

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7653907号
(P7653907)

(45)発行日 令和7年3月31日(2025.3.31)

(24)登録日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 K 31/496(2006.01)	A 6 1 K	31/496
A 6 1 K 31/513(2006.01)	A 6 1 K	31/513
A 6 1 K 31/4439(2006.01)	A 6 1 K	31/4439
A 6 1 K 31/454(2006.01)	A 6 1 K	31/454
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
請求項の数 10 (全48頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-522967(P2021-522967)	(73)特許権者	399052796 ダイナ ファーバー キャンサー インス ティチュート, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 2 1 5, ボストン, ブルックライン ア ベニュー 4 5 0
(86)(22)出願日	令和1年10月28日(2019.10.28)	(74)代理人	100092783 弁理士 小林 浩
(65)公表番号	特表2022-505884(P2022-505884 A)	(74)代理人	100120134 弁理士 大森 規雄
(43)公表日	令和4年1月14日(2022.1.14)	(74)代理人	100141195 弁理士 西澤 恵美子
(86)国際出願番号	PCT/US2019/058319	(72)発明者	チェン, ジンウェイ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 2 1 5, ボストン, ブルックライン 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO2020/092221		
(87)国際公開日	令和2年5月7日(2020.5.7)		
審査請求日	令和4年10月26日(2022.10.26)		
(31)優先権主張番号	62/752,382		
(32)優先日	平成30年10月30日(2018.10.30)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
前置審査			

(54)【発明の名称】 p 5 3 W T 腫瘍の処置の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における p 5 3 野生型 (W T) かつメルケル細胞ポリオーマウイルス (M C V) 陽性メルケル細胞癌 (M C C) 固形腫瘍の処置における使用のための医薬組成物であって、 (b) (i) レナリドミドであるカゼインキナーゼ 1 アルファ (C K 1) 分解剤及び / 又は (ii) S C - 2 4 - U R 9 9 (4 - (3 - アミノ - 1 - (4 - クロロ - 5 - メチル - 6 - (メチルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 5 - フルオロ - 1 H - インダゾール - 6 - イル) ナフタレン - 1 - オール) であるマウス二重微小染色体 4 (M D M 4) 阻害剤と組合わせて投与される、 (a) H D M 2 0 1 ((S) - 5 - (5 - クロロ - 1 - メチル - 2 - オキソ - 1 , 2 - ジヒドロ - ピリジン - 3 - イル) - 6 - (4 - クロロ - フェニル) - 2 - (2 , 4 - ジメトキシ - ピリミジン - 5 - イル) - 1 - イソプロピル - 5 , 6 - ジヒドロ - 1 H - ピロロ [3 , 4 - d] イミダゾール - 4 - オン) 又はヌトリン - 3 であるマウス二重微小染色体 2 (M D M 2) 阻害剤を含む、医薬組成物。

【請求項 2】

対象における p 5 3 W T かつメルケル細胞ポリオーマウイルス (M C V) 陽性メルケル細胞癌 (M C C) 固形腫瘍の処置における使用のための医薬組成物であって、 (a) H D M 2 0 1 又はヌトリン - 3 である M D M 2 阻害剤と組合わせて投与される、 (b) (i) レナリドミドである C K 1 分解剤及び / 又は (ii) S C - 2 4 - U R 9 9 である M D M 4 阻害剤を含む、医薬組成物。

【請求項 3】

対象における p 5 3 W T かつメルケル細胞ポリオーマウイルス (M C V) 陽性メルケル細胞癌 (M C C) 固形腫瘍の処置における使用のための医薬組成物であって、 (a) H D M 2 0 1 又はヌトリン - 3 である M D M 2 阻害剤と、 (b) (i) レナリドミドである C K 1 分解剤及び / 又は (ii) S C - 2 4 - U R 9 9 である M D M 4 阻害剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 4】

(a) は、 H D M 2 0 1 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

(a) は、ヌトリン - 3 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

(b) は、レナリドミドである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

(b) は、 S C - 2 4 - U R 9 9 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

(b) は、レナリドミド及び S C - 2 4 - U R 9 9 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

対象における p 5 3 野生型 (W T) かつメルケル細胞ポリオーマウイルス (M C V) 陽性メルケル細胞癌 (M C C) 固形腫瘍の処置における使用のための医薬組成物であって、 (b) レナリドミドと組合わせて投与される、 (a) H D M 2 0 1 である M D M 2 阻害剤を含む、医薬組成物。

【請求項 10】

1 つ以上の更なる抗癌剤を更に含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願及び支援

本出願は、その内容が参照により全体として本明細書に援用される、2018年10月30日に出願された米国仮特許出願第62/752382号明細書に対する優先権及びその利益を主張する。

【0002】

本発明は、政府支援を受け、The National Institutes of Healthにより授与された助成金番号R01 CA063113 R01 CA173023及びP01 CA203655の下でなされた。政府は、本発明における一定の権利を有する。

【0003】

本発明は、p 5 3 野生型 (W T) 腫瘍を処置する方法に関する。特に、本発明は、マウス二重微小染色体2 (M D M 2) 阻害剤の、カゼインキナーゼ1アルファ (C K 1) 分解剤及び / 又は M D M 4 阻害剤と一緒に組み合わせに基づく、p 5 3 W T 腫瘍のための新規の療法を提供する。

【背景技術】

【0004】

メルケル細胞癌 (M C C) は、皮膚の攻撃性神経内分泌癌であり、米国での罹患率は、直近20年において3倍になっている [1 , 2]。2008年、Fengらは、10個のM C C 腫瘍のうちの8つにおいてクローン的にインテグレートされたメルケル細胞ポリオーマウイルス (M C V 、 M C P y V) を発見した [3]。M C V 陽性M C C は、M C V ゲノムのインテグレートコピーを含有し、スモールT抗原 (S T) 及びラージT抗原 (L T) のトランケート形態を発現する [4]。M C C 腫瘍関連トランケートL T は、N末端L X C X E 、 R B 結合モチーフを保持するが、ウイルス複製に要求されるC末端D N A 結合

10

20

30

40

50

及びヘリカーゼドメインを欠失する[3]。MCV-ST及びトランケートLTの発現は、いくつかの細胞タイプにおける増殖及び形質転換を促進し得、MCCにおけるそれらの発癌的役割と一致する[5]。

【0005】

原型ポリオマウイルスサル空胞ウイルス40(SV40)LTは、網膜芽細胞腫関連タンパク質RB(RB1)及び細胞腫瘍抗原p53(TP53)に結合し、それらの腫瘍抑制機能を不活性化させる[6]。対照的に、MCV-LTは、RBに結合するが、p53に結合しない[6]。MCCの次世代シーケンシングは、ウイルス陰性MCCが典型的にはp53及びRB突然変異をUV損傷シグネチャーと共に保有することを明らかにする[7, 8]。対照的に、ウイルス陽性MCCは、通常、野生型RB及びp53を含有し、UV損傷についてのエビデンスを含有しない[7, 8]。ウイルス陽性MCCにおける野生型p53の存在を考慮して、本発明者らは、MCV-T抗原がp53活性を機能的に不活性化させ得ることを疑った。

10

【0006】

p53は、広範な癌において突然変異される。代わりに、野生型p53は、MDM2、p53を標的化するユビキチンリガーゼ又はMDM4(MDMX)の過剰発現により機能的に不活性化され得る[9, 10]。MDM2及びMDM4の両方は、N末端p53結合及びC末端RINGドメインを有する類似の構造を有する[11]。MDM4は、p53を直接ユビキチン化しないが、そのRINGドメインは、MDM2へのユビキチンの動員を容易にする[11]。MDM4は、p53への結合を低減させる自己阻害ドメインも有する[12]。MDM4自己阻害相互作用は、カゼインキナーゼ1アルファ(CK1、CSNK1A1)により軽減され得る[13]。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、対象におけるp53WT腫瘍の処置における使用のための、MDM2阻害剤と、カゼインキナーゼ1アルファ(CK1)分解剤及び/又はMDM4阻害剤とを含む新規の組み合わせを提供する。

【0008】

本発明に係る組み合わせにおいて、MDM2阻害剤は、ヌトリン-3、イダサヌトリン(RG7388、RO5503781、Roche)、RG7775(RO6839921、Roche)、RO5045337(Roche)、AMG232(Amgen)、DS3032(DS3032b、Daiichi Sankyo)、ALRN-6924(Aileron)、KRT-232(Kartos)、ATSP-7041、CGM097(Novartis)及びHDM201(Novartis)からなる群から選択され得、好ましくはHDM201、即ち(S)-5-(5-クロロ-1-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロ-ピリジン-3-イル)-6-(4-クロロ-フェニル)-2-(2,4-ジメトキシ-ピリミジン-5-イル)-1-イソプロピル-5,6-ジヒドロ-1H-ピロロ[3,4-d]イミダゾール-4-オンである。

30

【0009】

本発明に係る組み合わせにおいて、カゼインキナーゼ1アルファ(CK1)分解剤及び/又はMDM4阻害剤は、サリドマイド、ボマリドミド、レナリドミド及びSC-24-UR99(Novartis)、即ち4-(3-アミノ-1-(4-クロロ-5-メチル-6-(メチルアミノ)ピリジン-3-イル)-5-フルオロ-1H-インダゾール-6-イル)ナフタレン-1-オールからなる群から選択され得、好ましくはレナリドミド、即ちREVLIMIDとも称される(RS)-3-(7-アミノ-3-オキソ-1H-イソインドール-2-イル)ピペリジン-2,6-ジオンである。

40

【0010】

本発明は、特にMDM2阻害剤HDM201とCK1分解剤レナリドミドとを有するこのような組み合わせを提供する。

50

【0011】

本発明に係る組み合わせは、更なる抗癌剤を含み得る。

【0012】

本発明に係る更なる抗癌剤は、

F L T 3 阻害剤（例えば、ギルテリニブ、キザルチニブ、ミドスタウリン）、

B C L 2 阻害剤（例えば、ナビトクラクス、ベネトクラクス）、

他のMDM2阻害剤（例えば、ヌトリン - 3、イダサヌトリン、AMG232、DS - 3032B、ALRN6924 / ATSP7041）、

メチル化抑制剤（HMA）（例えば、Vidaza [アザシチジン、5 - アザシチジン]、Dacogen [デシタピン]、グアデシタピン）、

アントラサイクリン（例えば、イダルビシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン）、

抗CD33抗体（例えば、Mylotarg [ゲムツズマブ]、バダスツキシマブ）、及び他の薬剤（例えば、AraC [シタラビン、aracytine]）

から選択され得る。

【0013】

本発明に係る組み合わせにより処置することができるp53WT腫瘍は、固形腫瘍又は血液腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肉腫、例えば脂肪肉腫又は軟部組織肉腫、リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫（NHL）、特にマントル細胞リンパ腫（MCL）、黒色腫、例えば皮膚黒色腫又はブドウ膜黒色腫、芽細胞腫（例えば、神経芽細胞腫）、結腸腫瘍、結腸直腸腫瘍、腎腫瘍及び肝腫瘍又は皮膚癌、例えばメルケル細胞癌（MCC）、特にメルケル細胞ポリオーマウイルス（MCV）陽性MCCであり得る。血液腫瘍は、急性骨髄性白血病（AML）、多発性骨髄腫（MM）、骨髄異形成症候群（MDS）又は急性リンパ芽球性白血病（ALL）であり得る。

【0014】

特に、本発明は、以下の実施形態を提供する。

【0015】

1. (a) マウス二重微小染色体2（MDM2）阻害剤と、(b) カゼインキナーゼ1アルファ（CK1）分解剤及び/又はマウス二重微小染色体4（MDM4）阻害剤とを含む組み合わせ。

【0016】

2. 対象におけるp53野生型（WT）腫瘍の処置における使用のための、(a) MDM2阻害剤と、(b) CK1分解剤及び/又はMDM4阻害剤とを含む組み合わせ。

【0017】

3. 対象におけるp53WT腫瘍を処置する方法であって、対象に、(a) MDM2阻害剤と、(b) CK1分解剤及び/又はMDM4阻害剤との組み合わせを投与することを含む方法。

【0018】

4. MDM2阻害剤は、ヌトリン - 3、イダサヌトリン（RG7388、RO5503781）、RG7775（RO6839921）、AMG232、DS3032（DS3032b）、ALRN - 6924、ATSP - 7041、CGM097及びHDM201、即ち(S) - 5 - (5 - クロロ - 1 - メチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロ - ピリジン - 3 - イル) - 6 - (4 - クロロ - フェニル) - 2 - (2, 4 - ジメトキシ - ピリミジン - 5 - イル) - 1 - イソプロピル - 5, 6 - ジヒドロ - 1H - ピロロ[3, 4 - d]イミダゾール - 4 - オンからなる群から選択される、実施形態1の組み合わせ、実施形態2の使用のための組み合わせ又は実施形態3の方法。

【0019】

5. MDM2阻害剤は、ヌトリン - 3、イダサヌトリン及びHDM201からなる群から選択される、実施形態1の組み合わせ、実施形態2の使用のための組み合わせ又は実施形態3の方法。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 0 】

6 . MDM 2 阻害剤は、HDM 2 0 1 である、実施形態 1 の組み合わせ、実施形態 2 の使用のための組み合わせ又は実施形態 3 の方法。

【 0 0 2 1 】

7 . CK 1 分解剤及び/又はMDM 4 阻害剤は、サリドマイド、ポマリドミド、レナリドミド、即ちREVLIMIDとも称される(RS) - 3 - (7 - アミノ - 3 - オキソ - 1 H - イソインドール - 2 - イル)ピペリジン - 2 , 6 - ジオン及びSC - 2 4 - UR 9 9、即ち4 - (3 - アミノ - 1 - (4 - クロロ - 5 - メチル - 6 - (メチルアミノ)ピリジン - 3 - イル) - 5 - フルオロ - 1 H - インダゾール - 6 - イル)ナフタレン - 1 - オールからなる群から選択される、実施形態 1、4 ~ 6 のいずれか 1 つの組み合わせ、実施形態 2、4 ~ 6 のいずれか 1 つの使用のための組み合わせ又は実施形態 3 ~ 6 のいずれか 1 つの方法。

10

【 0 0 2 2 】

8 . CK 1 分解剤及び/又はMDM 4 阻害剤は、レナリドミド及びSC - 2 4 - UR 9 9 からなる群から選択される、実施形態 1、4 ~ 6 のいずれか 1 つの組み合わせ、実施形態 2、4 ~ 6 のいずれか 1 つの使用のための組み合わせ又は実施形態 3 ~ 6 のいずれか 1 つの方法。

【 0 0 2 3 】

9 . MDM 2 阻害剤は、ヌトリン - 3、イダサヌトリン及びHDM 2 0 1 からなる群から選択され、CK 1 分解剤及び/又はMDM 4 阻害剤は、レナリドミド及びSC - 2 4 - UR 9 9 からなる群から選択される、実施形態 1 の組み合わせ、実施形態 2 の使用のための組み合わせ又は実施形態 3 の方法。

20

【 0 0 2 4 】

1 0 . MDM 2 阻害剤は、HDM 2 0 1 であり、且つCK 1 分解剤及び/又はMDM 4 阻害剤は、レナリドミドである、実施形態 1 の組み合わせ、実施形態 2 の使用のための組み合わせ又は実施形態 3 の方法。

【 0 0 2 5 】

1 1 . p 5 3 W T 腫瘍は、固形腫瘍である、実施形態 2、4 ~ 1 0 のいずれか 1 つの使用のための組み合わせ又は実施形態 3 ~ 1 0 のいずれか 1 つの方法。

【 0 0 2 6 】

1 2 . 固形腫瘍は、肉腫、例えば脂肪肉腫又は軟部組織肉腫、リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫(NHL)、特にマントル細胞リンパ腫(MCL)、黒色腫、例えば皮膚黒色腫又はブドウ膜黒色腫、芽細胞腫(例えば、神経芽細胞腫)、結腸腫瘍、結腸直腸腫瘍、腎腫瘍、肝腫瘍及び皮膚癌、例えばメルケル細胞癌(MCC)からなる群から選択される、実施形態 1 1 の使用のための組み合わせ又は実施形態 1 1 のいずれか 1 つの方法。

30

【 0 0 2 7 】

1 3 . 固形腫瘍は、メルケル細胞癌(MCC)である、実施形態 1 1 の使用のための組み合わせ又は実施形態 1 1 の方法。

【 0 0 2 8 】

1 4 . メルケル細胞癌(MCC)は、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)陽性MCCである、実施形態 1 3 の使用のための組み合わせ又は実施形態 1 3 の方法。

40

【 0 0 2 9 】

1 5 . p 5 3 W T 腫瘍は、血液腫瘍(又は血液悪性腫瘍)である、実施形態 2、4 ~ 1 0 のいずれか 1 つの使用のための組み合わせ又は実施形態 3 ~ 1 0 のいずれか 1 つの方法。

【 0 0 3 0 】

1 6 . 血液腫瘍は、急性骨髄性白血病(AML)、多発性骨髄腫(MM)、骨髄異形成症候群(MDS)及び急性リンパ芽球性白血病(ALL)からなる群から選択される、実施形態 1 5 の使用のための組み合わせ又は実施形態 1 5 の方法。

【 0 0 3 1 】

1 7 . 血液腫瘍は、多発性骨髄腫(MM)及び骨髄異形成症候群(MDS)からなる群

50

から選択される、実施形態 15 の使用のための組み合わせ又は実施形態 15 の方法。

【0032】

18. 血液腫瘍は、骨髄異形成症候群 (MDS) である、実施形態 15 の使用のための組み合わせ又は実施形態 15 の方法。

【0033】

19. MDM2 阻害剤は、HDM201 であり、CK1 分解剤及び / 又は MDM4 阻害剤は、レナリドミドであり、p53WT 腫瘍は、MCV 陽性 MCC である、実施形態 2 の使用のための組み合わせ又は実施形態 3 の方法。

【0034】

20. MDM2 阻害剤は、HDM201 であり、CK1 分解剤及び / 又は MDM4 阻害剤は、レナリドミドであり、p53WT 腫瘍は、MDS である、実施形態 2 の使用のための組み合わせ又は実施形態 3 の方法。

10

【0035】

21. 1つ以上の更なる抗癌剤を更に含む、実施形態 1 ~ 20 のいずれか 1つの組み合わせ / 使用のための組み合わせ / 方法。

【0036】

本明細書に記載される組み合わせは、有利な抗癌効果、例えば抗癌効果の増強、毒性の低減及び / 又は副作用の低減を提供できる。例えば、第 1 の治療剤、例えば本明細書に開示される治療剤のいずれか及び第 2 の治療剤、例えば 1つ以上の追加の治療剤又は全ては、単剤療法の用量と比較して同じ治療効果を達成するのに要求されることになるものより少ない投与量で投与され得る。従って、前述の組み合わせ療法を使用して、癌を含む増殖性障害を処置するための組成物及び方法が開示される。

20

【0037】

一部の実施形態において、本明細書に記載される組み合わせにより、対象、例えば本明細書に記載される癌を有する対象を処置する方法は、治療レジメンの一部としての組み合わせの投与を含む。ある実施形態において、治療レジメンは、本明細書に記載される 1つ以上、例えば 2、3 又は 4つの組み合わせを含む。一部の実施形態において、治療レジメンは、少なくとも 1つの相及び任意選択で 2つの相、例えば第 1 相及び第 2 相において対象に投与される。一部の実施形態において、第 1 相は、用量漸増相を含む。一部の実施形態において、第 1 相は、1つ以上の用量漸増相、例えば第 1、第 2 又は第 3 の用量漸増相を含む。一部の実施形態において、用量漸増相は、例えば、本明細書に記載される通りの 2、3、4つ又はそれを超える治療剤を含む組み合わせの投与を含む。一部の実施形態において、第 2 相は、用量拡大相を含む。一部の実施形態において、用量拡大相は、例えば、本明細書に記載される通りの 2、3、4つ又はそれを超える治療剤を含む組み合わせの投与を含む。一部の実施形態において、用量拡大相は、用量漸増相と同じ 2、3、4つ又はそれを超える治療剤を含む。

30

【0038】

一部の実施形態において、第 1 の用量漸増相は、2つの治療剤、例えば本明細書に記載される 2つの治療剤を含む組み合わせの投与を含み、治療剤の 1つ又は両方に関する最大耐量 (MTD) 又は拡大のための推奨用量 (RDE) が決定される。一部の実施形態において、第 1 の用量漸増相の前に、対象は、単剤として第 1 の用量漸増相において投与される治療剤の 1つと共に投与された。

40

【0039】

一部の実施形態において、第 2 の用量漸増相は、3つの治療剤、例えば本明細書に記載される 3つの治療剤を含む組み合わせの投与を含み、治療剤の 1、2つ又は全てに関する最大耐量 (MTD) 又は拡大のための推奨用量 (RDE) が決定される。一部の実施形態において、第 2 の用量漸増相は、第 1 の用量漸増相が終了した後に始まる。一部の実施形態において、第 2 の用量漸増相は、第 1 の用量漸増相において投与される治療剤の 1つ以上の投与を含む。一部の実施形態において、第 2 の用量漸増相は、第 1 の用量漸増相を実施することなく実施される。

50

【 0 0 4 0 】

一部の実施形態において、第3の用量漸増相は、4つの治療剤、例えば本明細書に記載される4つの治療剤を含む組み合わせの投与を含み、治療剤の1、2、3つ又は全ての最大耐量(MTD)又は拡大のための推奨用量(RDE)が決定される。一部の実施形態において、第3の用量漸増相は、第1又は第2の用量漸増相が終了した後に始まる。一部の実施形態において、第3の用量漸増相は、第2の用量漸増相において投与される治療剤の1つ以上(例えば、全て)の投与を含む。一部の実施形態において、第3の用量漸増相は、第1の用量漸増相において投与される治療剤の1つ以上の投与を含む。一部の実施形態において、第3の用量漸増相は、第1、第2又は両方の用量漸増相を実施することなく実施される。

10

【 0 0 4 1 】

一部の実施形態において、用量拡大相は、第1、第2又は第3の用量漸増相が終了した後に始まる。一部の実施形態において、用量拡大相は、用量漸増相、例えば第1、第2又は第3の用量漸増相において投与される組み合わせの投与を含む。ある実施形態において、生検は、用量拡大相において対象から得られる。

【 0 0 4 2 】

理論に束縛されるものではないが、一部の実施形態において、用量漸増相及び用量拡大相を含む治療レジメンは、組み合わせのための新規の薬剤若しくはレジメンの投入、組み合わせの迅速な生成及び/又は許容できる組み合わせの安全性及び活性の評価を可能にすると考えられる。

20

【 0 0 4 3 】

ここで、本発明者らは、MCV-STが転写アクチベーターとして機能して、次いでMDM4と協調するMDM2及びCK1のレベルを増大させて、MCCにおいてp53機能を阻害することを実証する。本発明者らは、MCCにおいてMDM2及びMDM4の両方を標的化する相乗的有効性を更に実証する。

【 0 0 4 4 】

メルケル細胞癌(MCC)は、攻撃性皮膚癌である。ウイルス陰性(メルケル細胞ポリオーマウイルス、MCV)MCCは、RB及びp53中の不活性化突然変異を含有する一方、MCV陽性MCCは、通常、野生型RB及びp53を含有する。本発明者らは、RBへのMCVラージT抗原結合がp53活性化をもたらす一方、MCVスモールT抗原がMDM2及びCK1、MDM4のアクチベーターのレベルを増大させることによりp53活性化を低減させることを実証する。レナリドミド又は特異的MDM4阻害剤によるCK1の標的化分解は、MDM2阻害剤と相乗的に作用してp53を活性化させ、アポトーシスを誘導する。本発明者らの研究は、MCCにおけるp53のMCV制御の背後の機序を明らかにし、p53野生型腫瘍におけるMDM2及びMDM4の組み合わせによる標的化の有用性を実証する。

30

【 0 0 4 5 】

メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)は、全てのメルケル細胞癌(MCC)、皮膚の高攻撃性神経内分泌癌のおよそ80%に寄与する。MCV陽性MCCは、スモールT抗原(ST)及びラージT抗原(LT)のトランケート形態を発現し、通常、野生型p53(TP53)及びRB(RB1)を含有する。対照的に、ウイルス陰性MCCは、TP53及びRB1中の不活性化突然変異を含有する。MCVトランケートLTは、RBに結合し、それを阻害し得る一方、p53に結合しない。本発明者らは、ここで、MCV-LTがRBに結合し、ARF、MDM2の阻害剤のレベルの増大及びp53の活性化をもたらすことを開示する。しかしながら、STの同時発現は、p53活性化を低減させた。

40

【 0 0 4 6 】

MCV-STは、MYCホモログMYCL(L-Myc)をEP400クロマチンリモデラー複合体に動員し、特異的標的遺伝子をトランス活性化させる。本発明者らは、MCV陽性MCC細胞系中のEP400の枯渇がp53標的遺伝子発現の増大をもたらすことを観察した。本発明者らは、MCV-ST-MYCL-EP400複合体がp53を機能

50

的に不活性化させ得ることを疑ったが、根本的な機序は、公知でなかった。EP400 枯
 渴後のChIP及びRNA-seq統合分析は、MDM2及びCK1、MDM4のアク
 チベーターをST-MYCL-EP400複合体の標的遺伝子として同定した。更に、M
 CV陽性MCC細胞は、高レベルのMDM4を発現した。MDM2阻害剤を、CK1を
 標的化するレナリドミド又はMDM4阻害剤と組み合わせることは、p53の相乗的活性
 化を引き起こし、MCV陽性MCC細胞及びマウス中のMCC由来ゼノグラフトにおける
 アポトーシス応答をもたらした。これらの結果は、ウイルス陽性MCC及び他のp53野
 生型腫瘍におけるMDM2及びMDM4の二重標的化を支持する。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1-1】図1：メルケル細胞ポリオーマウイルスラージT抗原は、p53応答を活性
 化させ、スモールT抗原は、それを減衰させる。A. MCV LTのトランケート腫瘍ア
 イソフォームの誘導性発現は、IMR90細胞中でARF及びp53標的遺伝子を増大さ
 せる。GFP又はLT-L21及びLT-162トランケートLTの発現を24時間のド
 キシサイクリン(DOX)処置により誘導した。LT、ARF及びp53標的遺伝子RN
 AレベルをGFP誘導細胞のものに正規化した一方、GFPレベルをLT-L21試料に
 正規化した。データを平均±SDとして示す；* スチューデントt検定 $P < 0.05$ 、**
 $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ 、**** $P < 0.00005$ 。B. IMR90
 細胞を、GFP、ST、LT-L21又はSTと共にLT-L21を発現するように40
 時間誘導した。溶解物をDOX前(-)又は後(+)に調製した。p53応答の活性化は
 、p53、ホスホ-セリン15p53(P-p53)、アセチル-リジン382p53(
 Ac-p53)、p21及び開裂PARP(**)のレベルの増大により反映される。C
 . L21の発現は、RBの阻害及びARFの誘導を介してp53を活性化させるが、LX
 CXEモチーフ中のLT突然変異体(E216K)は、それを活性化させない。

【図1-2】(上記の通り。)

【図1-3】(上記の通り。)

【図2-1】図2：MDM2及びCK1は、ST-MYCL-EP400複合体の転写
 標的である。A. 対照shRNAに対する誘導性shRNAを用いるEP400の枯渴後
 のMKL-1MCC細胞系中の示差的に発現されるp53標的遺伝子を説明するボルケ
 ーノプロット。各遺伝子log2倍率変化を統計的有意性のために-log10p値に対
 してプロットした。緑色ドットは、2倍変化カットオフを満たす遺伝子を示し、赤色ド
 ットは、0.1未満の調整p値を意味する。B. RT-qPCRを、MKL-1細胞につい
 てshRNAを8日間誘導した後に実施した。リードをRPLP0及び非誘導試料に正規
 化した。実験を3回実施し、平均化した。データを平均±SDとして示す；* スチュー
 デントt検定 $P < 0.05$ 、** $P < 0.005$ 、*** $P < 0.0005$ 、**** $P < 0$
 .00005。C. MKL-1細胞中の示されるプロモーターのMAX、EP400、S
 T及びIgG抗体を用いるChIP、それに続くpPCR。ChIP-qPCRを3回実
 施し、平均パーセントインプットを示す。D. MCV T抗原の枯渴は、MDM2、CK
 1及びMDM4レベルの低減を引き起こす。MKL-1細胞を特異的shRNAにより
 5日間形質導入し、ウエスタンブロッティングのために回収した。E. MCV T抗原の
 存在(+)又は不存在(-)下でのIMR90細胞中のMDM2プロモーターについての
 MAX、EP400及びST抗体を用いるChIP-qPCR。ChIPを独立して5回
 実施した。F. ヌトリン-3処置は、p53DDを発現するIMR90細胞中でp53応
 答を誘発しないが、MCV T抗原は、MDM2、MDM4及びCK1のレベルを増大
 させる。MKL-1及びIMR90-p53DDをヌトリン-3(1μM)により24時
 間処置した。

【図2-2】(上記の通り。)

【図2-3】(上記の通り。)

【図2-4】(上記の通り。)

【図2-5】(上記の通り。)

10

20

30

40

50

【図2 - 6】(上記の通り。)

【図3 - 1】図3：MDM4は、MCCV陽性MCCにおいて過剰発現される。A．MCC細胞系及びヒト包皮線維芽細胞(HFF)からのRNAをMDM4(総)、MDM4-FL(全長バリエーション)及びMDM4-S(ショートプライスバリエーション)についてのRT-qPCRのために回収した。MDM4レベルをRPLP0、18s rRNA及びベータアクチンRNA対照の幾何平均と正規化した。データを平均±SDとして示す；MDM4-FLについて*スチューデントt検定 $P < 0.05$ 。B．示される抗体を用いるMCC細胞系及びHFFのウエスタンブロット。MS-1及びMCC13は、不活性化突然変異に起因してp53を過剰発現し、MKL-2及びMCC26は、検出可能なレベルのp53を発現しない。

10

【図3 - 2】(上記の通り。)

【図4 - 1】図4：MDM2及びMDM4の阻害は、MCC細胞系中でp53活性化を増強させる。A．レナリドミドは、MKL-1中でヌトリン-3によるp53活性化を増強させる。MKL-1細胞をヌトリン-3(5µM)、レナリドミド(Len、10µM)又はその両方により40時間処置した。B．レナリドミドは、CK1を枯渇させるが、UISO細胞中でヌトリン-3によるp53活性化を増強させない。MKL-1(MCV+MCC)又はUISO(MCV-MCC)細胞をヌトリン-3(1µM)により、レナリドミド(10µM)を用いて又は用いずに24時間処置した。注目すべきことに、UISOは、MKL-1よりも少ないMDM2及びMDM4タンパク質を有する。C．レナリドミド及びより少ない程度でボマリドミドは、ヌトリン-3と協調してp53を活性化させるが、サリドマイドは、協調しない。MKL-1細胞をヌトリン-3により、レナリドミド、ボマリドミド(10µM)又はサリドマイド(10µM)により24時間処置した。D．レナリドミド処置は、p53及び活性化MDM2へのMDM4結合を低減させる。MKL-1細胞をヌトリン-3(5µM)、レナリドミド(10µM)又はその両方により40時間処置し、MDM4、p53及びCK1に対する抗体を用いる免疫沈降とそれに続くウエスタンブロッティングのために回収した。E．CRISPR形質導入によるCK1の枯渇は、ヌトリン-3によるp53活性化を増強させる。2つのCK1sgRNAのそれぞれを安定的に発現するMKL-1細胞をヌトリン-3(1µM)により、レナリドミドを用いて又は用いずに24時間処置した。レナリドミドは、sgRNAが完全に枯渇させなかったCK1を更に減少させた。F．MDM4阻害剤SC-24-UR99(UR99)は、p53の活性化においてMDM2阻害剤と協調する。MKL-1細胞をヌトリン-3(1µM)又はHDM201(0.1µM)により、レナリドミド(1µM)又はUR99(0.1µM)を用いて又は用いずに処置した。

20

30

【図4 - 2】(上記の通り。)

【図4 - 3】(上記の通り。)

【図4 - 4】(上記の通り。)

【図4 - 5】(上記の通り。)

【図4 - 6】(上記の通り。)

【図5 - 1】図5：MDM2及びCK1-MDM4の阻害は、アポトーシスによる細胞死を相乗的に誘導する。A．MKL-1及びMS-1細胞をMDM2阻害剤、ヌトリン-3、RG7388又はAMG232によりいくつかの濃度において処理し、XTTアッセイを処置の96時間後に実施した。*多重t検定p値 < 0.005 。B．Bliss相乗作用試験は、ヌトリン-3とレナリドミド又はSC-24-UR99との間で強い相乗作用を示すが、サリドマイドとの間では示さない。C．BH3プロファイリングを、レナリドミド、ヌトリン-3又はその両方の薬物により16時間処置されたMKL-1細胞を用いて実施した。実験を3回実施した。データを平均±SDとして示す；*スチューデントt検定 $P < 0.05$ 。D．SCIDマウス中のMKL-1MCCゼノグラフトは、HDM201及びレナリドミドの組み合わせ処置に応答した。HDM201(40mg/kg)、レナリドミド(50mg/kg)又はその両方の薬物を、ゼノグラフト腫瘍が200mm³になったときから出発して毎日経口投与した。データを平均±SEMとして示す

40

50

; HDM201と組み合わせ処置との間の多重t検定 * P < 0.05 # - 腫瘍容積が最大許容サイズに達したために試験を終了した。E. モデル：メルケル細胞ポリオーマウイルスT抗原は、p53 - MDM2 - MDM4経路の標的化についてメルケル細胞癌を感作させる。

【図5 - 2】(上記の通り。)

【図5 - 3】(上記の通り。)

【図5 - 4】(上記の通り。)

【図5 - 5】(上記の通り。)

【図6 - 1】図6：(本明細書において図S1とも称する)。A. MCV LTの全長又はトランケート腫瘍アイソフォームの誘導性発現は、IMR90細胞中でp53を活性化させる。GFP又はWT(野生型)LT、FL(全長)LT、162、168及びL21トランケートLTの発現をドキシサイクリン(DOX)処置により40時間誘導した。溶解物をDOX前(-)又は後(+)に調製した。p53応答の活性化は、p53、ホスホセリン15p53(P-p53)、アセチル-リジン382p53(Ac-p53)、p21及び開裂PARP(**)のレベルの増大により反映される。B. RT-qPCRは、IMR90細胞におけるLT-L21誘導が公知のp53標的遺伝子p21のレベルを増大させることを示す。L21-LTを単独又はスプライスパリアントとしてのSTと共に4、8、12、16、20、24、36、48、60及び72時間誘導し、RNAをRT-qPCRのために回収した。示されるデータは、3つの独立実験の代表値である。

10

**二元ANOVA p値 < 0.005。C. LXCXE LT突然変異体は、VPS39に結合し得るが、RBに結合し得ない。GFP、LT-L21又はLT-L21 E216 K突然変異体を安定的に発現するHCT116細胞をLT免疫沈降のために回収した。

20

【図6 - 2】(上記の通り。)

【図6 - 3】(上記の通り。)

【図7 - 1】図7：(本明細書において図S2とも称される)。A. RNA-seqの正規化カウントは、MKL-1中でEP400 shRNAを用いると、対照shRNAと比べてMDM2のレベルが減少し、p21が増大したことを示す。B. 2つの独立したshRNAを使用するEP400の枯渇後の対照shRNAと比較したMDM2、CK1(CSNK1A1)及びEP400のRNA-seq倍率変化は、EP400と共にMDM2及びCK1のレベルの低減を示す。ボンフェローニ補正のための調整p値を示す。C. MKL-1細胞を、EP400又は対照shRNAを発現するように8日間誘導した。ウエスタンブロットは、EP400 shRNAによるMDM2及びEP400レベルの減少並びにp53及びp21レベルの増大を示す。D. MCV T抗原(LT-L21及びST)を用いて(+)又は用いず(-)、hTERT、p53DD、MYCL(IMR90-p53DD)を安定的に発現するIMR90細胞を、示される抗体を用いてブロットした。E. MAX、EP400及びSTの2つの独立したChIP-seqは、MDM2及びCK1プロモーターにおけるピークを示し、H3K4me3によっても標識される。F. STのChIP-qPCRは、MCV T抗原を発現するIMR90-p53DD細胞中でMCV STがMDM2のプロモーター及びCK1プロモーターに結合することを示す。実験を2回実施した。データを平均±SDとして示す；* P < 0.05、n.s ≥ 0.05。G. MKL-1細胞中のMDM2及びCK1プロモーターにおけるST及びEP400濃縮は、p53を枯渇させた。p53 shRNAを安定的に発現するMKL-1を使用した。実験を2回実施した。

30

40

【図7 - 2】(上記の通り。)

【図7 - 3】(上記の通り。)

【図7 - 4】(上記の通り。)

【図7 - 5】(上記の通り。)

【図7 - 6】(上記の通り。)

【図7 - 7】(上記の通り。)

【図8 - 1】図8：(本明細書において図S3とも称される)。A. MDM4-FL(全

50

長)とMDM4-S(ショートバージョン)との比。B.MCCの101個の症例のcBioPortal分析は、TP53突然変異もRB1突然変異も有さないMCC(64個)と比較してTP53及びRB1突然変異並びに高レベルの突然変異を有する37個の腫瘍を明らかにする。MDM2及びMDM4は、高頻度コピー数増加(3~8コピー)及び増幅(>8コピー)を示す。

【図8-2】(上記の通り。)

【図9-1】図9:(本明細書において図S4とも称される)。A.レナリドミドは、MKL-1中でCK1タンパク質を急速に低減させる。MKL-1細胞をレナリドミド(Len、10 μ M)及び/又はシクロヘキシミド(CX、5 μ M)により、2、4又は6時間にわたり、MG132(10 μ M)を用いて又は用いずに処置した。p53は、シクロヘキシミドパルスチェイス処置のための陽性対照である。B.MKL-1、WaGa、Peta、BroLi及びMS-1MCCV陽性MCC細胞系をヌトリン-3(5 μ M)により、レナリドミド(10 μ M)を用いて又は用いずに40時間処置した。C.レナリドミド(10 μ M)及びより少ない程度でポマリドミド(10 μ M)は、CK1タンパク質レベルを減少させるが、サリドマイド(10 μ M)は、それを減少させない。D.MKL-1細胞をヌトリン-3、レナリドミド又はその両方により16時間処置し、次いでシクロヘキシミド処置を2及び4時間行った。Licorを使用してウエスタンブロットバンドを定量し、各処置について0時間の時点で正規化した。p53半減期をDMSO及びレナリドミド処置試料について1.5時間並びにヌトリン-3処置試料について4時間と推定する。実験を3回実施し、データを平均 \pm SDとして示す; **二元ANOVA<0.005。E.MKL-1細胞をヌトリン-3(5 μ M)、レナリドミド(10 μ M)又はその両方により24又は40時間処置し、MDM4、p53及びCK1を用いるIP-ウエスタンブロットングのために回収した。

【図9-2】(上記の通り。)

【図9-3】(上記の通り。)

【図9-4】(上記の通り。)

【図9-5】(上記の通り。)

【図10-1】図10:(本明細書において図S5とも称される)。A~C.MKL-1細胞をヌトリン-3(A)、RG7388(B)又はAMG232(C)により、レナリドミド(5 μ Mの固定濃度)を用いて又は用いずに処置した。XTTを96時間の処置において実施した。D.MKL-1(野生型p53を有する)及びMS-1(p53突然変異を有する)をヌトリン-3により、レナリドミドを用いて又は用いずに96時間処置し、XTTアッセイを実施してDMSO対照に正規化した相対細胞生存率を測定した。E.レナリドミド及びより少ない程度でポマリドミドは、MKL-1生存率の低減においてヌトリン-3と相乗作用するが、サリドマイドは、相乗作用しない。XTTアッセイを96時間の処置において3つの生物学的レプリケートで実施した。データを平均 \pm SDとして示す; *P<0.05、**P<0.005、***P<0.0005、****P<0.00005及びn.s>=0.05。

【図10-2】(上記の通り。)

【図10-3】(上記の通り。)

【図10-4】(上記の通り。)

【図10-5】(上記の通り。)

【図11-1】図11:(本明細書において図S6とも称される)。A.CompSyn相乗作用試験は、ヌトリン-3及びRG7388がレナリドミドと相乗作用することを示す。XTTアッセイをMKL-1細胞の96時間の処置後に実施した。A.1未満のCI値が相乗効果を意味する。B~D.ヌトリン-3と、サリドマイド(B)、レナリドミド(C)又はSC-24-UR99(D)との用量応答マトリックス。E.ZIP相乗作用試験。F.HSA相乗作用試験。

【図11-2】(上記の通り。)

【図11-3】(上記の通り。)

10

20

30

40

50

【図 1 1 - 4】(上記の通り。)

【図 1 1 - 5】(上記の通り。)

【図 1 1 - 6】(上記の通り。)

【発明を実施するための形態】

【0048】

LTは、p53応答を活性化させ、STは、それを減衰させる。

正常細胞中のp53に対するMCV T抗原の効果を試験するため、GFP又はLTの腫瘍由来トランケート若しくは全長形態を発現するドキシサイクリン誘導性ベクターをIMR90二倍体肺線維芽細胞中に導入した(図1A、S1A)。LTのトランケート形態としては、それぞれインタクトLXCXEモチーフを含有するL21(残基1~292をコード)、162(残基1~320)及び168(残基1~275)が挙げられる[6]。IMR90中のLT-L21又はLT-162発現は、RT-qPCRにより評価して、ARF並びにGDF15及びp21(CDKN1A)を含むいくつかのp53標的遺伝子のレベルを有意に増大させた(図1A)。RBの阻害は、E2F転写因子を活性化させ、ARFのレベルの増大をもたらす[10]。ARFは、主要なp53分解E3リガーゼMDM2の強力な阻害剤である[14]。LT発現は、p53並びにp53活性化を示すホスホ-セリン15p53(P-p53)及びp21のタンパク質レベルを増大させた(S1A)。LT-162の発現も開裂PARP(**)レベルの増大をもたらし、アポトーシス応答を示した。

【0049】

LT及びSTは、MCC腫瘍においてインテグレートMCPyVウイルスDNAからスプライスバリエーションとして同時発現される。IMR90細胞系においてこれを模倣するため、本発明者らは、STを同時発現するLT-L21のゲノムバージョンを導入した。STがLT-L21と同時に発現された場合、LT-L21のみに対する応答と比較して低いレベルのp53活性化(p21、p-p53及びアセチル-リジン382又はAC-p53)が観察された(図1B、S1B)。この結果は、トランケートLTがp53を活性化させ得る一方、STが同時発現される場合にこの応答を低減させ得ることを示す。ARFのレベルの増大がRBへのLT結合を要求したか否かを決定するため、本発明者らは、LT-L21のLXCXEモチーフ中の点置換突然変異(E216K)を導入した。HCT116細胞中で安定的に発現される場合、L21-E216Kは、RBを共沈させ得なかったが、LTの異なる領域に結合するVPS39への結合を保持した(S1C)[5]。IMR90細胞中で発現される場合、L21-E216Kは、ARFのレベルも、p21のレベルも、p53のレベルも、AC-p53のレベルも増大させなかった(図1C)。これらの結果は、RBへのLT結合がARFのレベルの増大及びp53応答の活性化に寄与することを示す。注目すべきことに、STがL21-E216Kと同時に発現された場合、MDM2のレベルの増大が検出されたが、p21のレベルの増大が検出されなかった。

【0050】

MDM2及びCK1は、ST-MYCL-EP400複合体の転写標的である。

本発明者らは、MCV STがMYCホモログMYCL(L-MyC)をEP400クロマチンリモデラー複合体に動員して特異的遺伝子プロモーターに結合させ、それらの発現を活性化させることを近年報告した[15]。MKL-1細胞中でST-MYCL-EP400複合体により調節される遺伝子を同定するため、3つの異なるshRNAを使用するEP400枯渇後にRNA-seqを実施した[15]。報告されたRNA-seq結果を使用して、本発明者らは、公知のp53標的遺伝子の遺伝子発現の変化を評価した[9]。EP400枯渇は、ボルケーノプロットにより可視化される通り、p21(CDKN1A)を含む多くのp53標的遺伝子のレベルの増大をもたらした(図2A)。1.5の倍率変化カットオフを使用して、合計198個のp53標的遺伝子のうちの59個の遺伝子が上方調節され、17個が下方調節された(表S1)[9]。EP400枯渇はまた、MDM2E3リガーゼ及びCK1レベルの減少をもたらした(図2B、S2A~C)。MDM2及びMDM4は、p53のトランス活性化ドメインに直接結合してp53活

10

20

30

40

50

性を遮断するN末端 p 5 3 結合ドメインを含有する [1 1]。MDM 4 は、p 5 3 に寄与するそれ自体の活性を調節し得る。MDM 4 のN末端 p 5 3 結合ドメインは、その中央 Wモチーフ領域との分子内相互作用を形成し、それにより p 5 3 への結合を低減させる [1 2]。CK 1 (CSNK 1 A) は、MDM 4 に結合し、それをリン酸化し、次いでこの自己阻害相互作用を防止し、MDM 4 を活性化させるセリン/トレオニンキナーゼである [1 3]。RT - qPCR 及びウエスタンブロッティングは、MKL - 1 細胞中で EP 4 0 0 ノックダウン時に p 2 1 レベルが増大し、MDM 2 及びCK 1 レベルが減少したことを裏付けた (図 2 B、S 1 C)。

【 0 0 5 1 】

ST、MAX (MYCL と二量体化する) 及び EP 4 0 0 に対する抗体を用いる ChIP - seq は、MDM 2 及びCK 1 プロモーターの濃縮を明らかにした (S 2 E) [1 5]。本発明者らは、MAX、ST 及び EP 4 0 0 について ChIP - qPCR を実施し、それらのプロモーターの特異的濃縮を観察した (図 2 C)。本発明者らは、MKL - 1 細胞中で特異的 shRNA を使用して ST 又は ST 及び LT を枯渇させ、MDM 2 及びCK 1 のレベルが shRNA の発現を減少させることを見出した (図 2 D) [1 6]。この結果は、RT - qPCR 及び ChIP データと一緒に、MDM 2 及びCK 1 が ST - MYCL - EP 4 0 0 複合体の直接的な転写標的であることを示す。注目すべきことに、ST の枯渇時に MDM 4 レベルが減少したが、本発明者らは、ST による MDM 4 の直接的な活性化についてのエビデンスを見出さなかった。ST は、p 5 3 に寄与する MDM 4 活性を活性化させるように機能し得る CK 1 のレベルを増大させる。

【 0 0 5 2 】

MDM 2 は、p 5 3 標的遺伝子であるため、MCV T 抗原は、p 5 3 の活性化により MDM 2 レベルを間接的に増大させることが可能である [9]。この可能性を排除するため、本発明者らは、内因性 p 5 3 に結合し、それを不活性化させる p 5 3 のドミナントネガティブバージョン (p 5 3 DD) を IMR 9 0 細胞中に導入した [1 7]。IMR 9 0 - p 5 3 DD 細胞を MYCL 及び ST と共に MCV LT - L 2 1 により更に形質導入した [1 7]。本発明者らは、MDM 2 及びCK 1 プロモーターへの ST 結合を ChIP - qPCR により検出し、MDM 2 プロモーターに対する EP 4 0 0 濃縮が MCV T 抗原の存在下で増大することを観察した (図 2 E、S 2 F)。ヌトリン - 3 による MDM 2 阻害剤処置は、p 5 3、p 5 3 活性化を示す p - p 5 3 及び PUMA レベルを増大させなかった (図 2 F、S 1 D)。ST - MYCL - EP 4 0 0 複合体が p 5 3 と無関係にそれらのプロモーターに結合することを更に決定するため、本発明者らは、MKL - 1 中で shRNA を用いて p 5 3 を枯渇させ、EP 4 0 0 及び ST の ChIP - qPCR を実施した (S 2 G)。本発明者らは、p 5 3 が MDM 2 及びCK 1 プロモーターに対する EP 4 0 0 及び ST 濃縮に影響しないことを見出した。これらの結果は、MCV ST が MCC 及び IMR 9 0 細胞中で p 5 3 と無関係に MDM 2 及びCK 1 をトランス活性化させることを示す。

【 0 0 5 3 】

MDM 4 は、ウイルス陽性 MCC において過剰発現される。

MDM 4 の過剰発現は、野生型 p 5 3 を有する一部の癌において見出すことができる [1 8]。本発明者らは、MDM 4 プライマーの 3 つのセットを使用して MCC 細胞系中の総 MDM 4 (全てのスプライズバリエーション)、MDM 4 - FL (全長) 及び MDM 4 - S (RING ドメインを欠くショートバリエーション) レベルを評価した [1 8]。ウイルス陽性 (MKL - 1、MKL - 2、MS - 1、WaGa、PeTa 及び BroLi) MCC 細胞系は、ウイルス陰性 (UISO、MCC 1 3 及び MCC 2 6) MCC 系と比べて有意に高いレベルの総 MDM 4 及び MDM 4 FL を有した (図 3 A)。更に、MDM 4 - FL と MDM 4 - S との比は、ウイルス陽性系において高かった (S 3 A)。本発明者らは、それらの MCC 細胞系中の MDM 4 - FL タンパク質レベルを評価した。ウイルス陽性 MCC 細胞系は、ウイルス陰性 MCC 細胞系と比較して高いレベルの MDM 4 - FL を発現した (図 3 B)。注目すべきことに、ウイルス陰性 UISO 細胞系は、高い MDM 4 - FL

10

20

30

40

50

とMDM4-Sとの比を有したが、豊富なレベルのMDM4タンパク質を発現しなかった(図3A、S3A)。ウイルス陽性MCCにおけるp53のLTの活性化は、MDM2又はMDM4発現への依存性を作出し得る。101個のMCC腫瘍の標的化次世代シーケンシング(オンコパネル)は、MCCVの存在にもかかわらず、MDM4の高頻度の低いコピー増加(3~8コピー)を明らかにした(S3B)[19]。

【0054】

MDM2及びMDM4の阻害は、MCCにおいてp53を活性化させる。

本発明者らは、野生型p53を含有するMKL-1、WaGa、PeTa及びBroLi MCC細胞系中の総p53、P-p53、Ac-p53、p21及びPUMAのレベルの増大により示される通り、ヌトリン-3MDM2阻害剤処置がp53を活性化させるが、不活性化p53突然変異を保有するMS-1細胞において活性化させないことを観察した(図2F、図4A、S2B)[20]。近年の報告は、CRBN(セレブロン)E3リガーゼがレナリドミドの存在下でユビキチン化のためにCK1を特異的に標的化し得ることを実証した[21, 22]。本発明者らは、MCC細胞中でレナリドミドがCK1レベルを減少させ、p53を活性化させ得たか否かを評価した。MKL-1細胞をレナリドミドにより、シクロヘキシミドを用いて又は用いずに処置してタンパク質合成を遮断した。CK1レベルは、6時間のシクロヘキシミド処置によってそれほど変化しなかったが、レナリドミドの添加後にレベルが急速に減少した(S4A)。

【0055】

レナリドミド処置単独は、p53レベルに対して穏やかな正の効果をもたらし、しかしながら、ヌトリン-3及びレナリドミドを組み合わせた場合、p53及びp53標的遺伝子のより大きい増大が、野生型p53を有する細胞系において観察された(図4A、S4B)。本発明者らは、定量的ウエスタンブロッティングによりシクロヘキシミドの存在下でヌトリン-3、レナリドミド又はその両方により処置されたMKL-1細胞におけるp53安定性を評価した(S4D)。レナリドミドは、ヌトリン-3の存在下でp53の安定性を有意に増大させた[23]。レナリドミドによるCK1の枯渇は、p53に寄与するMDM4の活性を減少させ得る。本発明者らは、レナリドミドが、MDM2及びMDM4をほとんど発現しないウイルス陰性及びp53野生型UISO細胞中でp53活性化を増強させるか否かを試験した(図3A~B)。本発明者らは、レナリドミドがUISO細胞中でCK1レベルを減少させるが、ヌトリン-3によるp53活性化を増強させ得ないことを観察した(図4B)。

【0056】

CRBNの構造分析は、レナリドミドがCK1との相互作用を強力に促進し得る一方、関連化合物サリドマイド及びポマリドミドがCK1をCRBNにそれほど動員し得ないことを明らかにした[22]。レナリドミドと比較して、ポマリドミド及びサリドマイドは、MKL-1細胞中でCK1タンパク質レベルを低減させなかった(S4C)。更に、ポマリドミド又はサリドマイドは、MKL-1細胞中でヌトリン-3に対するp53応答を増強させなかった(図4C)。p53へのMDM4結合に対するCK1の寄与を試験するため、本発明者らは、ヌトリン-3及びレナリドミドにより40時間処置されたMKL-1細胞から調製された溶解物を用いてMDM4、p53及びCK1について免疫沈降(IP)を実施した(図4D及びS4E)。レナリドミド及びヌトリン-3は、ヌトリン-3のみと比べてCK1レベルを低減させ、p53レベルを増大させた。p53のレベルの増大にかかわらず、ヌトリン-3とのレナリドミド同時処置は、非処置又はヌトリン-3処置対照と比較してMDM4、CK1又は活性化MDM2によるp53の共沈を増大させず、MDM2を活性化させなかった。これは、CK1のレベルの低減がp53へのMDM4結合を減少させたことを示す。

【0057】

CK1がp53へのMDM4結合を可能とする場合、本発明者らは、CK1の損失がp53へのMDM4結合を低減させ、p53活性化を増強させることを予測した[13]。これを試験するため、本発明者らは、2つの独立したCRISPRsgRNAによ

10

20

30

40

50

りM K L - 1中でC K 1 を枯渇させ、ヌトリン - 3処置後にp 5 3活性化を評価した(図4 E) [2 4]。C K 1 のC R I S P Rノックアウトは、活性化M D M 2 (ホスホセリン1 6 6、P - M D M 2)、P - p 5 3、p 5 3及びp 2 1のレベルの増大により評価してp 5 3活性の増大をもたらし、レナリドミド又はs g R N AのいずれかによるC K 1 の低減は、p 5 3活性化を増強させることを示した[2 5]。特に、レナリドミドの添加は、C R I S P Rにより完全に枯渇されなかったC K 1 タンパク質レベルを低減させ、p 5 3活性化の標識を更に増大させた。本発明者らは、新たに開発されたM D M 4阻害剤(S C - 2 4 - U R 9 9、U R 9 9)がM D M 2阻害剤ヌトリン - 3又はH D M 2 0 1の活性を増強させ得るか否かを試験した(図4 F) [2 6]。U R 9 9は、p 5 3へのM D M 4結合を特異的に遮断する。本発明者らは、U R 9 9によるM D M 4の阻害がM D M 2阻害剤によるp 5 3活性化を増大させることを見出した。

10

【 0 0 5 8 】

レナリドミドは、M D M 2阻害剤と相乗作用してM C C細胞系中でアポトーシスを誘導する。

M C C細胞生存率に対するM D M 2阻害の効果を証明するため、本発明者らは、M K L - 1 (p 5 3野生型)及びM S - 1 (p 5 3突然変異体)細胞をM D M 2阻害剤ヌトリン - 3、R G 7 3 8 8又はA M G 2 3 2により9 6時間処置し、X T T生存率アッセイを実施した[2 7]。M K L - 1は、3つ全てのM D M 2阻害剤に感受性であったが、M S - 1細胞は、感受性でなかった(図5 A)。本発明者らは、レナリドミドをヌトリン - 3、R G 7 3 8 8及びA M G 2 3 2と組み合わせることの効果を試験し、レナリドミドと使用された場合に3つ全てのM D M 2阻害剤の有意に改善された細胞毒性を観察した(S 5 A ~ D)。C o m p u s y n (S 6 A)及びB l i s s (図5 B)方法を使用する相乗作用試験は、ヌトリン - 3又はR G 7 3 8 8とレナリドミド又はU R 9 9との組み合わせについての相乗作用的活性を明らかにした(S 6 B ~ F) [2 8 ~ 3 1]。対照的に、サリドマイドは、ヌトリン - 3との組み合わせで使用された場合、相乗作用についてのエビデンスを有さず、C K 1 レベルに対するその比較的low減された効果と一致した(図5 B、S 5 E)。

20

【 0 0 5 9 】

レナリドミドが、M C C細胞中でアポトーシスによる細胞死を引き起こすヌトリン - 3の能力に影響したか否かを決定するため、本発明者らは、遊離B H 3ペプチドに対する感受性を測定するB H 3プロファイリングを実施した[3 2]。ヌトリン - 3へのレナリドミドの添加は、アポトーシスのためのプライミング効果を増強させた(図5 C)。インビボでのM D M 2及びM D M 4の二重阻害を決定するため、本発明者らは、M K L - 1 M C CゼノグラフトをH D M 2 0 1 (インビボ有効性試験に好適)により、レナリドミドを用いて又は用いずに処置した(図5 D、表S 3)。本発明者らは、レナリドミドの添加がH D M 2 0 1の有効性を大幅に増強させ、M D M 2及びM D M 4を発現するp 5 3野生型腫瘍のための組み合わせ療法の臨床的有用性についての潜在性を提供することを見出した。本発明者らは、M C V T抗原が、ウイルス陽性M C Cにおいてp 5 3活性を抑制するためのM D M 2、M D M 4及びC K 1 への依存性を増大させ、治療潜在性を示すモデルを提案する(図5 E)。

30

40

【 0 0 6 0 】

レナリドミドは、悪性腫瘍、骨髄異形成症候群(M D S)及び多発性骨髄腫(M M)を処置するために使用されている[2 1]。突然変異体C S N K 1 A 1は、レナリドミド処置M D Sにおける芳しくない予後を予測することが報告された[3 3]。更に、突然変異体p 5 3を有するM D Sは、野生型p 5 3を有するM D Sと比較してレナリドミドに対して十分に応答せず、急性骨髄性白血病に進行する可能性が高く、レナリドミドの効果は、M D M 4の不活性化に部分的に依存性であり得ることを示す[3 4]。本発明者らの研究は、野生型p 5 3を含有するM C Cにおける並びに他の固形腫瘍及び血液悪性腫瘍におけるレナリドミドとM D M 2阻害剤との組み合わせについての合理的根拠を提供する。

【 0 0 6 1 】

50

ヒト使用のため、レナリドミドは、例えば、カプセル剤の形態でREVLIMIDの処方情報に従い、例えばMM組み合わせ療法について反復28日サイクルの1～21日目の1日1回25mg経口；自己HSC T後のMM維持療法について反復28日サイクルの1～28日目の1日1回10mg継続；MDSについて1日1回10mg；MCLについて反復28日サイクルの1～21日目の1日1回25mg経口で経口投与することができる。投薬は、腎損傷の症例における臨床及び実験室所見に基づいて継続又は修正され、開始用量は、クレアチニンクリアランス値に基づいて調整される。

【0062】

ヒト使用のため、HDM201は、例えば、カプセル剤の形態で経口投与することができる。特に、経口投与は、高用量間欠レジメン〔例えば、レジメンA（50mg～400mgのHDM201を3週間サイクルの1日目に投与又はレジメンB（50mg～150mgのHDM201を4週間サイクルの1及び8日目に投与）又はレジメンC（50mg～500mgのHDM201を4週間サイクルの1日目に投与）又は低用量拡張レジメン〔例えば、レジメンD（10mg～30mgのHDM201を4週間サイクルの最初の2週間、1日1回）又はレジメンE（15mg～50mgのHDM201を4週間サイクルの最初の週、1日1回）〕を使用し得る。

10

【0063】

ヒト使用のため、イダサヌトリンは、例えば、カプセル剤の形態で各28日間処置サイクルの1～5日目に1日1回又は1日2回、経口投与することができる。1日用量は、100mg～1000mgであり得る。

20

【0064】

ヒト使用のため、SC-24-UR99は、例えば、液剤又はカプセル剤の形態で静脈内又は経口投与することができる。投与は、高用量間欠レジメン〔例えば、レジメンA（10mg～1000mgのSC-24-UR99を3週間サイクルの1日目に投与又はレジメンB（5mg～500mgのSC-24-UR99を4週間サイクルの1及び8日目に投与）又はレジメンC（100mg～1000mgのSC-24-UR99を4週間サイクルの1日目に投与）又は低用量拡張レジメン〔例えば、レジメンD（1mg～100mgのSC-24-UR99を4週間サイクルの最初の2週間、1日1回）又はレジメンE（1mg～200mgのSC-24-UR99、4週間サイクルの最初の週、1日1回）〕を使用し得る。

30

【0065】

化学式

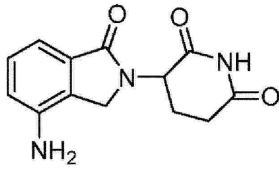
本明細書に挙げられる化合物は、以下の化学式により表すこともできる。

40

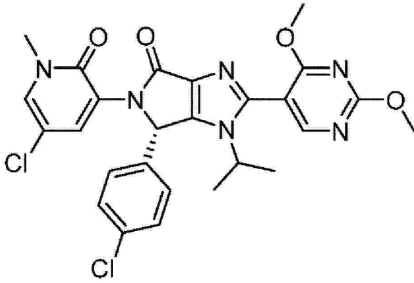
50

【化 1】

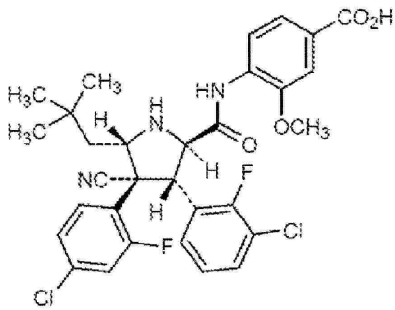
レナリドミド



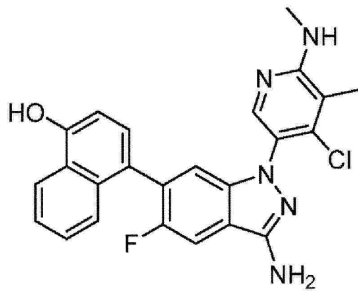
HDM201



イダサストリン



SC-24-UR99



【 0 0 6 6 】

表

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 S1. p53 は、EP400 shRNA の存在下で有意に示差的に発現される遺伝子を標的化する

上方調節された遺伝子(> 1.5)		下方調節された遺伝子(< -1.5)
VCAN	FAM183A	CBS
NTF3	PKP1	BTG2
CDKN1A	CCBP2	ASCC3
LOC100294145	PHLDA3	TRAF4
ATP2B2	RINL	ZNF219
TMEM63B	ANKRA2	CDC42BPG
PLK2	LRP1	MDM2
PTPRU	KRT18P55	SDC1
KSR1	SERPINB5	PGPEP1
CMBL	RNF157-AS1	TP53I3
PLEKHG1	COL17A1	DRAM1
DDIT4	PTCHD4	COL6A3
RRM2B	SCN2A	LOC284385
XPC	MYBPC3	KCNN4
INPP5D	CD82	FAS
ABCB9	KLHDC7A	ESRRB
FBXW7	PTPRE	PVT1
TP53I11	CPN1	
SULF2	GJB5	
LAMA3	ORAI3	
CEP85L	DOCK8	
SESN2	GDF15	
DGKI	TNFRSF10B	
ASS1	LOC284080	
LOC100506343	FLJ44511	
COL5A1	CFL1P1	
EPS8L2	DGKA	
LINC00663	PRDM1	
ITGA3	ITGA9	
ALOX5		

10

20

30

40

【 0 0 6 8 】

50

【表 2】

表 S2. RT-及び ChIP-qPCR プライマー

RT-qPCR	フォワード	リバース	
ARF	CGCCGTGTCCAGATGTCG	TGCTCTATCCGCCAATCAGG	
p21	GGAGACTCTCAGGGTCGAA	GGATTAGGGCTTCCTCTTG	
GDF15	TAACCAGGCTGCGGGCCAAC	CAGCCGCACTTCTGGCGTGA	
MDM2	GTGAATCTACAGGGACGCCAT	CTGATCCAACCAATCACCTGAA	
PUMA	TGGAGGGTCCTGTACAATCT	CACCTAATTGGGCTCCATCTC	
FBXW7	CCACTGGGCTTGTACCATGTT	CAGATGTAATTCGGCGTCGTT	10
GFP	AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC	CTTGTAGTTGCCGTCGTCCTTGAA	
EP400	CCAGGAGAGGGAAAGAATTGAG	TTCATCGTCCACTTCGTCATC	
CK1 α	GCTAGCATCAATGCACATCTTG	CATGGCAGGCTGGTTCATTA	
MDM4	ACATCAATTCAGGGCTTCATTG	GTGGGCCATTCACTCTTCTT	
MDM4-FL	CAGCAGGTGCGCAAGGTGAA	CTGTGCGAGAGCGAGAGTCTG	
MDM4-S	CAGCAGGTGCGCAAGGTGAA	GCACTTTGCTGTAGTAGCAGTG	
RPLP0	GTGTTGACAATGGCAGCAT	GACACCCTCCAGGAAGCGA	
18S rRNA	AACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	20
ベータ-アクチン	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
ChIP-qPCR	フォワード	リバース	
MDM2	CCTACCCAAAGTGATGGGATTA	TCTGGTTGGAGAACGAAGATG	
CK1 α	CGAAATCCGTACGTCCTCTAAA	CAGTTTCCGATCGCCTAGTT	
MYOG	CCAGATGAGACCTAAGAGAACATAC	CCAGGGATAAGAAGGATCAAGAC	
KRT9	CCAGGGATAAGAAGGATCAAGAC	CTCTCTCCATTGTGTGGGATAAT	
インタージェニック	GACCAAGCCTAAACCATCTCC	AGGACCACCCCTGCTTAGG	30

【 0 0 6 9 】

30

40

50

【表 3】

表 S3.

腫瘍容積変化値、% Ch = (T-T0) / T0、絶対 Ch = T-T0、T - 現在値、T0 - 初期値

群	動物 ID	データタイプ	0	4	7	11	14	18
1. ビヒクル	565	% Ch	0.00	63.65	259.33	625.24	1189.38	
1. ビヒクル	565	絶対 Ch	0.00	108.88	443.60	1069.52	2034.53	
1. ビヒクル	566	% Ch	0.00	84.34	118.43	403.6	4 585.21	1263.48
1. ビヒクル	566	絶対 Ch	0.00	162.09	227.63	775.80	1124.77	2428.42
1. ビヒクル	568	% Ch	0.00	202.44	446.30	1343.42		
1. ビヒクル	568	絶対 Ch	0.00	291.00	641.55	1931.14		
1. ビヒクル	573	% Ch	0.00	103.78	321.49	858.82	1551.86	
1. ビヒクル	573	絶対 Ch	0.00	153.70	476.14	1271.95	2298.37	
1. ビヒクル	574	% Ch	0.00	4.68	36.95	89.08	166.66	245.11
1. ビヒクル	574	絶対 Ch	0.00	6.53	51.56	124.30	232.55	342.02
1. ビヒクル	578	% Ch	0.00	136.55	276.44	864.34	1148.97	
1. ビヒクル	578	絶対 Ch	0.00	244.09	494.14	1545.02	2053.81	
1. ビヒクル	586	% Ch	0.00	52.54	154.62	463.34	602.34	1361.60
1. ビヒクル	586	絶対 Ch	0.00	83.73	246.41	738.37	959.89	2169.84
1. ビヒクル	599	% Ch	0.00	-20.11	-0.90	28.72	64.04	102.70
1. ビヒクル	599	絶対 Ch	0.00	-35.80	-1.61	51.12	114.01	182.83
2.HDM201, 40 mg/kg	560	% Ch	0.00	168.68	392.40	465.37	597.67	741.47
2.HDM201, 40 mg/kg	560	絶対 Ch	0.00	302.89	704.61	835.64	1073.19	1331.39
2.HDM201, 40 mg/kg	564	% Ch	0.00	25.53	107.65	122.53	128.4	4 165.70
2.HDM201, 40 mg/kg	564	絶対 Ch	0.00	66.12	278.82	317.36	332.66	429.17
2.HDM201, 40 mg/kg	572	% Ch	0.00	16.64	56.29	125.88	191.55	234.58
2.HDM201, 40 mg/kg	572	絶対 Ch	0.00	32.34	109.40	244.65	372.29	455.90
2.HDM201, 40 mg/kg	579	% Ch	0.00	93.53	123.49	248.58	295.64	350.27
2.HDM201, 40 mg/kg	579	絶対 Ch	0.00	133.99	176.91	356.12	423.53	501.79
2.HDM201, 40 mg/kg	592	% Ch	0.00	6.55	37.00	101.24	94.41	114.06
2.HDM201, 40 mg/kg	592	絶対 Ch	0.00	10.51	59.41	162.53	151.58	183.12
2.HDM201, 40 mg/kg	596	% Ch	0.00	29.08	27.47	14.09	41.69	20.72
2.HDM201, 40 mg/kg	596	絶対 Ch	0.00	44.16	41.71	21.39	63.30	31.46
2.HDM201, 40 mg/kg	601	% Ch	0.00	14.67	30.43	37.76	77.45	81.45
2.HDM201, 40 mg/kg	601	絶対 Ch	0.00	21.14	43.86	54.43	111.64	117.41
2.HDM201, 40 mg/kg	606	% Ch	0.00	11.44	28.15	61.17	56.59	83.83
2.HDM201, 40 mg/kg	606	絶対 Ch	0.00	14.26	35.09	76.25	70.55	104.49
3.レナリドミド, 50 mg/kg	570	% Ch	0.00	74.88	172.14	532.35	811.07	1406.04
3.レナリドミド, 50 mg/kg	570	絶対 Ch	0.00	144.53	332.29	1027.58	1565.59	2714.05
3.レナリドミド, 50 mg/kg	571	% Ch	0.00	101.33	170.30	513.08	861.89	1123.01
3.レナリドミド, 50 mg/kg	571	絶対 Ch	0.00	151.67	254.90	768.00	1290.11	1680.96
3.レナリドミド, 50 mg/kg	575	% Ch	0.00	102.10	232.85	584.49	936.62	1595.67
3.レナリドミド, 50 mg/kg	575	絶対 Ch	0.00	182.72	416.69	1045.97	1676.13	2855.54
3.レナリドミド, 50 mg/kg	582	% Ch	0.00	99.96	199.00	475.00	702.42	1146.29
3.レナリドミド, 50 mg/kg	582	絶対 Ch	0.00	171.42	341.29	814.62	1204.65	1965.88
3.レナリドミド, 50 mg/kg	585	% Ch	0.00	150.37	277.21	680.10	1182.50	1544.08
3.レナリドミド, 50 mg/kg	585	絶対 Ch	0.00	196.53	362.30	888.86	1545.48	2018.05
3.レナリドミド, 50 mg/kg	590	% Ch	0.00	52.58	108.30	321.83	538.29	774.41
3.レナリドミド, 50 mg/kg	590	絶対 Ch	0.00	107.98	222.38	660.89	1105.37	1590.25
3.レナリドミド, 50 mg/kg	594	% Ch	0.00	63.66	219.88	431.10	804.69	1719.65
3.レナリドミド, 50 mg/kg	594	絶対 Ch	0.00	82.85	286.16	561.06	1047.26	2238.02
3.レナリドミド, 50 mg/kg	597	% Ch	0.00	71.12	209.85	501.46	779.36	1318.82
3.レナリドミド, 50 mg/kg	597	絶対 Ch	0.00	113.80	335.77	802.36	1246.99	2110.15
群	動物 ID	データタイプ	0	4	7	11	14	18
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	561	% Ch	0.00	-1.40	-2.10	16.42	-23.07	-34.74
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	561	絶対 Ch	0.00	-2.27	-3.39	26.56	-37.32	-56.20

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

50

【表 4】

4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	569	% Ch	0.00	17.27	19.44	-5.80	-25.97	-30.26
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	569	絶対 Ch	0.00	29.95	33.70	-10.05	-45.03	-52.47
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	576	% Ch	0.00	-5.93	26.33	24.23	12.30	7.05
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	576	絶対 Ch	0.00	-11.37	50.48	46.45	23.57	13.51
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	583	% Ch	0.00	61.55	65.21	24.27	-3.61	11.30
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	583	絶対 Ch	0.00	88.79	94.07	35.02	-5.21	16.29
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	584	% Ch	0.00	24.49	73.62	21.10	-0.92	-10.29
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	584	絶対 Ch	0.00	39.84	119.75	34.33	-1.49	-16.74
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	591	% Ch	0.00	9.67	24.76	9.39	-4.48	-11.52
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	591	絶対 Ch	0.00	13.86	35.49	13.46	-6.43	-16.51
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	595	% Ch	0.00	-23.66	-33.05	-43.45	-50.80	-41.21
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	595	絶対 Ch	0.00	-30.46	-42.56	-55.95	-65.41	-53.06
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	605	% Ch	0.00	-25.11	-9.31	-36.95	-45.63	-46.64
4. HDM201, 40 mg/kg + レナリドミド, 50 mg/kg	605	絶対 Ch	0.00	-48.16	-17.86	-70.88	-87.52	-89.46

10

20

【 0 0 7 1 】

定義

本明細書で使用されるとき、冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、その冠詞の文法上の指示対象の1つ又は2つ以上(例えば、少なくとも1つ)を指す。

【 0 0 7 2 】

用語「又は」は、本明細書では、文脈上特に明らかに指示されない限り、用語「及び/又は」を意味して使用され、且つそれと同義的に使用される。

【 0 0 7 3 】

「約」及び「近似的に」は、概して、測定 of 性質又は精度を所与として測定された分量についての許容できる誤差の程度を意味するものとする。例示的な誤差の程度は、所与の値又は値の範囲の20パーセント(%)以内、典型的には10%以内及びより典型的には5%以内である。

30

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用されるとき、冠詞「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、その冠詞の文法上の指示対象の1つ又は2つ以上(例えば、少なくとも1つ)を指す。

【 0 0 7 5 】

用語「又は」は、本明細書では、文脈上特に明らかに指示されない限り、用語「及び/又は」を意味して使用され、且つそれと同義的に使用される。

【 0 0 7 6 】

「約」及び「近似的に」は、概して、測定 of 性質又は精度を所与として測定された分量についての許容できる誤差の程度を意味するものとする。例示的な誤差の程度は、所与の値又は値の範囲の20パーセント(%)以内、典型的には10%以内及びより典型的には5%以内である。

40

【 0 0 7 7 】

「組み合わせ」又は「~と組み合わせる」とは、その療法又は治療剤を同じ時点で投与しなければならない、且つ/又は一緒に送達するために製剤化しなければならないことを含意するように意図するものではないが、しかし、そうした送達方法は、本明細書に記載される範囲内にある。本組み合わせにおける治療剤は、1つ以上の他の追加の療法又は治療剤と同時に、その前又はその後投与することができる。治療剤又は療法プロトコルは、い

50

かなる順序でも投与することができる。一般に、各薬剤は、その薬剤について決められた用量及び/又はタイムスケジュールで投与されることになる。更に、この組み合わせに利用される追加の治療剤は、単一の組成物と一緒に投与されるか又は異なる組成物で個別に投与され得ることが理解されるであろう。一般に、組み合わせに利用される追加の治療剤は、それが個々に利用されるレベルを超えないレベルで利用されることが予想される。一部の実施形態において、組み合わせに利用されるレベルは、個々に利用されるレベルよりも低くなるであろう。

【0078】

実施形態において、追加の治療剤は、治療量又は治療量未満で投与される。特定の実施形態において、阻害、例えば成長阻害を実現するために必要な第2の治療剤の濃度は、第2の治療剤が第1の治療剤と組み合わせて投与される場合により低い。特定の実施形態において、阻害を実現するために必要な第1の治療剤の濃度は、第1の治療剤が第2の治療剤と組み合わせて投与される場合、第1の治療剤が個々に投与される場合よりも低い。特定の実施形態において、組み合わせ療法では、阻害を実現するために必要な第2の治療剤の濃度は、単剤療法としての第2の治療剤の治療量よりも低く、例えば10～20%、20～30%、30～40%、40～50%、50～60%、60～70%、70～80%又は80～90%低い。特定の実施形態において、組み合わせ療法では、阻害を実現するために必要な第1の治療剤の濃度は、単剤療法としての第1の治療剤の治療量よりも低く、例えば10～20%、20～30%、30～40%、40～50%、50～60%、60～70%、70～80%又は80～90%低い。

10

20

【0079】

用語「阻害」、「阻害剤」又は「アンタゴニスト」は、所与の分子、例えば免疫チェックポイント阻害剤の特定のパラメータ、例えば活性の低下を含む。例えば、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%又はそれを超える活性、例えば所与の分子の活性の阻害、例えば阻害分子がこの用語に含まれる。従って、阻害は、100%である必要はない。

【0080】

用語「抗癌効果」は、例えば、腫瘍容積の減少、癌細胞の数の減少、腫瘍転移の数の減少、平均寿命の増加、癌細胞増殖の減少、癌細胞生存の減少又は癌性状態と関連する様々な生理的症状の寛解を含むが、これらに限定されない、様々な手段によって明らかにされ得る生物学的効果を指す。「抗癌効果」は、最初の部分における癌の発生の予防におけるペプチド、ポリヌクレオチド、細胞及び抗体の能力によっても明らかにされ得る。

30

【0081】

用語「抗腫瘍効果」は、例えば、腫瘍容積の減少、腫瘍細胞の数の減少、腫瘍細胞増殖の減少又は腫瘍細胞生存の減少を含むが、これらに限定されない、様々な手段によって明らかにされ得る生物学的効果を指す。

【0082】

用語「癌」は、異常な細胞の急速且つ制御されていない増殖によって特徴付けられる疾患を指す。癌細胞は、局所的に又は血流及びリンパ系を介して体の他の部分に広がることのできる。様々な癌の例は、本明細書に記載され、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、肝臓癌、脳癌、リンパ腫、白血病、肺癌などが挙げられるが、これらに限定されない。用語「腫瘍」及び「癌」は、本明細書において同義的に使用され、例えば、両方の用語は、固形及び液性、例えば散在性又は循環性腫瘍を包含する。本明細書で使用されるとき、用語「癌」又は「腫瘍」は、前癌性並びに悪性の癌及び腫瘍を含む。本明細書で使用されるとき、用語「癌」は、原発性悪性細胞又は腫瘍(例えば、細胞が最初の悪性腫瘍又は腫瘍の部位以外に対象の体内の部位に転移していないもの)及び二次悪性細胞又は腫瘍(例えば、最初の腫瘍の部位と異なる二次的な部位への悪性細胞又は腫瘍細胞の転移である転移から生じるもの)を含む。

40

【0083】

本明細書で使用されるとき、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、1

50

つ以上の療法の投与によってもたらされる、障害、例えば増殖性障害の進行、重症度及び/若しくは持続期間の低減若しくは改善又は障害の1つ以上の症状(好ましくは1つ以上の認識できる症状)の改善を指す。具体的な実施形態において、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、必ずしも患者が認識できるとは限らない、腫瘍の成長など、増殖性障害の少なくとも1つの測定可能な物理的パラメータの改善を指す。他の実施形態において、用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、例えば、認識できる症状の安定化による物理的な、例えば物理的パラメータの安定化による生理学的な又は両方のいずれかの増殖性障害の進行の阻害を指す。他の実施形態において用語「処置する」、「処置」及び「処置している」は、腫瘍サイズ又は癌性細胞数の減少又は安定化を指す。

【0084】

用語「対象」は、本明細書においてヒトを指す。ヒトは、成人、青年、小児又は幼児であり得る。

【0085】

本明細書におけるMDM4阻害剤という用語は、MDM-4に優先的に結合し、p53-MDM4結合を破壊し、したがって封鎖p53タンパク質を放出する阻害剤を指す。

【0086】

参考文献

1. Becker JCC et al. (2017) Merkel cell carcinoma. Nat Rev Dis Primers 3:17077.
2. Paulson KG et al. (2017) Merkel cell carcinoma: Current US incidence and projected increases based on changing demographics. J. Am. Acad. Dermatol.
3. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human merkel cell carcinoma. Science (New York, N.Y.) 319(5866):1096-1100. 10.1126/science.1152586.
4. Rodig SJ et al. (2012) Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. The Journal of clinical investigation 122(12):4645-4653. 10.1172/JCI64116.
5. Shuda M, Kwun HJ, Feng H, Chang Y, Moore PS (2011) Human Merkel cell polyomavirus small t antigen is an oncoprotein targeting the 4e-bp1 translation regulator. The Journal of clinical investigation 121(9):3623-3634. 10.1172/JCI46323.
6. Cheng J, Rozenblatt-Rosen O, Paulson KG, Nghiem P, DeCaprio JA (2013) Merkel cell polyomavirus large t antigen has growth-promoting and inhibitory activities. Journal of virology 87(11):6118-6126. 10.1128/JVI.00385-13.
7. Starrett GJ et al. (2017) Merkel cell polyomavirus exhibits dominant control of the tumor genome and transcriptome in virus-associated Merkel cell carcinoma. mBio 8(1). 10.1128/mBio.02079-16.

10

20

30

40

50

8. Harms PW et al. (2015) The distinctive mutational spectra of polyomavirus-negative Merkel cell carcinoma. *Cancer research* 75(18):3720-3727. 10.1158/0008-5472.CAN-15-0702.
9. Allen MA et al. (2014) Global analysis of p53-regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms. *eLife* 3.10.7554/elife.02200.
10. Bates S et al. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395(6698):124-5. 10
11. Nomura K et al. (2017) Structural analysis of MDM2 RING separates degradation from regulation of p53 transcription activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24(7):578-587.
12. Bista M, Petrovich M, Fersht AR (2013) MDMX contains an autoinhibitory sequence element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110(44):17814-9. 20
13. Chen L et al. (2015) Autoinhibition of MDMX by intramolecular p53 mimicry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112(15):4624-9.
14. Beliveau A, Yaswen P (2007) Soothing the watchman: telomerase reduces the p53-dependent cellular stress response. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6(11):1284-1287. 10.4161/cc.6.11.4298.
15. Cheng J et al. (2017) Merkel cell polyomavirus recruits mycl to the ep400 complex to promote oncogenesis. *PLoS Pathogens* 13(10):1-31. 30
16. Arora R et al. (2012) Survivin is a therapeutic target in merkel cell carcinoma. *Sci Transl Med* 4(133):133ra56.
17. Berrios C et al. (2016) Merkel cell polyomavirus small t antigen promotes pro-glycolytic metabolic perturbations required for transformation. *PLoS pathogens* 12(11). 10.1371/journal.ppat.1006020. 40
18. Lenos K et al. (2012) Alternate splicing of the p53 inhibitor hdmx offers a superior prognostic biomarker than p53 mutation in human cancer. *Cancer Research* 72(16):4074-4084. 10.1158/0008-5472.CAN-12-0215.
19. Sholl LM et al. (2016) Institutional implementation of clinical tumor profiling on an unselected cancer population. *JCI Insight* 1(19):e87062.
20. Houben R et al. (2013) Mechanisms of p53 50

restriction in merkel cell carcinoma cells are independent of the merkel cell polyoma virus t antigens. *The Journal of investigative dermatology* 133(10):2453-2460. 10.1038/jid.2013.169.

21. Kroenke J et al. (2015) Lenalidomide induces ubiquitination and degradation of ck1alpha in del(5q)mds. *Nature* 523(7559):183-188. 10.1038/nature14610.

22. Petzold G, Fischer ES, Thoma NH (2016) Structural basis of lenalidomide-induced CK1 degradation by the CRL4(CRBN) ubiquitin ligase. *Nature* 532(7597):127-30.

10

23. Spiotto MT et al. (2010) Imaging the unfolded protein response in primary tumors reveals microenvironments with metabolic variations that predict tumor growth. *Cancer Res.* 70(1):78-88.

24. Doench JG et al. (2016) Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat. Biotechnol.* 34(2):184-191.

20

25. Zhou B et al. (2001) HER-2/neu induces p53 ubiquitination via akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 3(11):973-82.

26. Furet P et al. (2016) Discovery of a novel class of highly potent inhibitors of the p53-MDM2 interaction by structure-based design starting from a conformational argument. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 26(19):4837-4841.

30

27. Scudiero D et al. (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48(17):4827-33.

28. Chou T, Motzer R, Tong Y, Bosl G (1994) Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design. *J. Natl. Cancer Inst.* 86(20):1517-24.

40

29. Ianevski A, He L, Aittokallio T, Tang J (2017) SynergyFinder: a web application for analyzing drug combination dose-response matrix data. *Bioinformatics* 33(15):2413-2415.

30. Ding Q et al. (2013) Discovery of rg7388

50

, a potent and selective p53 -mdm2 inhibitor in clinical development. Journal of medicinal chemistry 56(14):5979-5983. 10.1021/jm400487c.

31. Sun D et al. (2014) Discovery of amg 232, a potent, selective, and orally bioavailable mdm2 - p53 inhibitor in clinical development. Journal of medicinal chemistry 57(4):1454-1472. 10.1021/jm401753e.

32. Montero J et al. (2015) Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. Cell 160(5):977-89.

10

33. Smith AE et al. (2015) CSNK1A1 mutations and isolated del(5q) abnormality in myelodysplastic syndrome: a retrospective mutational analysis. Lancet Haematol 2(5):e212-21.

34. Saft L et al. (2014) p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). Haematologica 99(6):1041-9.

20

35. Cronin J, Zhang XYY, Reiser J (2005) Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. Current gene therapy 5(4):387-398. 10.2174/1566523054546224.

36. Pallis M et al. (2016) Complementary dynamic bh3 profiles predict co-operativity between the multi-kinase inhibitor tg02 and the bh3 mimetic abt-199 in acute myeloid leukaemia cells. Oncotarget. 10.18632/oncotarget.8742.

30

37. Schmidt D et al. (2009) Chip-seq: Using high-throughput sequencing to discover protein-dna interactions. Methods 48(3):240-248. 10.1016/j.jymeth.2009.03.001.

【実施例】

【0087】

材料及び方法

40

プラスミド

GFP及びT抗原cDNAを、David Root (Addgeneプラスミド]41394)及びEric Campeau (Addgeneプラスミド17486)からそれぞれ入手したpLIX-402誘導性エンブティ又はpLenti CMV Blastエンブティベクター(w263-1)中にGateway (Invitrogen)クローニングした。CK1 についてのsgRNAクローン(BRDN0001149315、BRDN0001145680)をJohn Doench及びDavid Root (Addgeneプラスミド76188、76189)から入手した。pLKO-p53-shRNA-941をTodd Waldman (Addgeneプラスミド25637)から入手した。

50

【 0 0 8 8 】

細胞及び細胞培養

これらの構築物を安定的に発現する細胞系を生成するため、3つのベクターレンチウイルス形質導入系を使用してIMR90ヒト肺線維芽細胞、HCT116結腸癌又はMKL-1 MCC細胞を形質導入した(15)。MCC細胞系をMasa Shuda (University of Pittsburgh, PA)、Juergen Becker (Medical University Graz, Austria)及びRoland Houben (University of Wuerzburg, Germany)から入手した。293T、HCT116及びIMR90細胞をATCCから入手した。shRNAを誘導的に発現するMKL-1 MCC細胞系の生成並びにp53DD、MYCL及びhTERT構築物を使用するIMR90形質転換は、既に記載された(17)。IMR90及びヒト初代包皮線維芽細胞(HFF)を、15%のFBS、抗生物質及び非必須アミノ酸が補給されたDMEM中で培養し、MCC細胞系を、10%のFBS及び抗生物質が補給されたRPMI中で成長させた。

10

【 0 0 8 9 】

細胞生存率アッセイ

ヌトリン-3 (Cayman chemical)、レナリドミド (Cayman chemical)、サリドマイド (Santa Cruz Biotechnology)、ボマリドミド (Selleck chemicals)、AMG232 (MedChem Express)、RG7388 (Aileron Therapeutics製)、HDM201 (Novartis Pharmaceuticals)、SC-24-UR99 (Novartis Pharmaceuticals)、シクロヘキシミド (Sigma-Aldrich)及びMG132 (Boston Biochem)をDMSO中で再構成し、培養培地に直接添加した。Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche)を製造業者の説明書に従って使用して細胞生存率アッセイを実施し、BH3プロファイリングをPallis et al. (36)に記載の通りに実施した。Compusyn及びSynergyfinder (28, 29)を使用して相乗作用試験を実施した。

20

【 0 0 9 0 】

免疫沈降、免疫プロットティング及び抗体。

細胞のコンフルエント培養物を氷冷リン酸緩衝生理食塩水(PBS)により洗浄し、EBC溶解緩衝液(50mMのTris、pH8.0、150mMのNaCl、0.5%のNP-40、1:10,000-メルカプトエタノール、0.5mMのEDTA)中において氷上で10分間再懸濁させ、次いで遠心分離した。澄明化溶解物を抗体及び磁性タンパク質A/Gビーズ(PureProteome磁性ビーズ、EMD Millipore)と一晚インキュベートした。ビーズを高塩濃度EBC緩衝液(50mMのTris、pH8.0、300mMのNaCl、0.5%のNP-40、0.5mMのEDTA)により5回洗浄し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動前にLaemmli試料緩衝液中で沸騰させた。免疫沈降及びウエスタンプロットティングを、MDM4 (17914-1-AP; Proteintech Group)、MDM2 (SMP14, Santa Cruz biotechnology)、CK1 (17125-1-AP; Proteintech Group)、ホスホ-Ser166MDM2 (J3521, Cell Signaling Technology)、ホスホ-Ser15p53 (J9284; Cell Signaling Technology)、アセチル-Lys382p53 (J2525; Cell Signaling Technology)、p21 (J2946; Cell Signaling Technology)、PUMA (J12450; Cell Signaling Technology)、VPS39 (ab107570; Abcam)、PARP (J9542; Cell Signaling Technology)、GFP (J2555; Cell Signaling Technology)、MYCL (14584-1-AP; Proteintech Group)、p53

30

40

50

(DO-1; Thermo Scientific/Lab Vision) 及び RB1 (G3-245; BD Biosciences) に対する抗体を用いて実施した。MCV T 抗原に対するマウスモノクローナル抗体 Ab3 及び Ab5 を MCV ラージ T 抗原残基 1 ~ 260 に対して生成し、細菌中でグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合タンパク質として産生した (17)。Odyssey 近赤外線システム (Li-Cor Biotechnology) を使用して定量的ウエスタンブロッティングを実施した。

【0091】

ChIP - 及び RT - qPCR

ChIP 法を、Schmidt et al. (37) に記載のプロトコルから修正した。ジスクシイミジルグルタレート (DSG) 及びホルムアルデヒドを用いる二重架橋を使用して MKL-1 細胞又は IMR90 細胞を架橋させた。架橋後、SimpleChIP 緩衝液 A 及び B (Cell signaling) を使用して細胞を溶解させ、DNA をミクロコッカールヌクレアーゼ (New England Biolabs Inc.) により 37 °C において 30 分間プロセッシングし、次いで 4 °C において 5 回の 20 秒間のパルスで超音波処理した。RT - qPCR のため、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を使用して総 RNA を精製し、High-Capacity cDNA 逆転写キット (Applied Biosystems) を使用して cDNA を合成した。Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green qPCR Master Mix (Agilent Technologies) を使用して定量的 PCR を実施した。プライマー情報は、補足表 2 に見出すことができる。

【0092】

ゼノグラフト有効性試験

7 ~ 9 週齢の NSG マウス (Jackson laboratory) に 1.00×10^7 個の MKL-1 MCC 細胞を注射した。腫瘍が 200 mm³ のサイズに達したとき、8 匹のマウスの群をビヒクル、HDM201 (Novartis Pharmaceuticals 製、50 mM のリン酸緩衝液、pH 6.8 中 40 mg/kg、0.5% のメチルセルロース (400 cP)、経口)、レナリドミド (MedChemExpress、50 mg/kg、0.5% の CMC + 0.25% の Tween 80、経口) 又は HDM201 及びレナリドミドの両方により毎日処置した。腫瘍容積が 2000 mm³ の最大許容サイズに達したとき、試験を終了した。

【0093】

実施された実験の一部及び得られた結果を本発明の詳細な説明のセクションにおいて且つ図面及びその説明において本明細書に開示する。

【0094】

実施例 1

以下の表は、MKL-1 MCC 細胞の生存率の低減における薬物 / 化合物の種々の組み合わせの相乗作用試験からのデータを提供する。MKL-1 (野生型 p53 を有するウイルス陽性メルケル細胞癌細胞系) を 96 時間処置した。XTT アッセイを実施して非処置細胞に正規化された相対生存率 (% 応答) を決定した。別々の表は、組み合わせ 1 . ヌトリン - レナリドミド 2 . ヌトリン - UR99 3 . HDM201 - UR99 4 . ヌトリン - 3 + / - レナリドミド ; RG7388 + / - レナリドミド ; レナリドミド 単独 5 . HDM201 + レナリドミド についてのデータを含む。

【0095】

10

20

30

40

50

【表 5】

薬物 1	薬物 2	濃度 1	濃度 2	応答	濃度単位
レナリドミド	ヌトリン-3	0	0	100	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	5000	0	104.85	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	10000	0	105.06	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	15000	0	107.06	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	18000	0	100.64	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	0	1250	82.16	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	5000	1250	51.05	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	10000	1250	48.71	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	15000	1250	52.74	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	18000	1250	46	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	0	2500	65.56	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	5000	2500	35.92	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	10000	2500	35.85	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	15000	2500	36.1	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	18000	2500	33.84	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	0	3750	44.2	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	5000	3750	25.46	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	10000	3750	26.75	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	15000	3750	28.79	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	18000	3750	27.94	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	0	4500	41.19	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	5000	4500	23.51	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	10000	4500	26.37	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	15000	4500	22.99	nM
レナリドミド	ヌトリン-3	18000	4500	24.53	nM

10

20

30

【 0 0 9 6 】

40

50

【表 6】

薬物 1	薬物 2	濃度 1	濃度 2	応答	濃度単位
SC-24-UR99	ヌトリン-3	0	0	100	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	50	0	103.6933	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	100	0	99.5168	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	150	0	99.3633	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	180	0	92.5016	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	0	1250	96.8309	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	50	1250	51.4828	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	100	1250	44.9011	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	150	1250	35.9542	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	180	1250	38.5128	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	0	2500	72.5696	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	50	2500	26.7148	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	100	2500	22.6589	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	150	2500	22.0257	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	180	2500	21.9253	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	0	3750	63.6648	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	50	3750	22.7101	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	100	3750	22.892	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	150	3750	21.6436	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	180	3750	21.8598	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	0	4500	56.8421	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	50	4500	23.6636	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	100	4500	22.4951	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	150	4500	23.0683	nM
SC-24-UR99	ヌトリン-3	180	4500	21.8378	nM

【 0 0 9 7 】

10

20

30

40

50

【表 7】

薬物 1	薬物 2	濃度 1	濃度 2	応答	濃度単位
SC-24-UR99	HDM201	0	0	100	nM
SC-24-UR99	HDM201	50	0	100.5561	nM
SC-24-UR99	HDM201	100	0	105.263	nM
SC-24-UR99	HDM201	150	0	93.4308	nM
SC-24-UR99	HDM201	180	0	89.8385	nM
SC-24-UR99	HDM201	0	50	93.9107	nM
SC-24-UR99	HDM201	50	50	72.9123	nM
SC-24-UR99	HDM201	100	50	59.4628	nM
SC-24-UR99	HDM201	150	50	45.9284	nM
SC-24-UR99	HDM201	180	50	42.8791	nM
SC-24-UR99	HDM201	0	100	90.5417	nM
SC-24-UR99	HDM201	50	100	54.0118	nM
SC-24-UR99	HDM201	100	100	49.0179	nM
SC-24-UR99	HDM201	150	100	40.2345	nM
SC-24-UR99	HDM201	180	100	35.2668	nM
SC-24-UR99	HDM201	0	150	94.8184	nM
SC-24-UR99	HDM201	50	150	61.1783	nM
SC-24-UR99	HDM201	100	150	46.8796	nM
SC-24-UR99	HDM201	150	150	35.6452	nM
SC-24-UR99	HDM201	180	150	31.2955	nM
SC-24-UR99	HDM201	0	180	87.8557	nM
SC-24-UR99	HDM201	50	180	50.8719	nM
SC-24-UR99	HDM201	100	180	40.5355	nM
SC-24-UR99	HDM201	150	180	32.0859	nM
SC-24-UR99	HDM201	180	180	29.2436	nM

10

20

30

【 0 0 9 8 】

40

50

【表 8】

薬物 1	薬物 2	濃度 1	濃度 2	応答- レプリケート 1	応答- レプリケート 2	レプリ ケート 1 未加工	レプリ ケート 2	濃度単位
レナリドミド	HDM201	0	0	100	100	1.3383	1.5094	nM
レナリドミド	HDM201	5000	0	98.9539	97.72758	1.3243	1.4751	nM
レナリドミド	HDM201	10000	0	83.3296	76.26209	1.1152	1.1511	nM
レナリドミド	HDM201	15000	0	69.78256	67.82165	0.9339	1.0237	nM
レナリドミド	HDM201	18000	0	25.1812	49.26461	0.337	0.7436	nM
レナリドミド	HDM201	0	50	90.75693	92.94421	1.2146	1.4029	nM
レナリドミド	HDM201	5000	50	77.60592	78.13701	1.0386	1.1794	nM
レナリドミド	HDM201	10000	50	67.27938	55.88976	0.9004	0.8436	nM
レナリドミド	HDM201	15000	50	31.12904	25.18882	0.4166	0.3802	nM
レナリドミド	HDM201	18000	50	13.24068	13.03829	0.1772	0.1968	nM
レナリドミド	HDM201	0	100	75.79765	77.71962	1.0144	1.1731	nM
レナリドミド	HDM201	5000	100	46.64873	51.47078	0.6243	0.7769	nM
レナリドミド	HDM201	10000	100	23.56721	37.25984	0.3154	0.5624	nM
レナリドミド	HDM201	15000	100	12.76246	14.34345	0.1708	0.2165	nM
レナリドミド	HDM201	18000	100	11.42494	11.56751	0.1529	0.1746	nM
レナリドミド	HDM201	0	150	53.3961	61.83914	0.7146	0.9334	nM
レナリドミド	HDM201	5000	150	15.87835	29.39579	0.2125	0.4437	nM
レナリドミド	HDM201	10000	150	12.42621	17.77527	0.1663	0.2683	nM
レナリドミド	HDM201	15000	150	12.80729	15.48297	0.1714	0.2337	nM
レナリドミド	HDM201	18000	150	12.25435	12.91904	0.164	0.195	nM
レナリドミド	HDM201	0	180	33.31839	40.87055	0.4459	0.6169	nM
レナリドミド	HDM201	5000	180	13.27057	19.14668	0.1776	0.289	nM
レナリドミド	HDM201	10000	180	13.07629	14.60183	0.175	0.2204	nM
レナリドミド	HDM201	15000	180	14.93686	16.28462	0.1999	0.2458	nM
レナリドミド	HDM201	18000	180	13.98042	12.76004	0.1871	0.1926	nM

10

20

30

【 0 0 9 9 】

【表 9】

固定量のレナリドミド(5uM)を用いる															
ストリン-3又はRG7388	ストリン-3		ストリン-3+レナリドミド			RG7388		RG7388+レナリドミド			レナリドミド				
0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
25	0.662584	0.59335	0.649785	0.249101	0.246948	0.298225	0.78191	0.711067	0.822231	0.326404	0.349082	0.380782	1.143371	0.884466	1.021567
50	0.381798	0.397717	0.393338	0.175281	0.185707	0.182002	0.683595	0.581439	0.688452	0.265393	0.272854	0.286892	1.089326	0.938362	1.081456
75	0.266742	0.19196	0.285781	0.183034	0.167643	0.172669	0.553034	0.433846	0.543117	0.202921	0.202084	0.220225	1.027416	1.060546	1.088012
90	0.233258	0.187892	0.27767	0.155056	0.155732	0.164446	0.468292	0.369529	0.510783	0.204045	0.189777	0.195558	1.011348	0.945012	0.952122

40

【 0 1 0 0 】

参照による援用

本明細書において言及される全ての刊行物、特許及び受託番号は、各個別の刊行物又は特許が参照によって援用されることが具体的且つ個別的に指示されたものとして本明細書

50

によって全体として参照により援用される。

【 0 1 0 1 】

均等物

本発明の具体的な実施形態が考察されているが、上記の本明細書は、例示的なものであり、限定的なものではない。本明細書及び以下の特許請求の範囲を検討すれば、当業者に本発明の多くの変形形態が明らかになるであろう。本発明の完全な範囲は、その均等物の全範囲と併せた特許請求の範囲及びかかる変形形態と併せた本明細書を参照することにより決定されなければならない。

本発明は以下の態様を含み得る。

[1]

(a) マウス二重微小染色体 2 (M D M 2) 阻害剤と、 (b) カゼインキナーゼ 1 アルファ (C K 1) 分解剤及び / 又はマウス二重微小染色体 4 (M D M 4) 阻害剤とを含む組み合わせ。

[2]

対象における p 5 3 野生型 (W T) 腫瘍の処置における使用のための、 (a) M D M 2 阻害剤と、 (b) C K 1 分解剤及び / 又は M D M 4 阻害剤とを含む組み合わせ。

[3]

対象における p 5 3 W T 腫瘍を処置する方法であって、前記対象に、 (a) M D M 2 阻害剤と、 (b) C K 1 分解剤及び / 又は M D M 4 阻害剤との組み合わせを投与することを含む方法。

[4]

前記 M D M 2 阻害剤は、ヌトリン - 3、イダサヌトリン (R G 7 3 8 8、R O 5 5 0 3 7 8 1)、R G 7 7 7 5 (R O 6 8 3 9 9 2 1)、A M G 2 3 2、D S 3 0 3 2 (D S 3 0 3 2 b)、A L R N - 6 9 2 4、A T S P - 7 0 4 1、C G M 0 9 7 及び H D M 2 0 1、即ち (S) - 5 - (5 - クロロ - 1 - メチル - 2 - オキソ - 1, 2 - ジヒドロ - ピリジン - 3 - イル) - 6 - (4 - クロロ - フェニル) - 2 - (2, 4 - ジメトキシ - ピリミジン - 5 - イル) - 1 - イソプロピル - 5, 6 - ジヒドロ - 1 H - ピロロ [3, 4 - d] イミダゾール - 4 - オンからなる群から選択される、請求項 1 に記載の組み合わせ、請求項 2 に記載の使用のための組み合わせ又は請求項 3 に記載の方法。

[5]

前記 M D M 2 阻害剤は、ヌトリン - 3、イダサヌトリン及び H D M 2 0 1 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組み合わせ、請求項 2 に記載の使用のための組み合わせ又は請求項 3 に記載の方法。

[6]

前記 M D M 2 阻害剤は、H D M 2 0 1 である、請求項 1 に記載の組み合わせ、請求項 2 に記載の使用のための組み合わせ又は請求項 3 に記載の方法。

[7]

前記 C K 1 分解剤及び / 又は M D M 4 阻害剤は、サリドマイド、ポマリドミド、レナリドミド、即ち R E V L I M I D とも称される (R S) - 3 - (7 - アミノ - 3 - オキソ - 1 H - イソインドール - 2 - イル) ピペリジン - 2, 6 - ジオン及び S C - 2 4 - U R 9 9、即ち 4 - (3 - アミノ - 1 - (4 - クロロ - 5 - メチル - 6 - (メチルアミノ) ピリジン - 3 - イル) - 5 - フルオロ - 1 H - インダゾール - 6 - イル) ナフタレン - 1 - オールからなる群から選択される、請求項 1 若しくは 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の組み合わせ、請求項 2 若しくは 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ又は請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

[8]

前記 C K 1 分解剤及び / 又は M D M 4 阻害剤は、レナリドミド及び S C - 2 4 - U R 9 9 からなる群から選択される、請求項 1 若しくは 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の組み合わせ、請求項 2 若しくは 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ又は請求項 3 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

[9]

前記MDM2阻害剤は、ヌトリン-3、イダサヌトリン及びHDM201からなる群から選択され、前記CK1分解剤及び/又はMDM4阻害剤は、レナリドミド及びSC-24-UR99からなる群から選択される、請求項1に記載の組み合わせ、請求項2に記載の使用のための組み合わせ又は請求項3に記載の方法。

[10]

前記MDM2阻害剤は、HDM201であり、且つ前記CK1分解剤及び/又はMDM4阻害剤は、レナリドミドである、請求項1に記載の組み合わせ、請求項2に記載の使用のための組み合わせ又は請求項3に記載の方法。

[11]

前記p53WT腫瘍は、固形腫瘍である、請求項2若しくは4～10のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ又は請求項3～10のいずれか一項に記載の方法。

10

[12]

前記固形腫瘍は、肉腫、例えば脂肪肉腫又は軟部組織肉腫、リンパ腫、例えば非ホジキンリンパ腫(NHL)、特にマントル細胞リンパ腫(MCL)、黒色腫、例えば皮膚黒色腫又はブドウ膜黒色腫、芽細胞腫(例えば、神経芽細胞腫)、結腸腫瘍、結腸直腸腫瘍、腎腫瘍、肝腫瘍及び皮膚癌、例えばメルケル細胞癌(MCC)からなる群から選択される、請求項11に記載の使用のための組み合わせ又は請求項11に記載の方法。

[13]

前記固形腫瘍は、メルケル細胞癌(MCC)である、請求項11に記載の使用のための組み合わせ又は請求項11に記載の方法。

20

[14]

前記メルケル細胞癌(MCC)は、メルケル細胞ポリオーマウイルス(MCV)陽性MCCである、請求項13に記載の使用のための組み合わせ又は請求項13に記載の方法。

[15]

前記p53WT腫瘍は、血液腫瘍(又は血液悪性腫瘍)である、請求項2若しくは4～10のいずれか一項に記載の使用のための組み合わせ又は請求項3～10のいずれか一項に記載の方法。

[16]

前記血液腫瘍は、急性骨髄性白血病(AML)、多発性骨髄腫(MM)、骨髄異形成症候群(MDS)及び急性リンパ芽球性白血病(ALL)からなる群から選択される、請求項15に記載の使用のための組み合わせ又は請求項15に記載の方法。

30

[17]

前記血液腫瘍は、多発性骨髄腫(MM)及び骨髄異形成症候群(MDS)からなる群から選択される、請求項15に記載の使用のための組み合わせ又は請求項15に記載の方法。

[18]

前記血液腫瘍は、骨髄異形成症候群(MDS)である、請求項15に記載の使用のための組み合わせ又は請求項15に記載の方法。

[19]

前記MDM2阻害剤は、HDM201であり、前記CK1分解剤及び/又はMDM4阻害剤は、レナリドミドであり、前記p53WT腫瘍は、MCV陽性MCCである、請求項2に記載の使用のための組み合わせ又は請求項3に記載の方法。

40

[20]

前記MDM2阻害剤は、HDM201であり、前記CK1分解剤及び/又はMDM4阻害剤は、レナリドミドであり、前記p53WT腫瘍は、MDSである、請求項2に記載の使用のための組み合わせ又は請求項3に記載の方法。

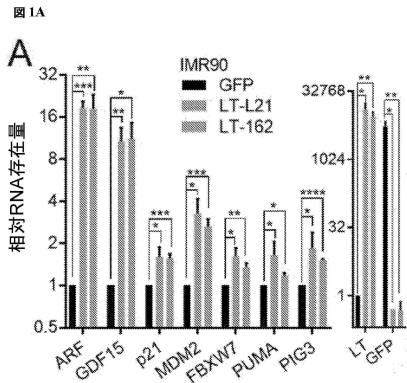
[21]

1つ以上の更なる抗癌剤を更に含む、請求項1～20のいずれか一項に記載の組み合わせ/使用のための組み合わせ/方法。

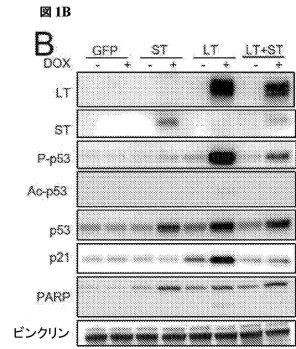
50

【図面】

【図 1 - 1】



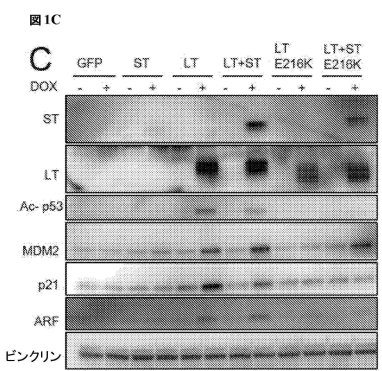
【図 1 - 2】



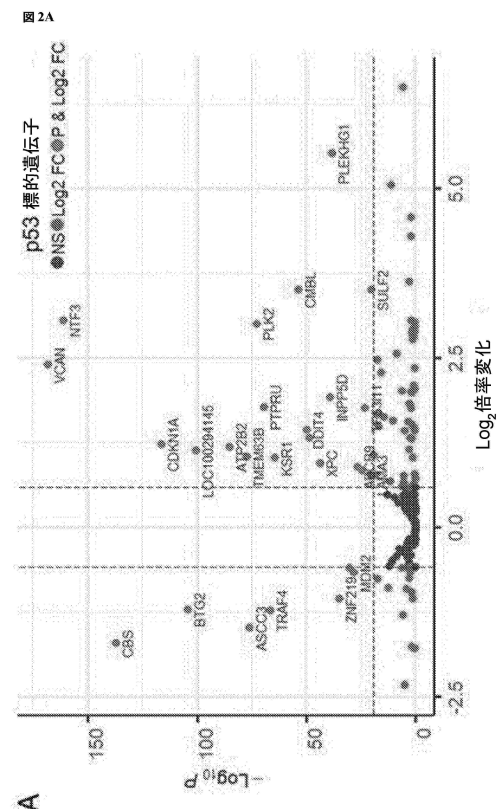
10

20

【図 1 - 3】



【図 2 - 1】



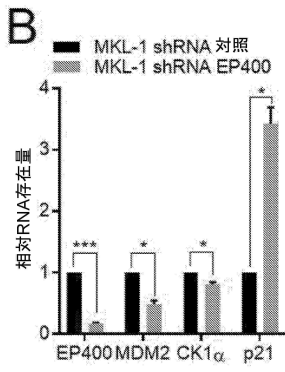
30

40

50

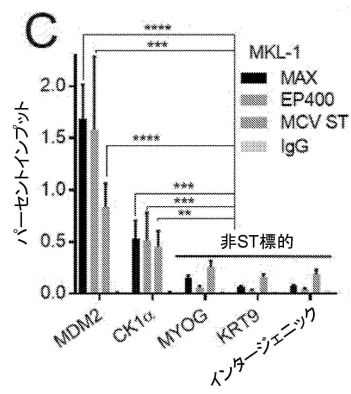
【 図 2 - 2 】

図 2B



【 図 2 - 3 】

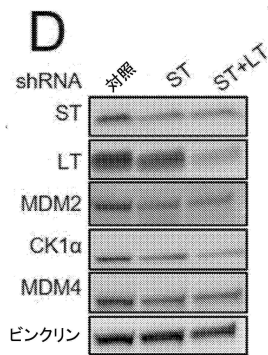
図 2C



10

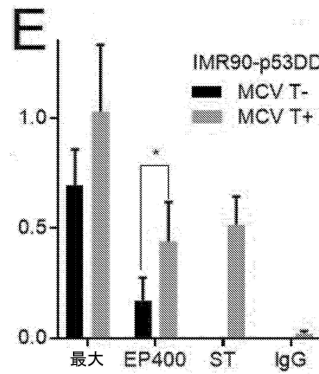
【 図 2 - 4 】

図 2D



【 図 2 - 5 】

図 2E



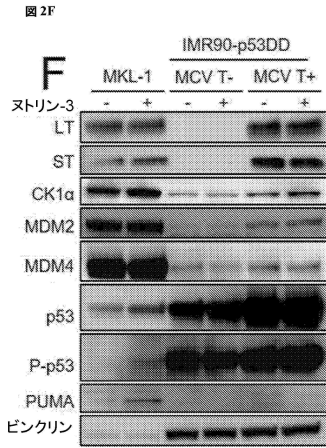
20

30

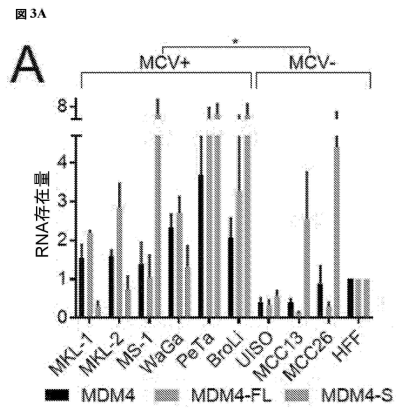
40

50

【 図 2 - 6 】

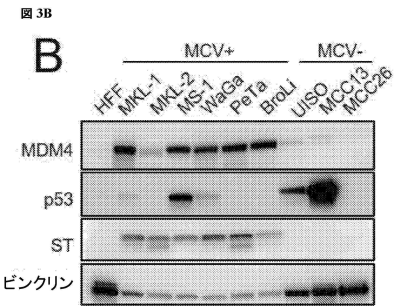


【 図 3 - 1 】

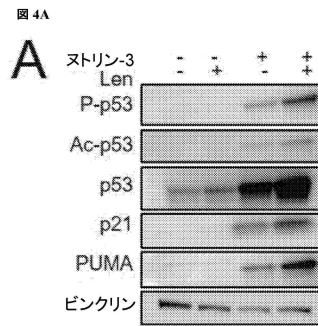


10

【 図 3 - 2 】



【 図 4 - 1 】



20

30

40

50

【 図 4 - 2 】

【 図 4 - 3 】

図 4B

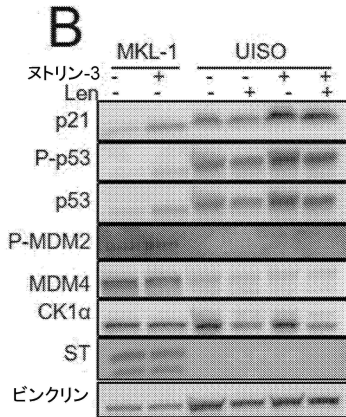
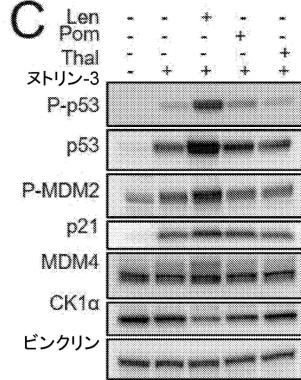


図 4C



10

【 図 4 - 4 】

【 図 4 - 5 】

図 4D

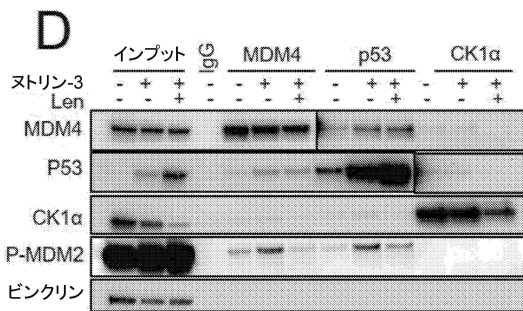
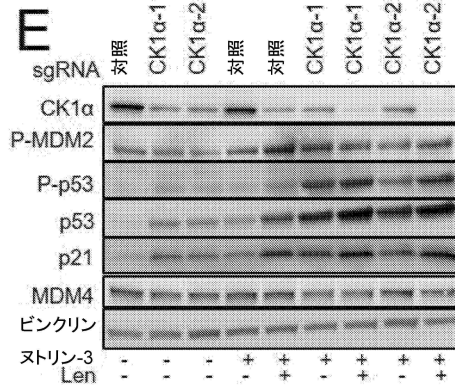


図 4E



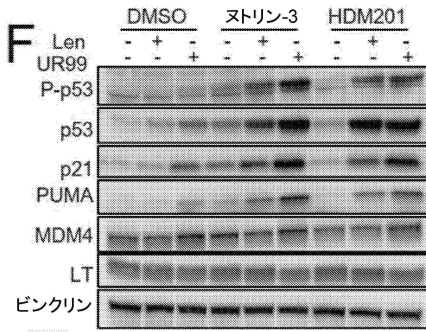
30

40

50

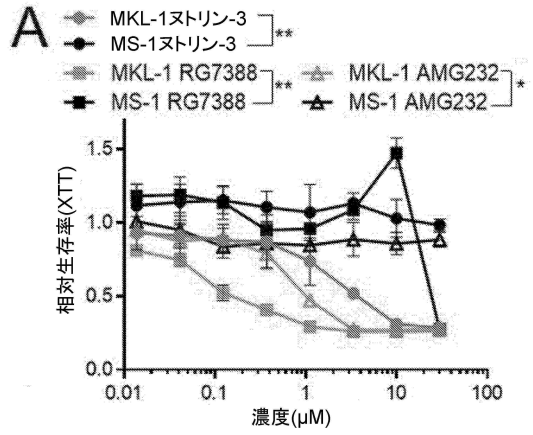
【 図 4 - 6 】

図 4F



【 図 5 - 1 】

図 5A

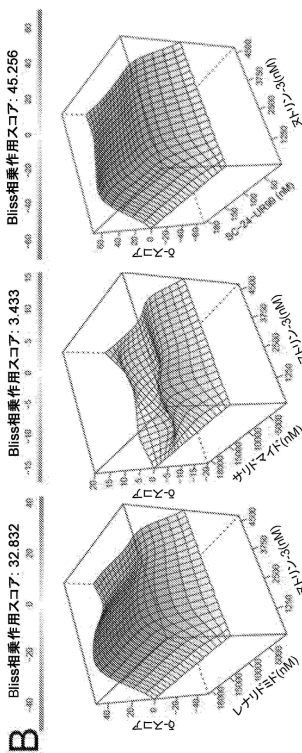


10

20

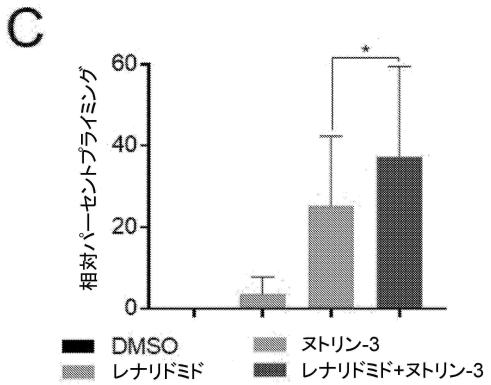
【 図 5 - 2 】

図 5B



【 図 5 - 3 】

図 5C

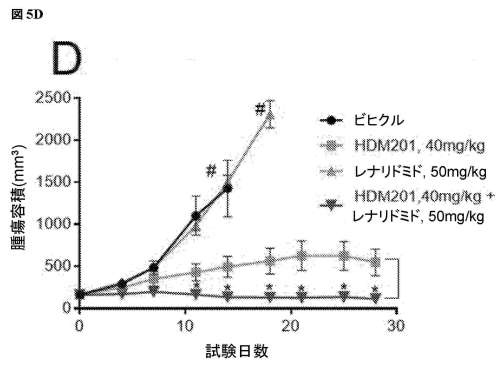


30

40

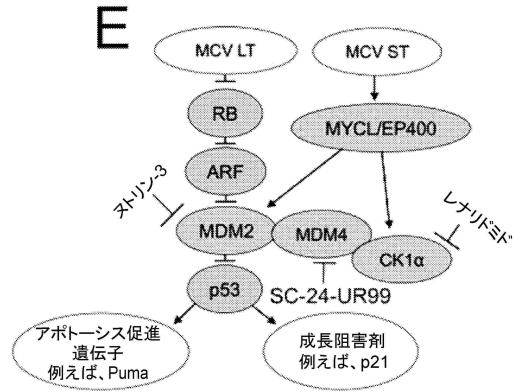
50

【図 5 - 4】



【図 5 - 5】

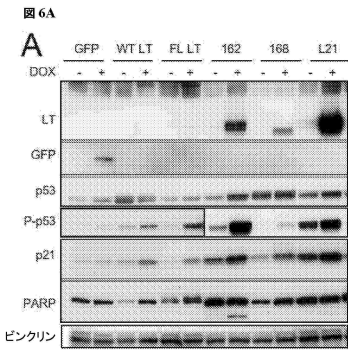
図 5E



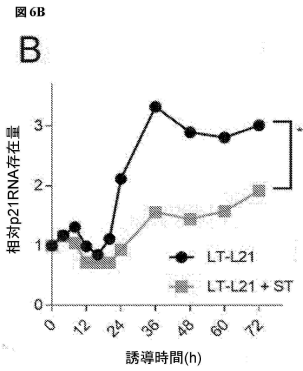
10

20

【図 6 - 1】



【図 6 - 2】

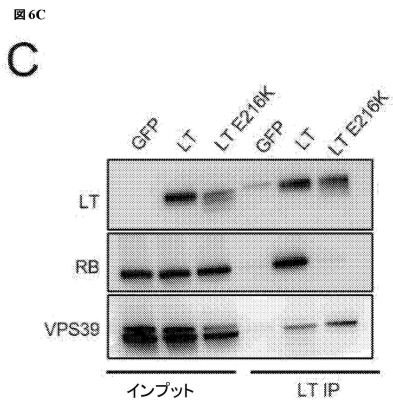


30

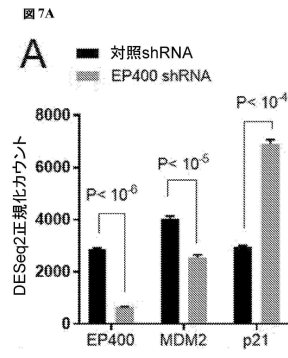
40

50

【 図 6 - 3 】

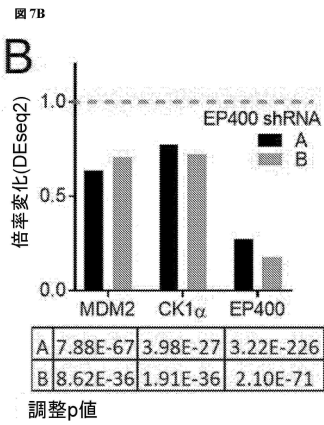


【 図 7 - 1 】

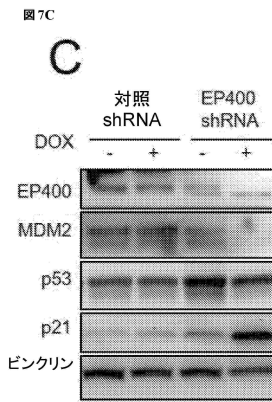


10

【 図 7 - 2 】



【 図 7 - 3 】



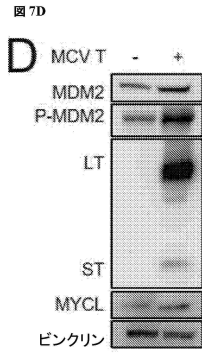
20

30

40

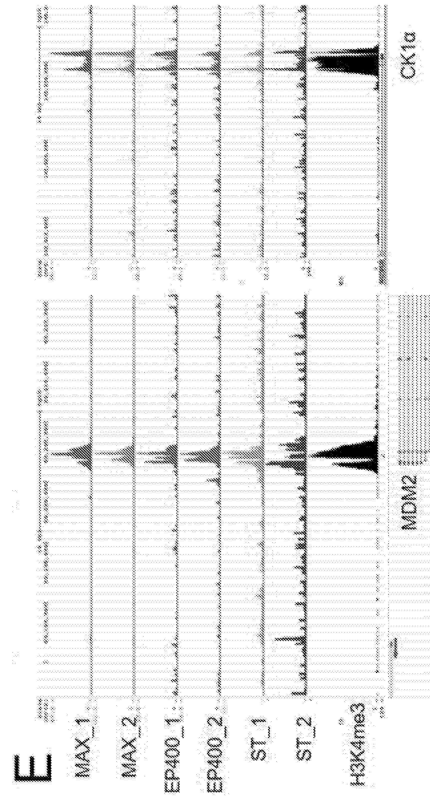
50

【 図 7 - 4 】



【 図 7 - 5 】

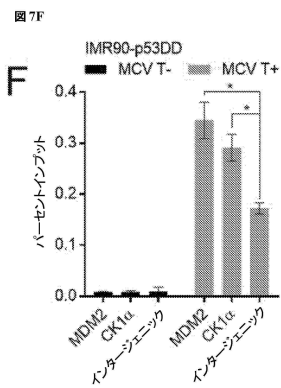
Fig. 7E



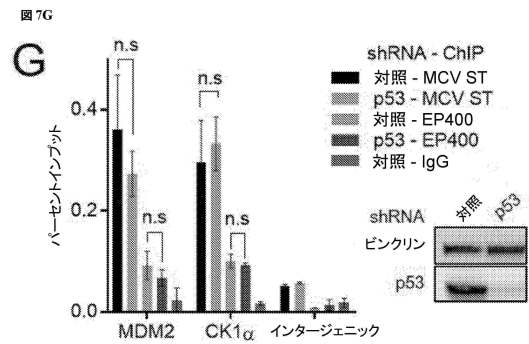
10

20

【 図 7 - 6 】



【 図 7 - 7 】

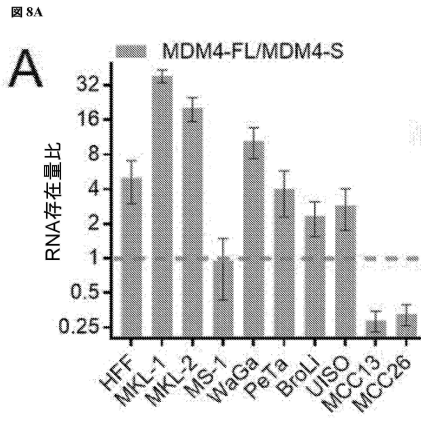


30

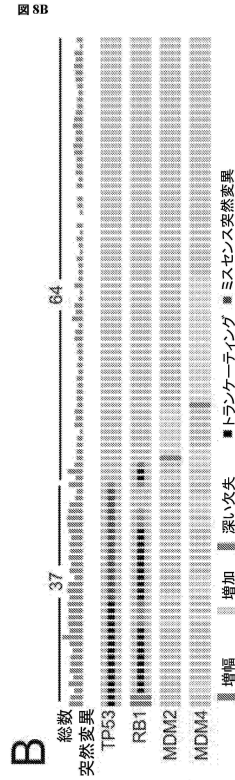
40

50

【 図 8 - 1 】



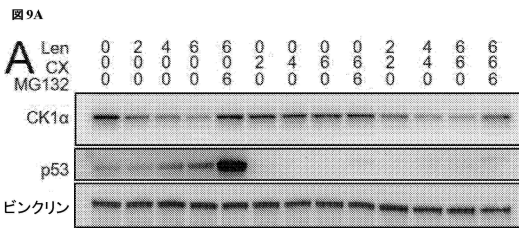
【 図 8 - 2 】



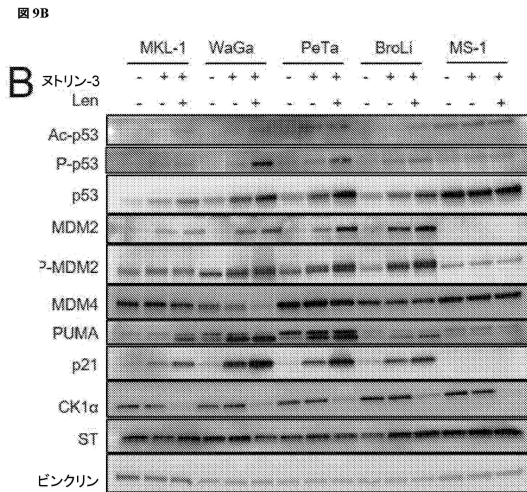
10

20

【 図 9 - 1 】



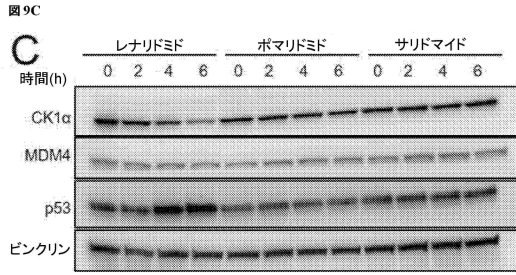
【 図 9 - 2 】



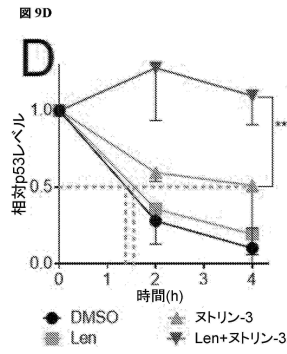
30

40

【 図 9 - 3 】

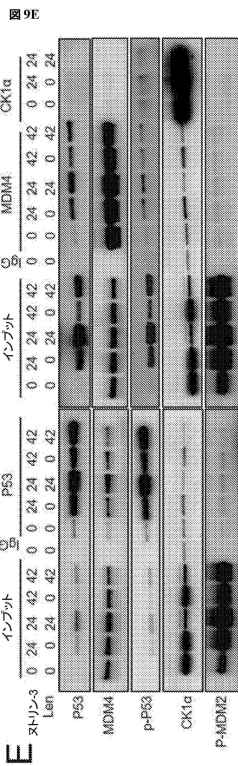


【 図 9 - 4 】

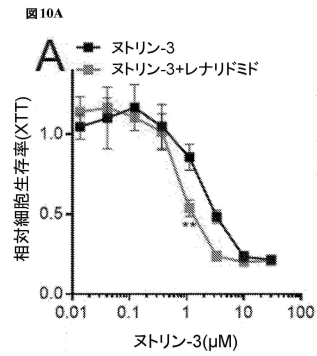


10

【 図 9 - 5 】



【 図 10 - 1 】



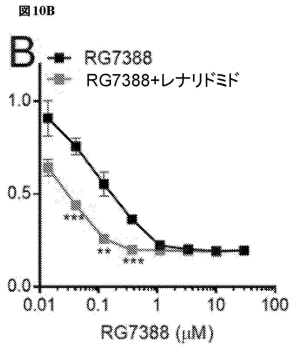
20

30

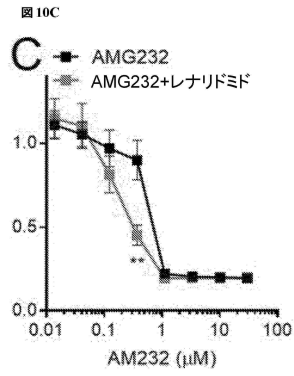
40

50

【 10 - 2 】

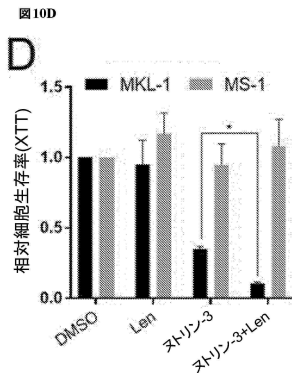


【 10 - 3 】

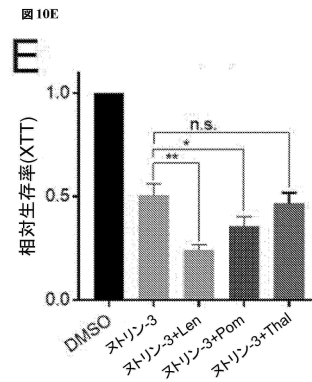


10

【 10 - 4 】



【 10 - 5 】



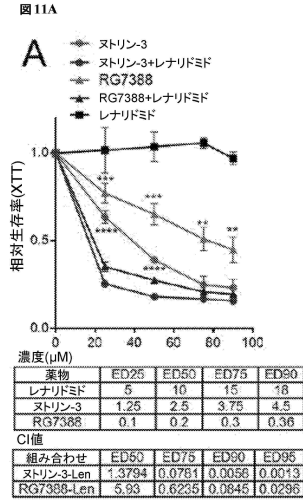
20

30

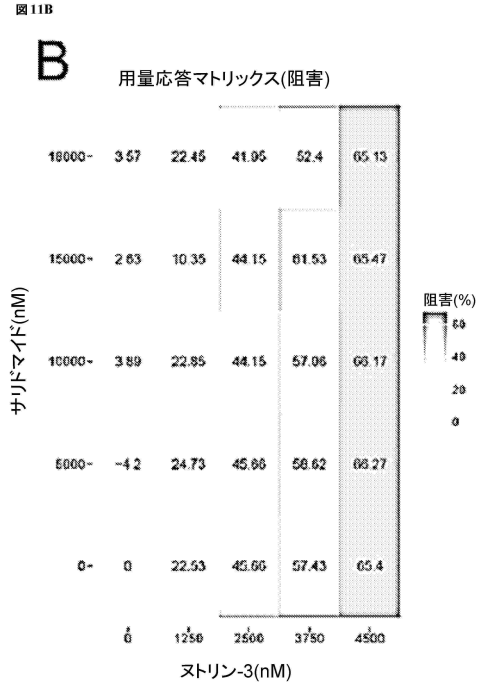
40

50

【 図 1 1 - 1 】



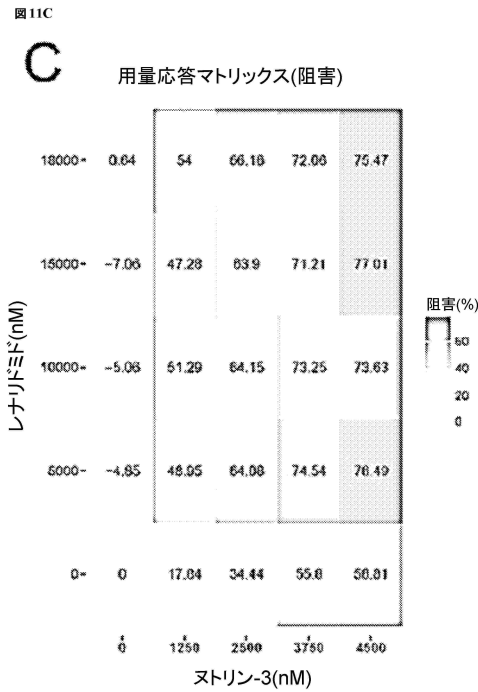
【 図 1 1 - 2 】



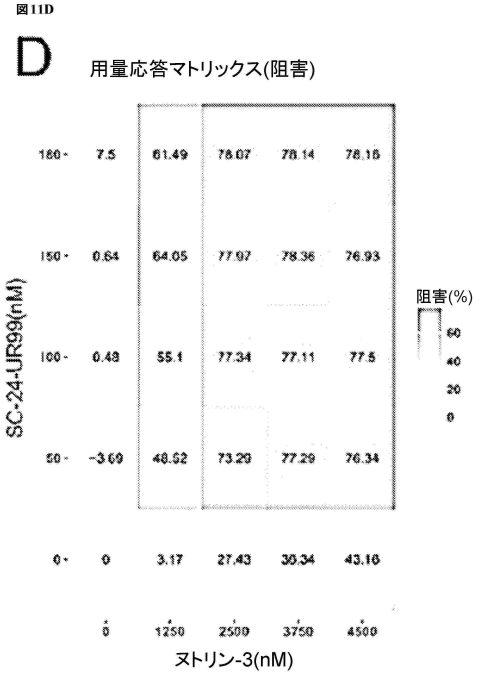
10

20

【 図 1 1 - 3 】



【 図 1 1 - 4 】

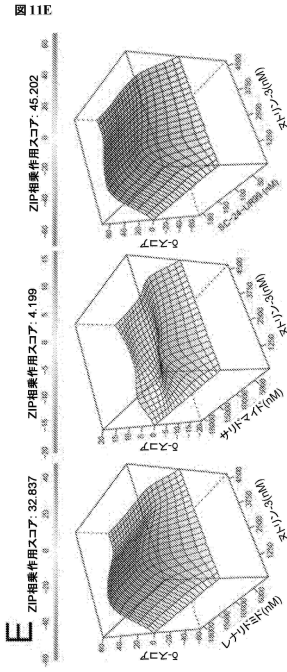


30

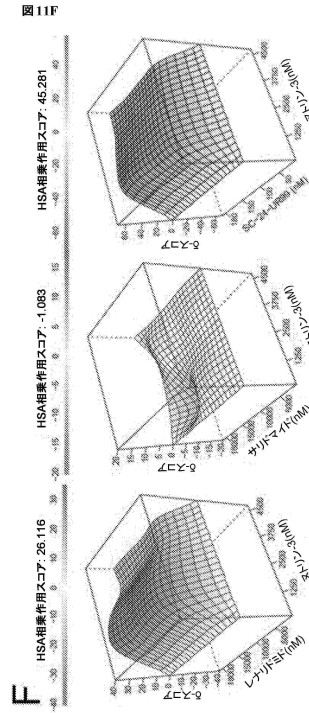
40

50

【 1 1 - 5 】



【 1 1 - 6 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)

F I

A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 43/00 1 2 1

(72)発明者 アベニュー 450, デイナ ファーバー キャンサー インスティテュート, インコーポレイテッド内
デカプリオ, ジェームス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02215, ボストン, ブルックライン アベニュー 450,
デイナ ファーバー キャンサー インスティテュート, インコーポレイテッド内

(72)発明者 パーク, ドンリム, エスター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02215, ボストン, ブルックライン アベニュー 450,
デイナ ファーバー キャンサー インスティテュート, インコーポレイテッド内

審査官 春田 由香

(56)参考文献

Hirose, M. et al. , MDM4 expression as an indicator of TP53 reactivation by combined targeting of MDM2 and MDM4 in cancer cells without TP53 mutation , *Oncoscience* , 2014年 , Vol.1, No.12 , p.830-843 , doi:10.18632/oncoscience.103

Hu, B. et al. , MDMX overexpression prevents p53 activation by the MDM2 inhibitor Nutlin , *The Journal of Biological Chemistry* , 2006年 , Vol.281, No.44 , p.33030-33035 , doi:10.1074/jbc.C600147200

Houben, R. et al. , Mechanisms of p53 restriction in Merkel cell carcinoma cells are independent of the Merkel cell polyoma virus T antigens , *The Journal of Investigative Dermatology* , 2013年 , Vol.133, No.10 , p.2453-2460 , doi:10.1038/jid.2013.169

Liao, G. et al. , The development of piperidinones as potent MDM2-P53 protein-protein interaction inhibitors for cancer therapy , *European Journal of Medicinal Chemistry* , 2018年09月18日 , Vol.159 , p.1-9 , doi:10.1016/j.ejmech.2018.09.044

Manni, S. et al. , Inactivation of CK1 in multiple myeloma empowers drug cytotoxicity by affecting AKT and -catenin survival signaling pathways , *Oncotarget* , 2017年 , Vol.8, No.9 , p.14604-14619 , doi:10.18632/oncotarget.14654

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

A 6 1 K 45 / 00 - 45 / 08

A 6 1 K 31 / 00 - 31 / 80

P u b M e d

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