o n ら、 1 9 6 2 ; S p r e c h e r ら、 1 9 6 4)。ゆえに、 I D H 1 / 2 酵素は、基質結合の際の立体的拘束に起因して、 - K G を L - 2 - ヒドロキシグルタル酸に還元することができない可能性が高い。

【0178】

代謝酵素は、「無差別の」触媒活性 (L i n s t e r ら、 2 0 1 3) を呈することができ、以前の細胞分画試験は、細胞基質のリンゴ酸デヒドロゲナーゼ 1 (M D H 1) 及びミトコンドリアのリンゴ酸デヒドロゲナーゼ 2 (M D H 2) を、 L - 2 H G の潜在的な酵素源として関連づけた (R z e m ら、 2 0 0 7)。本発明者らは、その主な触媒活性が、 - ケト酸基質の L - ヒドロキシル酸への還元に関与し、それぞれ - K G 及び L - 2 H G に対する構造類似性を有する、代謝酵素の要件を試験した (図 3 D)。 S F 1 8 8 細胞では、本発明者らは、低酸素誘発性 L - 2 H G に対する M D H 1 及び M D H 2 から部分的な寄与を特定した (図 3 B)。しかしながら、際立って、乳酸脱水素酵素 A (L D H A) が、 S F 1 8 8 細胞における低酸素誘発性 L - 2 H G に必要とされる主要な酵素として特定された (図 3 C)。これらの所見は、 H E K 2 9 3 T 細胞において確認され、そこでは L D H A 及び M D H 2 の組み合わせ除去もまた、低酸素誘発性 L - 2 H G のほぼ全ての抑制をもたらした (図 S 7 B 及び S 7 C)。まとめると、これらの知見は、低酸素性細胞は、 L D H A による無差別の基質使用を介して細胞質においてグルタミン由来の - K G の還元から L - 2 H G を產生することができ、それより少ない細胞基質の M D H 1 及びミトコンドリアの M D H 2 からの寄与を伴う、ということを示す (図 3 D)。

【0179】

低酸素誘発性 L - 2 H G の抑制は、 H I F 1 タンパク質レベルに大きな影響を与えたかった (図 3 B 及び 3 C)。以前の報告は、 L - 2 H G が、プロテアソーム分解のために H I F 1 をマークする - K G 依存性プロリルヒドロキシラーゼの E G L N ファミリーの、 L - 2 H G 媒介性阻害を介して、正常酸素状態において H I F 1 を安定化させるこ

10

20

30

40

50

とができる事を実証した (Chowdhuryら、2011; Koivunenら、2012; Losmanら、2013)。これらの所見と一致して、本発明者らは、(結果として低酸素誘発性L-2HGの増強を伴う)L2HGDHの除去に供された低酸素性細胞中のHIF1タンパク質レベルにおいて軽微な増加を認めた(図1C)。しかしながら、低下した酸素利用可能度(0.5%)が、L-2HGにおける上昇がたとえ無くとも、EGLNプロリルヒドロキシラーゼの活性を弱めるのに十分であるように思われる(図3C)。

【0180】

考察 :

IDH1/2変異による悪性病変の分子病態におけるD-2HGの役割の解明に焦点を当てた集中的な研究努力とは対照に、正常な細胞生理学におけるD-2HG及びL-2HGの制御された産生及び除去の潜在的な役割は、あまり注目されていない(Kraneндijkら、2012)。本明細書に提示する知見は、低酸素により強いられた環境的ストレスに応答した新規の細胞の代謝応答としてL-2HG誘発を同定する。酸素制限条件下では、細胞は、TCA回路中間体ならびにNADHの形態の細胞基質の及びミトコンドリアの還元等価物を蓄積し(Bensaad及びHarris, 2014; Metalloら、2012; Semenza, 2013; Wiseら、2011; Zhdanovら、2014)、それは、-KGの酵素的還元を支持して本明細書に記載のL-2HGを産生するだろう。低酸素におけるL-2HGの産生は、IDH1/2とは独立して生じ、代わりに主にLDHAによる-KGの無差別な酵素的還元を介して生じる。低酸素誘発性L-2HGは、それにより細胞が、制限された酸素利用可能度に直面したときに、-KGに依存するプロセス(例えば、H3K9me3の脱メチル化)を抑圧し得る分子メカニズムを表す。あるいはまたは加えて、L-2HGは、低酸素適応の-KG依存性逆転を抑制することができる。-KGは、HIF1クリアランスを開始し、ヒストンのメチル化によりサイレンシングされた遺伝子の発現を回復させることが求められる(Kaelin及びRatcliffe, 2008; Kooistra及びHelin, 2012; Ozer及びBruick, 2007; Tausendschonら、2011)。ゆえに、低酸素誘発性L-2HGは、それを通して低酸素適応に反作用し得る-KGに依存するプロセスの抑圧を細胞が維持できる手段を表す。

【0181】

代替的な(alternative)または無差別な基質使用は、乳酸脱水素酵素を含む多くの代謝酵素の十分に記載された特性である(Linsterら、2013; Meister, 1950; Schatz及びSegal, 1969)。低酸素においてL-2HGへの-KGの還元を触媒するLDHAの能力は、有意義な生物学的效果を媒介し得る代替的な基質使用の例を表す。LDHAによるL-2HGの産生は、簡素なメカニズムを表し、ここでは単一の酵素が、嫌気的解糖の媒介因子及び細胞の代謝状態についての情報を核に伝達する代謝シグナル伝達経路の発動因子の両方として機能する。LDHA発現は、低酸素においてHIF1により上方制御され(Huら、2003)、その後のL-2HGへのKGのLDHA依存性変換は、低酸素適応を持続するために正のフィードバックループを提供し得る。Zhdanovら、(2014)は、近年、持続的な核HIF1の蓄積は、低酸素適応中に進行しているグルタミン代謝に依存することを実証した。これと一致して、本発明者らは、L-2HGの低酸素誘発性蓄積もグルタミン依存性であることを発見した。これらの知見は、低酸素におけるグルタミン依存性L-2HG産生と持続的なHIF1誘発との間のつながりを示す。

【0182】

低酸素におけるL-2HGの選択性蓄積は、2HGのエナンチオマー種を区別することの重要性を強調する(Terunumaら、2014)。L-2HGは、HIF1分解を開発し低酸素適応を終了させるその能力を抑制する、EGLNプロリルヒドロキシラーゼの競合阻害剤として機能すると示されている。対照的に、D-2HGは、HIF1の水酸化及び分解を促進し、ゆえに低酸素適応を妨害する、EGLNプロリルヒドロキシラ

10

20

30

40

50

ーゼに対する基質として作用することができる (Koivunenら、2012; Losmanら、2013)。まとめると、本結果は、D-2HGと共有されない特性である、HIF1軸を強化し、低酸素への細胞の適応を維持することにおける低酸素誘発性L-2HGの支援的役割を、支持する。

【0183】

実施例4：LDHAの活性部位は、L-2HGへの-KGの還元に対応することができる

材料及び方法：

細胞培養及びGC-MS手法を実施例1に記載する。

【0184】

推定LDHA基質の分子ドッキング：推定基質及び産物分子のドッキングをMaestro 2014-3のGlideを使用して行った (Friesnerら、2004; Friesnerら、2006; Halgrenら、2004; Schrodinger, 2014)。結晶水及びリガンドを、NADHを除いて除去した後にリガンドをPDB構造1I10の鎖A内へとドッキングした (Readら、2001)。欠落している側鎖及びループを、Primeを使用して自動的に再構築した (Jacobsonら、2002; Jacobsonら、2004)。PROPKAを、7のpHに適合するプロトン状態を配置するために使用した (Olssonら、2011; Sondergaardら、2011)。NADHまたはNAD⁺の結合次数は、PROPKAによる割り当てのミスを避けるために手動で確認した。OPLS2005を使用して制限最小化を行った (Banksら、2005)。結合部位定義を満たすための最小原子要件を確認するために架空の原子を加えた後、オキサメートを基準リガンドとして使用して結合部位を定義した。ヒドロキシル及びチオール基を、グリッド生成中に回転させた。ピルベート及び-Ketoglutタル酸を、結晶NADHの存在下でドッキングした。乳酸塩及びL-2-ヒドロキシグルタル酸を、結合次数を変えることにより結晶NADHからモデル化されたNAD⁺の存在下でドッキングした。リガンドのカルボン酸部分を完全に脱プロトン化した。ドッキングを、柔軟なリガンドを用いてExtra Precision Glideを使用して行った (Friesnerら、2004; Friesnerら、2006; Halgrenら、2004)。ドッキングポーズは、ドッキング後に最小化した。結果得られたコンформーションは、1オングストロームのRMSDカットオフ内でクラスタリングした。これは、それぞれのドッキングされたリガンドについて単一の代表的なポーズをもたらした。全てのステップは、別段の注記がない限り、既定パラメータを使用した。ポーズ及び予測された水素結合は、PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, バージョン1.7.0.0 Schrodinger, LLC) を用いて可視化された。

【0185】

結果：

LDHAが、どのようにしてL-2HGへの-KGの還元を触媒し得るかをよりよく理解するために、本発明者らは、LDHAの活性部位への推定基質の分子ドッキングを行った。結果得られたドッキングポーズは、ピルベートが、カルボン酸頭部基及び隣接するカルボニル基への水素結合により空間的に配位されたことを実証した。(図4A)。NADHからのヒドリド基によるピルベートのカルボニル炭素の求核攻撃は、還元反応が乳酸塩のL-(S)-エナンチオマーを排他的に産生するように空間的に制限される(図4B)。同様に、-Ketoglutタル酸の分子ドッキングは、カルボン酸頭部基及び隣接するカルボニル基への同一の水素結合を介してピルベートへの類似した空間配位を有利に採択し得ることを示した(図4C)。重要なことに、LDHAの基質結合性ポケット内に、好ましくない立体相互作用を伴わずに、-Ketoglutタル酸のより長い尾に対応するために利用可能かなりの立体的空間があった(図4C)。L-乳酸塩へのピルベートの還元に類似して、-KGのカルボニル炭素の求核攻撃は、L-2-ヒドロキシグルタル酸が還元反応の独占的な最終産物となり得るように空間的に制限された(図4D)。まとめると、

10

20

30

40

50

これらの知見は、代替的にまたは追加的に、LDHAを低酸素誘発性L-2HGの主要な酵素源と同定する遺伝的データを支持する(図3C、S7B、S7C)。

【0186】

実施例5:L-2HGは、低酸素に応答してエピジェネティックな変化を媒介する材料及び方法:

ヒト膠芽腫検体:ヒト膠芽腫生検検体は、治験審査委員会からの承認後にベンシルベニア大学から得た。全ての事例は、分析の前に非特定化し、以前に十分に特徴づけされた組織マイクロアレイ(Vennetiら、2013a)に含有した。

【0187】

免疫組織化学的分析:免疫組織化学試験及び定量化を、以前に記載されたように実施した(Vennetiら、2013b)。要するに、免疫染色をDiscovery XTプロセッサ(Ventana Medical Systems)を使用して行った。組織切片を、PBS中の2%BSA中の10%正常ヤギ血清にて30分間ブロックした。切片を、10マイクログラム/mlのマウスモノクローナル抗HIF1(Alexis Biochem, ALX-210-069)と、または0.1マイクログラム/mlのウサギポリクローナル抗H3K9me3抗体(Abcam, ab8898)と5時間インキュベートした。次いで、組織切片をビオチン標識されたヤギ抗マウスまたは抗ウサギIgG(Vector labs, PK6102及びPK6101)と1:200希釈で60分間インキュベートした。ブロッカーD、ストレプトアビシン-HRP及びDAB検出キット(Ventana Medical Systems)を、製造業者の使用説明書に従って使用した。

【0188】

自動スコアリングのために、スライドをPanoramic Flash 250スキャナー(Perkin Elmer, マサチューセッツ州ウォルサム)を使用して走査し、Panoramic viewerソフトウェアプログラム(3D Histech, マサチューセッツ州ウォルサム)を通して見た。実験計画を知らされていない個体は、JPEG画像を10倍の倍率でとらえた。各JPEGでの免疫染色の定量化は、前述の方法(Vennetiら、2013b)に従って、Matlabの画像処理ツールボックスを用いる自動解析プログラムを使用して実行した。アルゴリズムは、RGBの色区別を伴うカラーセグメンテーション、K平均法及び大津の閾値を用いる背景前景分離を使用した。抽出された画素の数に、各コアのそれらの平均強度(画素単位で表される)を乗じて、スコアに到達した。所与の事例及びマーカーについての最終スコアは、所与のマーカーについて(各事例の)2つのコアのスコアを平均化することにより算出された。

【0189】

結果:

生化学的に、D-2HG及びL-2HGは両方とも、Jumonjiファミリーヒストンリジン脱メチル化酵素KDM4Cを阻害すると報告されており、それはトリメチル化ヒストン3リジン9(H3K9me3)の異常蓄積及び正常な細胞の分化の機能障害を結果もたらす(Chenら、2013; Chowdhuryら、2011; Katsら、2014; Luら、2012; Rohleら、2013; Sasakiら、2012)。膠芽腫では、IDH1/2変異は、腫瘍全体にわたるH3K9me3の拡散的増加を伴うが、一方でH3K9me3は、IDH1/2変異を伴わない腫瘍において領域による変動を示す(Vennetiら、2013a)。

【0190】

上記の結果は、IDH1/2野生型膠芽腫におけるH3K9me3染色の変動性は、低酸素の領域と関連する可能性があることを示す。この考えを試験するために、本発明者らは、IDH1/2について野生型である47ヒト膠芽腫試料を使用して免疫組織化学によりHIF1発現とH3K9me3との間の相関関係を決定した(図5A)。HIF1発現及びH3K9me3は、これらの試料において高く統計学的に相關した($p = 0.01$)(図5B)。

10

20

30

40

50

【0191】

これらの所見は、低酸素誘発性 L - 2 HG が、ヒト膠芽腫の血管性に易感染性の領域において観察される H3K9me3 の増強を媒介し得ることを示す。この仮説を試験するために、ヒト膠芽腫細胞株 SF188 を、L2HGDH を発現するレンチウイルスまたは空レンチウイルスベクターに安定的に感染させた。空ベクターに感染した SF188 膠芽腫細胞は、低酸素に応答して H3K9me3 の増加した全体レベルを呈し（図 5C）、これは原発性膠芽腫検体からの知見と一致した（図 5A 及び 5B）。しかしながら、低酸素誘発性 L - 2 HG が L2HGDH の過剰発現により抑止されたとき、低酸素誘発性 H3K9me3 において大幅な低下があった（図 5C）。逆に、L2HGDH の除去（結果として低酸素誘発性 L - 2 HG の増加を伴う）は、H3K9me3 の増加をもたらした（図 5D）。同様のパターンが、比較的強くないが、H3K27me3 で観察された（データは示さず）。

【0192】

本発明者らは、インビトロでヒストン脱メチル化アッセイを行って、H3K9me3 に与える効果が、低酸素誘発性 L - 2 HG による KDM4C の直接阻害を通して媒介され得るかどうか決定した。ヒストン基質への精製した KDM4C の添加は、用量依存的様式で、L - 2 HG による阻害に感受性である H3K9me3 の脱メチル化をもたらした（図 5D）。これらの所見は、L - 2 HG 及び D - 2 HG による KDM4C のほぼ同等の阻害を実証する以前の報告と一致する（Chowdhuryら、2011；Lurkら、2012）。ゆえに、L - 2 HG の誘発は、低酸素に応答して H3K9me3 を増強すると思われる。

【0193】

考察：

HIF1 の EGLN 依存性プロリンヒドロキシル化を制御するそれらの異なる役割とは対照的に、L - 2 HG 及び D - 2 HG は両方とも、ヒストン脱メチル化酵素の阻害剤として機能する（Chowdhuryら、2011；Koivunenら、2012；Lurkら、2012；Xuら、2011）。D - 2 HG の発癌性レベルのように、L - 2 HG の低酸素誘発性性レベルは、増強された抑圧的なヒストンメチル化をもたらす。IDH1 / 2 变異による D - 2 HG の発癌性産生が分化に対する癌促進遮断をもたらす一方で、低酸素誘発性 L - 2 HG は、幹 / 前駆細胞分化の生理学的制御因子として機能し得る。低酸素誘発性 L - 2 HG は、少なくとも一部には、様々な幹細胞集団の自己複製を維持するための低酸素性ニッチ及び LDHA 両方の重要性について説明し得る（Nombela-Arietaら、2013；Simon 及び Keith, 2008；Spencerら、2014；Sudaら、2011；Wangら、2014；Xieら、2014）。具体的には、低酸素性ニッチに存在する正常幹細胞は、分化に必要とされる遺伝子のサイレンシングを維持するのに十分な L - 2 HG を産生し得、ゆえに前駆 / 幹細胞運命を維持する。これと一致して、Shimら（2014）は、癌進行プロセス中の L2GHDH の喪失が、低酸素に応答して本明細書で観察されるものと類似した、L - 2 HG の蓄積及び抑圧的なヒストンのメチル化における変化をもたらすと近年示している。最後に、膠芽腫を有する患者からの生検を試験する我々の結果は、L - 2 GH の低酸素性誘発が、この腫瘍型におけるエピジェネティックな異質性の発達に寄与する可能性があることを示す。これらの結果が他の腫瘍型に当てはまるかどうかは、将来の臨床検査の対象とするところであるだろう。

【0194】

本実施例は、それにより IDH1 / 2 野生型細胞が低酸素中に - KG の酵素的還元を介して L - 2 HG を選択的に産生する新規代謝経路の本明細書に含まれる記載を支持する。低酸素誘発性 L - 2 HG は、IDH1 または IDH2 のいずれにも依存せず、代わりに、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ 1 及び 2 (MDH1 / 2) からの追加的な寄与を伴う乳酸脱水素酵素 A (LDHA) による無差別の基質使用を介して生じる。LDHA の活性部位の構造モデルは、- KG の LDHA 媒介性還元がどのように L - 2 HG を生じさせるかに

ついて指示する基質結合に対する空間的拘束を実証する。さらには、本開示は、L-2HGが、低酸素に応答して生じるヒストン3リジン9のトリメチル化(H3K9me3)を増強することを示す。ゆえに、本開示は、低酸素誘発性L-2HGが、核内のエピジェネティックなマークの調節を介して細胞の代謝状態についての情報を運ぶ代謝シグナル伝達中間体を表すことを実証する。

参考文献

- Achouri, Y., Noel, G., Vertommen, D., Rider, M. H., Veiga-Da-Cunha, M., and Van Schaftingen, E. (2004). Identification of a dehydrogenase acting on D-2-hydroxyglutarate. *The Biochemical Journal* 381, 35-42. 10
- Albers, E., Gustafsson, L., Niklasson, C., and Liden, G. (1998). Distribution of ¹⁴C-labeled carbon from glucose and glutamate during anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144 (Pt 6), 1683-1690.
- Amary, M. F., Bacsic, K., Maggiani, F., Damato, S., Halai, D., Berisha, F., Pollock, R., O'Donnell, P., Grigoriadis, A., Diss, T., et al. (2011). IDH1 and IDH2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *The Journal of Pathology* 224, 334-343. 20
- Banks, J. L., Beard, H. S., Cao, Y., Cho, A. E., Damm, W., Farid, R., Felts, A. K., Halgren, T. A., Mainz, D. T., Maple, J. R., et al. (2005). Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *Journal of Computational Chemistry* 26, 1752-1780. 30
- Bensaad, K., and Harris, A. L. (2014). Hypoxia and metabolism in cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 772, 1-39.
- Borger, D. R., Tanabe, K. K., Fan, K. C., Lopez, H. U., Fantin, V. R., Straley, K. S., Schenkein, D. P., Hezel, A. F., Ancukiewicz, M., Liebman, H. M., et al. (2012). Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH) 1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping. *The Oncologist* 17, 72-79. 40
- Cairns, R. A., Iqbal, J., Lemonnier, F., Kucuk, C., de Leval, L., Jais, J. P., Parrens, M., Martin, A., Xerri, L., Brousset, P., et al. (2012). IDH2 mutations are frequent in angiomyoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 119, 1901-1903.
- Chen, C., Liu, Y., Lu, C., Cross, J. R., Morris, J. 50

- . P. t., Shroff, A. S., Ward, P. S., Bradner, J. E., Thompson, C., and Lowe, S. W. (2013). Cancer-associated IDH2 mutants drive an acute myeloid leukemia that is susceptible to Brd4 inhibition. *Genes & Development* 27, 1974-1985.
- Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillelringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., Leung, I. K., Li, X. S., Woon, E. C., Yang, M., et al. (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO Reports* 12, 463-469.
- Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., Fantin, V. R., Jang, H. G., Jin, S., Keenan, M. C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462, 739-744.
- DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Daikhin, E., Nissim, I., Yudkoff, M., Wehrli, S., and Thompson, C. B. (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19345-19350.
- Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H. F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* 18, 553-567.
- Friesner, R. A., Banks, J. L., Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., et al. (2004). Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry* 47, 1739-1749.
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Sanschagrin, P. C., and Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 49, 6177-6196.
- Gross, S., Cairns, R. A., Minden, M. D., Drigger 50

- s , E . M . , B i t t i n g e r , M . A . , J a n g , H . G . , S a s a k i , M . , J i n , S . , S c h e n k e i n , D . P . , S u , S . M . , e t a l . (2 0 1 0) . C a n c e r - a s s o c i a t e d m e t a b o l i t e 2 - h y d r o x y g l u t a r a t e a c c u m u l a t e s i n a c u t e m y e l o g e n o u s l e u k e m i a w i t h i s o c i t r a t e d e h y d r o g e n a s e 1 a n d 2 m u t a t i o n s . T h e J o u r n a l o f E x p e r i m e n t a l M e d i c i n e 2 0 7 , 3 3 9 - 3 4 4 .
- H a l g r e n , T . A . , M u r p h y , R . B . , F r i e s n e r , R . A . , B e a r d , H . S . , F r y e , L . L . , P o l l a r d , W . T . , a n d B a n k s , J . L . (2 0 0 4) . G l i d e : a n e w a p p r o a c h f o r r a p i d , a c c u r a t e d o c k i n g a n d s c o r i n g . 2 . E n r i c h m e n t f a c t o r s i n d a t a b a s e s c r e e n i n g . J o u r n a l o f M e d i c i n a l C h e m i s t r y 4 7 , 1 7 5 0 - 1 7 5 9 .
- H a l i l o g l u , G . , J o b a r d , F . , O g u z , K . K . , A n l a r , B . , A k a l a n , N . , C o s k u n , T . , S a s s , J . O . , F i s c h e r , J . , a n d T o p c u , M . (2 0 0 8) . L - 2 - h y d r o x y g l u t a r i c a c i d u r i a a n d b r a i n t u m o r s i n c h i l d r e n w i t h m u t a t i o n s i n t h e L 2 H G D H g e n e : n e u r o i m a g i n g f i n d i n g s . N e u r o p e d i a t r i c s 3 9 , 1 1 9 - 1 2 2 .
- H u , C . J . , W a n g , L . Y . , C h o d o s h , L . A . , K e i t h , B . , a n d S i m o n , M . C . (2 0 0 3) . D i f f e r e n t i a l r o l e s o f h y p o x i a - i n d u c i b l e f a c t o r 1 a l p h a (H I F - 1 a l p h a) a n d H I F - 2 a l p h a i n h y p o x i c g e n e r e g u l a t i o n . M o l e c u l a r a n d C e l l u l a r B i o l o g y 2 3 , 9 3 6 1 - 9 3 7 4 .
- J a c o b s o n , M . P . , F r i e s n e r , R . A . , X i a n g , Z . , a n d H o n i g , B . (2 0 0 2) . O n t h e r o l e o f t h e c r y s t a l e n v i r o n m e n t i n d e t e r m i n i n g p r o t e i n s i d e - c h a i n c o n f o r m a t i o n s . J o u r n a l o f M o l e c u l a r B i o l o g y 3 2 0 , 5 9 7 - 6 0 8 .
- J a c o b s o n , M . P . , P i n c u s , D . L . , R a p p , C . S . , D a y , T . J . , H o n i g , B . , S h a w , D . E . , a n d F r i e s n e r , R . A . (2 0 0 4) . A h i e r a r c h i c a l a p p r o a c h t o a l l - a t o m p r o t e i n l o o p p r e d i c t i o n . P r o t e i n s 5 5 , 3 5 1 - 3 6 7 .
- K a e l i n , W . G . , J r . , a n d M c K n i g h t , S . L . (2 0 1 3) . I n f l u e n c e o f m e t a b o l i s m o n e p i g e n e t i c s a n d d i s e a s e . C e l l 1 5 3 , 5 6 - 6 9 .
- K a e l i n , W . G . , J r . , a n d R a t c l i f f e , P . J . (2 0 0 8) . O x y g e n s e n s i n g b y m e t a z o a n s : t h e c e n t r a l r o l e o f t h e H I F h y d r o x y l a s e p a t h w a y . M o l e c u l a r C e l l 3 0 , 3 9 3 - 4 0 2 .
- K a t s , L . M . , R e s c h k e , M . , T a u l l i , R . , P o z d n y a k o v a , O . , B u r g e s s , K . , B h a r g a v a , P . , S t r a l e y , K . , K a r n i k , R . , M e i s s n e r , A . , S m a l l , D . , e t a l . (2 0 1 4) . P r o t o - o n c o g e n i c r o l e o f m u t a n t I D H 2 i n l e u k e m i a i n i t i a t i o n a n d m a i n t e n a n c e . C e l l S t e m C e l l 1 4 , 3 2 9 - 3 4 1 .

- Koivunen, P., Lee, S., Duncan, C. G., Lopez, G., Lu, G., Ramkissoon, S., Losman, J. A., Joensuu, P., Bergmann, U., Gross, S., et al. (2012). Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature* 483, 484-488.
- Kooistra, S. M., and Helin, K. (2012). Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 297-311. 10
- Kranendijk, M., Struys, E. A., Salomons, G. S., Van der Knaap, M. S., and Jakobs, C. (2012). Progress in understanding 2-hydroxyglutaric acidurias. *Journal of Inherited Metabolic Disease*.
- Ley, T. J., Mardis, E. R., Ding, L., Fulton, B., McLellan, M. D., Chen, K., Dooling, D., Dunford-Shore, B. H., McGrath, S., Hickenbotham, M., et al. (2008). DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456, 66-72. 20
- Linster, C. L., Van Schaftingen, E., and Hanson, A. D. (2013). Metabolite damage and its repair or pre-emption. *Nature Chemical Biology* 9, 72-80.
- Losman, J. A., and Kaelin, W. G., Jr. (2013). What a difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer. *Genes & Development* 27, 836-852.
- Losman, J. A., Looper, R. E., Koivunen, P., Lee, S., Schneider, R. K., McMahon, C., Cowley, G. S., Root, D. E., Ebert, B. L., and Kaelin, W. G., Jr. (2013). (R)-2-hydroxyglutarate is sufficient to promote leukemogenesis and its effects are reversible. *Science* 339, 1621-1625. 30
- Lu, C., Ward, P. S., Kapoor, G. S., Rohle, D., Turcan, S., Abdel-Wahab, O., Edwards, C. R., Khani, R., Figueiroa, M. E., Melnick, A., et al. (2012). IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483, 474-478. 40
- Meister, A. (1950). Reduction of alpha gamm a-diketo and alpha-keto acids catalyzed by muscle preparations and by crystalline lactic dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 184, 117-129.
- Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Bell, E. L., Mattaini, K. R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C. M., Johnson, Z. R., Irvine, D. J., Guarente, L., et 50

- al. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481, 380-384.
- Millard, P., Letisse, F., Sokol, S., and Portaïs, J.C. (2012). IsoCor: correcting MS data in isotope labeling experiments. *Bioinformatics* 28, 1294-1296.
- Moroni, I., Bugiani, M., D'Incerti, L., Maccagno, C., Rimoldi, M., Bissola, L., Pollo, B., Finocchiaro, G., and Uziel, G. (2004). L-2-hydroxyglutaric aciduria and brain malignant tumors: a predisposing condition? *Neurology* 62, 1882-1884.
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Carty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nature Cell Biology* 15, 533-543.
- Olsson, M.H.M., Sondergaard, C.R., Rostkowskii, M., and Jensen, J.H. (2011). PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK(a) Predictions. *J Chem Theory Comput* 7, 525-537.
- Ozer, A., and Bruick, R.K. (2007). Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nature Chemical Biology* 3, 144-153.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807-1812.
- Patel, J.P., Gonen, M., Figueroa, M.E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., Van Vlierberghe, P., Dolgalev, I., Thomas, S., Aminova, O., et al. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine* 366, 1079-1089.
- Patterson, A.L., Vanderhelm, D., Johnson, C.K., and Minkin, J.A. (1962). Absolute Configuration of Naturally Occurring Isocitric Acid. *J Am Chem Soc* 84, 309-8.
- Read, J.A., Winter, V.J., Eszes, C.M., Sessions, R.B., and Brady, R.L. (2001). Structural basis for altered activity of M- and H-is

- ozy me forms of human lactate dehydrogenase. *Proteins* 43, 175 - 185.
- Rohle, D., Popovici-Muller, J., Palaskas, N., Turcan, S., Grommes, C., Campos, C., Tsoi, J., Clark, O., Oldrini, B., Komisopoulou, E., et al. (2013). An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science* 340, 626 - 630.
- Rzem, R., Veiga-da-Cunha, M., Noel, G., Goffette, S., Nassogne, M.C., Tabarki, B., Scholler, C., Marquardt, T., Vikkula, M., and Van Schaftingen, E. (2004). A gene encoding a putative FAD-dependent L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase is mutated in L-2-hydroxyglutaric aciduria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 16849 - 16854.
- Rzem, R., Vincent, M.F., Van Schaftingen, E., and Veiga-da-Cunha, M. (2007). L-2-hydroxyglutaric aciduria, a defect of metabolite repair. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30, 681 - 689.
- Sasaki, M., Knobbe, C.B., Munger, J.C., Lind, E.F., Brenner, D., Brustle, A., Harris, I.S., Holmes, R., Wakeham, A., Haight, J., et al. (2012). IDH1(R132H) mutation increases murine hematopoietic progenitors and alters epigenetics. *Nature* 488, 656 - 659.
- Schatz, L., and Segal, H.L. (1969). Reduction of alpha-ketoglutarate by homogeneous lactic dehydrogenase X of testicular tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 4393 - 4397.
- Schrodinger (2014). Schrodinger Release 2014-3: Maestro, version 9.9, Schrodinger, LLC, New York, NY.
- Semenza, G.L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 3664 - 3671.
- Shim, E.H., Livi, C.B., Rakheja, D., Tan, J., Benson, D., Parekh, V., Kho, E.Y., Ghosh, A.P., Kirkman, R., Velu, S., et al. (2014). L-2-Hydroxyglutarate: An Epigenetic Modifier and Putative Oncometabolite in Renal Cancer. *Cancer Discovery* 4, 1290 - 1298.
- Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 285 - 296.

- Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowsk i, M., and Jensen, J. H. (2011). Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of $pK(a)$ Values. *J Chem Theory Comput* 7, 2284-2295.
- Spencer, J. A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J. M., Zaher, W., Mortensen, L. J., Alt, C., Turcotte, R., et al. (2014). Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508, 269-273. 10
- Sprecher, M., Berger, R., and Sprinson, D. B. (1964). Stereochemical Course of the Isocitrate Lyase Reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 239, 4268-4271.
- Struys, E. A., Gibson, K. M., and Jakobs, C. (2007). Novel insights into L-2-hydroxyglutaric aciduria: mass isotopomer studies reveal 2-oxoglutaric acid as the metabolic precursor of L-2-hydroxyglutaric acid. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 30, 690-693. 20
- Struys, E. A., Salomons, G. S., Achouri, Y., Van Schaftingen, E., Gross, S., Craigen, W. J., Verhoeven, N. M., and Jakobs, C. (2005). Mutations in the D-2-hydroxyglutarate dehydrogenase gene cause D-2-hydroxyglutaric aciduria. *American Journal of Human Genetics* 76, 358-360. 30
- Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G. L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 9, 298-310.
- Tausendschon, M., Dehne, N., and Brune, B. (2011). Hypoxia causes epigenetic gene regulation in macrophages by attenuating Jumonji histone demethylase activity. *Cytokine* 53, 256-262.
- Terunuma, A., Putluri, N., Mishra, P., Mathe, E. A., Dorsey, T. H., Yi, M., Wallace, T. A., Issaq, H. J., Zhou, M., Killian, J. K., et al. (2014). MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *The Journal of Clinical Investigation* 124, 398-412. 40
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033. 50

Venneti, S., Felicella, M.M., Coyne, T., Phillips, J.J., Gorovets, D., Huse, J.T., Kofler, J., Lu, C., Tihan, T., Sullivan, L.M., et al. (2013a). Histone 3 lysine 9 trimethylation is differentially associated with isocitrate dehydrogenase mutations in oligodendrogliomas and high-grade astrocytomas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 72, 298-306.

Venneti, S., Garimella, M.T., Sullivan, L.M., Martinez, D., Huse, J.T., Heguy, A., Santi, M., Thompson, C.B., and Judkins, A.R. (2013b). Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2 (EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol* 23, 558-564. 10

Wang, F., Travins, J., DeLaBarre, B., Penard-Lacronique, V., Schalm, S., Hansen, E., Straley, K., Kurnytsky, A., Liu, W., Gliser, C., et al. (2013). Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science* 340, 622-626. 20

Wang, Y.H., Israelsen, W.J., Lee, D., Yu, V.W., Jeanson, N.T., Clish, C.B., Cantley, L.C., Van der Heiden, M.G., and Scadden, D.T. (2014). Cell-state-specific metabolic dependency in hematopoiesis and leukemogenesis. *Cell* 158, 1309-1323. 30

Ward, P.S., Cross, J.R., Lu, C., Weigert, O., Abdel-Wahab, O., Levine, R.L., Weinstock, D.M., Sharp, K.A., and Thompson, C.B. (2012). Identification of additional IDH mutations associated with oncometabolite R(-)-2-hydroxyglutarate production. *Oncogene* 31, 2491-2498.

Ward, P.S., Patel, J., Wise, D.R., Abdel-Wahab, O., Bennett, B.D., Collier, H.A., Cross, J.R., Fantin, V.R., Hedvat, C.V., Perl, A.E., et al. (2010). The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* 17, 225-234. 40

Ward, P.S., and Thompson, C.B. (2012). Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell* 21, 297-308.

Wise, D. R., DeBerardinis, R. J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X. Y., Pfeiffer, H. K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S. B., et al. (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 18782-18787.

Wise, D. R., and Thompson, C. B. (2010). Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 427-433.

Wise, D. R., Ward, P. S., Shay, J. E., Cross, J. R., Gruber, J. J., Sachdeva, U. M., Platt, J. M., De Matteo, R. G., Simon, M. C., and Thompson, C. B. (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 19611-19616.

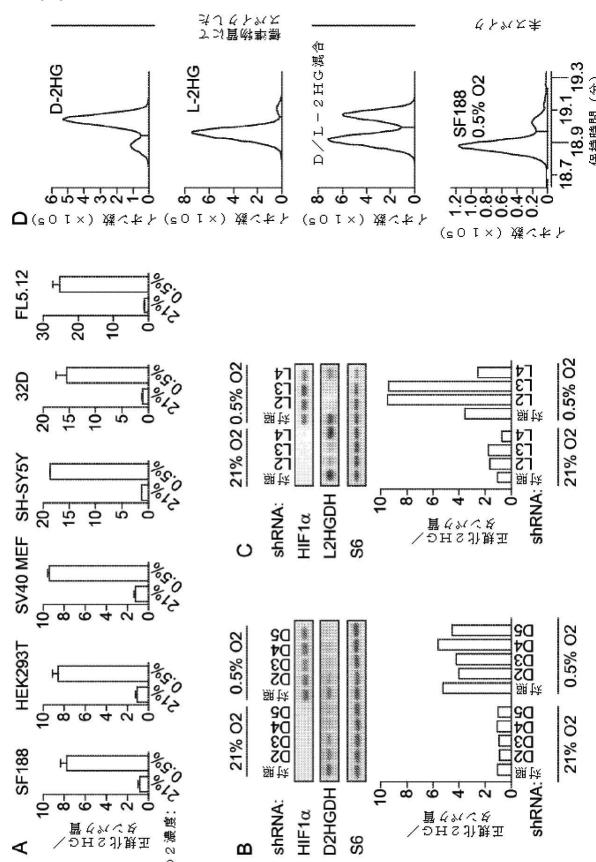
Xie, H., Hanai, J., Ren, J. G., Kats, L., Burgess, K., Bhargava, P., Signoretti, S., Billiard, J., Duffy, K. J., Grant, A., et al. (2014). Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell Metabolism* 19, 795-809.

Xu, W., Yang, H., Liu, Y., Yang, Y., Wang, P., Kim, S. H., Ito, S., Yang, C., Xiao, M. T., Liu, L. X., et al. (2011). Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell* 19, 17-30.

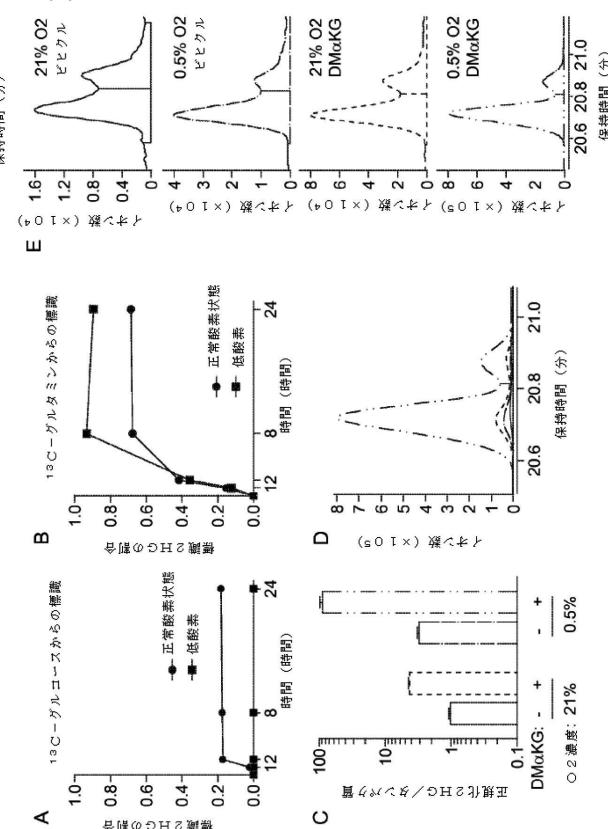
Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England Journal of Medicine* 360, 765-773.

Zhdanov, A. V., Waters, A. H., Golubeva, A. V., and Papkovsky, D. B. (2014). Differential contribution of certain metabolic substrates and cellular oxygen in HIF signalling. *Experimental Cell Research*.

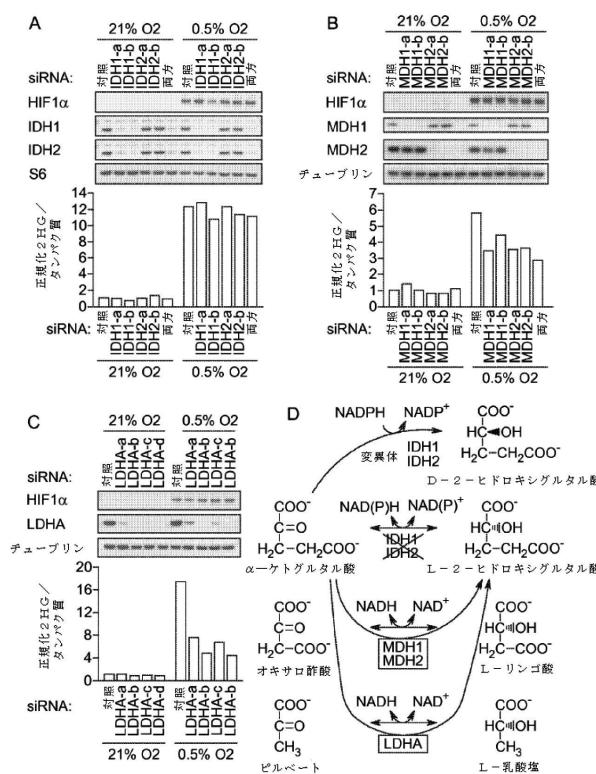
【図1】



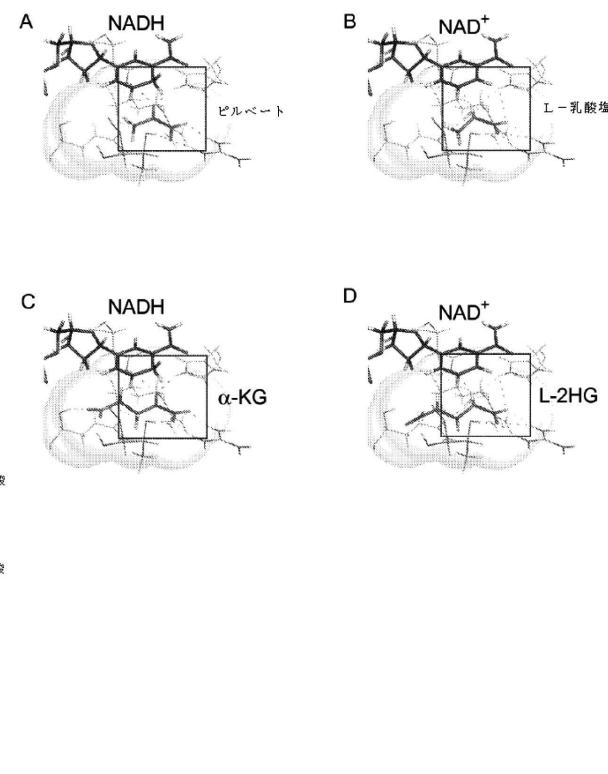
【図2】



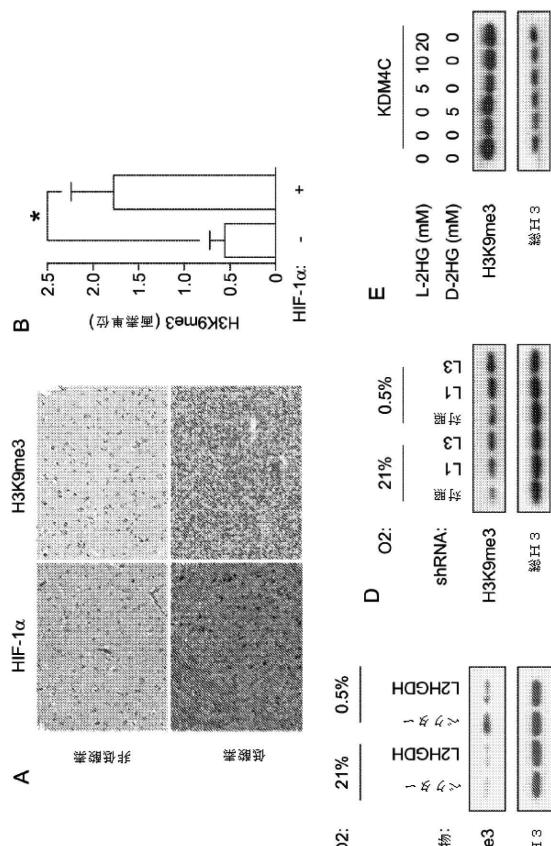
【図3】



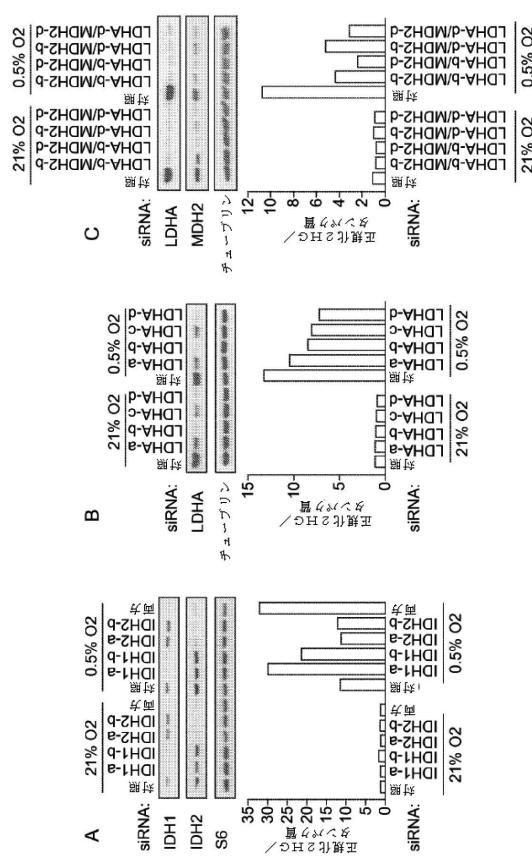
【図4】



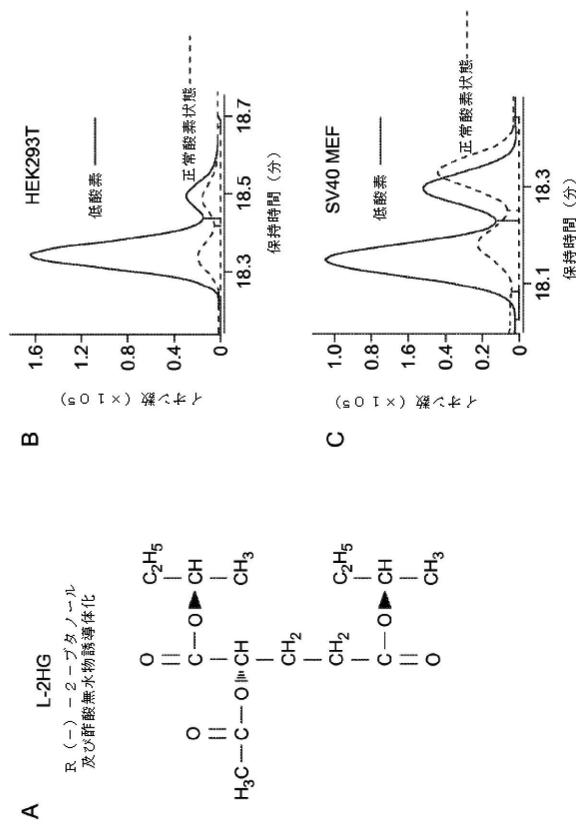
【 四 5 】



【 义 7 】



【 义 6 】



【配列表】

0006953305000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 イントルコファー, アンドリュー エム.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, イ- 63アールディー スト
リート 504, アパートメント 12エル

(72)発明者 トンプソン, クレッグ ビー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10021, ニューヨーク, イ- 71エスティー ストリ
ート 247

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 國際公開第2013/075065 (WO, A1)

特表2013-506833 (JP, A)

國際公開第2013/086365 (WO, A2)

Rakheja, D. et al., Papillary thyroid carcinoma shows elevated levels of 2-hydroxyglut
arate, *Tumor Biology*, Springer, 2010年11月16日, Vol.32, pp.325-333

STRUYS, E.A. et al., Measurement of Urinary D- and L-2-Hydroxyglutarate Enantiomers by
Stable-Isotope-Dilution Liquid Chromatography.Tandem Mass Spectrometry after Derivati
zation with Diacetyl-L-Tartaric Anhydride, *Clinical Chemistry*, 2004年08月01日, Vol.50/
No.8, pp.1391-1395

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33/48 - 33/98

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