

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-136077

(P2017-136077A)

(43) 公開日 平成29年8月10日(2017.8.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68	Z N A A 2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 5 0
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C O 8 4

審査請求 有 請求項の数 52 O L 外国語出願 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-52865 (P2017-52865)  
 (22) 出願日 平成29年3月17日 (2017. 3. 17)  
 (62) 分割の表示 特願2015-509554 (P2015-509554) の分割  
 原出願日 平成25年5月2日 (2013. 5. 2)  
 (31) 優先権主張番号 1207722.8  
 (32) 優先日 平成24年5月2日 (2012. 5. 2)  
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)  
 (31) 優先権主張番号 61/641, 512  
 (32) 優先日 平成24年5月2日 (2012. 5. 2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514276920  
 ベルゲンビオ アーエスアー  
 ノルウェー国, エン-5009 ベルゲン  
 , ジョナス ライズ ヴェイ 91  
 (74) 代理人 100107766  
 弁理士 伊東 忠重  
 (74) 代理人 100070150  
 弁理士 伊東 忠彦  
 (74) 代理人 100091214  
 弁理士 大貫 進介  
 (72) 発明者 ローレンス, ジム  
 ノルウェー国, エン-5009 ベルゲン  
 , ジョナス ライズ ヴェイ 91 デパ  
 ートメント オブ ビオメディシン

最終頁に続く

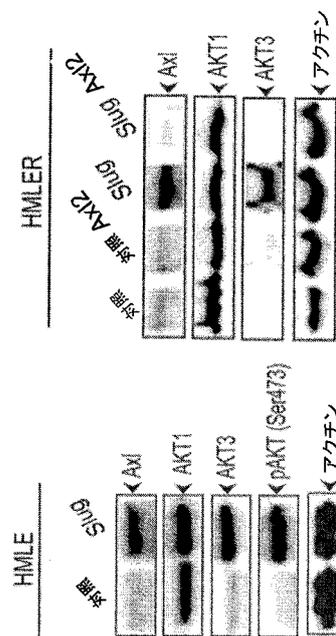
(54) 【発明の名称】 Akt 3 関連病態の予知及び治療方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】プロテインキナーゼ関連の癌の予知及び治療方法を提供する。

【解決手段】上皮間葉転換 ( E M T ) が起きている対象を特定する方法であって、前記対象から得た試料における Akt 3 の発現レベル又は活性レベルを対照試料と比較して決定するステップ、を含み、Akt 3 の発現レベル又は活性レベルの増加が、EMT の発生を示す、方法。対象における EMT の発生の検出用バイオマーカーとしての Akt 3 の使用、及び癌を治療するために Akt 3 阻害薬の使用。また、Akt 3 発現及び/又は活性を測定することにより対象における上皮間葉転換 ( E M T ) の発生を検出するための方法。Akt 3 の発現レベル又は活性レベルの増加は EMT の発生を示し、EMT の発生は転移性癌又は薬物耐性癌発生リスクの増加を示す、方法。

【選択図】 図 2



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) が起きている対象を特定する方法であって、

前記対象から得た試料における A k t 3 の発現レベル又は活性レベルを対照試料と比較して決定するステップ、

を含み、

A k t 3 の発現レベル又は活性レベルの増加が、E M T の発生を示す、方法。

**【請求項 2】**

A k t 3 の発現レベル又は活性レベルの増加によって示される前記 E M T の発生は、前記対象の転移性癌又は薬物耐性癌発症リスクの増加を示す、

請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

A k t 3 の発現レベル又は活性レベルの増加によって示される前記 E M T の発生は、癌幹細胞 (Cancer Stem Cell : C S C ) の存在を示す、

請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 4】**

( i ) 対象が A x 1 阻害薬による治療に対して感受性を示すかどうかを判定することと

、

( i i ) 対象が特に転移性癌に罹患し易いかどうかを判定することと、

のいずれか 1 つのための予知方法であって、

前記対象から得た試料における A k t 3 の発現レベル又は活性レベルを対照試料と比較して評価することにより、前記対象における上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の発生を検出するステップ、

を含む方法。

**【請求項 5】**

対照試料対比の A k t 3 活性又は発現の増加は、E M T を阻害又は逆転する能力を有する薬剤による治療に対する感受性の指標となる、

請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記薬剤は A k t 3 阻害薬又は A x 1 阻害薬である、

請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

A x 1 活性を特定する方法であって、

対象から得た試料における A k t 3 の発現レベル又は活性レベルを対照試料と比較して決定するステップ、

を含み、

A k t 3 の発現レベル又は活性レベルの増加は A x 1 活性と相関する、方法。

**【請求項 8】**

前記対象は哺乳類である、

請求項 1 乃至 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記対象はヒトである、

請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記対象から得た試料における A k t 2 の発現レベル又は活性レベルを評価するステップ、

をさらに含み、

10

20

30

40

50

A k t 2 の発現レベル又は活性レベルの低下は、  
 ( i ) 前記対象が A k t 3 関連病態を有すること、  
 ( i i ) 転移性癌又は薬物耐性癌の発症リスクの増加、  
 ( i i i ) 癌幹細胞の存在、及び / 又は  
 ( i v ) 上皮間葉転換 ( Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の発生

を示す、

請求項 1 乃至 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

A k t 1 及び / 又は A k t 2 ではなく、A k t 3 の発現が決定される、

10

請求項 1 乃至 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記 A k t 3 の発現レベルは、

( i ) A k t 3 をコードする遺伝子のコピー数を対照試料と比較して決定することにより評価され、前記コピー数の増加は A k t 3 の発現レベルの増加を示し、且つ / 又は、

( i i ) A k t 3 のタンパク質レベル又は m R N A レベルを決定することにより評価される、

請求項 1 乃至 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

A k t 3 活性は、

20

( i ) A k t 3 のリン酸化を決定することにより評価され、A k t 3 のリン酸化は活性 A k t 3 を示し、任意に A k t 3 のリン酸化は、セリン 4 7 2 で決定され、且つ / 又は、

( i i ) A k t 3 タンパク質の細胞内局在性を決定することにより評価され、核における局在が活性 A k t 3 を示す、

請求項 1 乃至 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

A k t 3 関連病態の治療対象として患者、好ましくはヒトの患者を選択する方法であって、

上皮間葉転換 ( Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の発生の指標を有する患者を特定するステップと、

30

特定された患者を治療対象として選択するステップと、

を含み、

E M T の発生の指標を有する患者は、前記患者から得た試料における A k t 3 の発現レベル又は活性レベルを決定するステップを含む方法によって特定され、A k t 3 の発現レベル又は活性レベルの増加が、E M T の発生を示し、

前記治療は、A x 1 阻害薬を投与することを含む、  
方法。

【請求項 1 5】

前記 A k t 3 関連病態は癌である、

請求項 1 4 に記載の方法。

40

【請求項 1 6】

癌又は A k t 3 関連病態は、乳癌、黒色腫、前立腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌又は神経膠腫から選択される癌である、

請求項 1 乃至 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

上皮間葉転換 ( Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の阻害薬を含む、  
A k t 3 関連病態の治療に使用される医薬組成物。

【請求項 1 8】

前記 A k t 3 関連病態は癌である、

請求項 1 7 に記載の医薬組成物。

50

## 【請求項 19】

A k t 3 阻害薬を含む、上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) 関連疾患の治療に使用される医薬組成物。

## 【請求項 20】

癌を有する対象における薬剤耐性の予防、阻害又は治療に使用される、A k t 3 活性の阻害能を有する化合物を含む医薬組成物。

## 【請求項 21】

別の治療剤と組み合わせられる、  
請求項 17 乃至 20 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 22】

対象における A k t 3 関連病態の治療に使用される医薬組成物であって、  
A k t 3 阻害薬又は請求項 34 乃至 36 のいずれか一項に記載の方法により得られる候補化合物として選択されるか若しくは前記候補化合物に由来する医薬化合物を含む、  
医薬組成物。

10

## 【請求項 23】

前記対象の治療は、前記対象における A k t 3 活性レベルを定期的に評価するステップを含む、  
請求項 22 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 24】

前記 A k t 3 関連病態は癌である、  
請求項 22 又は 23 に記載の医薬組成物。

20

## 【請求項 25】

前記対象の治療は、検出された A k t 3 活性レベルに応じて調整される、  
請求項 22 乃至 24 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 26】

前記対象の治療は、A x 1 阻害薬での治療を含む、  
請求項 22 乃至 25 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 27】

E M T 阻害能を有する化合物を含む、対象における A k t 3 関連病態の治療に使用される医薬組成物。

30

## 【請求項 28】

A k t 3 活性の阻害能を有する化合物を含む、対象における癌幹細胞の阻害に使用される医薬組成物。

## 【請求項 29】

別の癌治療薬と組み合わせられる、  
請求項 22 乃至 28 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 30】

癌を有する対象における薬剤耐性の予防又は阻害に使用される医薬組成物であって、  
A k t 3 活性の阻害能を有する化合物、  
を含む医薬組成物。

40

## 【請求項 31】

前記対象は哺乳類である、  
請求項 22 乃至 30 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

## 【請求項 32】

前記対象はヒトである、  
請求項 31 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 33】

前記別の治療剤は、  
( i ) スルホン酸アルキル ( 例えばブスルファン ) 等のアルキル化剤、  
( i i ) ナイトロジェンマスタード ( 例えばクロラムブシル、シクロホスファミド、エ

50

- ストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラムスチン)、
- ( i i i ) エチレンイミン誘導体 ( 例 えばチオテパ )、
- ( i v ) ニトロソウレア ( 例 えばカルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン )、
- ( v ) トリアゼン ( 例 えばダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロミド )、
- ( v i ) 白金化合物 ( 例 えばシスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、サト  
ラプラチン、ピコプラチン、オンナプラチン ( o n n a p l a t i n )、テトラプラチン  
、スプリオプラチン ( s p r i o p l a t i n )、イブロプラチン、クロロ ( ジエチレン  
ジアミノ ) - 白金 ( I I ) クロリド、ジクロロ ( エチレンジアミノ ) - 白金 ( I I )、ジ  
アミノ ( 2 - エチルマロナト ) 白金 ( I I )、( 1 , 2 - ジアミノシクロヘキサン ) マロ  
ナト白金 ( I I )、( 4 - カルボキシフタロ ) - ( 1 , 2 - ジアミノシクロヘキサン ) 白  
金 ( I I )、( 1 , 2 - ジアミノシクロヘキサン ) - ( イソシトラト ) 白金 ( I I )、( 1  
、 2 - ジアミノシクロヘキサン ) - c i s - ( ビルバト ) 白金 ( I I )、
- ( v i i ) 抗葉酸剤 ( 例 えばメトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、  
トリメトレキサート ) 等の代謝拮抗薬、
- ( v i i i ) ピリミジン類似体 ( 例 えばアザシチジン、カペシタビン、シタラビン、エ  
ダトレキサート、フロクスウリジン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、トロキサシタビ  
ン )、
- ( i x ) プリン類似体 ( 例 えばクラドリビン、クロロデオキシアデノシン、クロファラ  
ビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン )、
- ( x ) 抗腫瘍抗生物質 ( 例 えばブレオマイシン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、  
マイトマイシン、ミトキサントロン、ポルフィロマイシン ) 等の天然生成物、
- ( x i ) アントラサイクリン ( 例 えばダウノルビシン、ドキシソルビシン、エビルピシン  
、イダルピシン、バルルピシン )、
- ( x i i ) 有糸分裂阻害薬 ( 例 えばピンカアルカロイド、ピンブラスチン、ピンベシル  
、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン )、
- ( x i i i ) 酵素 ( 例 えば L - アスパラギナーゼ、PEG - L - アスパラギナーゼ )、
- ( x i v ) 微小管ポリマー安定剤 ( 例 えばタキサン、パクリタキセル、ドセタキセル )  
、
- ( x v ) トポイソメラーゼ I 阻害薬 ( 例 えばカンプトテシン、イリノテカン、トポテカ  
ン )、
- ( x v i ) トポイソメラーゼ I I 阻害薬 ( 例 えばボドフィロトキシシン、アムサクリン、  
エトポシド、テニポシド、ロソキサントロン、アクチノマイシン )、
- ( x v i i ) アンドロゲン ( 例 えばフルオキシメステロン、テストラクトン )、抗アン  
ドロゲン薬 ( 例 えばピカルタミド、シプロテロン、フルタミド、ニルタミド )、コルチコ  
ステロイド ( 例 えばデキサメタゾン、プレドニゾン )、アロマターゼ阻害薬 ( 例 えばアミ  
ノグルテチミド、アナストロゾール、エキセメスタン、ホルメスタン、レトロゾール )、  
エストロゲン ( 例 えばジエチルスチルベストロール )、抗エストロゲン薬 ( 例 えばフルベ  
ストラント、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレミフェン )、黄体形成ホルモン放出  
ホルモン ( L H R H ) 作用薬及び拮抗薬 ( 例 えばアバレリックス、ブセレリン、ゴセレリ  
ン、ロイプロリド、ヒストレリン、デスロレリン、酢酸ナファレリン、トリプトレリン )  
、プロゲスチン ( 例 えば酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール )、甲状腺  
ホルモン ( 例 えばレボチロキシン、リオチロニン ) 等のホルモン及びホルモン拮抗薬、
- ( x v i i i ) P K B 経路阻害薬 ( 例 えばペリホシン、エンザスタウリン塩酸塩、トリ  
シリピン )、
- ( x i x ) P 1 3 K 阻害薬 ( 例 えばセマフォア ( s e m a p h o r e )、S F 1 1 2 6  
 )、M T O R 阻害薬 ( 例 えばラパマイシン及び類似体 )、
- ( x x ) C D K 阻害薬 ( 例 えばセリシクリブ、アルボシジブ、7 - ヒドロキシスタウロ  
スポリン )、
- ( x x i ) C O X - 2 阻害薬 ( 例 えばセレコキシブ )、
- ( x x i i ) H D A C 阻害薬 ( 例 えばトリコスタチン A、スペロイルアニリドヒドロキ

サム酸、クラミドシン)、

( x x i i i ) DNAメチラーゼ阻害薬(例えばテモゾロミド)、その他の薬剤(例えばアルトレタミン、三酸化ヒ素、サリドマイド、レナリドマイド、硝酸ガリウム、レバミゾール、ミトタン、ヒドロキシウレア、オクトレオチド、プロカルバジン、スラミン、光線力学的化合物(メトキサレン、ポルフィマーナトリウム等)、

( x x i v ) プロテアソーム阻害薬(ボルテゾミブ等)、

( x x v ) 分子標的療法剤(遺伝子療法剤、アンチセンス療法剤等の機能性治療剤)、

( x x v i ) チロシンキナーゼ阻害薬(例えばエルロチニブ塩酸塩、ゲフィチニブ、メシル酸イマチニブ、セマクサニブ)、

( x x v i i ) R a f 阻害薬(例えばソラフェニブ)、レチノイド、レキシノイド等の遺伝子発現修飾物質(例えばアダパレン、ベキサロテン、trans-レチノイン酸、9-cis-レチノイン酸、N-(4-ヒドロキシフェニル)レチンアミド)、

( x x v i i i ) モノクローナル抗体(例えばアレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン、リツキシマブ、トラスツズマブ)を含む表現型特異的療法剤、免疫毒素(例えばゲムツズマブオゾガマイシン)、放射性免疫複合体(例えばI-トシツモマブ(tositumobab))、

( x x i x ) 癌ワクチン、

( x x x ) インターフェロン(例えばインターフェロン-[ ] 2 a、インターフェロン-[ ] 2 b)、インターロイキン(例えばアルデスロイキン、デニロイキンジフチクス、オブレルベキン)等の生物学的療法剤、

( x x x i ) 抗癌療法であって以下を含む保護剤又は補助剤(細胞保護剤(例えばアミホスチン、デクスラゾキサソ)、ホスホン酸塩(例えばパミドロネート、ゾレドロン酸)、刺激因子(例えばエポエチン、ダルベポエチン、フィルグラスチム、PEG-フィルグラスチム、サルグラモスチム)等)の使用が関わるもの、

( x x x i i ) A x l 阻害薬(例えば、1-(6,7-ジヒドロ-5H-ベンゾ[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジン-3-イル)-N<sup>3</sup>-(7-(S)-ピロリジン-1-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾ[7]アヌレン-2-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-3,5-ジアミン)、及び/又は、

( x x x i i i ) さらに併用化学療法レジメン(例えばカルボプラチン/パクリタキセル、カペシタピン/ドセタキセル、フルオロウラシル/レバミゾール、フルオロウラシル/ロイコボリン、メトトレキサート/ロイコボリン、トラスツズマブ/パクリタキセルの組み合わせであって、単独か、又はカルボプラチンなどとさらに併用するもの)、

から選択される癌治療剤である、

請求項 2 1 又は請求項 2 9 乃至 3 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 3 4】

( i ) A k t 3 関連病態の予防、阻害又は治療に有用な医薬化合物、

( i i ) 転移性癌又は薬剤耐性癌の治療に有用な医薬化合物、又は、

( i i i ) 上皮間葉転換(Epithelial-to-Mesenchymal Transition: EMT)の予防又は阻害に有用な医薬化合物、

を選択する方法であって、

試験対象として一群の候補医薬化合物を提供するステップと、

試験系においてEMTの発生に対する候補医薬化合物の効果を試験するステップと、

A k t 3 活性の阻害に基づき、候補医薬化合物を選択するステップと、

を含む方法。

【請求項 3 5】

A k t 3 関連病態の予防、阻害又は治療に有用な候補医薬化合物の選択方法であって、

( i ) 試験細胞におけるA k t 3の発現を選択的に低下させ、前記試験細胞を候補医薬化合物と接触させ、前記候補医薬化合物のEMTの発生に対する効果を決定するステップ、又は、

( i i ) インビトロ試験系においてA k t 3の発現を低レベルまで選択的に低下させ、

10

20

30

40

50

前記試験系を候補医薬化合物と接触させ、E M T の発生を阻害する候補医薬化合物を選択するステップ、  
を含む方法。

【請求項 3 6】

A k t 3 活性を大幅に又は完全に阻害する候補医薬化合物が選択される、  
請求項 3 4 又は 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

E M T の低下は、A k t 3 活性の阻害により示される、  
請求項 3 5 乃至 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記試験系における細胞の A k t 3 の発現は、9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 % 又は 2 0 % 低下する、  
請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の阻害を生じさせないように前記 A k t 3 の発現を低下させる、  
請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記試験系における細胞に A k t 3 の発現を妨げるヌクレオチドを導入することにより、  
前記 A k t 3 の発現を選択的に低下させる、  
請求項 3 4 乃至 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の阻害薬に対して感受性を示す細胞株であって、  
E M T を妨げるには僅かに不十分な A k t 3 発現レベルを有する、  
細胞株。

【請求項 4 2】

ヒト細胞株である、請求項 4 1 に記載の細胞株。

【請求項 4 3】

上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) を阻害する化合物を特定する方法であって、  
請求項 4 1 又は 4 2 に記載の細胞株由来の細胞を試験化合物に接触させるステップと、  
前記細胞における A k t 3 活性の阻害を決定するステップと、  
を含む方法。

【請求項 4 4】

対象における上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の発生を検出するためのバイオマーカーとしての A k t 3 の使用。

【請求項 4 5】

E M T の発生は、A k t 3 の発現及び / 又は活性化の増加により示される、  
請求項 4 4 に記載の使用。

【請求項 4 6】

A x 1 の発現及び / 又は活性化を検出するためのバイオマーカーとしての A k t 3 の使用であって、

A x 1 の発現及び / 又は活性化の増加は、A k t 3 の発現及び / 又は活性化の増加により示される、  
使用。

【請求項 4 7】

試料において上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) の発生を検出する方法であって、

細胞、細胞群、動物モデル又はヒトから単離された試料における、対照試料対比の A k

10

20

30

40

50

t 3 の発現レベル又は活性化レベルを決定するステップ、  
を含み、

前記対照試料対比の前記 A k t 3 の発現レベル又は活性化レベルの増加が、E M T の発生の指標となる、  
方法。

【請求項 4 8】

上皮間葉転換 (Epithelial - to - Mesenchymal Transition : E M T ) を阻害又は逆転する能力を有する薬剤を特定する方法であって、

細胞、細胞群又は動物モデルに前記薬剤を投与するステップと、  
A k t 3 の活性化及び / 又は発現をモニタリングするステップと、  
を含む方法。

10

【請求項 4 9】

( i ) ヒトにではなく、細胞、細胞群又は動物モデルに前記薬剤を投与するステップと、

( i i ) 処理済み及び未処理の細胞又は動物モデルに由来する試料において、A k t 3 発現及び / 又は A k t 3 活性化を測定するステップと、

( i i i ) E M T を阻害又は逆転する能力の指標として、前記未処理の試料と比較して、前記処理済み試料における A k t 3 の発現及び / 又は活性化の増加を検出するステップと、

を含む、

20

請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記動物モデルはヒトではない、

請求項 4 8 又は 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 A k t 3 の発現レベルは、

( i ) A k t 3 をコードする遺伝子のコピー数を対照試料と比較して決定することにより評価され、

前記コピー数の増加は、A k t 3 の発現レベルの増加を示し、且つ / 又は、

( i i ) A k t 3 のタンパク質レベル又は m R N A レベルを決定することにより評価される、

30

請求項 4 4 乃至 5 0 のいずれか一項に記載の使用又は方法。

【請求項 5 2】

A k t 3 活性は、

( i ) A k t 3 のリン酸化を決定することにより評価され、A k t 3 のリン酸化は A k t 3 活性を示し、任意に A k t 3 のリン酸化はセリン 4 7 2 で決定され、且つ / 又は、

( i i ) A k t 3 タンパク質の細胞内局在性を決定することにより評価され、核における局在は活性 A k t 3 を示す、

請求項 4 4 乃至 5 0 のいずれか一項に記載の使用又は方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、薬剤開発及び癌治療の分野に関する。詳細には、本発明はプロテインキナーゼの分野に関し、より詳細には癌の予知及び治療方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

A k t

A k t ( プロテインキナーゼ B ) は、増殖、運動性、成長、グルコース恒常性、生存及び細胞死を含む多様な細胞過程に参与することが知られるセリン / スレオニンプロテインキナーゼである。A k t は、P I 3 K / A k t 経路の 3 つの主要な構成要素 ( ホスファチ

50

ジルイノシトール (phosphatidylinositol) 3キナーゼ、そのアンタゴニストPTEN及びAkt)の1つである。この経路の構成要素の突然変異は、癌において最も頻繁に観察される突然変異として挙げられ、乳癌の最大70%に認められる。ヒトには3つのAktファミリーメンバー、即ちAkt1、Akt2及びAkt3があり、これらは異なる遺伝子から転写される。Aktに関する研究発表の大半は、Akt1を取り上げているか、或いはファミリーメンバーを区別しない汎Akt抗体が普及した結果、どのファミリーメンバーとも特定しないAktを取り上げている。3つのアイソフォームのなかでは、Akt3に関する知見が最も少ない。実際、最近のレビュー論文「乳腺発達及び癌において鍵となるシグナル伝達ノード。非特許文献1の中で、Akt3についての言及は僅か3回である。1回はその存在を位置付け、1回は、それが正常な乳腺発達において担う役割は小さいと思われることを指摘し、及び1回は、それが妊娠及び授乳中のStat5aリン酸化に影響を及ぼさないことを指摘している。

10

20

30

40

50

#### 【0003】

正常な発達におけるAkt1、Akt2及びAkt3の役割がノックアウトマウスで研究されており、Akt1は全体的な成長に重要であり(ノックアウトマウスは概して健全であるが、成長が低下する)、Akt2は主にグルコース代謝に関与し(ノックアウトマウスは正常に成長するが、インスリン抵抗性を示す)、及びAkt3は脳の発達において重要であることが明らかになっている(例えば非特許文献2を参照のこと)。Akt1及びAkt2が体全体にわたり広範囲に発現するのに対し、Akt3は脳、腎臓及び心臓に発現が限られていることから、Akt1及びAkt2の役割がより普遍的であることが示唆される。

#### 【0004】

Aktは癌療法の格好の標的であると考えられ、単独での、又は標準的な癌化学療法薬と組み合わせたAktの阻害が、アポトーシス閾値を低下させ、癌細胞を選択的に死滅させるものと見なされている(非特許文献3)。Aktメンバーを阻害する試みについての最近のレビューでは、Akt2が癌において変異することが最も多いファミリーメンバーであると特定され、Akt1及びAkt2を阻害すれば最適であることが示唆されている( )。このレビューで対象とされている化合物の多くは他のキナーゼと比較してAktの選択性が低く、概してAkt1を主眼としている。このレビューに報告される化合物で異なるファミリーメンバー間の選択性を有するものは、Akt3ではなく、圧倒的にAkt1及び/又はAkt2を阻害する。

#### 【0005】

文献では圧倒的にAkt1に主眼が置かれているが、Akt3の過剰発現が、黒色腫(非特許文献5)及び卵巣癌(非特許文献6)を含め、いくつかの癌と関係付けられている。

#### 【0006】

いくつかの特許公報が、Akt3の使用に関する。

#### 【0007】

特許文献1は、対象における癌の診断方法に関し、これはチロシン176がリン酸化された(AKT3でなく)AKT1の発現レベルを決定することを含む。

#### 【0008】

特許文献2は、結腸直腸癌の予後判定のため評価し得る膨大な遺伝子の中に、Akt3を挙げている。しかしながら、Akt3は好ましいマーカーとしては選択されていない。

#### 【0009】

特許文献3は、対象における前立腺癌の再発可能性の評価においてその発現レベルを決定し得る膨大な遺伝子の中に、Akt3を挙げている(表3A)。Akt3の重要性について特に言及はない。

#### 【0010】

特許文献4は、対象のAktアイソフォームプロファイル、特にAkt1とAkt2との比を、当該のプロファイルと正常なAktアイソフォームプロファイルとの比較によ

て評価することにより、潜在的な癌及び既存の癌の進行を診断又は予知する方法に関する。

【 0 0 1 1 】

特許文献 5 は、A k t 1 及び A k t 2 の発現レベルに基づく浸潤性膠芽腫の特定で使用される方法及びキットに関する。非腫瘍性の脳標本では A k t 3 m R N A 発現が高く、神経膠腫では減少していることが認められた（ [ 0 1 3 0 ] ）。さらに、長期生存患者では A k t 3 発現が有意に高いことが認められた。

【 0 0 1 2 】

特許文献 6 は、前立腺細胞におけるアンドロゲン応答の決定方法を開示し、可能性のある前立腺癌バイオマーカーの長いリストの中で A k t 3 に触れている。

10

【 0 0 1 3 】

上皮間葉転換（ E M T ）

上皮組織は、結合組織、筋組織及び神経組織と共に、身体の 4 つの基本的な組織型の 1 つを構成する。上皮細胞は、強力な細胞間結合で一体に保持されるシート状の極性細胞を形成する傾向によって特徴付けられる。この結果、上皮細胞は自由に動くことができず、他の細胞型と比較してほとんど移動を示さない。対照的に、間葉状細胞（例えば線維芽細胞）は強力な細胞間結合を欠き、個々の細胞として動くことができる。間葉状細胞は高度な運動性を有し、細胞外マトリックスを通じた移動が可能であり得る。

【 0 0 1 4 】

上皮間葉転換（ E M T ）は天然の細胞プログラムであり、個々の上皮細胞が上皮細胞に特有の遺伝子発現パターン及び挙動を失い、代わりに間葉細胞に典型的な遺伝子の様相、挙動及び発現を呈し始める。こうして上皮細胞は接着性及び尖端 - 基底極性を失い、細胞外マトリックスに移動及び侵入する能力を得る。 E M T は不可逆ではない。間葉上皮転換（ M E T ）と称される鏡映的プロセスが、間葉特性の消失、並びに細胞 - 細胞接着及び尖端 - 基底極性の回復をもたらす。

20

【 0 0 1 5 】

E M T は、胚発生時に特に重要である。 E M T は原腸形成において基本的な役割を果たし、原腸形成では、単層の上皮細胞層からなる胚が、三層の古典的胚葉である外胚葉、中胚葉及び内胚葉を含む胚へと発達する。脊椎動物発生のやや後期に、 E M T により神経堤細胞が生じる。これらの細胞が胚全体にわたって移動し、末梢神経系の神経節、顔及び頭部の骨及び軟骨、色素細胞及びグリア細胞を含む多くの異なる構造を生じる。中胚葉及び内胚葉の双方からの内臓器官の形成には、さらなる M E T 及び E M T ラウンドが必須である。

30

【 0 0 1 6 】

E M T 及び疾患

胚発生時のその重要性に比して、 E M T プログラムが健常成体で活性化されることはほとんどない。しかしながらこれは、傷害又は疾患後の炎症に応答して誘導される。 E M T は、創傷治癒及び組織修復において役割を果たし、臓器変性疾患（例えば腎線維症）の間に起こる。

【 0 0 1 7 】

E M T はまた、癌転移において重要な役割を果たすことが次第に明らかになっている。癌腫は上皮癌であり、転移を起こすには、個々の細胞が原発腫瘍から抜け出し、一連の移動を経る必要がある。これには、原発腫瘍から局所循環系又はリンパ系への移動、及び血管系からの遊走及び転移部位における定着が含まれる。現在、腫瘍細胞とその微小環境との間の相互作用が一部の腫瘍細胞で E M T の誘導を引き起こし得ることのエビデンスは、優れたものが存在し、蓄積されつつある。次には、もたらされる細胞遊走の増加及びそうした細胞の潜在的な浸潤能力により、転移が確立されるようになる可能性が強まる。近年、慢性骨髄性白血病関連癌遺伝子である受容体チロシンキナーゼ A x 1 が、浸潤 - 転移カスケードに不可欠な E M T 誘導エフェクターであることが示されている（特許文献 7 ）。

40

【 0 0 1 8 】

50

転移能の亢進におけるこの役割のみならず、近年 EMT プログラムは、癌幹細胞 (CSC) と関係付けられている。この細胞は、幹細胞特性、即ち特定の癌に見られるあらゆる細胞型を生じる能力、ひいては新しい腫瘍を形成する能力を有する一部の腫瘍細胞を表すものと仮定されている。CSC は、腫瘍における細胞のほんの一部に相当し得るに過ぎないが、既存の抗癌薬に対して特に耐性を有すると考えられる。従って、薬物治療が腫瘍の圧倒的多数の細胞を死滅させ得るとしても、唯一生き残った CSC が疾患の再発を引き起こし得る。最新のエビデンスは EMT と CSC との表現型の重複を示唆しており、化学療法後の癌の再発及び薬物耐性腫瘍の発生においてもまた EMT が役割を果たし得ることが示唆される。

#### 【0019】

EMT 表現型に対するロバストなバイオマーカーが、転移性癌又は薬物耐性癌を発症する特定のリスクを有する患者の特定に有用となり得る一方、EMT を起こした細胞を標的化する新規薬物が、従来の治療後の転移及び再発を低下させ得る。

#### 【0020】

EMT アクチベータ (例えば転写因子 Slug) は、Akt 1 活性 / 発現を増加させる。また、(例えばミリスチル化変異体 MyrAkt1 の) Akt 1 活性化が EMT アクチベータ (例えば転写リプレッサーの Snail; 非特許文献 7) を誘導し、上皮から間葉へのバイオマーカースイッチングも生じさせることが知られている。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0021】

- 【特許文献 1】国際公開第 2010/091354 号パンフレット
- 【特許文献 2】米国特許出願公開第 20120040842 号明細書
- 【特許文献 3】米国特許出願公開第 20120028264 号明細書
- 【特許文献 4】米国特許出願公開第 20120021983 号明細書
- 【特許文献 5】米国特許出願公開第 20120003209 号明細書
- 【特許文献 6】米国特許第 8133684 号明細書
- 【特許文献 7】国際公開第 2010/103388 号パンフレット
- 【特許文献 8】国際公開第 2009/082488 号パンフレット
- 【特許文献 9】PCT/US07/089177 号明細書
- 【特許文献 10】PCT/US2010/021275 号明細書
- 【特許文献 11】PCT/EP2011/004451 号明細書
- 【特許文献 12】米国特許第 4,683,195 号明細書
- 【特許文献 13】米国特許第 4,683,202 号明細書
- 【特許文献 14】欧州特許出願公開第 239400A 号明細書
- 【特許文献 15】米国特許第 5,837,832 号明細書
- 【特許文献 16】米国特許第 5,143,854 号明細書
- 【特許文献 17】国際公開第 90/15070 号パンフレット
- 【特許文献 18】国際公開第 92/10092 号パンフレット
- 【特許文献 19】米国特許出願公開第 2008014037 号明細書

#### 【非特許文献】

#### 【0022】

- 【非特許文献 1】Wickenden JA および Watson CJ、乳腺上皮における PI3 キナーゼの下流のシグナル伝達：3 つの Akt における役割 (Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary epithelium: a play in 3 Akts)、Breast Cancer Research、2010、12、202
- 【非特許文献 2】Dummler B, Hemmings BA、発達及び疾患における PKB/Akt アイソフォームの生理学的役割 (Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease)、Biochem Soc Trans

10

20

30

40

50

2007; 35: 231-5

【非特許文献3】Lindley CW, Curr Top Med Chem, 10, 458, 2010

【非特許文献4】Mattmann ME他、小分子及び生物製剤によるAktの抑制：歴史的観点及び特許ランドスケープの現状 (Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape)、Expert Opinion on Therapeutic Patents, 21, 1309, 2011

【非特許文献5】Cancer Res. 2004年10月1日; 64(19): 7002-10

【非特許文献6】Cancer Discov. 2012年1月1日; 2(1): 56-67

【非特許文献7】Oncogene. 2007年11月22日; 26(53): 7445-56. Epub 2007年7月1日

【非特許文献8】Jiang Q, Ho YY, Hao L, Nichols Berrios C, Chakravarti A.、候補遺伝子におけるコピー数変異体はヒルシュスプリング病の遺伝的修飾因子である (Copy number variants in candidate genes are genetic modifiers of Hirschsprung disease)、PLoS One. 2011; 6(6)

【非特許文献9】Sci Signal. 2009年6月30日、2(77)

【非特許文献10】Mann他、Nature Biotechnology 2003年3月, Vol. 21, pp. 255-261

【非特許文献11】Melton他、Nuc. Acids Res. 12: 7035

【非特許文献12】Landegren, U.他、Science 242: 229-237 (1988)

【非特許文献13】Lewis, R., Genetic Engineering News 10: 1, 54-55 (1990)

【非特許文献14】Mok他、1994、Gynaecologic Oncology 52: 247-252

【非特許文献15】Guatelli他、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874

【非特許文献16】Wu, D.Y. and Wallace, R.B., 1989, Genomics 4: 560

【非特許文献17】Lizardi他、1988, Bio/Technology 6: 1197

【非特許文献18】Lizardi他、1998, Nat Genet 19: 225

【非特許文献19】Walker他、1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 392

【非特許文献20】Ausubel他編、1994、現代分子生物学プロトコル (Current Protocols in Molecular Biology)、Vol. 1、John Wiley & Sons, Inc., New York

【非特許文献21】Lemieux他、1998, Molecular Breeding 4: 277-289

【非特許文献22】Schena and Davis、生物学的チップによる並列解析 (Parallel Analysis with Biological Chips)、PCR Methods Manual (M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky 編)

【非特許文献23】Schena and Davis, 1999, 遺伝子、ゲノム及びチップ (Genes, Genomes and Chips)、DNAマイクロアレイ：実践的アプローチ (DNA Microarrays: A Practical Approach) (M. Schena 編), Oxford University Press, Oxford, UK, 1999)

10

20

30

40

50

- 【非特許文献24】ザ・チップング・フォーキャスト(The Chipping Forecast)、(Nature Genetics 特集号; 1999年1月別冊)
- 【非特許文献25】Mark Schena 編、マイクロアレイバイオチップ技術(Microarray Biochip Technology)、Eaton Publishing Company
- 【非特許文献26】Cortes, 2000, The Scientist 14(17): 25; Gwynne and Page, マイクロアレイ解析: 分子生物学における次の革命(Microarray analysis: the next revolution in molecular biology)、Science、1999年6月6日
- 【非特許文献27】Eakins and Chu, 1999, Trends in Biotechnology, 17: 217 - 218 10
- 【非特許文献28】Celis 他、2000, FEBS Lett, 480(1): 2 - 16
- 【非特許文献29】Lockhart and Winzler, 2000, Nature 405(6788): 827 - 836
- 【非特許文献30】Khan 他、1999、20(2): 223 - 9
- 【非特許文献31】Marx, 2000, Science 289: 1670 - 1672
- 【非特許文献32】Scherf 他、2000、Nat Genet 24(3): 236 - 44
- 【非特許文献33】Ross 他、2000、Nat Genet 2000, 24(3): 227 - 35 20
- 【非特許文献34】Wang 他、1998、Science 280(5366): 1077 - 82
- 【非特許文献35】Chemical & Engineering News, 1999年2月22日, 77(8): 27 - 36
- 【非特許文献36】Rockett and Dix(2000), Xenobiotica 30(2): 155 - 77
- 【非特許文献37】Afshari 他、1999, Cancer Res 59(19): 4759 - 60
- 【非特許文献38】Nuwaysir 他、1999, Molecular Carcinogenesis 24: 153 - 159 30
- 【非特許文献39】Cortese, 2000, The Scientist 14(11): 26
- 【非特許文献40】Fodor 他、1991, Science 251: 767
- 【非特許文献41】Dower and Fodor, 1991, Ann. Rep. Med. Chem. 26: 271
- 【非特許文献42】Shalon 他、1996, Genome Res 6(7): 639 - 45
- 【非特許文献43】Ekins and Chu, 1999, Trends in Biotechnology, 17: 217 - 218
- 【非特許文献44】Marshall and Hodgson, 1998, Nature Biotechnology 16(1): 27 - 31 40
- 【非特許文献45】Brazma and Vilo J, 2000, FEBS Lett 480(1): 17 - 24
- 【非特許文献46】Borrebaeck CA, 2000, Immunol Today 21(8): 379 - 82
- 【非特許文献47】MacBeath and Schreiber, 2000, Science, 289(5485): 1760 - 1763
- 【非特許文献48】医薬賦形剤ハンドブック(Handbook of Pharmaceutical Excipients)、第2版、1994、編者A Wade and PJ Weller
- 【非特許文献49】レミントン薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)、Ma 50

- ck Publishing Co., A. R. Gennaro 編、1985
- 【非特許文献50】Gjerdrum C 他、Ax1は乳癌転移及び患者生存の必須の上皮間葉転換誘導調節因子である(Ax1 is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival)、Proc Natl Acad Sci USA. 2010年1月19日; 107(3): 1124-9
- 【非特許文献51】Lorens JB, Jang Y, Rossi AB, Payan DG, Bogenberger JM(2000)、調節性LTR媒介性発現の最適化(Optimization of regulated LTR-mediated expression)、Virology 272: 7-15 10
- 【非特許文献52】Elenbaas B, Spirio L, and Weinberg RA、初代乳腺上皮細胞の腫瘍形成性形質転換により生成したヒト乳癌細胞(Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells)、Genes Dev.、2001年1月1日; 15(1): 50-65
- 【非特許文献53】Kilpinen S, Autio R, Ojala K, Iljin K, Bucher E, Sara H, Pisto T, Saarela M, Skotheim RI, Bjoerkman M, Mpindi JP, Haapa-Pananen S, Vainio P, Edgren H, Wolf M, Astola J, Nees M, Hautaniemi S, Kallioniemi O、175種の健常及び病的組織由来の全9,783例の試料にわたる17,330個のヒト遺伝子の発現レベルの体系的バイオインフォマティクス解析(Systematic bioinformatic analysis of expression levels of 17,330 human genes across 9,783 samples from 175 types of healthy and pathological tissues)、Genome Biol. 2008; 9(9): R139 20
- 【非特許文献54】Gjerdrum C, Tiron C, Hoeiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, Collett K, Lis, McCormack E, Gjertsen BT, Micklem DR, Akslen LA, Glackin C, Lorens JB、Ax1は乳癌転移及び患者生存の必須の上皮間葉転換誘導調節因子である(Ax1 is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival)、Proc Natl Acad Sci USA. 2010年1月19日; 107(3): 1124-9 30
- 【非特許文献55】Barthel A, Kohn AD, Luo Y, Roth RA、構成的に活性なバージョンのSer/ThrキナーゼAktは、3T3-L1脂肪細胞においてob遺伝子産物レプチンの産生を誘導する(A constitutively active version of the Ser/Thr kinase Akt induces production of the ob gene product, leptin, in 3T3-L1 adipocytes)、Endocrinology. 1997年8月; 138(8): 3559-62
- 【非特許文献56】Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS、ヒト乳腺幹細胞/前駆細胞のインビトロ増殖及び転写プロファイリング(In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells)、Genes Dev. 2003年5月15日; 17(10): 1253-70 40
- 【非特許文献57】Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA、上皮間葉転換により幹細胞の特性を有する細胞が生じる(The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells)、Cell. 2008年5月16日; 50

133(4):704-15

【非特許文献58】Garbe JC, Pepin F, Pelissier FA, Sputova K, Fridriksdottir AJ, Guo DE, Villadsen R, Park M, Petersen OW, Borowsky AD, Stampfer MR, Labarge MA、ヒト乳腺上皮の加齢時における基底分化バイアスを伴う多能性前駆体の蓄積 (Accumulation of multipotent progenitors with a basal differentiation bias during aging of human mammary epithelia)、Cancer Res. 2012年7月15日; 72(14):3687-701

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0023】

予想外にも、ここで、Akt3がヒト細胞におけるEMT及び癌幹細胞形質の誘導で中心的な役割を果たすことが見出された。詳細には、構成的に活性なAkt3が、対照細胞又は構成的に活性なAkt1を発現する細胞と比較して、インビボ及びマンモスフェアでの細胞の腫瘍形成能を有意に増加させることが見出された。さらに、Akt3の阻害により、EMT及びCSC形質を逆転させることが可能であった。

【0024】

これは、この分野でAkt1及びAkt2に主眼が置かれていることを考えると、予想外であった。

20

【0025】

また、Akt3はAx1受容体チロシンキナーゼシグナル伝達のバイオマーカーであることも見出された。より具体的には、Akt3は上皮細胞におけるAx1シグナル伝達のバイオマーカーであることが分かった。Akt3はまた、EMTの維持をもたらすフィードバックループに関与することも見出された。癌幹細胞、転移のバイオマーカーなど、Akt3のさらなる適用が、本開示から明らかとなる。

【課題を解決するための手段】

【0026】

本発明の一態様によれば、Akt3関連病態の予防、阻害又は治療に有用な医薬化合物を選択する方法が提供される。この方法は、試験対象として一群の候補医薬化合物を提供するステップと、試験系においてAkt3活性に対する候補医薬化合物の効果を試験するステップと、Akt3活性の阻害に基づき候補医薬化合物を選択するステップと、を含む。

30

【0027】

或いは本発明は、転移性癌又は薬剤耐性癌の治療に有用な候補医薬化合物を選択する方法を提供する。この方法は、試験対象として一群の候補医薬化合物を提供するステップと、試験系においてAkt3活性に対する候補医薬化合物の効果を試験するステップと、Akt3活性の阻害に基づき候補医薬化合物を選択するステップと、を含む。

【0028】

別の態様によれば、EMTの予防又は阻害に有用な候補医薬化合物を選択する方法が提供される。この方法は、試験対象として一群の候補医薬化合物を提供するステップと、試験系においてAkt3活性に対する候補医薬化合物の効果を試験するステップと、Akt3活性の阻害に基づき候補医薬化合物を選択するステップと、を含む。

40

【0029】

インビボ応答を予測するために、インビトロ試験系で候補医薬化合物の有効レベルを決定できることは、極めて有利である。これにより、医薬化合物の有効最小投薬レベルの決定が容易になり、また、用量依存的な方法での薬物標的の検証が容易になる。医薬品に対するインビボ応答の予測に特に有用な手法は、RNA干渉を用いた標的遺伝子の条件付き選択的ノックアウトによるものである。かかる方法で使用するヌクレオチドの効果的な生成は、特許文献8に記載されている。

【0030】

50

本発明の別の態様によれば、Akt3 関連病態の予防、阻害又は治療に有用な候補医薬化合物を選択する方法が提供される。この方法は、試験細胞におけるAkt3 の発現を選択的に低下させるステップと、試験細胞を候補医薬化合物と接触させるステップと、該候補医薬化合物のAkt3 活性の阻害に対する効果を決定するステップと、を含む。

【0031】

本発明のさらなる態様によれば、Akt3 関連病態の予防、阻害又は治療に有用な化合物を選択する方法が提供される。この方法は、インビトロ試験系においてAkt3 の発現を低レベルまで選択的に低下させるステップと、試験系を候補医薬化合物と接触させるステップと、Akt3 活性を阻害する候補医薬化合物を選択するステップと、を含む。

【0032】

本発明のさらなる態様によれば、Akt3 関連病態を有する対象を特定する方法が提供される。この方法は、対象又は対象から得た試料におけるAkt3 の発現レベル又は活性レベルを評価するステップを含む。概して、対象又は対象から得た試料における発現レベル又は活性レベルは、本明細書に記載されるように、対照試料と比較して決定することができる。

【0033】

本発明のさらなる態様によれば、転移性癌又は薬物耐性癌を発症する特定のリスクを有する対象を特定する方法が提供される。この方法は、対象又は対象から得た試料におけるAkt3 の発現レベル又は活性レベルを評価するステップを含み、Akt3 の発現レベル又は活性レベルの増加が、該対象の転移性癌又は薬物耐性癌発症リスクの増加を示す。

【0034】

本発明のさらなる態様によれば、対象における癌幹細胞 (Cancer Stem Cell : CSC) の存在を特定する方法が提供される。この方法は、対象又は対象から得た試料におけるAkt3 の発現レベル又は活性レベルを決定するステップを含み、Akt3 の発現レベル又は活性レベルの増加が、CSC の存在を示す。

【0035】

本発明のさらなる態様によれば、EMT が起きている対象を特定する方法が提供される。この方法は、対象又は対象から得た試料におけるAkt3 の発現レベル又は活性レベルを決定するステップを含み、Akt3 の発現レベル又は活性レベルの増加が、EMT の発生を示す。

【0036】

本発明のさらなる態様によれば、対象における癌関連転帰を予知する方法が提供される。この方法は、対象又は対象から得た試料におけるAkt3 活性又は発現を評価するステップを含む。

【0037】

一部の実施形態では、対照試料対比のAkt3 活性又は発現の増加が、癌治療剤による治療に対する感受性、例えばEMT を阻害する又は逆転する能力の指標となる。薬剤は、本明細書に記載されるように、例えばAkt3 阻害薬又はAx1 阻害薬であってもよい。

【0038】

本発明のさらなる態様によれば、Ax1 活性を特定する方法が提供される。この方法は、対象又は対象から得た試料におけるAkt3 の発現レベル又は活性レベルを決定するステップを含み、Akt3 の活性レベル又は発現レベルの増加はAx1 活性と相関する。

【0039】

予想外にも、Akt3 の発現レベル又は活性レベルがAkt2 の発現レベル又は活性レベルと逆相関することが見出された。本発明の方法及び使用は、対象又は対象から得た試料におけるAkt2 の発現レベル又は活性レベルを評価するステップを含む。Akt2 の発現レベル又は活性レベルの低下は、(i) 対象がAkt3 関連病態を有すること、(ii) 転移性癌又は薬物耐性癌の発症リスクの増加、(iii) 癌幹細胞の存在及び/又は(iv) EMT の発生、を示すことができる。

【0040】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、Akt2とAkt3の両方の発現レベル又は活性レベルが評価される。2つの逆相関するバイオマーカーを評価することにより、アッセイの信頼度を高めることができる

【0041】

一部の実施形態では、Akt3の発現レベルは、Akt3をコードする遺伝子のコピー数を対照試料と比較して決定することにより評価される。ここで、コピー数の増加は、Akt3の発現レベルの増加を示す。コピー数（即ち遺伝子複製イベント）は、当該技術分野において既知の標準技法、例えばJiang他（非特許文献8）に記載されるようなDNAチップを使用して、決定することができる。

【0042】

一部の実施形態では、Akt3（又はAkt2）の発現レベルは、Akt3（又はAkt2）のタンパク質レベル又はmRNAレベルを決定することにより評価される。タンパク質レベル及びmRNAレベルの決定方法は当該技術分野において既知であり、本明細書に記載される。

【0043】

一部の実施形態では、Akt3活性は、Akt3のリン酸化を決定することにより評価され、ここでAkt3のリン酸化は活性Akt3を示す。Akt3リン酸化は、本明細書に記載されるように、セリン472で決定されてもよい。代替又は追加として、リン酸化は、スレオニン305及び/又はチロシン174で決定されてもよい。この番号はAkt3配列を参照する。すなわち、対応するAkt1残基は、それぞれS473、T308及びY176である。

【0044】

理論によって限定されるものではないが、スレオニン305におけるリン酸化は、チロシン174及びセリン472におけるリン酸化及びAkt3の活性化をもたらす核へのAkt3の局在化において重要であると考えられる。一部の実施形態では、Akt3活性は、Akt3タンパク質の細胞内局在性を決定することにより評価され、ここで核における局在が活性Akt3を示す。

【0045】

一部の実施形態では、Akt3活性は、下流標的、例えばEMTに関連する遺伝子の発現レベルを決定することにより評価される。さらなる実施形態では、Akt3キナーゼ活性が、例えばTuomi他（非特許文献9）に記載されるように、基質タンパク質（例えばSNAIL）又はペプチドのリン酸化を決定することにより評価されてもよい。

【0046】

本発明の別の態様によれば、Akt3関連病態を有する対象を治療する方法が提供される。この方法は、Akt3阻害薬又は本発明の第1の態様に係る方法により得られる候補化合物として選択されるか若しくは該候補化合物に由来する医薬化合物に、対象を接触させるステップを含む。

【0047】

本発明のさらなる態様は、対象におけるEMTを阻害する方法を含む。この方法は、Akt3活性の阻害能を有する化合物に対象を接触させるステップを含む。

【0048】

本発明のさらなる態様は、対象における癌幹細胞を阻害する方法を提供する。この方法は、Akt3活性の阻害能を有する化合物に対象を接触させるステップを含む。

【0049】

本発明はまた、癌を有する対象における薬剤耐性を予防又は阻害する方法を提供する。この方法は、Akt3活性の阻害能を有する化合物に対象を接触させるステップを含む。

【0050】

本発明はまた、Akt3関連病態、例えば癌の治療におけるAkt3阻害薬の使用を提供する。

【0051】

10

20

30

40

50

本発明はまた、E M Tの阻害におけるA k t 3阻害薬の使用を提供する。

【0052】

本発明はまた、本明細書に記載されるような治療方法に使用されるA k t 3阻害薬を提供する。

【0053】

本発明のさらなる態様によれば、癌を有する対象における薬剤耐性の予防、阻害又は治療における、A k t 3活性の阻害能を有する化合物の使用が提供される。この方法は、A k t 3活性の阻害能を有する化合物に対象を接触させるステップを含む。

【0054】

本発明における方法により特定されるA k t 3阻害薬又は本発明における方法又は使用において使用されるA k t 3阻害薬は、単剤療法として使用されてもよいし、以下に記載するような他の癌治療との併用療法で使用されてもよい。

【0055】

好適な化学療法剤としては、以下が挙げられる。すなわち、  
 スルホン酸アルキル（例えばブスルファン）等のアルキル化剤、  
 ナイトロジェンマスタード（例えばクロラムブシル、シクロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、ウラムスチン）、エチレンイミン誘導体（例えばチオテパ）、  
 ニトロソウレア（例えばカルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン）、トリアゼン（例えばダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロミド）、  
 白金化合物（例えばシスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、ピコプラチン、オンナプラチン（*onnaplatin*）、テトラプラチン、スプリオプラチン（*sprionaplatin*）、イプロプラチン、クロロ（ジエチレンジアミノ）-白金（II）クロリド、ジクロロ（エチレンジアミノ）-白金（II）、ジアミノ（2-エチルマロナト）白金（II）、（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）マロナト白金（II）、（4-カルボキシフタロ）-（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）白金（II）、（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）-（イソシトラト）白金（II）、（1, 2-ジアミノシクロヘキサン）-*cis*-（ピルバト）白金（II））、  
 抗葉酸剤（例えばメトトレキサート、ペメトレキサド、ラルチトレキサド、トリメトレキサート）等の代謝拮抗薬、  
 ピリミジン類似体（例えばアザシチジン、カペシタビン、シタラビン、エダトレキサート、フロクスウリジン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、トロキサシタビン）、  
 プリン類似体（例えばクラドリビン、クロロデオキシアデノシン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン）、  
 抗腫瘍抗生物質（例えばプレオマイシン、ダクチノマイシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ポルフィロマイシン）、アントラサイクリン（例えばダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン）等の天然生成物、  
 有糸分裂阻害薬（例えばピンカルカロイド、ピンブラスチン、ピンベシル（*vinorelbine*）、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルビン）、  
 酵素（例えばL-アスパラギナーゼ、PEG-L-アスパラギナーゼ）、  
 微小管ポリマー安定剤（例えばタキサン、パクリタキセル、ドセタキセル）、  
 トポイソメラーゼI阻害薬（例えばカンプトテシン、イリノテカン、トポテカン）、  
 トポイソメラーゼII阻害薬（例えばポドフィロトキシン、アムサクリン、エトポシド、テニポシド、ロソキサントロン、アクチノマイシン）、  
 アンドロゲン（例えばフルオキシメステロン、テストラクトン）等のホルモン及びホルモン拮抗薬、  
 抗アンドロゲン薬（例えばピカルタミド、シプロテロン、フルタミド、ニルタミド）、  
 コルチコステロイド（例えばデキサメタゾン、プレドニゾン）、  
 アロマターゼ阻害薬（例えばアミノグルテチミド、アナストロゾール、エキセメスタン

10

20

30

40

50

、ホルメスタン、レトロゾール)、  
 エストロゲン(例えばジエチルスチルベストロール)、  
 抗エストロゲン薬(例えばフルベストラント、ラロキシフェン、タモキシフェン、トレ  
 ミフェン)、  
 黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)作用薬及び拮抗薬(例えばアバレリックス  
 、ブセレリン、ゴセレリン、ロイプロリド、ヒストレリン、デスロレリン、酢酸ナファレ  
 リン、トリプトレリン)、  
 プロゲスチン(例えば酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール)、  
 甲状腺ホルモン(例えばレボチロキシン、リオチロニン)、  
 PKB経路阻害薬(例えばペリホシン、エンザスタウリン塩酸塩、トリシリピン)、  
 P13K阻害薬(例えばセマフォア(semaphore)、SF1126)、  
 MTOR阻害薬(例えばラパマイシン及び類似体)、  
 CDK阻害薬(例えばセリシクリブ、アルボシジブ、7-ヒドロキシスタウロスポリン  
 )、  
 COX-2阻害薬(例えばセレコキシブ)、  
 HDAC阻害薬(例えばトリコスタチンA、スベロイルアニリドヒドロキサム酸、クラ  
 ミドシン)、  
 DNAメチラーゼ阻害薬(例えばテモゾロミド)、  
 その他の薬剤(例えばアルトレタミン、三酸化ヒ素、サリドマイド、レナリドマイド、  
 硝酸ガリウム、レバミゾール、ミトタン、ヒドロキシウレア、オクトレオチド、プロカル  
 バジン、スラミン、光線力学的化合物(メトキサレン、ポルフィマーナトリウム等)、プ  
 ロテアソーム阻害薬(ボルテゾミブ等)、  
 等が挙げられる。

#### 【0056】

分子標的療法剤としては、以下が挙げられる。すなわち、  
 遺伝子療法剤等の機能性治療剤、  
 アンチセンス療法剤、  
 チロシンキナーゼ阻害薬(例えばエルロチニブ塩酸塩、ゲフィチニブ、メシル酸イマチ  
 ニブ、セマクサニブ)、  
 Raf阻害薬(例えばソラフェニブ)、  
 レチノイド、レキシノイド等の遺伝子発現修飾物質(例えばアダバレン、ベキサロテン  
 、trans-レチノイン酸、9-cis-レチノイン酸、N-(4-ヒドロキシフェニ  
 ル)レチンアミド)、  
 モノクローナル抗体(例えばアレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、イブリツ  
 モマブチウキセタン、リツキシマブ、トラスツズマブ)、免疫毒素(例えばゲムツズマブ  
 オゾガマイシン)、放射性免疫複合体(例えばI-トシツモマブ(tositumoba  
 b))等の表現型特異的療法剤、  
 癌ワクチン、  
 等が挙げられる。

#### 【0057】

生物学的療法剤としては、以下が挙げられる。すなわち、  
 インターフェロン(例えばインターフェロン-[ ]2a、インターフェロン-[ ]  
 2b)、  
 インターロイキン(例えばアルデスロイキン、デニロイキンジフチトクス、オブレルベ  
 キン)、  
 等が挙げられる。Ax1阻害剤としては、例えば、1-(6,7-ジヒドロ-5H-ベン  
 ゴ[6,7]シクロヘプタ[1,2-c]ピリダジン-3-イル)-N3-(7-(  
 S)-ピロリジン-1-イル)-6,7,8,9-テトラヒドロ-5H-ベンゾ[7]ア  
 ヌレン-2-イル)-1H-1,2,4-トリアゾール-3,5-ジアミン(BGB32  
 4/R428)、CH5451098(Roche)、並びに特許文献9、特許文献10

及び特許文献 11 (参照により本明細書に援用される) に記載される A x 1 阻害薬等が挙げられる。

【0058】

癌細胞に対してする作用することが意図されるこれらの薬剤に加え、抗癌療法には、保護剤又は補助剤の使用が含まれる。該保護剤又は補助剤には、

細胞保護剤 (例えばアミホスチン、デクスラゾキサン)、

ホスホン酸塩 (例えばパミドロネート、ゾレドロン酸)、

刺激因子 (例えばエポエチン、ダルベポエチン、フィルグラスチム、PEG-フィルグラスチム、サルグラモスチム)、

等が含まれる。

10

【0059】

多くの併用化学療法レジメン、例えば、カルボプラチン/パクリタキセル、カペシタピン/ドセタキセル、フルオロウラシル (fluorouracil) /レバミゾール、フルオロウラシル (fluorouracil) /ロイコボリン、メトトレキサート/ロイコボリン、及びトラスツズマブ/パクリタキセルの組み合わせであって、単独か、又はカルボプラチンなどとさらに併用するものが、当該技術分野で知られている。

【0060】

本発明のさらなる態様によれば、Akt3 関連病態の治療対象として、患者、好ましくはヒトの患者を選択する方法が提供される。この方法は、Akt3 の活性又は発現が上昇した患者を特定するステップと、特定された患者を治療対象として選択するステップと、を含む。患者は、本明細書に記載されるような本発明の方法により特定されてよい。

20

【0061】

好ましくは、Akt3 関連病態は癌である。癌は、以下の癌の 1 つ以上であってよい。

すなわち、白血病 (例えば急性白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病 (骨髄芽球性白血病、前骨髄球性白血病、骨髄単球性白血病、単球性白血病、赤白血病、骨髄異形成症候群等)、慢性白血病 (慢性骨髄性 (顆粒性) 白血病、慢性リンパ性白血病、ヘアリー細胞白血病等))、真性赤血球増加症、リンパ腫 (ホジキン病、非ホジキン病等)、多発性骨髄腫 (くすぶり型多発性骨髄腫、非分泌性骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、形質細胞性白血病、孤立性形質細胞腫、髄外性形質細胞腫等)、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症、良性単クローン性免疫グロブリン血症、重鎖病、骨及び結合組織の肉腫 (骨肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性巨細胞腫、骨線維肉腫、脊索腫、骨膜性肉腫、軟部組織肉腫、血管肉腫 (angiosarcoma) (血管肉腫 (hemangiosarcoma))、線維肉腫、カボジ肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、転移性癌、神経鞘腫、横紋筋肉腫、滑膜肉腫等)、脳腫瘍 (神経膠腫、星状細胞腫、脳幹神経膠腫、上衣腫、乏突起膠腫、非神経膠腫、聴神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、髄芽腫、髄膜腫、松果体細胞腫、松果体芽細胞腫、原発性脳リンパ腫等)、乳癌 (腺癌、小葉 (小細胞) 癌、腺管内癌、髄様乳癌、粘液性乳癌、管状乳癌、乳頭癌、原発性癌、パジェット病、炎症性乳癌等)、副腎癌 (褐色細胞腫、副腎皮質癌等)、甲状腺癌 (乳頭様又は濾胞性甲状腺癌、甲状腺髄様癌、未分化甲状腺癌等)、膵癌 (インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、ピポーマ、ソマトスタチン産生腫瘍、カルチノイド又は膵島細胞腫等)、下垂体癌 (クッシング病、プロラクチン産生腫瘍、先端巨大症、尿崩症等)、眼癌 (眼メラノーマ (例えば虹彩メラノーマ、脈絡膜メラノーマ、毛様体メラノーマ)、網膜芽細胞腫等)、腔癌 (扁平上皮癌、腺癌、黒色腫)、外陰癌 (扁平上皮癌、黒色腫、腺癌、基底細胞癌、肉腫、パジェット病等)、子宮頸癌 (扁平上皮癌、腺癌等)、子宮癌 (子宮内膜癌、子宮肉腫等)、卵巣癌 (卵巣上皮癌、境界型腫瘍、胚細胞腫瘍、間質性腫瘍等)、食道癌 (扁平上皮癌、腺癌、腺様嚢胞癌、粘表皮癌、腺扁平上皮癌、肉腫、黒色腫、形質細胞腫、いぼ状癌、燕麦細胞 (小細胞) 癌等)、胃癌 (腺癌、菌状 (ポリープ状)、潰瘍性、表在拡大型、びまん性散在性、悪性リンパ腫、脂肪肉腫、線維肉腫、癌肉腫等)、結腸癌、直腸癌、肝癌 (肝細胞癌、肝芽腫等)、胆嚢癌 (腺癌等)、胆管癌 (乳頭状、結節性、びまん性等)、肺癌 (非小細胞肺癌、扁平

30

40

50

上皮癌（類表皮癌）、腺癌、大細胞癌、小細胞肺癌等）、精巣癌（生殖細胞腫瘍、セミノーマ、未分化、古典的（典型的）、精母細胞性、非セミノーム性、胚性癌腫、奇形癌腫、絨毛癌（ヨークザック腫瘍）等）、前立腺癌（腺癌、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫等）、性器癌（陰茎癌等）、口腔癌（扁平上皮癌等）、基底癌、唾液腺癌（腺癌、粘表皮癌、腺様嚢胞癌等）、咽頭癌（扁平上皮癌、いぼ状等）、皮膚癌（基底細胞癌、扁平上皮癌及び黒色腫、表在拡大黒色腫、結節型黒色腫、黒子型悪性黒色腫、末端性黒子性黒色腫等）、腎癌（腎細胞癌、腺癌、副腎腫、線維肉腫、移行細胞癌（腎盂及びノ又は子宮）等）、ウィルムス腫瘍、膀胱癌（移行上皮癌、扁平上皮癌、腺癌、癌肉腫等）のうちの1以上であってよい。加えて、癌には、粘液肉腫、骨肉腫、内皮肉腫、リンパ管内皮肉腫、中皮腫、滑膜腫、血管芽細胞腫、上皮癌、嚢胞腺癌、気管支原性肺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌等が含まれる。好ましくは、癌は、乳癌、黒色腫、前立腺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、肺癌又は神経膠腫から選択される。より好ましくは、癌は転移性乳癌である。

10

20

30

40

50

#### 【0062】

転移性癌の治療は、原発腫瘍がどこに位置するかに依存する。例えば乳癌が肺に広がる場合、それは依然として乳癌であり、治療は、乳房の範囲内の転移性癌原発部位により決定され、それが現在肺にあるということによって決定されるのではない。時間全体の約5パーセントは転移性癌が発見されるが、原発腫瘍は特定することができない。このような転移性癌の治療は、その原発部位でなく、その位置に左右される。転移性癌は、原発腫瘍の組織（分かる場合）により命名される。例えば、脳に広がった乳癌は、脳への転移性乳癌と呼ばれる。

#### 【0063】

本発明の方法により特定又は選択された患者は、治療されてもよいし、治療対象として選択されてもよい。例えば、Akt3発現が原発腫瘍で上方制御されることが示された場合、これを用いて転移確率の増加を推測することができる。この情報は、治療の選択肢、即ちより積極的な外科的抗癌治療、化学療法的抗癌治療又は放射線療法的抗癌治療、例えば根治的乳房切除術に向けた指針として使用することができる。一部の実施形態では、治療は、任意選択で本明細書に記載される治療剤又は当該技術分野において公知のさらなる治療剤と組み合わせた、Akt3及びノ又はAx1阻害薬の投与を含む。好ましくは、Ax1阻害薬はBGB324/R428である。

#### 【0064】

本発明はまた、EMTの阻害薬に対して感受性を示す細胞株を提供する。この細胞株は、EMTを妨げるには不十分なAkt3発現レベルを有する。好ましくは、細胞株はヒト細胞株である。

#### 【0065】

本発明はまた、Akt3活性を阻害する化合物を特定する方法を提供する。この方法は、本発明に係る細胞株由来の細胞を試験化合物に接触させるステップと、細胞におけるAkt3活性の阻害を決定するステップと、を含む。

#### 【0066】

本発明の一態様は、対象における上皮間葉転換（Epithelial - to - Mesenchymal Transition: EMT）の発生を検出するためのバイオマーカーとしてのAkt3の使用に関する。一部の実施形態では、EMTの発生は、Akt3の発現及びノ又は活性化の増加により示される。

#### 【0067】

遠隔部位への転移は、固形腫瘍による死亡の最も一般的な原因である（Gupta 2006, Sporn 1996）。これを達成するため、腫瘍細胞は上皮の拘束を捨て、結合複合体を再定義し、浸潤運動性を獲得することにより、基底膜境界を突破する。次に、このような転移性細胞はリンパ及び血行循環へと血管内侵入し、身体の高隔部位に広がる。これらの転移性細胞のごく一部が毛細血管壁を通過して血管外遊出することに成功し、まれな例では異組織間質を定着させる（Weinberg他）。この悪性の過程は、上皮間葉転換（EMT）、即ち、原腸形成及び器官形成の間に上皮細胞が一過性に間葉表現型

をとり、単細胞が浸潤性の移動により上皮層から離れることが可能となる発生プログラムによって促進される (Hall, 1985; Thierry, 2002)。EMTプログラムは、Twist、Snail、Slug、Zeb2等の転写調節因子の発現を誘導するモルフォゲンシグナル伝達経路のコンテクストによる活性化により惹起され、これらの転写調節因子により、結合複合体タンパク質の発現が変化する (Thierry and Sleeman, 2006)。EMT遺伝子発現プロファイルは、表現型シフト、E-カドヘリン及びサイトケラチンの抑制と、ビメンチン及びN-カドヘリンの誘導を反映する (Weinberg他、2007)。

【0068】

用語「マーカー」又は「バイオマーカー」は、本明細書では、上皮間葉転換 (EMT) が起こったときに、細胞又は哺乳動物に由来する試料中におけるその発現が変化し又は調節される (例えば上方制御又は下方制御される) 遺伝子又はタンパク質を指して使用される。バイオマーカーがタンパク質である場合、発現の調節又は変化は、種々の翻訳後修飾を介した調節を包含する。

10

【0069】

翻訳後修飾は、タンパク質分解切断によるか又は1つ以上のアミノ酸に対する修飾基の付加によりタンパク質の特性を変化させる共有結合性のプロセシングイベントである。一般的な翻訳後修飾には、リン酸化、アセチル化、メチル化、アシル化、グリコシル化、GPIアンカー、ユビキチン化などが含まれる。かかる修飾及び検出方法のレビューは、非特許文献10を参照することができる。

20

【0070】

また、本明細書には、Ax1の発現及び/又は活性化を検出するためのバイオマーカーとしてのAkt3の使用が提供される。ここで、Ax1の発現及び/又は活性化の増加は、Akt3の発現及び/又は活性化の増加により示される。

【0071】

用語「発現」は、遺伝子のDNA鋳型を転写して対応するmRNAを産生し、このmRNAを翻訳して対応する遺伝子産物 (即ち、ペプチド、ポリペプチド又はタンパク質) を産生することと、翻訳後修飾を受けた場合もあり得る1以上の形態のタンパク質の「発現」とを指す。

【0072】

遺伝子発現等の発現レベルの検出は、当該技術分野において公知の方法のいずれか1つにより、特にマイクロアレイ解析、ウエスタンブロットティング又はQPCR等のPCR技法により行われてよい。発現の変化はまた、本明細書に記載されるようにELISA、PET、SELDI-TOF MS等の方法を用いて、また、2Dゲル電気泳動などのさらなる解析手法を用いて、試料のタンパク質含量を分析することによって検出されてもよい。このような技法は、選択的な翻訳後修飾された形態のタンパク質の形で発現の変化を検出するのに特に有用であり得る。

30

【0073】

好適な試料としては、限定はされないが、組織試料 (生検、血液、尿、口腔内擦過物等)、血清、血漿、組織培養上清試料等が挙げられる。一実施形態において、遺伝子発現は好ましくは、腫瘍細胞 (乳癌、肺癌、胃癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎癌、膵癌、子宮癌、肝癌、膀胱癌、子宮内膜癌、前立腺癌等) 及び白血病に由来する細胞又はリンパ球等の血球細胞、好ましくはPBMCなどの末梢リンパ球に由来する細胞において検出される。

40

【0074】

血清中、詳細には患者の血漿試料中のタンパク質の検出では、試料が採取され、本明細書に記載されるように、フローサイトメトリー、ELISA、PET、SELDI-TOF MSなどのタンパク質解析手法に供される。

【0075】

好ましい一実施形態において、この方法は、前記試料からRNAを抽出するステップと、QPCRにより遺伝子発現を検出するステップと、を含む。

50

## 【0076】

一実施形態では、タンパク質産物を例えばウエスタンブロットにより検出することにより、遺伝子発現が検出される。

## 【0077】

本発明のさらなる態様は、試料において上皮間葉転換（EMT）の発生を検出する方法を提供する。前記方法は、細胞、細胞群、動物モデル又はヒトから単離された試料における対照試料対比のAkt3の発現レベル又は活性化レベルを決定するステップを含み、ここで対照試料対比のAkt3の発現レベル又は活性化レベルの増加が、上皮間葉転換（EMT）の発生の指標となる。

## 【0078】

本発明のさらなる態様は、上皮間葉転換（EMT）を阻害又は逆転する能力を有する薬剤を特定する方法に関する。この方法は、細胞、細胞群又は動物モデルに前記薬剤を投与するステップと、Akt3の活性化及び/又は発現をモニタリングするステップと、を含む。

## 【0079】

一実施形態において、この方法は、  
 (i) ヒトにではなく、細胞、細胞群又は動物モデルに薬剤を投与するステップと、  
 (ii) 処理済み及び未処理の細胞又は動物モデルに由来する試料において、Akt3発現及び/又はAkt3活性化を測定するステップと、  
 (iii) 上皮間葉転換（EMT）を阻害又は逆転する能力の指標として、未処理試料と比較して、処理済み試料におけるAkt3の発現及び/又は活性化の増加を検出するステップと、  
 を含む。

## 【0080】

一実施形態では、動物モデルはヒトではない。

## 【0081】

一実施形態では、Akt3の発現レベルは、Akt3をコードする遺伝子のコピー数を対照試料と比較して決定することにより評価され、ここでコピー数の増加は、Akt3の発現レベルの増加を示す。

## 【0082】

一実施形態では、Akt3の発現レベルは、Akt3のタンパク質レベル又はmRNAレベルを決定することにより評価される。

## 【0083】

一実施形態では、Akt3活性は、Akt3のリン酸化を決定することにより評価され、ここでAkt3のリン酸化はAkt3活性を示す。Akt3リン酸化は、本明細書に記載されるように、セリン472で決定されてよい。代替又は追加として、リン酸化は、スレオニン305及び/又はチロシン174で決定されてもよい。

## 【0084】

一実施形態では、Akt3活性は、Akt3タンパク質の細胞内局在性を決定することにより評価され、ここで核における局在は活性Akt3を示す。

## 【0085】

一実施形態では、Akt3活性は、下流標的、例えばEMTに関連する遺伝子の発現レベルを決定することにより評価される。さらなる実施形態において、Akt3キナーゼ活性が、例えば非特許文献9に記載されるように、基質タンパク質（例えばSNAIL）又はペプチドのリン酸化を決定することにより評価されてもよい。

## 【0086】

Akt3

Akt3（PKBとしても知られる）は、ヒトにおいて2つのアイソフォーム、即ちアイソフォーム1及びアイソフォーム2で存在する。「カノニカル」な配列であるアイソフォーム1（Q9Y23、バージョン1）の配列は、以下のとおりである。

10

20

30

40

50

## 【化 1】

## 配列番号1

MSDVTIVKEGWVQKRGEYIKNWRPRYFLLKTDGSFIGYKEKPQDVDLPYPLN  
 NFSVAKCQLMKTERPKPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVDTPEERE EWTEAIQAV  
 ADRLQRQEEERMNCSPTSQIDNIGEEEMDASTTHHKRKT MNDFDYLKLLGKG  
 TFGKVILVREKASGKYYAMKILKKEVIIAKDEVAHTL TESRVLKNTRHPFLTS  
 LKYSFQTKDRLCFVMEYVNGGELFFHLSRERVFSEDRTRFYGAEIVSALDY LH  
 SGKIVYRDLKLENLMLDKDGHKIDTDFGLCKEGITDAATMKTFCGTPEYLAPE  
 VLEDNDYGRAVDWWGLGVVMMYEMMCGRLPFYNQDHEKLFELILMEDIKFP  
 RTLSSDAKSLLSGLLIKDPNKRLGGGPDDAKEIMRHSFFSGVNWQDVYDKKL  
 VPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQTITITPPEKYDEDGMDCMDNERRPHFPQFS  
 YSASGRE

10

20

## 【 0 0 8 7 】

アイソフォーム 2 は以下の配列を有する。

## 【化 2】

## 配列番号2

MSDVTIVKEGWVQKRGEYIKNWRPRYFLLKTDGSFIGYKEKPQDVDLPYPLN  
 NFSVAKCQLMKTERPKPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVDTPEERE EWTEAIQAV  
 ADRLQRQEEERMNCSPTSQIDNIGEEEMDASTTHHKRKT MNDFDYLKLLGKG  
 TFGKVILVREKASGKYYAMKILKKEVIIAKDEVAHTL TESRVLKNTRHPFLTS  
 LKYSFQTKDRLCFVMEYVNGGELFFHLSRERVFSEDRTRFYGAEIVSALDY LH  
 SGKIVYRDLKLENLMLDKDGHKIDTDFGLCKEGITDAATMKTFCGTPEYLAPE  
 VLEDNDYGRAVDWWGLGVVMMYEMMCGRLPFYNQDHEKLFELILMEDIKFP  
 RTLSSDAKSLLSGLLIKDPNKRLGGGPDDAKEIMRHSFFSGVNWQDVYDKKL  
 VPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQTITITPPEKCQQSDCGMLGNWKK

30

40

## 【 0 0 8 8 】

遺伝子 / タンパク質マーカーの発現変化の測定

遺伝子及びタンパク質の発現レベルは、複数の異なる技法を用いて決定されてよい。

## 【 0 0 8 9 】

( a ) R N A レベルにおいて

遺伝子発現は R N A レベルで検出することができる。 R N A は、例えば、酸性フェノー

50

ルノグアニジンイソチオシアネート抽出 (RNAzol B; Biogenesis)、RNeasy RNA調製キット (Qiagen) 又はPAXgene (PreAnalytix、スイス) を使用することを含むRNA抽出技法を用いて細胞から抽出されてよい。リボ核酸ハイブリダイゼーションを利用する典型的なアッセイフォーマットとしては、核ランオンアッセイ、RT-PCR、RNAアーゼ保護アッセイ (非特許文献11)、ノーザンブロッティング及びインサイチュハイブリダイゼーションが挙げられる。遺伝子発現はまた、以下に記載するようにマイクロアレイ解析によっても検出することができる。

#### 【0090】

ノーザンブロッティングは、初めに変性条件下でのアガロースゲルにおける電気泳動によってRNA試料をサイズで分離する。次にRNAを膜に移し、標識プローブと架橋及びハイブリダイズさせる。非同位体又は高比活性放射標識プローブを、ランダムプライミングされるか、ニックトランスレーションされるか、又はPCR生成されたDNAプローブ、インビトロ転写RNAプローブ、及びオリゴヌクレオチドを含め、使用することができる。加えて、一部のみ相同性を有する配列 (例えば、異なる種由来のcDNA又はエクソンを含み得るゲノムDNA断片) を、プローブとして使用してもよい。

10

#### 【0091】

ヌクレアーゼ保護アッセイ (リボヌクレアーゼ保護アッセイ及びS1ヌクレアーゼアッセイの両方を含む) は、特異的なmRNAを検出及び定量化するための極めて感度の高い方法を提供する。NPAの基本は、アンチセンスプローブ (放射性標識又は非同位体) とRNA試料との溶液ハイブリダイゼーションである。ハイブリダイゼーション後、一本鎖のハイブリダイズされていないプローブ及びRNAがヌクレアーゼによって分解される。残りの保護された断片がアクリルアミドゲルで分離される。NPAは、いくつかのRNA種の同時検出を可能にする。

20

#### 【0092】

インサイチュハイブリダイゼーション (ISH) は、細胞又は組織において特定のmRNAを局在化させるための強力な多目的なツールである。細胞又は組織内でプローブのハイブリダイゼーションが行われる。手順全体にわたり細胞構造が維持されるため、ISHは、組織試料内のmRNAの局在に関する情報を提供する。

#### 【0093】

この手順は、中性緩衝ホルマリン中に試料を固定し、組織をパラフィン包埋することから始まる。次に試料を薄切片にスライスし、顕微鏡スライドにマウントする。或いは、組織は切片化し、凍結し、パラホルムアルデヒドに後固定してもよい。一連の洗浄により切片を脱ろう及び再水和した後、プロテイナーゼK消化を実施してプローブの接触し易さを高め、次に標識プローブを試料切片とハイブリダイズさせる。スライド上で乾燥させた液膜により放射標識プローブを視覚化し、一方、非同位体標識プローブを好都合には比色試薬又は蛍光試薬により検出する。この後者の検出方法は、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH) の基礎である。

30

#### 【0094】

用いることのできる検出方法としては、放射性標識、酵素標識、化学発光標識、蛍光標識及び他の好適な標識が挙げられる。

40

#### 【0095】

典型的には、RT-PCRを使用してRNA標的を増幅する。このプロセスでは、逆転写酵素を使用してRNAを相補DNA (cDNA) に変換し、次にこれを増幅して検出を促進することができる。相対定量RT-PCRには、内部標準を目的の遺伝子と同時に増幅することが含まれる。内部標準を使用して試料を正規化する。正規化後、全試料にわたって特定のmRNAの相対存在量の直接比較を行うことができる。一般に用いられる内部標準としては、例えば、GAPDH、HPRT、アクチン及びシクロフィリンが挙げられる。

#### 【0096】

多くのDNA増幅方法が知られており、そのほとんどは酵素連鎖反応 (ポリメラーゼ連

50

鎖反応、リガーゼ連鎖反応、又は自家持続配列複製法など)に頼るものか、又はそれがクローニングされたベクターの全て又は一部の複製によるものである。

【0097】

多くの標的及びシグナル増幅法(TAS)が、文献、例えば非特許文献12及び非特許文献13におけるこれらの方法の総論的レビューに記載されている。

【0098】

PCRは、とりわけ特許文献12及び特許文献13に記載される核酸増幅法である。PCRを使用することにより、診断のコンテキストにおいてあらゆる既知の核酸を増幅することができる(非特許文献14)。自家持続配列複製法(3SR)はTASの変化形であり、これには、逐次的な逆転写酵素(RT)ラウンドを介した核酸鋳型の等温増幅、酵素カクテル及び適切なオリゴヌクレオチドプライマーにより媒介されるポリメラーゼ及びヌクレアーゼ活性が関わる(非特許文献15)。ライゲーション増幅反応又はライゲーション増幅系は、DNAリガーゼと、標的鎖毎に2つずつの、4つのオリゴヌクレオチドとを使用する。この技法は、非特許文献16により記載されている。Qレプリカーゼ法では、非特許文献17により記載されるように、一本鎖RNAを複製するバクテリオファージQ用のRNAレプリカーゼを使用して標的DNAを増幅する。

10

【0099】

定量的PCR(Q-PCR)は、試料中における転写物の相対量の決定を可能にする技法である。QPCRの好適な実施方法は、本明細書に記載される。

【0100】

本発明では選択的増幅法を利用することができる。例えば、ローリングサークル増幅(非特許文献18)は市販の増幅法であり(RCAT(商標))、これはDNAポリメラーゼによって駆動され、等温条件下で線形的或いは幾何学的動力学で環状オリゴヌクレオチドプローブを複製することができる。さらなる技法の鎖置換増幅(SDA;非特許文献19)は、特定の標的に固有の特異的に定義された配列から始める。

20

【0101】

本明細書で特定されるAkt3又はAkt2の発現の検出に好適なプローブは、好都合には、検査キットの形で好適な容器にパッケージ化されてもよい。かかるキットでは、プローブが固体支持体に結合していてもよく、ここでキットの設計のアッセイフォーマットにはかかる結合が必要である。キットはまた、プローブする試料の処理、プローブと試料中の核酸とのハイブリダイズに好適な試薬、対照試薬、説明書なども含んでよい。好適なキットは、例えば、QPCR反応用のプライマー又はFISHの実施用の標識プローブを含んでよい。

30

【0102】

(b)ポリペプチドレベルにおいて

遺伝子又はタンパク質発現の変化はまた、Akt3又はAkt2遺伝子によりコードされるポリペプチドを測定することによっても検出されてよい。これは、Akt3又はAkt2遺伝子によりコードされるポリペプチドに結合する分子を使用して達成することができる。タンパク質の存在を検出するため直接、或いは間接的にポリペプチドと結合する好適な分子/薬剤には、ペプチド及びタンパク質、例えば抗体などの天然に存在する分子が含まれ、又はそれは合成分子であってもよい。

40

【0103】

Akt3又はAkt2遺伝子又はタンパク質に対する抗体は商業的供給元から得られてもよく、又は当業者が熟知している技法を用いて得られてもよい。一実施形態において、発現の変化が、翻訳後修飾された形態のタンパク質バイオマーカーの変化の発現によって現れる場合、それらの種々の形態に特異的な抗体が使用されてよい。

【0104】

抗体の産生方法は当業者に公知である。ポリクローナル抗体が望ましい場合、選択された哺乳動物(例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等)が、あるポリペプチドのエピトープを有する免疫原性ポリペプチドで免疫される。免疫動物の血清が採取され、公知の手順

50

に従い処理される。ポリペプチドのエピトープに対するポリクローナル抗体を含有する血清が他の抗原に対する抗体を含有する場合、そのポリクローナル抗体は、イムノアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。ポリクローナル抗血清の産生及び処理技法は当該技術分野において公知である。より広い免疫原性反応を生じさせるため、ポリペプチド又はその断片を、動物又はヒトにおける免疫原として使用される別のポリペプチドとハプテン化してもよい。

【0105】

ポリペプチドにおけるエピトープに対するモノクローナル抗体は、当業者が容易に生成することもできる。ハイブリドーマによりモノクローナル抗体を作製するための一般的な手法が周知されている。細胞融合により、また、腫瘍原性DNAによるBリンパ球の直接形質転換、又はエプスタイン・バーウイルスによるトランスフェクションなどの他の技法によっても、不死化抗体産生細胞株を作成することができる。本発明のポリペプチドにおけるエピトープに対して産生されるモノクローナル抗体のパネルを、様々な特性；即ち、アイソタイプ及びエピトープ親和性に関してスクリーニングすることができる。

10

【0106】

代替的な技法には、ファージディスプレイライブラリをスクリーニングすることが含まれ、ここで例えばファージは、多種多様の相補性決定領域(CDR)を有するその外被の表面上にscFv断片を発現する。この技法は当該技術分野において周知されている。

【0107】

この発明の目的上、用語「抗体」は、反する旨が明記されない限り、全抗体、又は標的抗原に対するその結合活性を保持する全抗体の断片を含む。かかる断片には、Fv、F(ab')<sub>2</sub>及びF(ab')<sub>2</sub>断片、並びに一本鎖抗体(scFv)が含まれる。さらに、抗体及びその断片は、例えば特許文献14に記載されるようなヒト化抗体であってもよい。例えば、モノクローナル及びポリクローナル抗体、組換え抗体、抗体のタンパク質分解性及び組換え断片(Fab、Fv、scFv、ダイアボディ)、シングルドメイン抗体(VHH、sdAb、ナノボディ、IgNAR、VNAR)、抗体と無関係なタンパク質であって抗体様特異的結合を有するように構成されているもの等がある。例を以下に挙げる(名称とベースとなっているものを列挙する)。

20

Affibody プロテインA、Zドメイン 6kDa

Affitin Sac7d(スルホロプス・アシドカルダリウス(Sulfobus acidocaldarius)由来) 7kDa

30

Anticalin リポカリン 20kDa

DARPin アンキリン反復モチーフ 14kDa

Fynomer Fyn、SH3ドメイン 7kDa

Kunitzドメインペプチド 様々なプロテアーゼ阻害薬 6kDa

モノボディ フィブロネクチン

【0108】

上記に記載したような免疫プロット法などの標準的な実験技術を使用して、同じ細胞集団における未処置細胞と比較したときのAkt3又はAkt2活性レベルの変化を検出することができる。

40

【0109】

遺伝子発現はまた、ポリペプチドの翻訳後プロセッシング又は核酸の転写後修飾の変化を検出することによって決定されてもよい。例えば、ポリペプチドの示差的リン酸化、ポリペプチドの切断又はRNAの選択的スプライシングなどを測定してよい。ポリペプチドなどの遺伝子産物の発現、並びにその翻訳後修飾のレベルは、2Dポリアクリルアミドゲル電気泳動などの有標のタンパク質アッセイ又は技術を使用して検出されてよい。

【0110】

Akt3又はAkt2発現の検出には、抗体が用いられてよい。該検出は、(a)抗体を提供するステップと、(b)抗体抗原複合体の形成を可能にする条件下で生体試料を該抗体と共にインキュベートするステップと、(c)該抗体を含む抗体抗原複合体が形成さ

50

れるかどうかを判定するステップと、を含む方法により行われてよい。

【0111】

好適な試料としては、脳、乳房、卵巣、肺、結腸、膵臓、精巣、肝臓、筋肉及び骨組織などの組織の抽出物、又はかかる組織に由来する腫瘍性成長からの抽出物が挙げられる。他の好適な例には、血液又は尿試料が含まれる。

【0112】

A k t 3 又は A k t 2 タンパク質に特異的に結合する抗体を、当業者に公知の診断又は予知方法及びキットに使用して、体液又は組織における A k t 3 又は A k t 2 タンパク質の発現を検出又は定量化することができる。これらの試験結果を使用して、癌の発生又は再発及び他の細胞運動性又は細胞生存介在性疾患を診断又は予測することができ、又は薬物投薬量及び治療の有効性を評価することができる。

10

【0113】

抗体は、当該技術分野において公知の任意の方法により、免疫特異的結合についてアッセイすることができる。用いることのできるイムノアッセイとしては、限定はされないが、ウエスタンブロット、免疫組織化学、ラジオイムノアッセイ、E L I S A、サンドイッチイムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ及びプロテインAイムノアッセイなどの技法を用いる競合及び非競合アッセイシステムが挙げられる。かかるアッセイは当該技術分野では常法である（例えば、非特許文献20（参照により全体として本明細書に援用される）を参照のこと）。

20

【0114】

本発明において使用される抗体は、好ましくは固体支持体に結合され、及び/又はキットとして好適な容器に、好適な試薬、対照標準、説明書などと共にパッケージ化される。

【0115】

他の方法としては、限定はされないが2D-PAGEが挙げられ、しかしながらこれは、大規模スクリーニングにはそれほど好適でない。最新の技法には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析法(MALDI-TOF MS)が含まれる。MALDI-TOF分析では、複合混合物中のタンパク質が固体金属マトリックスに固着され、パルスレーザービームで脱離されることにより気相イオンが生成され、この気相イオンがフィールドフリー飛行管を横断し、次にその質量依存速度に応じて分離される。個々のタンパク質及びペプチドは、情報科学ツールを使用してタンパク質及びペプチド配列データベースを検索することにより特定されてよい。表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型MS(SELDI-TOF MS)は親和性ベースのMS法であり、タンパク質が化学修飾固体表面に選択的に吸着され、不純物が洗浄により取り除かれ、エネルギー吸収マトリックスが加えられ、タンパク質がレーザー脱離質量分析により特定される。

30

【0116】

SELDI-TOF-MSは、特定のタンパク質のインタクトなタンパク質又は断片のいずれの出現/消失の検出にも使用することができる。加えて、化学基の付加/除去によって質量に差が生じるため、SELDI-TOF-MSはタンパク質の翻訳後修飾の検出にも使用することができる。従って単一の残基のリン酸化が、リン酸基に起因して80Daの質量シフトを引き起こし得る。翻訳後修飾に帰することのできる分子量のデータベースは、インターネット上で自由にアクセス可能である(<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home?avgmass=all>)。さらに、特定のポリペプチドを、SELDI-TOF-MSを使用する親和性ベースの手法により、翻訳後修飾された形態のタンパク質を特異的に認識する抗体、又はあらゆる形態のタンパク質を同等に十分に認識することのできる抗体を用いて捕捉することができる。

40

【0117】

アレイ

アレイ技術並びにそれに関連する様々な技術及び応用は、概して数多くのテキストブック及び文献に記載されている。それらとしては、非特許文献21、非特許文献22、非特

50

許文献 23、非特許文献 24、非特許文献 25、非特許文献 26、非特許文献 27、及びまた様々なワールドワイドウェブサイトが挙げられる。

【0118】

アレイ技術は、概して「1回の実験で1つの遺伝子」に基づき作業する結果としてスループットが低くなり、且つ遺伝子機能の「全体像」を理解することができないという分子生物学の従来方法の欠点を解消する。現在、アレイ技術の主な用途としては、配列（遺伝子/遺伝子突然変異）の特定及び遺伝子の発現レベル（存在量）の決定が挙げられる。遺伝子発現プロファイリングは、アレイ技術を任意選択でプロテオミクス技術と組み合わせて利用してよい（非特許文献 28、非特許文献 29、非特許文献 30）。アレイ技術の他の用途もまた当該技術分野において公知である；例えば、遺伝子発見、癌研究（非特許文献 31、非特許文献 32、非特許文献 33）、SNP解析（非特許文献 34）、創薬、ファーマコゲノミクス、疾患診断（例えば、マイクロフルイディクス装置を利用する：非特許文献 35）、毒物学（非特許文献 36、非特許文献 37）及びトキシコゲノミクス（機能ゲノミクスと分子毒性学との掛け合わせ）。トキシコゲノミクスの目標は、毒物に対する毒性反応と、かかる毒物に曝露された対象の遺伝子プロファイルの変化との間の相関を見出すことである（非特許文献 38）。

10

【0119】

本発明との関連においてアレイ技術は、例えば、Akt3又はAkt2タンパク質又はmRNAの発現解析に使用することができる。一実施形態では、アレイ技術を使用してAkt3活性に対する候補化合物の効果をアッセイしてよい。

20

【0120】

一般には、任意のライブラリ又は一群の試料が、ライブラリ又は群のメンバーを空間的に分けることにより、秩序立った方法でアレイに並べられてよい。配列するのに好適なライブラリの例としては、とりわけ、核酸ライブラリ（DNA、cDNA、オリゴヌクレオチド等のライブラリを含む）、ペプチド、ポリペプチド及びタンパク質ライブラリ、並びに任意の分子を含むライブラリ、例えばリガンドライブラリが挙げられる。従って、本文書で「ライブラリ」に言及する場合、文脈上別段の指示がない限り、かかる言及は、アレイの形態のライブラリに対する言及を含むものと解釈されなければならない。

【0121】

試料（例えばライブラリのメンバー）は、概して、試料の拡散及び混合を制限するため固相、好ましくは固体基板に固定又は不動化される。好ましい実施形態において、DNA結合リガンドのライブラリが調製されてもよい。詳細には、このライブラリは、膜及び多孔質基板、例えばプラスチック及びガラスを含めた略平面固相に不動化されてよい。さらに、試料は好ましくは、索引付け（即ち、特定の試料への参照又はアクセス）が促進されるような方法で並べられる。典型的には試料は格子状編成のスポットとして加えられる。一般的なアッセイシステムを本目的に適合させることができる。例えば、アレイはマイクロプレートの表面に、あるウェルに複数の試料を含んで、又は各ウェルに単一の試料を含んで不動化されてもよい。さらに、固体基板は、膜、例えばニトロセルロース又はナイロン膜（例えばプロッティング実験で使用される膜）であってもよい。代替的な基板としては、ガラス、又はシリカをベースとする基板が挙げられる。従って、試料は当該技術分野において公知の任意の好適な方法により、例えば、電荷相互作用によるか、又は壁若しくはウェル底面、又は膜の表面との化学的カップリングにより、不動化される。

30

40

【0122】

他の配列及び固定手段、例えば、ピペッティング、ドロップタッチ（drop-touch）、圧電手段、インクジェット及びバブルジェット（登録商標）技術、静電印加等が用いられてもよい。シリコンベースのチップの場合、試料をチップ上に配列及び固定するためにフォトリソグラフィが利用されてもよい。

【0123】

試料は、固体基板上に「スポットティングする」ことにより並べられてもよい；これは、手作業で、又はロボティクスを利用して試料を堆積させることにより行われてよい。一般

50

に、アレイはマクロアレイ又はマイクロアレイとして記載することができ、違いは試料スポットのサイズである。マクロアレイは、典型的には約300ミクロン又はそれ以上の試料スポットサイズを含み、既存のゲル及びプロットスキャナにより容易に画像化することができる。マイクロアレイにおける試料スポットサイズは、典型的には直径200ミクロン未満であり、これらのアレイは、通常、数千個のスポットを含む。従って、マイクロアレイには、特注の必要があり得る特殊なロボティクス及び画像化機器が必要となり得る。機器類については、概して非特許文献39によるレビューに記載される。

#### 【0124】

不働化したDNA分子ライブラリの作製技術は、当該技術分野で記載がなされている。概して、ほとんどの先行技術の方法が、一本鎖核酸分子ライブラリをどのように合成するか、例えばマスキング技術を使用して固体基板上的様々な個別の位置に様々な並び替えた配列を作り上げることについて記載した。特許文献15（この内容は参照により本明細書に援用される）は、極めて大規模な集積化技術に基づきシリコン基板に不働化されたDNAアレイを作製する改良された方法を記載する。詳細には、特許文献15は、基板上的空間的に定義された位置に特定のプローブセットを合成する「タイリング」と呼ばれる戦略について記載しており、これは本発明の不働化されたDNAライブラリの作製に用いられたい。特許文献15はまた、同様に用いられ得る先行技術に関する文献も提供する。

10

#### 【0125】

ペプチド（又はペプチド模倣体）のアレイはまた、表面上で、アレイにおける別々の所定位置に個別の各ライブラリメンバー（例えばユニークなペプチド配列）を置く方法で合成することもできる。各ライブラリメンバーのアイデンティティは、アレイにおけるその空間的位置によって決定される。アレイにおいて、所定の分子（例えば標的又はプローブ）と反応性のライブラリメンバーとの間の結合相互作用が起こる位置が決定され、それにより空間的位置に基づいて反応性のライブラリメンバーの配列が特定される。これらの方法は、特許文献16、特許文献17、特許文献18、非特許文献40及び非特許文献41に記載される。

20

#### 【0126】

検出を支援するため、標的及びプローブは、任意の容易に検出可能なレポーター、例えば、蛍光、生物発光、リン光、放射性等のレポーターで標識されてよい。かかるレポーター、その検出、標的/プローブとのカップリング等は、本文書の他の部分で考察される。プローブ及び標的の標識はまた、非特許文献42にも開示されている。

30

#### 【0127】

DNAアレイの具体的な例としては、以下が挙げられる：  
フォーマットI：プローブcDNA（約500～約5,000塩基長）が、ロボットスポットティングを使用してガラスなどの固体表面に不働化され、別々に、或いは混合物中において一組の標的に曝露される。この方法は、スタンフォード大学（Stanford University）で開発されたものとして広く認められている（非特許文献43）。

#### 【0128】

フォーマットII：オリゴヌクレオチドのアレイ（約20～約25merオリゴ）又はペプチド核酸（PNA）プローブが、インサイチュ（オンチップ）で、或いは従来の合成と、続くオンチップ不働化により合成される。標識された試料DNAにアレイが曝露され、ハイブリダイズされ、相補配列のアイデンティティ/存在量が決定される。かかるDNAチップはAffymetrix, Inc.によりGeneChip（登録商標）の商標で販売されている。

40

#### 【0129】

いくつかの市販のマイクロアレイフォーマットの例が、例えば、非特許文献44に詳説されている。

#### 【0130】

データ解析もまた、アレイが関わる実験の重要な一部分である。マイクロアレイ実験の生データは典型的には画像であって、これは遺伝子発現行列に変換する必要があり、遺伝

50

子発現行列は、行が例えば遺伝子を表し、列が例えば様々な試料、例えば組織又は実験条件を表すテーブルであり、各細胞における数値が、例えば特定の試料中における特定の遺伝子の発現レベルを特徴付ける。根底にある生物学的過程に関する任意の情報が抽出されるべき場合には、これらの行列をさらに分析する必要がある。データ解析方法（教師付き及び教師なしデータ解析並びにバイオインフォマティクス手法を含む）は、非特許文献45に開示されている。

【0131】

上記に開示されるように、タンパク質、ポリペプチド等もまたアレイに不動化されてよい。例えば、タンパク質チップを使用したプロテオームのマイクロアレイ解析において抗体が使用されている（非特許文献46）。ポリペプチドアレイについては、例えば、非特許文献47にレビューされる。

10

【0132】

医薬組成物

さらなる態様は、薬学的に許容可能な希釈剤、賦形剤又は担体と混合された、上述の方法のいずれかにより特定されるAkt3阻害薬又は他の薬剤を含む医薬組成物に関する。

【0133】

本発明に係る使用に関して、薬剤は、化合物又はその生理学的に許容可能な塩、エステル若しくは他の生理学的に機能性の誘導体を、1つ以上の薬学的に許容可能な担体及び任意選択で他の治療用及び/又は予防用成分と共に含む医薬製剤として提供されてもよい。担体は、製剤の他の成分と適合性を有し、且つそのレシピエントにとって有害でないという意味で、許容されるものでなければならない。医薬組成物は、ヒト及び獣医学におけるヒト使用又は動物使用に向けたものであってよい。

20

【0134】

本明細書に記載される種々の異なる形態の医薬組成物に好適なかかる賦形剤の例は、非特許文献48を参照することができる。

【0135】

治療用途に許容可能な担体又は希釈剤は薬学の技術分野で周知されており、例えば、非特許文献49に記載されている。

【0136】

好適な担体の例としては、ラクトース、デンプン、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトールなどが挙げられる。好適な希釈剤の例としては、エタノール、グリセロール及び水が挙げられる。

30

【0137】

医薬担体、賦形剤又は希釈剤の選択は、意図する投与経路及び標準的な薬務に関連して選択することができる。医薬組成物は、担体、賦形剤又は希釈剤として、又はそれに加えて、任意の好適な結合剤、潤滑剤、懸濁剤、コーティング剤、可溶化剤、緩衝剤、香味剤、表面活性剤、増粘剤、保存剤（抗酸化剤を含む）など、及び製剤を意図するレシピエントの血液と等張性にする目的で含まれる物質を含んでよい。

【0138】

好適な結合剤の例としては、デンプン、ゼラチン、天然糖、例えばグルコース、無水ラクトース、易流動性ラクトース、ラクトース、コーンシロップ、天然及び合成ゴム、例えば、アカシア、トラガカント又はアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース及びポリエチレングリコールが挙げられる。

40

【0139】

好適な潤滑剤の例としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0140】

保存剤、安定剤、色素及びさらには香味剤が、医薬組成物中に提供されてもよい。保存剤の例としては、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸及びp-ヒドロキシ安息香酸エステル

50

が挙げられる。抗酸化剤及び懸濁剤もまた用いられてよい。

【0141】

医薬製剤には、経口、局所（経皮、頬側及び舌下を含む）、直腸内又は非経口（皮下、皮内、筋肉内及び静脈内を含む）、例えば吸入による経鼻及び肺内投与に好適なものが含まれる。製剤は、適切な場合には、好都合には個別の投薬量単位で提供されてもよく、薬学の技術分野において公知の方法のいずれによって調製されてもよい。全ての方法が、活性化合物を液体担体又は微粉化された固体担体又は両方と集合させて、次に、必要であれば、生成物を所望の製剤に成形するステップを含む。

【0142】

担体が固体である場合の経口投与に好適な医薬製剤は、最も好ましくは、所定量の活性薬剤を各々含有するポラス、カプセル又は錠剤などの単位用量製剤として提供される。錠剤は圧縮又は成形によって、任意選択で1つ以上の補助成分と共に作製されてよい。圧縮錠剤は、好適な機械において、粉末又は顆粒などの易流動性の形態の活性薬剤を、任意選択で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、界面活性剤又は分散剤と混合して圧縮することにより調製されてよい。成形錠剤は、活性薬剤を不活性な液体希釈剤と共に成形することにより作製されてよい。錠剤は任意選択でコーティングが施されてもよく、コーティングなしの場合、任意選択で割線が設けられてもよい。カプセルは、活性薬剤を単独で、或いは1つ以上の補助成分と混合してカプセルシェルに充填し、次にそれを常法で密封することにより調製されてよい。カシエ剤はカプセルと類似しており、活性薬剤が任意の補助成分と共にオブラート囊（rice paper envelope）に密封される。活性薬剤はまた、分散性顆粒として製剤化されてもよく、これは例えば投与前に水中に懸濁されてもよいし、食物の上に振り掛けられてもよい。顆粒は、例えばサシェに包装されてもよい。担体が液体である場合の経口投与に好適な製剤は、水性又は非水性液体中の溶液又は懸濁液として提供されてもよいし、水中油型液体エマルジョンとして提供されてもよい。

10

20

【0143】

経口投与用の製剤には、放出制御剤形、例えば、活性薬剤が適切な放出制御マトリックス中に製剤化される錠剤、又は好適な放出制御膜でコーティングされる錠剤が含まれる。かかる製剤は、特に予防用途に好都合であり得る。

【0144】

担体が固体である場合の直腸投与に好適な医薬製剤は、最も好ましくは単位用量坐薬として提供される。好適な担体としては、カカオ脂及び当該技術分野で一般的に使用される他の材料が挙げられる。坐薬は、好都合には、活性薬剤を軟化又は溶融させた担体と混合し、続いて冷却及び型で成形することにより形成されてよい。

30

【0145】

非経口投与に好適な医薬製剤としては、水性又は油性媒体中にある活性薬剤の無菌溶液又は懸濁液が挙げられる。

【0146】

注射用製剤はポラス注射又は持続注入用に適合されてよい。かかる製剤は、好都合には単位用量又は複数用量容器に提供され、そうした容器は製剤の導入後、使用のため必要となるまで密封される。或いは、活性薬剤は粉末形態であってもよく、これは使用前に無菌パイロジェンフリー水などの好適な媒体で構成される。

40

【0147】

活性化合物はまた長時間作用型デポ製剤として製剤化されてもよく、これは、筋肉内注射によるか、又は例えば皮下若しくは筋内への植え込みにより投与されてよい。デポ製剤としては、例えば、好適な高分子若しくは疎水性材料、又はイオン交換樹脂を挙げることができる。かかる長時間作用型製剤は、予防用途に特に好都合である。

【0148】

頬側口腔からの肺内投与に好適な製剤は、活性化合物を含有し、且つ望ましくは0.5~7ミクロンの範囲の直径を有する粒子がレシピエントの気管支樹に送達されるようにし

50

て提供される。

【0149】

1つの可能性として、かかる製剤は微粉碎された粉末の形態であり、これは好都合には、好適には例えばゼラチンの、吸入装置で使用される穿孔可能なカプセルで提供されてもよく、或いは、活性薬剤、好適な液体又は気体推進剤及び任意選択で他の成分、例えば界面活性剤及び/又は固体希釈剤を含む自己推進型製剤として提供されてもよい。好適な液体推進剤としてはプロパン及びクロロフルオロカーボンが挙げられ、好適な気体推進剤としては二酸化炭素が挙げられる。活性薬剤が溶液又は懸濁液の液滴の形態で分注される自己推進型製剤もまた用いられてよい。

【0150】

かかる自己推進型製剤は、当該技術分野において公知のものと類似しており、確立された手順により調製されてよい。好適には自己推進型製剤は、所望の噴霧特性を有する手動で操作可能か或いは自動で機能するバルブを備えた容器に提供される；有利には、バルブは、その動作毎に一定量、例えば25～100マイクロリットルを送達する定量式である。

【0151】

さらなる可能性として、活性薬剤は、アトマイザー又はネブライザーで使用される溶液又は懸濁液の形態であってもよく、これにより加速気流又は超音波攪拌を用いて吸入用の微細液滴ミストが作られる。

【0152】

経鼻投与に好適な製剤としては、上記に肺内投与に関して記載されるものと略同様の製剤が挙げられる。分注時、かかる製剤は望ましくは、鼻腔に滞留させることが可能であるように、10～200ミクロンの範囲の粒径を有しなければならない；これは、必要に応じて、好適な粒度の粉末を使用することによるか又は適切なバルブを選択することにより達成されてよい。他の好適な製剤としては、鼻に密接して保持された容器から鼻道を介する急速吸入による投与用の20～500ミクロンの範囲の粒径を有する粗末、及び水性又は油性溶液又は懸濁液中0.2～5% w/vの活性薬剤を含む点鼻液が挙げられる。

【0153】

薬学的に許容可能な担体は当業者に周知されており、限定はされないが、0.1M、好ましくは0.05Mリン酸緩衝液又は0.8%生理食塩水が挙げられる。加えて、かかる薬学的に許容可能な担体は、水性又は非水性溶液、懸濁液、及びエマルジョンであってもよい。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射用有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体としては、水、アルコール溶液/水溶液、エマルジョン又は懸濁液、例えば生理食塩水及び緩衝媒体が挙げられる。非経口ピヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、リンガーデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液又は固定油が挙げられる。例えば、抗菌薬、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガスなどの保存剤及び他の添加剤もまた存在してよい。

【0154】

局所製剤に好適な製剤は、例えばゲル、クリーム又は軟膏として提供されてよい。かかる製剤は、例えば創傷又は潰瘍に対し、その創傷又は潰瘍の表面に直接塗り広げるか、又は好適な支持体、例えば包帯、ガーゼ、メッシュなどに付着させ、それを処置範囲に、そこを覆うように当てて適用されてよい。

【0155】

液体又は粉末製剤が提供されてもまたよく、これは、処置部位、例えば創傷又は潰瘍に直接噴霧又は散布することができる。或いは、包帯、ガーゼ、メッシュなどの担体に製剤を噴霧又は散布して、次にそれを処置部位に当ててもよい。

【0156】

本発明のさらなる態様によれば、上記に記載したような医薬品又は獣医用組成物の調製方法が提供され、この方法は、活性化合物を担体と例えば混合することにより集合させる

10

20

30

40

50

ステップを含む。

【0157】

一般に、製剤は、均一且つ均質に活性薬剤を液体担体又は微粉化された固体担体又は両方と集合させて、次に必要であれば生成物を成形することにより調製される。本発明は、薬剤を薬学的又は獣医学的に許容可能な担体又はビヒクルと集合させるステップを含む、医薬組成物の調製方法にまで及ぶ。

【0158】

投与

本発明の医薬組成物は、直腸、経鼻、気管支内、局所（頬側及び舌下を含む）、腔内又は非経口（皮下、筋肉内、静脈内、動脈内及び皮内を含む）、腹腔内又は髄腔内投与に適合されてよい。好ましくは、製剤は経口投与製剤である。製剤は好都合には、単位剤形で、即ち、単位用量を含有するか、又は単位用量の複数単位若しくは部分単位を含有する個別の部分量の形態で提供されてよい。例として、製剤は錠剤及び徐放カプセルの形態であってもよく、薬学の技術分野において公知の任意の方法により調製されてよい。

10

【0159】

本発明における経口投与用製剤は、例えば、所定量の活性薬剤を含有するカプセル、ゼラチンカプセル、ドロップ、カシェ、丸薬、錠剤などの個別単位として提供されてもよいし、粉末又は顆粒として提供されてもよいし、水性液体又は非水性液体中の活性薬剤の溶液、エマルション又は懸濁液として提供されてもよいし、水中油型液体エマルション又は油中水型液体エマルションとして提供されてもよいし、ポーラスとして提供されてもよい。

20

【0160】

経口投与用組成物（例えば錠剤及びカプセル）に関して、用語「許容可能な担体」は、一般的な賦形剤等の媒体を含み、例えば結合剤（例えばシロップ、アカシア、ゼラチン、ソルビトール、トラガカント、ポリビニルピロリドン（ポビドン）、メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピル-メチルセルロース、スクロース、デンプン）、充填剤及び担体（例えばコーンスターチ、ゼラチン、ラクトース、スクロース、微結晶性セルロース、カオリン、マンニトール、リン酸二カルシウム、塩化ナトリウム、アルギン酸）、潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸ナトリウム及び他のステアリン酸金属塩、ステアリン酸グリセロール、ステアリン酸、シリコーン液、タルク、ワックス、油、コロイドケイ酸）を含む。ペパーミント、冬緑油、チェリーフレーバーなどの香味剤もまた使用することができる。剤形を容易に識別可能にするため、着色剤を添加することが望ましいこともある。錠剤はまた、当該技術分野において公知の方法によりコーティングされてもよい。

30

【0161】

錠剤は圧縮又は成形によって、任意選択で1つ以上の補助成分と共に作製されてよい。圧縮錠剤は、好適な機械において、粉末又は顆粒などの易流動性の形態の活性薬剤を、任意選択で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、保存剤、界面活性剤又は分散剤と混合して圧縮することにより調製されてよい。成形錠剤は、好適な機械において、不活性な液体希釈剤で湿らせた粉末状化合物の混合物を成形することにより作製されてよい。錠剤は任意選択でコーティングが施されるか、又は割線が付けられてもよく、活性薬剤の遅延放出又は制御放出を提供するように製剤化されてもよい。

40

【0162】

経口投与に好適な他の製剤としては、香味基剤（通常はスクロース及びアカシア又はトラガカント）中に活性薬剤を含むロゼンジ、不活性基剤（例えばゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシア）中に活性薬剤を含むトローチ、好適な液体担体中に活性薬剤を含む洗口剤等が挙げられる。

【0163】

他の投与形態としては溶液又はエマルションが挙げられ、該溶液又はエマルジョンは、

50

静脈内、動脈内、髄腔内、皮下、皮内、腹腔内又は筋内に注入されてよく、無菌の溶液又は滅菌可能な溶液から調製される。注射用形態は、典型的には用量当たり10～1000mg、好ましくは10～250mgの活性成分を含有する。

【0164】

本発明の医薬組成物はまた、坐薬、ペッサリー、懸濁液、エマルション、ローション、軟膏、クリーム、ゲル、噴霧、溶液又は散粉剤の形態であってもよい。

【0165】

代替的な経皮投与手段は、皮膚パッチの使用によるものである。例えば、ポリエチレングリコール又は流動パラフィンの水性エマルションからなるクリーム中に活性成分を添合することができる。活性成分はまた、1～10重量%の濃度で、白ろう又は白色軟パラフィン基剤からなる軟膏中に、必要に応じてかかる安定化剤及び保存剤と共に添合することもできる。

10

【0166】

投薬量

当業者は、必要以上に実験を行うことなく、対象に投与する本組成物の1つの適切な用量を容易に決定することができる。典型的には、医師が、個々の患者に最適な実際の投薬量を決定し、それは、用いる特定の薬剤の活性、当該の薬剤の代謝安定性及び作用時間、年齢、体重、全般的な健康、性別、食事、投与の方式及び時間、排泄速度、併用薬物、特定の病態の重症度、及び個々に行われる治療法を含む様々な要因に依存する。本明細書に開示される投薬量は、平均的なケースの例示である。当然ながら、より高い又はより低い投薬量範囲が有利となる個々の場合があってもよく、それらは本発明の範囲内である。

20

【0167】

この発明に従えば、薬剤の有効量を投与することによりAkt3が阻害され得る。当然ながら、この投薬量は薬剤投与のタイプに従いさらに修正されてよい。例えば、救急治療の「有効量」を達成するには、非経口投与が好ましい。水中又は通常生理食塩水中5%デキストロースの化合物、又は好適な賦形剤を含む同様の製剤の静脈内注入が最も効果的であるが、筋肉内ボラス注射もまた有用である。典型的には、非経口用量は、血漿中薬物濃度をキナーゼの阻害に有効な濃度に維持する方法において約0.01～約100mg/kg、好ましくは0.1～20mg/kgであってよい。薬剤は、約0.4～約400mg/kg/日の総1日用量を達成するレベルで、1日1～4回投与されてもよい。治療上有効な活性薬剤の正確な量、及びかかる薬剤が最良に投与される経路は、当業者によって、血中薬剤濃度と治療効果を得るために必要な濃度とを比較することにより容易に決定される。

30

【0168】

この発明の薬剤はまた、本明細書に開示される治療指標の1つ以上を達成するのに十分な薬物濃度となるような方法で患者に経口投与されてよい。典型的には、薬剤を含有する医薬組成物は、患者の病態に合致する方法で約0.1～約50mg/kgの経口用量で投与される。好ましくは、経口用量は約0.5～約20mg/kgであってよい。

【0169】

この発明の薬剤は、所与の薬理効果を得るために必要な薬剤の濃度を決定するため、いくつかの生物学的アッセイのうち1つで試験されてよい。

40

【0170】

パーツキット

本発明の別の態様は、上述の方法のいずれかで使用される、Akt3阻害薬、抗Akt3抗体、Akt3用の核酸プローブ又はAkt3用の少なくとも1つのQPCRプライマーを含むキットに関する。

【0171】

診断及び予知

本発明はまた、特にAkt3阻害薬で治療されている個体における、増殖活性により特徴付けられる疾患の診断又は予知におけるバイオマーカーとしてのAkt3の使用にも関

50

する。

【0172】

本明細書で使用されるとき、用語「予知方法」は、疾患、詳細には癌と診断されたヒト又は動物の疾患の進行に関する予測を可能にする方法を意味する。より具体的には、関心が持たれる癌としては、乳癌、肺癌、胃癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、腎癌、膵癌、子宮癌、肝癌、膀胱癌、子宮内膜癌及び前立腺癌並びに白血病が含まれる。

【0173】

用語「診断方法」は、本明細書で使用されるとき、ヒト又は動物における又はそれに関する癌の存在又はタイプの決定を可能にする方法を意味する。好適には、マーカーにより、Akt3阻害薬による治療の奏功を評価することが可能である。上記に考察したように、好適な診断は、例えばQPCRプライマー、FISHプローブなど、本明細書で特定されるような遺伝子のいずれかを対象とするプローブを含む。

10

【0174】

用語「予知方法」は、本明細書で使用されるとき、対象が特定の薬剤/レジメンによる治療に対して感受性又は応答性を示す可能性の判定を可能にする方法を意味する。かかる予知方法は、特定の治療レジメンの起こり得る転帰に関する情報、例えば、対象が前記治療に応答する可能性、及び/又は特定の治療レジメンの範囲内で個体をどの程度積極的に治療すべきか、及び/又は個体を放射線療法/化学療法などの従来の治療法でどの程度積極的に治療すべきかに関する情報を提供する。従って本明細書に記載される予知方法には、オーダーメイド医療の分野で高い適用性がある。

20

【0175】

従って好ましい一実施形態は、オーダーメイド医療適用における上記に記載したようなバイオマーカーの使用に関する。

【0176】

好ましい一実施形態において、オーダーメイド医療適用は、対象がAkt3又はAx1阻害薬による治療に対して感受性又は応答性を示すかどうかを判定するためである。

【0177】

好ましい一実施形態において、オーダーメイド医療適用は、対象が特に転移性癌に罹患し易いかどうかを判定するためである。

【0178】

本発明の別の態様は、対象がAkt3又はAx1阻害薬による治療に対して感受性を示すかどうかを判定するための予知方法に関し、前記方法は、前記対象における上皮間葉転換(EMT)の発生を検出するステップを含む。

30

【0179】

本発明の別の態様は、対象がAkt3又はAx1阻害薬による治療に対して感受性又は応答性を示すかどうかを判定するための、予知用薬剤におけるバイオマーカーとしてのAkt3の使用に関する。

【0180】

本発明の別の態様は、対象が特に転移性癌に罹患し易いかどうかを判定するための予知方法に関し、前記方法は、前記対象における上皮間葉転換(EMT)の発生を検出するステップを含む。

40

【0181】

本明細書全体を通じ、好ましくは本明細書に記載される方法はインビトロ又はエキソピボで実施される。

【0182】

ここで、限定ではなく例示として、添付の図面を参照することにより本発明をさらに詳細に説明する。本開示の提供により、当業者には多くの等価な改変例及び変形例が明らかとなるであろう。従って、記載される本発明の例示的实施形態は、例示であり、限定するものではないと考えられる。記載される実施形態に対し、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく様々な変更を加えることができる。本明細書に引用される全ての文献は、参

50

照によって明示的に援用される。

【図面の簡単な説明】

【0183】

【図1】EMTを起こしている乳房上皮細胞に対する実験結果を示す免疫プロットの写真である。

【図2】乳癌細胞がEMTを起こすとAkt3が上方制御され、それらの変化がAx1依存性であることを示す写真である。

【図3】トリプルネガティブ乳癌細胞においてAx1阻害に応答してAkt3は下方制御され、Akt1は下方制御されないことを示す写真である。

【図4】EMT誘導乳癌細胞におけるAktアイソフォームのレベルを決定する免疫プロットの写真である。

【図5】乳癌細胞及び乳癌生検においてAkt3のmRNAはEMT及び幹細胞遺伝子と相関し、Akt1及びAkt2のmRNAは相関しないことを示す図である。

【図6】乳房上皮細胞においてAkt3発現の抑制によりEMT及びCSC形質を逆転することが可能であることを示す写真である。

【図7】Aktアイソフォームの活性に関するゲル実験の写真である。

【図8】乳癌細胞の成長試験の写真である。

【図9】乳癌細胞のマンモスフェア培養物の写真及びグラフである。

【図10】構成的に活性なAkt3(myr-Akt3)はEMTの誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さないことを示す写真である。

【図11】乳房上皮細胞において構成的に活性なAkt3(MyrAkt3)はEMT及びCSC形質の誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さないことを示す写真である。

【図12】構成的に活性なAkt3を発現する細胞はマンモスフェアでの成長能を有を示すが、構成的に活性なAkt1を発現する細胞はそれを示さないことを示すグラフである。

【図13】構成的に活性なAkt3を発現する細胞は、構成的に活性なAkt1を発現する細胞と比べてはるかに高い腫瘍形成能を示すことを示す表である。

【図14】乳癌細胞の成長試験の写真である。

【図15】乳癌細胞をAkt阻害薬で処理した実験で得たゲルの写真である。

【図16】Aktアイソフォームの活性を調べる実験で得たゲルの写真である。

【図17】構成的に活性なAkt3は細胞核に局在化するが、構成的に活性なAkt1は局在化しないことを示す写真である。

【図18】Akt3及びSnailが核画分に見られることを示す写真である。

【図19】培養トリプルネガティブ乳癌細胞及び初代ヒト乳腺上皮細胞においてAkt3が核に局在化することを示す写真である。

【図20】Ax1キナーゼ発現を抑制すると、Akt3のEMT誘導核局在化が低下することを示す写真である。

【図21】Ax1キナーゼ活性を阻害するとAkt3の核局在化が阻害されることを示す写真及びグラフである。

【図22】Akt1及びAkt3キナーゼがSnailタンパク質を直接リン酸化する能力を有することを示す写真である。

【図23】MCF7、WM115及びLNCaP細胞におけるホスホ-Akt3の特異的検出を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0184】

実施例1 乳房上皮細胞がEMTを起こすと、Akt3が上方制御される一方、Akt2が下方制御され、これらの変化はAx1依存性である。

正常乳房上皮細胞のモデルとして使用した、乳房上皮細胞株であるMCF10A細胞(American Type Culture Collection)を、5%ウマ血

10

20

30

40

50

清、20 ng/mL EGF、0.5 μg/mL ヒドロコルチゾン、100 ng/mL コレラ毒素、10 μg/mL インスリン、100 U/mL ペニシリン及び100 μg/mL ストレプトマイシン (Sigma - Aldrich) を補足したDMEM/F12培地中で培養した。この実験では、MCF10A細胞を、EMT誘導因子Slugの発現を駆動するレトロウイルスベクター(「Slug」)及びAx1の発現をノックダウンするshRNAの発現を駆動するレトロウイルスベクター(「Ax12」)(非特許文献50に記載されるベクター)と共に使用した。簡潔に言えば、レトロウイルスベクターRRI-Red/L087 (GenBank: EU424173)のLTRにおける修飾ヒトU6プロモーターからAx1 shRNAを発現させて、一方、BC012910 (Open Biosystems)のヒトSlug cDNA配列をCRU5-IRES-GFPレトロウイルスベクターにクローニングした(非特許文献51)。MCF10A細胞に、レトロウイルスベクター「Slug」単独、或いは「Slug」と「Ax12」との両方のレトロウイルスベクターの組み合わせのいずれかを形質導入した。対照細胞にはいずれのベクターも形質導入しなかった。対照及び形質導入細胞集団から、プロテアーゼ阻害薬(13457200; Roche)及び0.2 mM PMSFを補足したRIPA緩衝液(1% (vol/vol) Nonidet P-40 (Nonidet P-40)、0.5% (wt/vol) デオキシコール酸ナトリウム、及び0.1% (wt/vol) SDS含有PBS)中に溶解することによってタンパク質抽出物を調製した。Bradfordアッセイ(BioRad)によりタンパク質濃度を決定し、SDS/PAGEの各ウェルに50 μgの総タンパク量を負荷した。標準手順に従いゲルの泳動及び免疫ブロット法を実施した。使用した抗体は、マウスモノクローナル抗ヒトAx1 (MAB154; R&D Systems)、Akt1 (Cell Signaling #2967)、Akt2 (Cell Signaling #3063)、Akt3 (Millipore #1586912)、pAkt (Ser473, Cell Signaling 2971)、-アクチン (Sigma - Aldrich)、pERK (Cell Signaling #4695)であった。pAkt抗体はAkt1、Akt2及びAkt3と、それらのAkt1のSer473に対応するアミノ酸がリン酸化されたときに反応する。

#### 【0185】

これらの実験の結果を図1に示す。予想どおり、EMTを起こしている細胞でpAktは増加し(対照、Slugレーンを比較のこと)、この増加は、Ax1のノックダウンによりEMTがブロックされるとブロックされる(対照、Slug、Ax12-Slugレーンを比較のこと)。予想外にも、これらの乳房上皮細胞がEMTを起こすと、Akt3発現が強力に上方制御される。対照的に、Akt1発現は一定のままであり、Akt2は下方制御される。EMT誘導細胞におけるAx1のブロック(Ax12-Slugレーン)はまた、Aktアイソフォームのスイッチングもブロックし、Akt2からAkt3への発現の変化がAx1に依存することを示している。活性化(リン酸化)Akt (pAkt)はAkt3レベルに従い、Akt1及び2レベルに従うのではないことに留意されたく、これらの細胞における主要なホスホ-AktアイソフォームがAkt3であり得ることが示唆される。これは実施例4で確認する。

#### 【0186】

実施例2 形質転換乳癌細胞がEMTを起こすとAkt3が上方制御され、このような変化はAx1依存性である

実験的に形質転換された乳癌細胞株であるHMLE及びHMLER細胞(非特許文献52)を、5 ng/mL EGF、10 μg/mL インスリン、0.5 μg/mL ヒドロコルチゾン、100 U/mL ペニシリン及び100 μg/mL ストレプトマイシン (Sigma - Aldrich) を補足したMEGM (Lonza) / DMEMF12 (Sigma - Aldrich)培地中で培養した。細胞に、実施例1に記載されるようにレトロウイルスベクター「Slug」、「Ax12」、対照ルシフェラーゼshRNA (ctr)、又は「Slug」と「Ax12」との両方のレトロウイルスベクターの組み合

わせのいずれかを形質導入した。タンパク質抽出物の調製、ゲルの泳動、免疫プロット法及び膜のプローブを、実施例 1 に記載するように実施した。

【0187】

これらの実験の結果を図 2 に示す。実施例 1 で分かるように、これらの乳房上皮細胞が EMT を起こすと Akt3 発現は強力に上方制御される（対照、Slug レーンを比較のこと）。HMLE 細胞（左）：活性化（リン酸化）Akt (pAkt) は Akt3 レベルに従い、Akt1 レベルに従うのではない（対照及び Slug レーンを比較のこと）。HMLER 細胞（右）：EMT 誘導細胞における Ax1 のブロック (Slug - Ax12 レーン) はまた、Akt3 発現もブロックし、Akt3 発現レベルが Ax1 に依存することを示している。

10

【0188】

実施例 3 トリプルネガティブ乳癌細胞における Ax1 阻害に应答して Akt3 は下方制御され、Akt1 は下方制御されない

トリプルネガティブ乳癌細胞株である MDA - MB231 細胞 (American Type Culture Collection) を、10% ウシ胎仔血清、100 U / mL ペニシリン及び 100 µg / mL ストレプトマイシン (Sigma - Aldrich) を補足した F12 培地中で培養した。実施例 1 及び実施例 2 に記載されるように、細胞に、shAx1 (「Ax12」) 又は対照ルシフェラーゼ shRNA (「対照」) を発現するレトロウイルスコンストラクトを形質導入した。タンパク質抽出物の調製、ゲルの泳動、免疫プロット法及び膜のプローブを、実施例 1 及び 2 に記載するように実施した。

20

【0189】

結果は図 3 に示す。MDA - MB231 細胞は Ax1、Akt1 及び Akt3 を発現する（「対照」レーンを参照のこと）。実施例 1 及び 2 に示されるデータと一致して、Ax1 (「Ax12」) のブロックが Akt3 発現もブロックし、しかしながら Akt1 発現に対して有意な効果は有さず、Akt3 発現レベルは Ax1 に依存するが、Akt1 発現レベルは依存しないことを示している。

【0190】

実施例 4 Akt3 は、EMT を起こすように (TGF 処理により) 誘導された MCF10A 細胞における主要な P - Akt アイソフォームである

30

MCF10A 細胞を TGF (10 ng / ml) で 4 日間処理した。次に、NP40 細胞溶解緩衝液 (40 mM HEPES NaOH、75 mM NaCl、2 mM EDTA、1% NP40、ホスファターゼ阻害薬カクテル錠剤、プロテアーゼ阻害薬カクテル錠剤 (Roche)) を使用して細胞を溶解させ、プレートからこそぎ取り、4 で 30 分間回転させ、13000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。免疫沈降のため、Akt1 (2H10、Cell Signaling #2967)、Akt2 (Cell Signaling #3063)、Akt3 (Millipore #07-383) 及び対照 IgG (Abcam) 抗体 (1 µg / ライセート) をライセートに添加し、4 で一晩インキュベートした。翌日、溶解緩衝液中の予めブロックしたプロテイン G ビーズ (GE Healthcare) を加え、4 で 1 時間結合させた。次にビーズを 3 回洗淨し (20 mM トリス - HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% NP40)、SDS - PAGE 負荷緩衝液中で煮沸することによりタンパク質を溶出させた。SDS / PAGE の泳動及び免疫プロット法を標準手順に従い実施した。pAktS473 (Cell Signaling #9271) 及び PAN - Akt (Cell Signaling #9272) 抗体を使用して膜をプローブした。

40

【0191】

図 4 に示すこれらのデータは、ホスホ - Akt3 が EMT 誘導 MCF10A 細胞における主要な pAkt アイソフォームであることを実証している。ホスホ - Akt1 は検出されなかった。先行研究では Akt の効果が Akt1 に起因したことが示唆されている点を考えると、これは予想外であった。

50

## 【 0 1 9 2 】

実施例 5 乳癌細胞及び乳癌生検において A k t 3 mRNA は E M T 及び幹細胞遺伝子と相関するが、A k t 1 及び 2 mRNA は相関しない

乳癌細胞株及びヒト乳癌生検試料（癌、正常）の発現解析を、既報且つ G E O に提出済みの A f f y m e t r i x データから記載どおり実施した（非特許文献 5 3）。正相関はプラス（+）記号で示され、灰色が濃いほど強い正相関を示し、信頼度が高いほど数が多いアスタリスク（\*）で示される。同様に、負相関はマイナス（-）記号で示され、灰色が濃いほど強い負相関を示し、信頼度が高いほど数が多いアスタリスク（\*）で示される。

## 【 0 1 9 3 】

10

## 【表 1】

遺伝子	上皮マーカー	間葉マーカー	EMT 媒介因子	癌幹細胞マーカー
SOX2			X	X
SNAI1			X	
CD44			X	X
SEMA3C		X?		
TWIST1			X	
ZEB1			X	
CDH2		X		
ID4				X
VIM		X		
ZEB1			X	
AXL			X	X
SNAI2			X	
PLXNA2				X

20

30

40

## 【 0 1 9 4 】

結果は図 5 に示す。乳癌細胞株及び乳癌生検において A k t 3 は E M T 及び幹細胞マーカーとの強い相関を示し、A k t 1 及び A k t 2 はそれを示さない。

50

## 【0195】

実施例6 Akt3をノックダウンすると、乳房上皮細胞のEMT及びCSC形質を逆転することができる

MCF10A細胞及びMDA-MB231細胞を、実施例1及び3に記載されるように培養した。MCF10aに、実施例1に記載されるようにEMT駆動因子「Slug」(Slug/対照)を形質導入した。HiPerFectトランスフェクション試薬(Qiagen)を使用して製造者のプロトコルに従いAkt3のsiRNA媒介サイレンシングを行い、細胞を2~3日間培養した。Akt3に対するアニーリングしたsiRNA(「siAKT3」、HsAkt3\_\_2 HP)と、GAPDH(「対照」、Hs\_\_GAPDH\_\_3)とを60nMの終濃度で使用した(全てQiagenからであった)。SDS/PAGE、免疫プロット法及び抗体は、ラット抗ヒトビメンチン(MAB2105、R&D Systems)を除き実施例1に記載される通りであった。記載どおり3Dマトリゲル実験を実施した(非特許文献54)。Nikon TE2000顕微鏡(Nikon)を使用して蛍光顕微鏡法(DAPI核染色)により細胞を視覚化した。

10

## 【0196】

図6に提供するこれらのデータは、間葉マーカビメンチンの下方制御及び3Dマトリゲルにおける浸潤性の星状成長の阻害により示されるように、2つの異なる乳房上皮細胞においてAkt3をノックダウンするとEMT形質を逆転させることが可能であることを示している。

20

## 【0197】

実施例7 構成的に活性なAkt3はEMTの活性化能及びEMT調節因子の活性化能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれらを有さない

ウサギ抗ヒトN-カドヘリン(ab18203; Abcam)、ウサギ抗ヒトEカドヘリン(24E10; Cell Signaling)、ウサギ抗ヒトb-カテニン(L54E2; Cell Signaling)、マウス抗ヒトTwist(Twist2C1a; Abcam)を除き、実施例1及び6に記載するようなSDS/PAGE、免疫プロット法及び抗体。

## 【0198】

実施例1に記載するように培養したMCF10A細胞に、空のベクター(実施例1に記載するCRU5-IRES-GFP)、又は構成的に活性なミリスチル化形態のAkt1(myrAkt1)若しくは構成的に活性なミリスチル化形態のAkt3(myrAkt3)を含むCRU5-IRES-GFPベクターを形質導入した。srcミリスチル化配列を加えることにより膜に誘導すると、Aktは構成的に活性となった(非特許文献55)。MCF10A細胞に、レトロウイルスベクター「myr-AKT1」又はレトロウイルスベクター「myr-AKT3」のいずれかを形質導入した。対照細胞(「wt」)にはいずれのベクターも形質導入しなかった。これらの細胞株から抽出されたタンパク質の免疫プロットを、上皮及び間葉細胞運命並びにEMTに関連するマーカーのパネルでプロブした。

30

## 【0199】

図7に示すこれらのデータは、予想外にも、間葉マーカ(N-カドヘリン、ビメンチン)の上方制御及び上皮マーカ(E-カドヘリン、b-カテニン)の消失によって示されるように、構成的に活性なAkt3はEMTの活性化能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さないことを示している。myr-Akt3の発現はまた、EMT調節因子Snail及びAx1の活性化、並びにAktのリン酸化ももたらし、正のフィードバックループの存在が示唆される。

40

## 【0200】

実施例8 構成的に活性なAkt3(MyrAkt3)は乳房上皮細胞においてEMT及びCSC形質の誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さない

この実験では、MCF10A細胞を、構成的に活性なAkt1の発現を駆動するレトロウイルスベクター(「myr-AKT1」)及び構成的に活性なAkt3の発現を駆動す

50

るレトロウイルスベクター（「myr-Akt3」）と共に使用した。3Dマトリゲル実験を実施例6に記載するように実施した。Nikon TE2000顕微鏡（Nikon）を使用した位相差・蛍光顕微鏡法（DAPI核染色）により、細胞を指示倍率で視覚化した。

#### 【0201】

図8に結果を示す。これらのデータは、構成的に活性なAkt3は乳房上皮細胞においてEMT及びCSC形質（2D培養における線維芽細胞様の細胞成長及び3Dマトリゲルにおける浸潤性星状成長）の誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さないことを示している。

#### 【0202】

実施例9 構成的に活性なAkt3を発現する細胞はマンモスフェアで成長能を示すが、構成的に活性なAkt1を発現する細胞はそれを示さない

使用される細胞株は、実施例1に記載するとおりである。MCF10A細胞のマンモスフェア培養を記載どおり実施した（非特許文献56）。簡潔に言えば、単細胞を35mm超低付着性プレート（Corning, USA、カタログ番号3471）に20000生細胞/mlを合計30000細胞/ウェルで播いた。マンモスフェアを10日間培養して画像化し、ImageJ（<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>）を使用してマンモスフェアを定量化した。統計的分析は学生t検定に基づいた。図9に結果を示す。

#### 【0203】

マンモスフェア - 多数の細胞から構成される大型構造 - を形成する能力は、癌幹細胞の形質であると考えられる。構成的に活性なAkt3を発現するMCF10A細胞はマンモスフェアの形成能を有した。対照的に、構成的に活性なAkt1を発現する細胞及び未処理のMCF10A細胞はマンモスフェアの形成能を有しなかった。従ってマンモスフェアの形成能は、Akt1ではなくAkt3を介したシグナル伝達により惹起される。

#### 【0204】

実施例10 構成的に活性なAkt3（myr-Akt3）は、EMT/間葉マーカ（Ax1、ビメンチン、N-カドヘリン）の上昇及び上皮マーカ（E-カドヘリン）の消失をもたらすEMTの誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さない

HMLER細胞に、実施例8に記載されるようにmyrAkt1又はmyrAkt3を発現するレトロウイルスベクターを形質導入し、Ax1受容体タンパク質、上皮（E-カドヘリン）及び間葉（ビメンチン、N-カドヘリン）マーカー発現、Akt1/3及びpAktレベルについて実施例7に記載するように分析した。

#### 【0205】

結果を図10に示す。構成的に活性なAkt3はEMTの活性化能及びEMT調節因子の活性化能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さない。

#### 【0206】

実施例11 構成的に活性なAkt3（MyrAkt3）は乳房上皮細胞においてEMT及びCSC形質の誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さない

実施例8に記載するように、myrAkt1、myrAkt3又は空のベクターを発現するHMLER細胞を2D（左）及び3Dマトリゲル（右）で成長させ、位相差顕微鏡法により視覚化した。

#### 【0207】

図11に結果を示す。

HMLER細胞は典型的には、組織培養プラスチック（左）の上で成長させたとき上皮形態（シート状の円形の細胞）を有し、マトリゲル（右）に包埋して成長させたとき浸潤性ではない。これらのデータは、構成的に活性なAkt3は形質転換乳房上皮HMLER細胞においてEMT及びCSC形質（2D培養における線維芽細胞様の細胞成長及び3Dマトリゲルにおける浸潤性星状成長）の誘導能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さないことを示している。

10

20

30

40

50

## 【0208】

実施例12 構成的に活性化Akt3を発現する細胞はマンモスフェアでの成長能を示すが、構成的に活性化Akt1を発現する細胞はそれを示さない

実施例9に記載されるように、myrAkt1、myrAkt3を発現するHMLER細胞をマンモスフェア培養で成長させて定量化した。

## 【0209】

結果を図12に示す。

## 【0210】

球状腫瘍塊形成は、癌幹細胞に特有のものである。HMLER細胞は、通常マンモスフェアを形成することができず、癌幹細胞特性を欠いていることが示唆される。活性化Akt3をコードするベクター(myrAkt3)によるトランスフェクションはマンモスフェアの形成能を付与するが、活性化Akt1をコードするベクター(myrAkt1)によるトランスフェクションはそれを付与しない。

10

## 【0211】

実施例13 構成的に活性化Akt3を発現する細胞は、構成的に活性化Akt1を発現する細胞と比べてはるかに高い腫瘍形成能を示す

実施例10に記載されるようにレトロウイルスベクターにより形質導入したHMLER細胞「HMLER/ベクター」、「HMLER/myrAkt1」及び「HMLER/myrAkt3」を、記載どおり限界希釈で宿主マウスに注入した(非特許文献57)。

## 【0212】

図13に提供される結果。これらのデータは、構成的に活性化Akt3(HMLER/myrAkt3)が発現することにより、対照細胞又は構成的に活性化Akt1を発現する細胞と比較してHMLER細胞の腫瘍形成能が有意に増加することを示している(1000細胞播種で形成された腫瘍の数を参照のこと)。

20

## 【0213】

実施例14 構成的に活性化Akt3及びSlugは間葉表現型及び浸潤性成長の誘導能を有するが、構成的に活性化Akt1はそれを有さない；Akt阻害薬は間葉表現型を阻害する

図1及び図3に記載するように、MCF10A細胞を培養し、myrAkt1、MyrAkt3又はSlugを発現するレトロウイルスコンストラクトで形質導入した。細胞を、Akt阻害薬LY294002(10µM、Cell Signaling Technology、カタログ番号9901)及びAkt V11I(10µM、Merck、カタログ番号124018)で指示どおり12時間処理した。次に細胞を位相差顕微鏡法により指示倍率で視覚化するが、又は実施例3に記載されるように浸潤性成長のため3Dマトリゲルに播種した。

30

## 【0214】

図14に結果を示す。

## 【0215】

これらの結果は、構成的に活性化Akt3及びSlugは2D成長において間葉表現型及び3D成長マトリゲルにおいて浸潤性成長の誘導能を有するが、構成的に活性化Akt1はそれを有さないことを示している。Akt阻害薬LY-294002及びAKT V11Iは、Akt3により誘導される間葉表現型を阻害するが、また2D及び3D成長でSlugにより誘導される間葉/侵襲性表現型も阻害し、Akt3がSlugシグナル伝達に必要であることが示唆される。

40

## 【0216】

実施例15 構成的に活性化Akt3及びSlugはEMTの活性化能を有するが、構成的に活性化Akt1はそれを有さず、Akt阻害薬は間葉表現型を部分的に逆転させる能力を有する

MCF10A細胞を培養し、図1及び図3に記載するようにmyrAkt1、MyrAkt3又はSlugを発現するレトロウイルスコンストラクトで形質導入した。細胞を、

50

図6に記載するようなAkt阻害薬、SDS/PAGE、免疫プロット法及び実施例1及び4に記載するような抗体で処理した。

【0217】

結果は図15に示す。

【0218】

これらの結果は、マーカーN-カドヘリン、ビメンチンの上方制御及び上皮マーカーE-カドヘリンの消失により示されるように、構成的に活性なAkt3及びSlugはEMTの活性化能を有するが、構成的に活性なAkt1はそれを有さないことを示している。Akt阻害薬のAKT-VIII(左)は、間葉マーカーN-カドヘリン及びビメンチン(左)の有意な低下により示されるように、Akt活性化(pAkt)を完全に阻害し、且つ間葉表現型を部分的に逆転させる能力を有する。Akt阻害薬LY-294002も同様にEMTの部分的な阻害を示し、ビメンチン発現の低下を示す。いずれの阻害薬も、上皮マーカーE-カドヘリンの再発現はもたらさなかった。

10

【0219】

実施例16 EMTを(H-RasV12又はSlugの発現により)起こすように誘導されたMCF10A細胞におけるAkt3のRNAiサイレンシングは、P-Aktレベルを有意に低下させるが、Akt1のサイレンシングはそれを低下させない

MCF10A細胞に、EMT誘導因子Slug、及びH-RasV12をコードするレトロウイルスベクターを形質導入した。これらの細胞から、HiPerFectトランスフェクション試薬(Qiagen)を製造者のプロトコルに従い使用して低分子干渉RNA媒介性サイレンシングを行い、細胞を3日間培養した。Akt1(Hs\_AKT1\_5 Flexitube siRNA)、Akt3(Hs\_AKT3\_2 HP siRNA)及びGAPDH(Hs\_GAPDH\_3 HPパリデート済みsiRNA)(全てQiagen)(陰性対照として)に対するアニーリングしたsiRNAを60nMの終濃度で使用した。サイレンシング後、細胞をSDS-PAGE負荷緩衝液で溶解し、超音波処理して煮沸した。ライセートをウェスタンプロット分析に供し、図2に記載されるようにAkt1、Akt3、pAkt Ser473抗体及び-チューブリン12g10(ハイブリドーマバンク; <http://dshb.biology.uiowa.edu/12G10-anti-alpha-tubulin>)を使用してプロットをプローブした。

20

30

【0220】

これらの結果を図16に提供する。これらの結果は、EMTを起こすように誘導された細胞におけるAkt3レベルのノックダウンは総P-Aktレベルを有意に低下させる能力を有するが、Akt1レベルのノックダウンはそれを有さないことを示している。これは、EMT誘導MCF10A細胞においてホスホ-Akt3が主要なpAktアイソフォームであることを示唆している。

【0221】

実施例17 構成的に活性なAkt3は細胞核に局在化するが、構成的に活性なAkt1は局在化しない

実施例2に記載されるようにHMLER細胞を培養し、抗ヒストン3(Cell Signaling、ヒストンH3抗体#9715)を除き実施例1に記載されるようなSDS/PAGE、免疫プロット法及び抗体であった。製造者の指示に従い核抽出を行った(Universal Magnetic Co-IP Kit、Active Motif、54002)。固定細胞の構成的に活性なAkt1及びAkt3の免疫蛍光染色を、製造者が記載する方法により(Cell Signaling、「免疫蛍光法一般プロトコル(Immunofluorescence General Protocol)」、実施例1にあるような抗体を使用して行った。

40

【0222】

これらの結果を図17に提供する。活性化Akt3(MyrAkt3)はHMLER細胞の核画分に局在化する(上)。免疫蛍光染色は、myrAkt3の核/核周囲染色、一

50

方でmyrAkt1の核からの排除を明らかにする。

【0223】

実施例18 Akt3及び転写因子Snailは、培養トリプルネガティブ乳癌細胞の核画分に圧倒的に認められる。チューブリン(細胞質)及びラミン(核)マーカーにより分画の成功が確認される。

MDA-MB 231細胞を実施例3に記載されるように培養した。Santa Cruz、sc-7292からのラミニンA/Cを除き、実施例1及び16に記載するようなSDS/PAGE、免疫プロット法及び抗体。細胞質タンパク質及び核タンパク質を、実施例17に記載するように単離した。

【0224】

これらの実験の結果を図18に示す。予想どおり、転写因子Snailは核に認められた。予想外にも、Akt3もまた、ほぼ例外なく核にあった。

【0225】

実施例19 Akt3は培養トリプルネガティブ乳癌細胞及び初代ヒト乳腺上皮細胞の核に局在化する

MDA-MB-231細胞の培養は、実施例3に記載されるようにであった。初代ヒト乳腺上皮細胞(HMEC)を記載どおり単離した(非特許文献58)。実施例17にあるようなMDA-MB-231及び初代ヒト乳腺上皮細胞(HMEC)におけるAkt3(抗Akt3-FITC、上側パネル)の局在化。核はDAPIにより染色された(下側パネル)。バー:50ミクロン

【0226】

これらの実験の結果を図19に示す。Akt3タンパク質(上側パネル)は、乳癌細胞及び初代乳腺上皮細胞の両方の核に局在化する(核染色と比較のこと、下側パネル)。

【0227】

実施例20 Ax1キナーゼをノックダウンすると、Akt3のEMT誘導核局在化が有意に低下する

HMLER及びHMLER/Slug細胞に、Ax1標的化shRNA(shAx12)又は対照ルシフェラーゼshRNA(shLuc)を発現するレトロウイルスベクターを形質導入した。細胞質画分及び核細胞画分を実施例17に記載するように単離し、核及び細胞質細胞画分においてAkt3タンパク質レベルを免疫プロット法により測定した。抗Akt3-FITC(核の緑色)又はDAPI核染色で染色した形質導入細胞の免疫蛍光(GFP、細胞質の緑色)。

【0228】

図20に示すこの実験の結果から、SlugによるEMTの誘導がAx1依存性プロセスにおいてAkt3の核局在化をもたらすことがわかる。

【0229】

実施例21 Ax1キナーゼ活性を阻害するとAkt3の核局在化が阻害される

ビヒクル(DMSO)、cKit TKI(1μM イマチニブ)及びAx1 TKI(600nM BGB324)で処理した乳腺上皮細胞(HMEC)における核Akt3免疫蛍光(抗Akt3-FITC、上側パネル)の定量化。バー:50ミクロン。\*P<0.05。

【0230】

図21に提供される結果は、Ax1活性をブロックすると(BGB324)、Akt3核局在化が阻害され、一方、cKit(イマチニブ)を阻害しても何らAkt3核局在化に影響しないことを示している。

【0231】

実施例22 他のタンパク質を含まない生化学アッセイにおいて、Akt1及びAkt3キナーゼはSnailタンパク質を直接リン酸化する能力を有する。

SNAIL1/Snailコード配列をpGEX-4T-1ベクター(Promega)にクローニングし、配列を確認した。GST融合タンパク質を大腸菌(Escherich

10

20

30

40

50

h i a c o l i ) ( R o s e t t a B L 2 1 D E 3 ) で 発 現 さ せ て 、 製 造 者 の 指 示 に 従 い 精 製 し た ( B D B i o s c i e n c e s ) 。 ト ロ ン ビ ン を 使 用 す る こ と に よ り G S T 部 分 を 切 断 し た 。 組 換 え A k t 1 及 び A k t 3 ( P r o Q i n a s e G m b H ) 、 S n a i l 及 び S l u g 基 質 タ ン パ ク 質 、 及 び <sup>3 2</sup> P - A T P を 使 用 し て イ ン ビ ト ロ キ ナ ー ゼ ア ッ セ イ を 実 施 し 、 記 載 ど お り オ ー ト ラ ジ オ グ ラ フ ィ ー に よ り 検 出 し た ( T u o m i 他 、 2 0 0 9 ) 。

#### 【0232】

図 2 2 に 提 供 さ れ る 結 果 は 、 他 の タ ン パ ク 質 を 含 ま ない 生 化 学 ア ッ セ イ に お い て 、 A k t 1 及 び A k t 3 キ ナ ー ゼ が S n a i l タ ン パ ク 質 を 直 接 リ ン 酸 化 す る 能 力 を 有 す る こ と を 示 し て い る 。

10

#### 【0233】

実 施 例 2 3 S u r e F i r e ア ッ セ イ は 、 A k t 3 を 発 現 す る イ ン ス リ ン 刺 激 メ ラ ノ ー マ 細 胞 ( W M 1 1 5 ) に お い て ホ ス ホ - A k t 3 を 検 出 す る 。 A k t 1 及 び A k t 2 を 発 現 す る が A k t 3 を 発 現 し ない 乳 房 及 び 前 立 腺 細 胞 株 ( M C F 7 及 び L N C a P ) で は 、 シ グ ナ ル は 検 出 さ れ ない 。

S u r e F i r e ア ッ セ イ を 使 用 し て 、 W M 1 1 5 、 M C F 7 及 び L N C a P 細 胞 に お け る 活 性 化 ( リ ン 酸 化 ) A k t 3 を 特 異 的 に 検 出 し た 。 簡 潔 に 言 え ば 、 細 胞 を 溶 解 し 、 リ ン 酸 化 A k t ( p 4 7 3 ) 及 び A k t 3 を 認 識 す る 抗 体 を 製 造 者 ( P e r k i n E l m e r ) の 記 載 ど お り ア ク セ プ タ ー 及 び ド ナ ー ビ ーズ と カ ッ プ リ ン グ し た 。 細 胞 は 刺 激 し ない が 、 又 は 1 0 n M イ ン ス リ ン で 1 0 分 間 刺 激 し て A k t を 活 性 化 さ せ た 。

20

#### 【0234】

こ れ ら の 実 験 の 結 果 を 図 2 3 に 示 す 。 予 想 ど お り 、 イ ン ス リ ン は W M 1 1 5 メ ラ ノ ー マ 細 胞 に お い て A k t 3 活 性 ( リ ン 酸 化 ) を 有 意 に 誘 導 す る 能 力 を 有 し 、 一 方 、 M C F 7 乳 房 上 皮 細 胞 又 は L N C a P 前 立 腺 細 胞 で は 、 シ グ ナ ル は 観 察 さ れ な か っ た 。

#### 【0235】

実 施 例 2 4 A k t 3 の 発 現 低 下

例 え ば 特 許 文 献 1 9 に 記 載 さ れ る よ う に 、 好 適 な s h R N A 配 列 を 特 定 す る こ と に よ り 、 A k t 3 の 発 現 を 種 々 の レ ベ ル ( 例 え ば 2 0 % 、 4 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % 、 9 0 % 、 1 0 0 % ) に ノ ッ ク ダ ウ ン す る こ と が 可 能 で あ る 。 哺 乳 類 細 胞 、 好 ま し く は ヒ ト 細 胞 に お い て 種 々 の レ ベ ル の A k t 3 ノ ッ ク ダ ウ ン に よ り E M T を 誘 導 し よ う と す る 試 み を 用 い て 、 E M T を 防 ぐ の に 必 要 な 最 小 限 度 の A k t 3 ノ ッ ク ダ ウ ン を 定 義 す る こ と が 可 能 で あ る 。 従 っ て 治 療 域 を 特 定 す る こ と が 可 能 で あ る 。 さ ら に 、 E M T を 防 ぐ の に 僅 か に 足 り ない A k t 3 ノ ッ ク ダ ウ ン の レ ベ ル を 選 択 す る こ と に よ り 、 E M T の 阻 害 薬 に 対 し て 特 に 感 受 性 を 示 す 哺 乳 類 細 胞 株 、 好 ま し く は ヒ ト 細 胞 株 を 生 成 す る こ と が 可 能 で あ る 。 か か る 細 胞 株 に は 、 E M T が 起 こ る こ と を 可 能 に す る の に 辛 う じ て 足 り る だ け の A k t 3 発 現 し か な く 、 A k t 3 シ グ ナ ル 伝 達 を 阻 害 す る 化 合 物 は 、 さ ら に 僅 か で あ り な が ら E M T を ブ ロ ッ ク し 得 る 。 従 っ て か か る 細 胞 株 は 、 E M T の 阻 害 薬 、 特 に A k t 3 の 阻 害 薬 の 有 用 な ス ク リ ー ニ ン グ ツ ー ル で あ る 。

30

#### 【産業上の利用可能性】

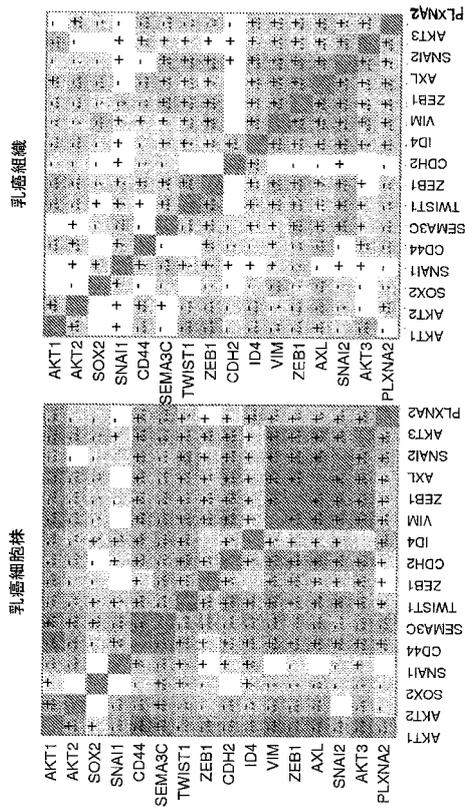
#### 【0236】

本 発 明 は 、 本 発 明 に お け る 方 法 の 動 作 を 通 じ て 産 業 上 利 用 可 能 で あ る 。

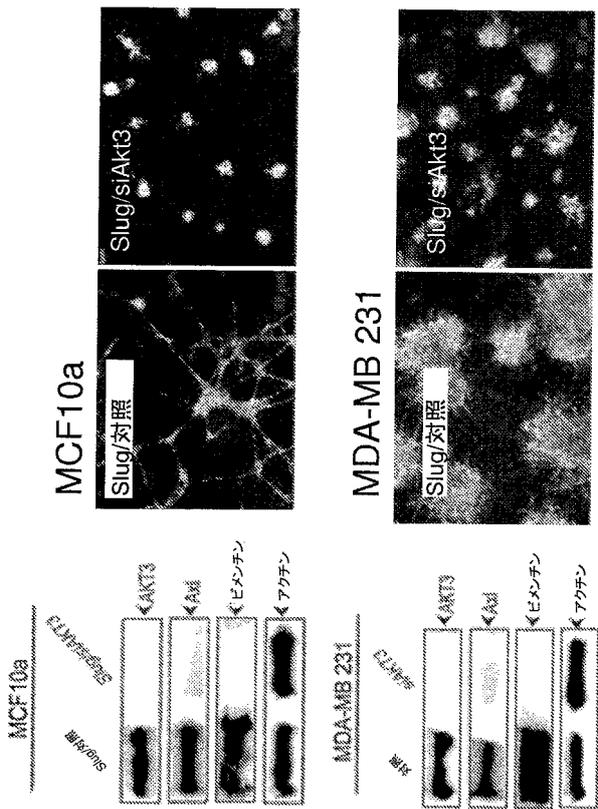
40



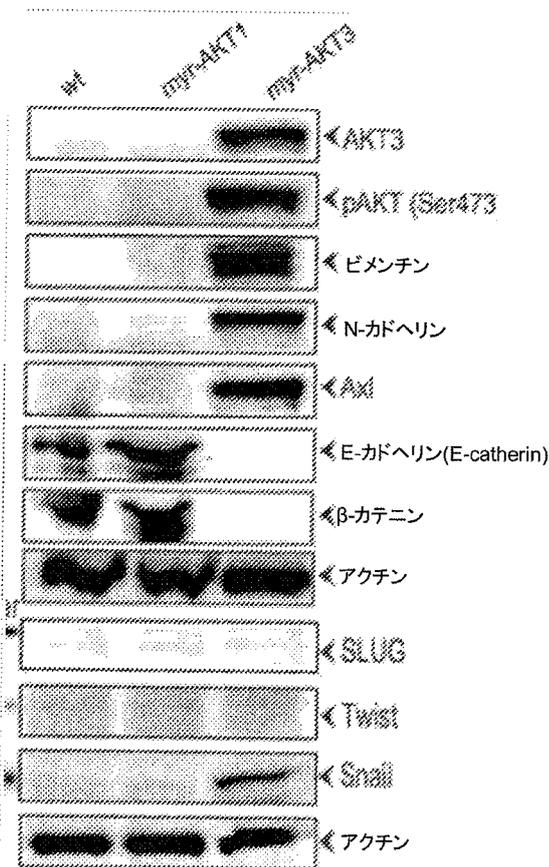
【 図 5 】



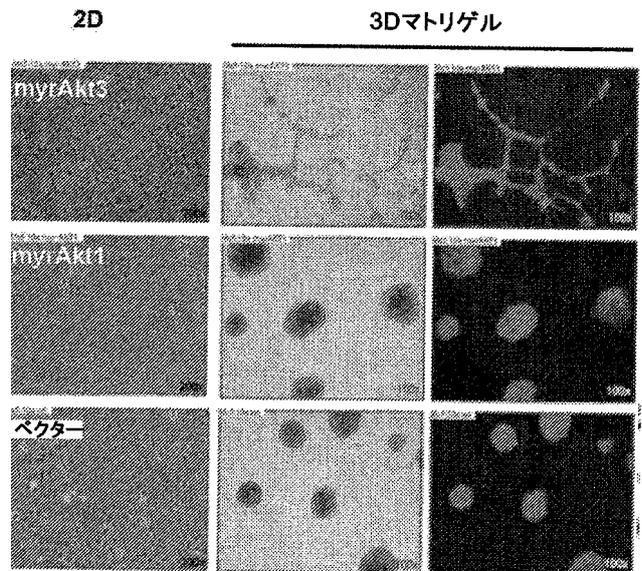
【 図 6 】



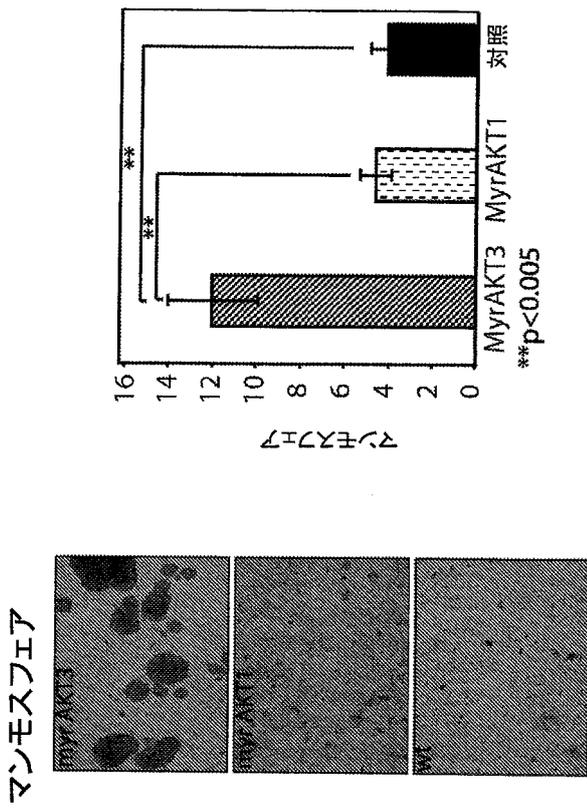
【 図 7 】



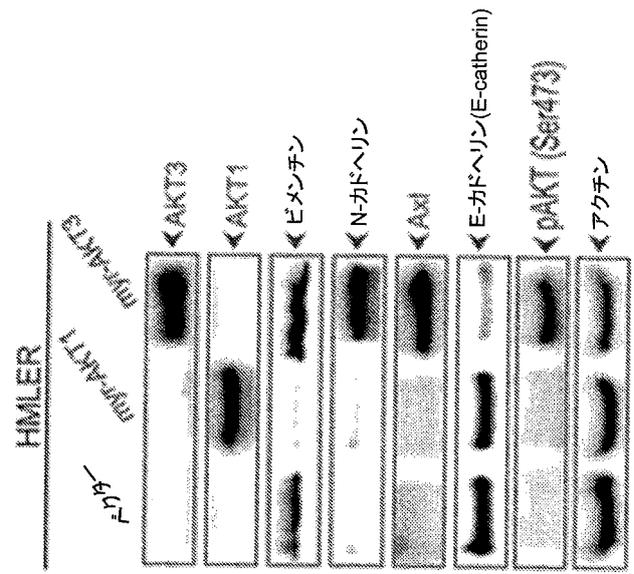
【 図 8 】



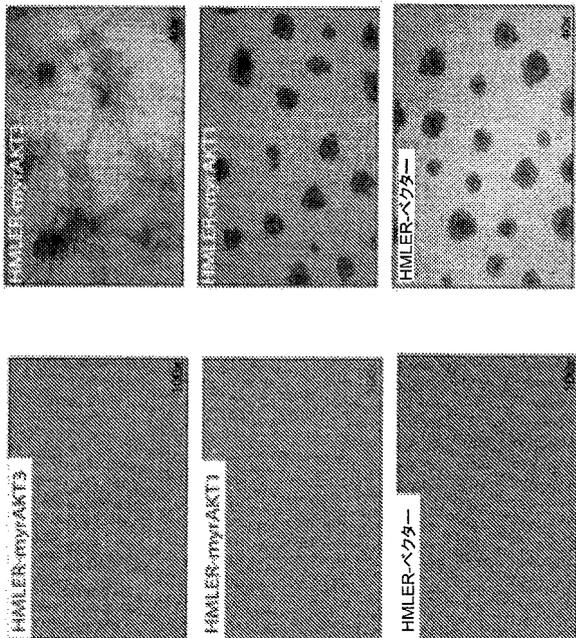
【 図 9 】



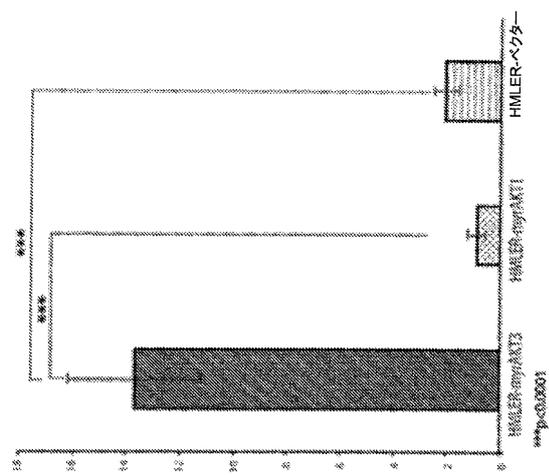
【 図 10 】



【 図 11 】



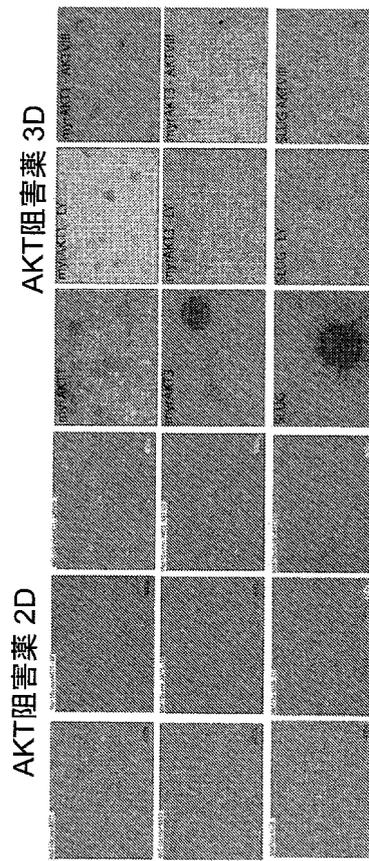
【 図 12 】



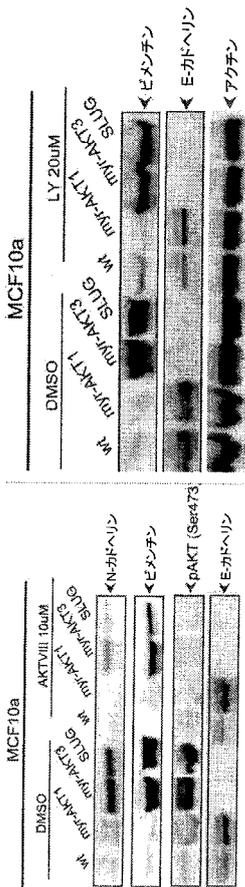
【 図 1 3 】

注入細胞数	腫瘍発生率				
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	
HMLER/ベクター	5/10	6/10	4/10	1/10	
HMLER/myrAkt1	6/10	6/10	3/10	0/10	
HMLER/myrAkt3	10/10	10/10	10/10	10/10	

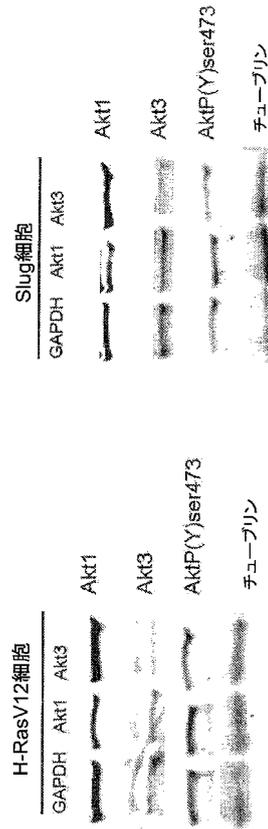
【 図 1 4 】



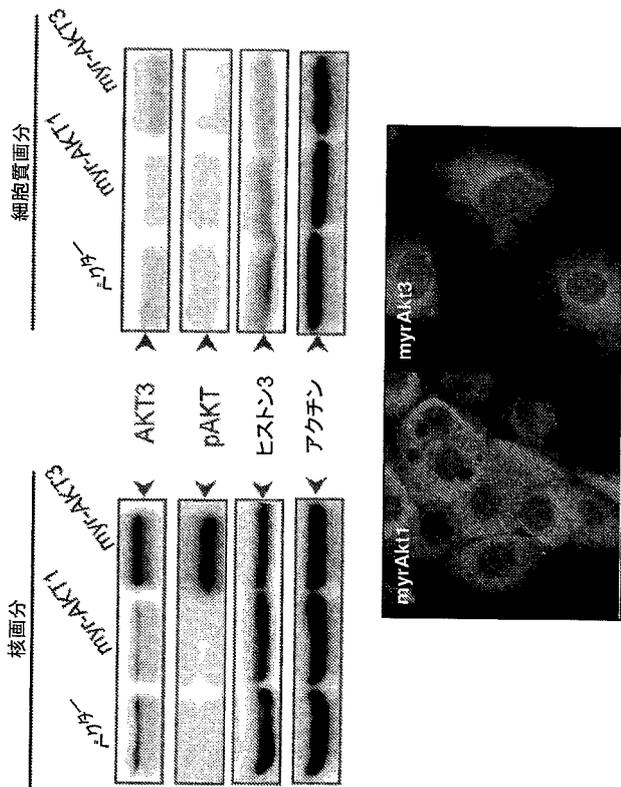
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】

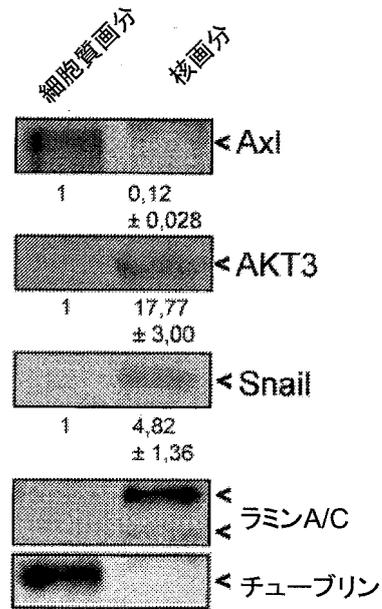


【 図 1 7 】

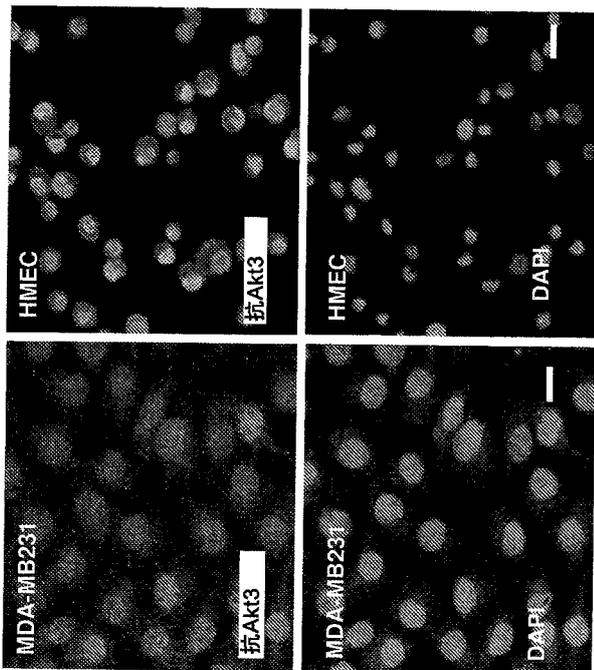


【 図 1 8 】

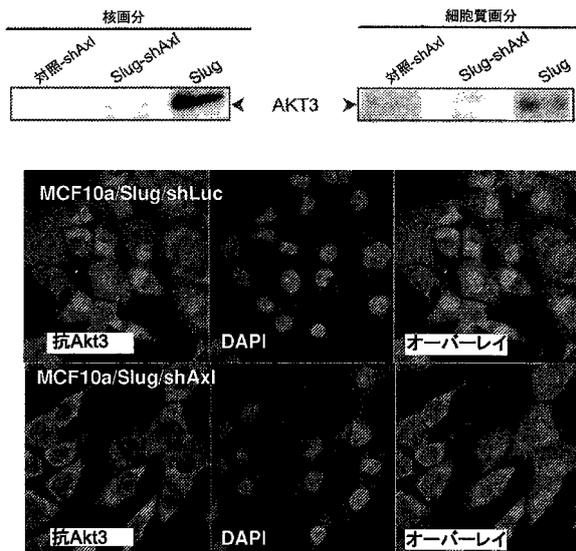
MDA-MB-231



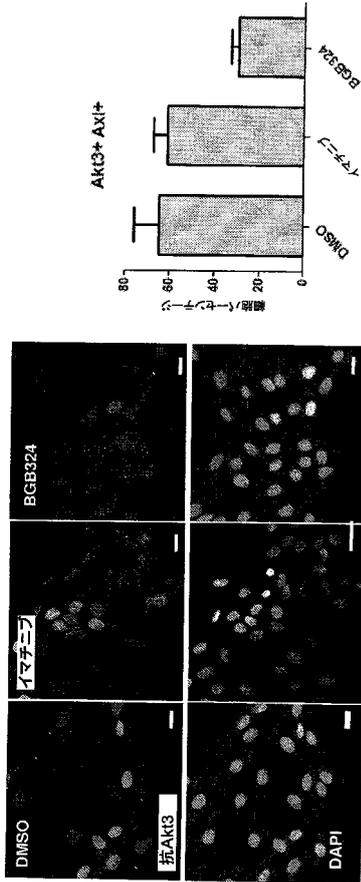
【 図 1 9 】



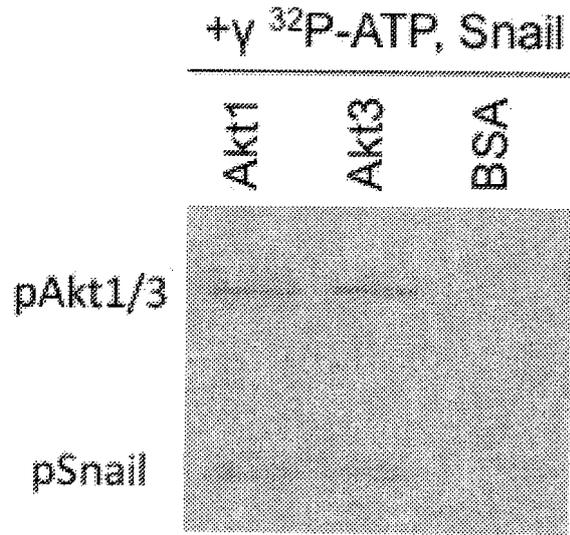
【 図 2 0 】



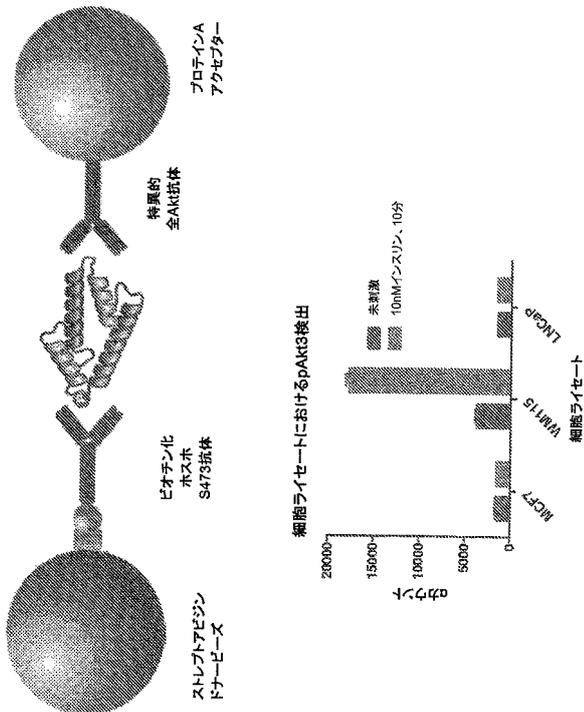
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>C 1 2 Q 1/48 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/48	Z
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00	A
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>C 1 2 N 5/077 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/077	
<b>C 1 2 Q 1/04 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/04	
<b>G 0 1 N 33/68 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/68	
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	Z
<b>G 0 1 N 33/15 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/15	Z
<b>C 1 2 N 9/12 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/12	
<b>C 1 2 N 9/99 (2006.01)</b>	C 1 2 N 9/99	

(72)発明者 タイロン, クリーナ

ノルウェー国, エン - 5 0 0 9 ベルゲン, ジョナス ライズ ヴェイ 9 1 デパートメント  
オブ ビオメディスン

F ターム(参考) 2G045 AA01 AA13 AA16 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BA14 BB20  
 BB22 BB24 CA01 CA17 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB17  
 CB26 DA13 DA14 DA20 DA36 FA12 FA16 FA34 FA37 FB01  
 FB02 FB03 FB08 FB09 FB12 FB13 FB15 GB02 GB03 GC12  
 GC15 JA01 JA06  
 4B050 CC10 DD11 LL03  
 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ27 QQ53 QQ79 QR07 QR36  
 QR48 QR62 QR72 QR77 QS02 QS07 QS33 QS34 QS38 QX01  
 4B065 AA90X AA93X AC12 AC14 BB40 CA46  
 4C084 AA17 AA19 AA20 NA14 ZB26 ZC20 ZC75

【外国語明細書】  
2017136077000001.pdf