

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-514349

(P2020-514349A)

(43) 公表日 令和2年5月21日 (2020.5.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 2 0 6
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 83 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-549542 (P2019-549542)
 (86) (22) 出願日 平成30年3月20日 (2018. 3. 20)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年10月30日 (2019. 10. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2018/023346
 (87) 国際公開番号 W02018/175429
 (87) 国際公開日 平成30年9月27日 (2018. 9. 27)
 (31) 優先権主張番号 62/473, 528
 (32) 優先日 平成29年3月20日 (2017. 3. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/521, 082
 (32) 優先日 平成29年6月16日 (2017. 6. 16)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507277642
 インディアナ ユニバーシティー リサーチ
 アンド テクノロジー コーポレーション
 INDIANA UNIVERSITY
 RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION
 アメリカ合衆国 46202 インディアナ
 ナ州 インディアナポリス インディアナ
 アベニュー 518
 (74) 代理人 100106002
 弁理士 正林 真之
 (74) 代理人 100120891
 弁理士 林 一好

最終頁に続く

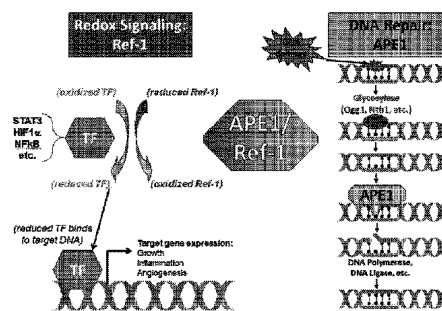
(54) 【発明の名称】 癌の処置のための併用治療剤における A P E 1 / R E F - 1 阻害剤の使用

(57) 【要約】

脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元 (レドックス) 因子 1 (A P E 1 / R e f - 1) のレドックス機能を阻害するのに特異的な A P E 1 / R e f - 1 阻害剤を含む併用治療剤が本願明細書に開示される。この併用治療剤は、種々の癌、及び他の血管新生媒介性疾患 (例えば、網膜疾患、心血管疾患) を処置するために使用することができる。

【選択図】 図 1

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子 1（A P E 1／R e f－1）阻害剤と第 2 治療剤とを含む併用治療剤であって、前記 A P E 1／R e f－1 阻害剤が A P E 1／R e f－1 のレドックス機能を阻害し、前記第 2 治療剤が、B 細胞リンパ腫 2（B c l－2）阻害剤、P T E N 阻害剤、W N T／ β －カテニン阻害剤、ビルビン酸デヒドロゲナーゼ（P D H）阻害剤、 α －ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、N o t c h 3 阻害剤、光線力学療法（P D T）、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される併用治療剤。

【請求項 2】

前記 A P E 1／R e f－1 阻害剤が、5－（2，3－ジメトキシ－6－メチル 1，4－ベンゾキノイル）]－2－ノニル－2－プロペン酸（A P X 3 3 3 0）、[（2 E）－2－[（3－メトキシ－1，4－ジオキソ－1，4－ジヒドロナフタレン－2－イル）メチリデン]－N，N－ジエチルペンタンアミド]（A P X 2 0 0 9）、（2 E）－2－[（3－メトキシ－1，4－ジオキソ－1，4－ジヒドロナフタレン－2－イル）メチリデン]－N－メトキシペンタンアミド]（A P X 2 0 1 4）及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 3】

前記第 2 治療剤が、ドキシソルピシン、エンドスタチン、5－フルオロウラシル（5－F U）、ボルテゾミブ、メシル酸イスピネシブ、S N－3 8、トポテカン、パクリタキセル、ブリオスタチン 1、トラメチニブ、L A Q 8 2 4、ビンブラスチン、B E Z 2 3 5、パノビノスタット、メトトレキセート、テムシロリムス、F K 8 6 6、アフアチニブ、トザセルチブ、イリノテカン、G S K 2 1 2 6 4 5 8、C P I－6 1 3、 γ －セクレターゼ阻害剤、D L L 4 抑制抗体、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 4】

（2 E）－2－[（3－メトキシ－1，4－ジオキソ－1，4－ジヒドロナフタレン－2－イル）メチリデン]－N－メトキシペンタンアミド]（A P X 2 0 1 4）と第 2 治療剤とを含む併用治療剤であって、前記 A P E 1／R e f－1 阻害剤が、A P E 1／R e f－1 のレドックス機能を阻害する併用治療剤。

【請求項 5】

前記第 2 治療剤が炭酸脱水酵素 9（C A 9）阻害剤である請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 6】

前記 C A 9 阻害剤が、S L C－0 1 1 1、F C 1 3－5 5 5 A、F C 1 2－5 3 1 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 5 に記載の併用治療剤。

【請求項 7】

前記第 2 治療剤がシグナル伝達性転写因子 3（S T A T 3）阻害剤である請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 8】

前記 S T A T 3 阻害剤がナパブカシン、ルキシソリチニブ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 7 に記載の併用治療剤。

【請求項 9】

前記第 2 治療剤が白金製剤である請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 10】

前記白金製剤が、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 7 に記載の併用治療剤。

【請求項 11】

癌の処置のための、請求項 1 から請求項 10 のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

前記癌が、前立腺癌、膵臓癌、膵管腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、胚細胞性腫瘍、結腸癌／結腸直腸癌、膀胱癌、頭頸部癌、胃癌／胃食道癌、神経外胚葉性腫瘍、横紋筋肉腫、膵胆管癌、成人神経膠腫、非小細胞肺癌、肝細胞癌、多発性骨髄腫、食道癌、乳癌、小児上衣腫、及び黒色腫からなる群から選択される請求項 1 1 に記載の使用。

【請求項 1 3】

前記癌が結腸癌であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル 1, 4-ベンゾキノイル)]-2-ノニル-2-プロペン酸 (APX 3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジエチルペンタンアミド] (APX 2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される APE 1 / Ref-1 阻害剤と、ドキシソルピシン、5-フルオロウラシル (5-FU)、CPI-613、オキサリプラチン、ナパブカシン、CP-839 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される第 2 治療剤を含む請求項 1 1 に記載の使用。

10

【請求項 1 4】

前記癌が白血病であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル 1, 4-ベンゾキノイル)]-2-ノニル-2-プロペン酸 (APX 3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジエチルペンタンアミド] (APX 2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される APE 1 / Ref-1 阻害剤と、レチノイン酸である第 2 治療剤を含む請求項 1 1 に記載の使用。

20

【請求項 1 5】

前記癌が悪性末梢神経鞘腫であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル 1, 4-ベンゾキノイル)]-2-ノニル-2-プロペン酸 (APX 3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジエチルペンタンアミド] (APX 2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される APE 1 / Ref-1 阻害剤と、サバイビン阻害剤である第 2 治療剤を含む請求項 1 1 に記載の使用。

【請求項 1 6】

前記癌が非小細胞肺癌であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル 1, 4-ベンゾキノイル)]-2-ノニル-2-プロペン酸 (APX 3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジエチルペンタンアミド] (APX 2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される APE 1 / Ref-1 阻害剤と、Bcl-2 阻害剤、光線力学療法及びこれらの組み合わせからなる群から選択される第 2 治療剤を含む請求項 1 1 に記載の使用。

30

【請求項 1 7】

前記癌が前立腺癌であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル 1, 4-ベンゾキノイル)]-2-ノニル-2-プロペン酸 (APX 3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N, N-ジエチルペンタンアミド] (APX 2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択される APE 1 / Ref-1 阻害剤と、サバイビン阻害剤である第 2 治療剤を含む請求項 1 1 に記載の使用。

40

【請求項 1 8】

処置を必要とする被験者における網膜疾患の処置のための、請求項 1 から請求項 1 0 のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

【請求項 1 9】

前記網膜疾患が、脈絡膜新生血管 (CNV)、加齢性黄斑変性症 (AMD)、未熟児網膜症 (ROP)、糖尿病性網膜症 (DR) 及び虚血性網膜症からなる群から選択される請求項 1 8 に記載の使用。

50

【請求項 20】

心血管疾患、細菌性感染症、胃の炎症性障害及び神経変性疾患からなる群から選択される疾患の処置のための、請求項 1 から請求項 10 のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

【請求項 21】

前記疾患が、アルツハイマー病（A D）、パーキンソン病（P D）、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、脳虚血及びこれらの組み合わせからなる群から選択される神経変性疾患である請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子 1（A P E 1／R e f－1）発現を低下させるための低分子阻害性リボ核酸（s i R N A）。 10

【請求項 23】

膵管腺癌（P D A C）の処置のための、請求項 22 に記載の低分子阻害性リボ核酸（s i R N A）の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017年3月20日出願の米国仮出願第62／473, 528号、及び2017年6月16日出願の米国仮出願第62／521, 082号に基づく優先権を主張する。これらの出願は、参照によりその全体を本願明細書に援用する。 20

【0002】

配列表の提出を裏付ける陳述

ファイル名「I U R T C _ 2 0 1 7 - 1 0 9 - 0 4 _ S T 2 5 . t x t」のファイルを含むコンピュータ可読形式の配列表が本願明細書に提示され、これを、参照により本願明細書に援用する。このファイルは、（マイクロソフトウインドウズ（M I C R O S O F T W I N D O W S）（登録商標）エクスプローラー（E X P L O R E R）で調べたところ）サイズが6, 406バイトである。この配列表は配列番号1～配列番号33からなる。

【0003】

本開示は、全体として、種々の癌を処置するための併用治療剤における脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子 1（A P E 1／R e f－1）阻害剤の使用に関する。特に、本開示は、前立腺癌、結腸癌、卵巣癌、膀胱癌、非小細胞肺癌、悪性末梢神経鞘腫、白血病等の癌、及び他の血管新生媒介性疾患（例えば、網膜疾患、心血管疾患）を処置するための併用治療剤における、A P E 1／R e f－1 のレドックス活性（本明細書中では「R e f－1」ともいう）の非常に選択的な阻害剤である A P X 3 3 3 0（以前はE 3 3 3 0として知られていた）の使用に関する。 30

【背景技術】

【0004】

脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子 1（A P E 1／R e f－1）は、もともとは、酸化的損傷及びアルキル化による損傷の塩基除去修復（B E R）経路の修復において非常に重要な役割を果たすエンドヌクレアーゼとして特定された。後に、A P E 1／R e f－1 は、特定の転写因子の活性を調節するレドックスシグナル伝達タンパク質として認識された。それ以降、A P E 1／R e f－1 のさらなる機能が明らかにされてきている。修復及びレドックス活性におけるA P E 1／R e f－1 の二重性及び中核的位置により、A P E 1／R e f－1 は、治療的調節のための独特の標的となっている。 40

【0005】

A P E 1／R e f－1 エンドヌクレアーゼ活性は、すべての細胞においてD N A 損傷応答にとって不可欠であり、このため、A P E 1／R e f－1 は細胞の機能及び生存におけ 50

る非常に重要な非常に重要なファクターとなっている。この修復機能は大腸菌からヒトまで保存されてきている。しかしながら、レドックスシグナル伝達機能は哺乳動物においてのみ見られる。

【0006】

APE1/Ref-1レドックスシグナル伝達は、STAT3、HIF-1 α 、NF- κ B、AP-1、p53、及び他のいくつかを含めて数多くの転写因子に影響を及ぼす。APE1/Ref-1レドックスシグナル伝達は、特定の転写因子の中の酸化されたシステイン残基をそれらのトランス活性化の一部として還元する高度に制御されたプロセスである（図1）。APE1/Ref-1発現は多くの腫瘍型で増加し、その変化は、腫瘍細胞における成長、遊走、及び薬物耐性の上昇又は増大、並びに患者生存の低下と関連づけられている。

10

【0007】

APE1/Ref-1が影響を及ぼす経路が理由で、APE1/Ref-1は、腫瘍シグナル伝達における非常に重要な節点（ノード）として見え（図2）、従って、抗癌治療についての第1標的である。しかしながら、APE1/Ref-1のエンドヌクレアーゼ機能又はレドックス機能のみを標的とする特異的阻害剤を創製するためにAPE1/Ref-1の活性を解き明かすことは困難である。特に、天然源から単離されたいくつかの化合物がRef-1レドックスシグナル伝達阻害剤として提案されてきているが、Ref-1レドックスシグナル伝達を直接又は特異的に阻害すると示されたものはない。これらの天然化合物の一例であるレスベラトロールは上記他の化合物の典型例である。そのインビボ効力は、大きくばらつくバイオアベイラビリティ及び低い分子特異性に起因してせいぜい散発的である。別の天然のRef-1レドックス阻害剤とされるクルクミンは、相手を選ばない化合物として確立されているが、様々な分子と相互作用して、数多くの生物学的アッセイにおいて偽陽性の結果を与える。従って、これらは特異的な又は実行可能なAPE1/Ref-1レドックス阻害剤ではない。

20

【0008】

しかしながら、近年、化合物APX3330（以前はE3330と呼ばれていた）が特異的APE1/Ref-1レドックス阻害剤として特定されている。APX3330は、Ref-1のエンドヌクレアーゼ活性に影響を及ぼさない、このタンパク質のレドックス活性の直接的で非常に選択的な阻害剤として広く十分に特徴づけられている（図6）。APX3330を用いた処置は、インビトロモデル及びインビボモデルの両方において、限定的な毒性で腫瘍の成長及び進行を示している。

30

【0009】

APE1/Ref-1等の標的をさらに評価して、相関的バイオマーカー研究を含めて併用治療剤を合理的に設計し、これによって治療法の選択肢が限られたままになっている癌患者のための処置を提供することは好都合であろう。さらに、単独で投与された場合の治療剤の効果と比較して共阻害が細胞死の劇的な増強につながる、2つの標的の合成の併用治療剤を特定することはさらに有益であろう。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

40

【0010】

本開示は、全体として、種々の癌を処置するための併用治療剤における、選択的なAPE1/Ref-1阻害剤APX3330及びこれから誘導される化合物（例えば、APX2009及びAPX2014）の使用に関する。この併用治療剤は、前立腺癌、結腸癌、卵巣癌、非小細胞肺癌、悪性末梢神経鞘腫、白血病等の癌、及び他の血管新生媒介性疾患（例えば、網膜疾患、心血管疾患）を処置することが見出されている。

【0011】

従って、1つの態様では、本開示は、脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ/酸化還元（レドックス）因子1（APE1/Ref-1）阻害剤と第2治療剤とを含む併用治療剤であって、上記APE1/Ref-1阻害剤がAPE1/Ref-1のレドック

50

ス機能を阻害する併用治療剤に関する。

【0012】

別の態様では、本開示は、癌の処置のための併用治療剤の使用であって、上記併用治療剤が脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子1（APE1／Ref-1）阻害剤と第2治療剤とを含み、上記APE1／Ref-1阻害剤がAPE1／Ref-1のレドックス機能を阻害する使用に関する。

【0013】

さらに別の態様では、本開示は、処置を必要とする被験者における網膜疾患の処置のための併用治療剤の使用であって、上記併用治療剤が脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子1（APE1／Ref-1）阻害剤と第2治療剤とを含み、上記APE1／Ref-1阻害剤が、APE1／Ref-1のエンドヌクレアーゼ機能又はレドックス機能を阻害する使用に関する。

【0014】

さらに別の態様では、本開示は、心血管疾患、細菌性感染症、胃の炎症性障害、及び神経変性疾患からなる群から選択される疾患の処置のための併用治療剤の使用に関する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

本開示の以下の詳細な説明を考慮すると、本開示は、よりよく理解され、上述の特徴、態様及び利点以外の特徴、態様及び利点が明らかになるであろう。このような詳細な説明は、以下の図面を参照する。

【図1】図1はAPE1／Ref-1の二重機能を描く。APE1／Ref-1はレドックスシグナル伝達及びDNA修復に関与する多機能タンパク質である。このレドックスシグナル伝達機能（Ref-1）は、特定の転写因子（TF）の中の酸化されたシステイン残基の還元を担い、細胞成長、炎症、血管新生、及び他の細胞機能に関与する遺伝子の転写活性の上昇及び上方制御につなげる。上記DNA修復機能（APE1）は、塩基除去修復においてエンドヌクレアーゼ活性を担い、DNAのホスホジエステル骨格をグリコシラーゼによって作り出された脱塩基部位で切断する。これらの切断によって脱塩基部位が適切なヌクレオチド塩基で置き換えられることが可能になり、DNA塩基除去修復プロセスを完了する。

【図2】図2は、腫瘍細胞におけるノードとしてのRef-1シグナル伝達及び関連経路における有望な阻害剤を描く。Ref-1レドックスシグナル伝達はSTAT3、HIF-1 α 、及びNF- κ B等の転写因子のトランス活性化を促進する。Ref-1をAPX3330で阻害することは、下流の遺伝子の発現を低下させ、腫瘍細胞成長の停止及び／又は（細胞）死につながる。加えて、Ref-1によって影響を受けるシグナル伝達経路及びこれらの経路によって上方制御される酵素を阻害するための他の方法は、Ref-1阻害の細胞毒性効果及び細胞増殖抑制効果を増強することが示された。

【図3】図3A及び図3Bは、Ref-1及びJak／STATのシグナル伝達の二重標的化が三次元共培養モデルにおいてPDAC腫瘍成長を阻害することを描く。図3Aは、CAFの存在下及び不存在下で三次元培養物において成長したPa03C低継代患者由来腫瘍細胞を示す。スフェロイドは、ルキシソリチニブ単独で、及びルキシソリチニブとAPX3330（40 μ M）とを組み合わせる処置され、腫瘍（赤色チャンネル）及びCAF19番号1（緑色チャンネル）の面積が12日後に培養物中で、n=4で定量され、倍率変化は、腫瘍単独スフェロイドにおける薬物処置済み対培地のみの比較を指す。図3Bは、プレATING後8～10日目の三次元アッセイにおけるルキシソリチニブ（12.5 μ M）処置の4時間後のpSTAT3 Y705残渣についての免疫プロットによるSTAT3活性化の阻害の確認を描く。全STAT3タンパク質は、負荷対照として、及び両方の細胞型におけるSTAT3のレベルの基準として提供される。代表的なウエスタンプロットは、n=3から示される。

【図4】図4は、APE1／Ref-1の多機能性に起因するヒト疾患におけるAPE1／Ref-1の効果を描き、APE1／Ref-1は広い範囲のヒト疾患に影響する。R

e f - 1 の発現の変化は、複数の転写因子に対するその制御に影響を及ぼし、種々の癌、網膜疾患、心血管疾患、胃疾患及び神経変性疾患につながる。同様に、改変された A P E 1 D N A 修復機能は、様々な癌及び神経変性疾患の進行に影響を及ぼす。

【図 5】図 5 は、酸化的 D N A 損傷を含めた抗癌処置が感覚神経機能を変えらることを描く。これらの薬剤としては、シスプラチン、オキサリプラチン、電離放射線及び他の薬物が挙げられる。R O S、活性酸素種；P t、白金付加物；A P E 1、脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ。

【図 6 - 1】図 6 A は、感覚神経対腫瘍細胞の、A P E 1 レドックス阻害の差異的役割を描く。腫瘍細胞において、R e f - 1 レドックス阻害は、腫瘍成長、生存、遊走及び腫瘍炎症に対して複数の下流効果を及ぼす。D R G ニューロン等の感覚神経細胞では、A P X 3 3 3 0 の添加は、細胞に対して負の効果を及ぼさず、D N A B E R 経路を誘発した酸化的 D N A 傷害剤（例えばシスプラチン、オキサリプラチン）に対する R e f - 1 D N A 修復活性の増強を通して生存及び機能保護を促す（図 6 A）。下側右のパネルでは、A P X 3 3 3 0 は、腫瘍保有マウスへのシスプラチンの全身投与によって誘導される神経毒性を減弱させる。

【図 6 - 2】図 6 B ~ 図 6 E は、感覚神経対腫瘍細胞の、A P E 1 レドックス阻害の差異的役割を描く。図 6 B は、D R G 内での D N A 損傷に対するシスプラチン及び A P X 3 3 3 0 の効果の検討のための処置概念図式を描く。神経芽細胞腫細胞が 6 週齢の雄の N S G マウスの右側腹部に皮下移植され、腫瘍量が 150 mm^3 以上になるまで増殖するようにされた。次に、マウスは、シスプラチン ± A P X 3 3 3 0 処置を用いる処置について無作為化された。シスプラチン及び A P X 3 3 3 0 は、3 週間（0 日目 ~ 17 日目）同時に投与され、神経細胞毒性のエンドポイントを、シスプラチンの最後の用量の後のいくつかの時間点においてマウスの D R G 内で評価した。図 6 C は、24 日目及び 31 日目の p H 2 A . X 免疫反応性を実証する代表的なプロットである。図 6 D 及び図 6 E は、p H 2 A . X 免疫反応性の定量化を描く。星印は、 $p < 0.05$ でチューキー（T u k e y）の事後検定を用いた一元配置 A N O V A によって決定される、18 日目と 24 日目との統計的有意性を示す。十字架は、 $p < 0.05$ でボンフェローニ（B o n f e r r o n i）の事後検定を用いた二元配置 A N O V A によって決定される、V e h / V e h 群と V e h / C i s 群との間の統計的有意性を示す。

【図 7】図 7 は、A P X 3 3 3 0 が様々な癌において幅広い有望性を有することを描く。支持する前臨床データは、略図（右から 2 番目の縦列の箱）に掲載されている各薬物と組み合わせた A P X 3 3 3 0 について、及び各適応症（一番右の箱）について存在する。＊抗腫瘍活性に加えて、A P X 3 3 3 0 は、ニューロンへの酸化的損傷を引き起こす薬剤と一緒に投与されるとき、神経防護作用をもたらす。

【図 8】図 8 A ~ 図 8 C は、s i R N A ノックダウン後の細胞における A P E 1 発現及びバッチ効果を描く。図 8 A は、 20 nM s i R N A を用いた A P E 1 ノックダウン後の P a 0 3 C 細胞の代表的なウエスタンプロット及び濃度測定分析である。ビンキュリンが負荷対照として使用される。s i A P E 1 試料は、S C R 対照試料と比較して 10 % A P E 1 レベルを有していた。図 8 B は、未補正遺伝子発現データの主成分分析を描く。図 8 C は、補正後の遺伝子発現データの主成分分析を描く。細胞周期注釈付き遺伝子を用いたバッチ効果の補正の後、S C R 1 群及び S C R 2 群は、x 軸に沿って一緒になり、単一の S C R 群を形成する。

【図 9 - 1】図 9 A ~ 図 9 B は、s c R N A - s e q の結果及び分析の比較を描く。図 9 A は、S C R、検出可能 s i A P E 1 及び検出不能 s i A P E 1 の試料における百万リードあたりの A P E 1 R N A 発現カウント（C P M）の差を説明するバイオリンプロットである。図 9 B は、この分析における 2 つの群として S C R 細胞及び s i A P E 1 細胞を用いる平均発現及び倍率変化プロットを描く。

【図 9 - 2】図 9 C は、s c R N A - s e q の結果及び分析の比較を描く。図 9 C は、この分析において S C R 細胞、検出可能 s i A P E 1 細胞及び検出不能 s i A P E 1 細胞を用いる平均発現及び倍率変化プロットを描く。この分析は 3 つの別個の群を使用するが、

10

20

30

40

50

このプロットは、グラフの限界のため、平均発現及び倍率変化の算出のために S C R 及び s i A P E 1 を使用することに留意されたい。

【図 10】図 10 A～図 10 G は、A P E 1 レベルに関連して差別的に発現される遺伝子の特定を描く。図 10 A は、s c R N A－S e q データに対して実施された 3 つの分析及びそれらの間の重複遺伝子を示すベン図である。6 つの遺伝子がすべての 3 つの分析で有意に変化した (図 10 B) T M E M 4 5 A、(図 10 C) T M E M 1 2 6 A、(図 10 D) T M E M 1 5 4、(図 10 E) C O M M D 7、(図 10 F) I S Y N A 1 及び (図 10 G) T N F A I P 2。これらの遺伝子は発現の増大変化を示す。というのも、A P E 1 レベルは S C R から検出可能 (しかし低下している) s i A P E 1 へ、そして検出不能 s i A P E 1 へとさらに低下するからである。

10

【図 11-1】図 11 A は、重複する過剰出現標準経路を描く。図 11 A は、S C R / 検出可能 s i A P E 1 / 検出不能 s i A P E 1 結果に対する I P A 分析後の 20 個の最も有意に過剰出現した経路を描く。x 軸は、過剰出現経路において差別的に発現された遺伝子の数を示す。y 軸上の経路ラベルの隣にある百分率は、S C R 細胞と s i A P E 1 細胞との間で差別的に発現されるその経路における遺伝子の百分率を示す。

【図 11-2】図 11 B は、重複する過剰出現標準経路を描く。図 11 B は、E I F 2 経路における変化を描く。この E I F 2 経路は、70 個の D E G による A P E 1 ノックダウンによって最も影響を受ける経路であった。s i A P E 1 細胞においてより高く発現される遺伝子としては e I F 5 及び e I F 4 E が挙げられ、他方で、対照細胞においてより高く発現されるものとしては e I F 2 γ 、e I F 3、G A D D 3 4、G－アクチン、及び 40 S リボソームサブユニットが挙げられる。差別的に発現されると特定された遺伝子又は複合体は、丸で囲まれており、太字になっている。

20

【図 11-3】図 11 C は、重複する過剰出現標準経路を描く。図 11 C は、E I F 2 経路に関与する 1 細胞あたりの D E G の発現の変化を示すヒートマップである。色を示す箱は、示された発現の規格化された変化に対応する。

【図 12-1】図 12 A～図 12 D は、P a 0 3 C 細胞における q R T－P C R による s c R N A－S e q の検証を描く。図 12 A は、S C R / s i A P E 1 検証後の q R T－P C R 検証のために選ばれた遺伝子を描く。図 12 B は、q R T－P C R 検証のために選ばれたすべての 3 つの分析において統計的に有意な遺伝子を描く。

【図 12-2】図 12 C～図 12 D は、P a 0 3 C 細胞における q R T－P C R による s c R N A－S e q の検証を描く。図 12 C は、P a 0 3 C 細胞において q R T－P C R によって評価した選択された遺伝子の発現を示す。この細胞は、s i R N A ノックダウン後に採取され、80%以上の A P E 1 タンパク質レベルの低下について評価された。各グラフは 3 つの独立の実験の結果であり、S C R と比較した s i A P E 1 試料中の平均倍率変化 $\pm$ S D (標準偏差) を示す。 $p < 0.05$ (A N C O V A モデル)。図 12 D は検証分析を描く。s c R N A－S e q 後の $\log_2$ 倍率変化 (x 軸) と q R T－P C R (y 軸) との間の関係。 $R^2 = 0.82$ 。傾きの線形回帰分析は $p < 0.0001$ を与えた。

30

【図 13】図 13 A 及び図 13 B は、P D A C 細胞及び C A F に対するドセタキセル又はトラメチニブと組み合わせた R e f－1 の効果を描く。図 13 B では、C A F の存在下での減少した効力のため、より高い用量のドセタキセルを共培養において使用した。

40

【図 14】図 14 A～図 14 C は、A P X 3 3 3 0 及びゲムシタビン (G e m) を用いた三次元スフェロイド及びインビボでの組み合わせ研究を描く。癌関連線維芽細胞 (C A F 19) との共培養における低継代患者由来 P D A C 細胞 (P a 0 3 C、図 14 A) が、A P X 3 3 3 0 (50 μ M) と組み合わせた増加する量の G e m で処置された。図 14 B はグラフ表示である：*すべての G e m + A P X 3 3 3 0 処置は、腫瘍において G e m 単独とは有意に異なる ($p < 0.01$)。図 14 C は、処置後 30 日目の腫瘍量を描く。A P X 3 3 3 0 (25 mg / kg) は、以前に公開されたように、動物モデルにおいて、P a C a－2 及び P a n c 2 5 3 の患者由来細胞の両方で腫瘍量を低下させる。

【図 15-1】図 15 A～図 15 B は、H C T－1 1 6 細胞株に対する A P X 3 3 3 0 及び C P I－6 1 3 の効果を描く。

50

【図15-2】図15Cは、HCT-116細胞株に対するAPX3330及びCPI-613の効果を描く。

【図16-1】図16A～図16Cは、siRNAノックダウン後の選択された遺伝子の発現に対して様々な変化を呈する、異なるPDAC細胞株を描く。選択された遺伝子の発現が、(図16A) Pa02C細胞、(図16B) Panc10.05細胞及び(図16C) Panc198細胞においてqRT-PCRによって評価された。これらの細胞はsiRNAノックダウン後に採取され、80%以上のAPE1タンパク質レベルにおける低下について評価された。各グラフは3つの独立の実験の結果であり、SCRと比べたsiAPE試料における平均倍率変化±SDを示す。 $p < 0.05$ (ANCOVAモデル)。

10

【図16-2】図16C～図16Dは、siRNAノックダウン後の選択された遺伝子の発現に対して様々な変化を呈する、異なるPDAC細胞株を描く。選択された遺伝子の発現が、(図16C) Panc198細胞においてqRT-PCRによって評価された。図16Dは、4つの異なるPDAC細胞株間でのqRT-PCRの重複する結果を示すベン図である。COMMD7、ITGA1、RAB3D及びTNFAIP2はすべての4つの細胞株で有意に変化した。PPIF及びSIPA1は、Pa03C細胞、Pa02C細胞及びPanc10.05細胞で差別的に発現された。TAPBPは、Pa03C及びPanc10.05において差別的に発現された。PRDX5、ISYNA1、BCRP及びNOTCH3は、Pa03CとPa02Cとの間で共通であった(BCRP及びNOTCH3は、上記細胞株間で反対方向に変化した)が、CIRBPはPa03Cにおいて差別的に発現されただけであった。

20

【図17】図17は、膵臓癌の三次元スフェロイドモデルにおける親化合物APX3330、並びに類似体化合物APX2009及びAPX2014の単剤効力を描く。グラフはN=3の標準偏差を伴う平均である。

【図18】図18は、APX3330及びナバブカシン(BBI-608-STAT3阻害剤)が、膵臓癌の患者由来の三次元スフェロイドモデル(腫瘍+CAF)において相乗的な腫瘍死滅を有することを示す。示されている濃度はマイクロモル濃度単位である; Napap 0.125 μ M、APX3330 25又は35 μ M、及びAPX2009 3.5 μ M。

【図19】図19A及び図19Bは、三次元スフェロイドモデル(腫瘍及びCAF)におけるSTAT3iナバブカシンと組み合わせたAPX3330が膵腫瘍細胞の相乗的な死滅を有していたことを示す。

30

【図20】図20A及び図20Bは、三次元スフェロイドモデル(腫瘍及びCAF)におけるSTAT3iナバブカシンと組み合わせたAPX3330及びAPX2009が相乗的な腫瘍細胞死滅を実証したことを示す。示されている濃度はマイクロモル濃度単位である; Napap 0.125 μ M、APX3330 25 μ M、及びAPX2009 3.5 μ M。 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ 。

【図21】図21A及び図21Bは、Ref-1及びSTAT3の二重標的化が、遺伝的PDACモデルにおいてインビトロ(図21A)及びインビボ(図21B)で増強された死滅を生じることを描く。

40

【図22】図22A～図22Cは、CA9及びAPE1の二重標的化が三次元共培養膵臓癌腫瘍モデルにおいてPDAC腫瘍を死滅させることを示す。

【図23-1】図23A～図23Bは、PDAC三次元共培養モデルにおけるAPE1/Ref-1阻害剤との併用治療剤を描く。図23Aは、APX3330+オパトクラックス(Bcl2拮抗薬)の併用治療剤を描く。図23Bは、APX3330+エンチノスタット(HDAC1及び3阻害剤)の併用治療剤を描く。

【図23-2】図23C～図23Dは、PDAC三次元共培養モデルにおけるAPE1/Ref-1阻害剤との併用治療剤を描く。図23Cは、APX3330+アキシチニブ(TKI阻害剤)の併用治療剤を描く。図23Dは、APX3330+オパトクラックス(Bcl2拮抗薬)の併用治療剤を描く。

50

【図 2 3 - 3】図 2 3 E は、P D A C 三次元共培養モデルにおける A P E 1 / R e f - 1 阻害剤との併用治療剤を描く。図 2 3 E は、A P X 3 3 3 0 + エンチノスタット (H D A C 1 及び 3 阻害剤) の併用治療剤を描く。

【図 2 4 - 1】図 2 4 A ~ 図 2 4 B は、P D A C 三次元共培養モデルにおける A P E 1 / R e f - 1 阻害剤と C P I - 6 1 3、ミトコンドリア標的 (m i t o t a r g e t e d) T C A 回路阻害剤 (図 2 4 A) 又は S T A T 3 阻害剤ナバブカシン (図 2 4 B) との併用治療剤を描く。

【図 2 4 - 2】図 2 4 C は、P D A C 三次元共培養モデルにおける A P E 1 / R e f - 1 阻害剤と S T A T 3 阻害剤ナバブカシン (図 2 4 C) との併用治療剤を描く。

【図 2 5】図 2 5 は、膵臓癌の三次元モデルにおける A P X 3 3 3 0 と組み合わせたルキシソリチニブの効果を描く。

【図 2 6】図 2 6 は、膵臓癌の三次元共培養モデルにおける p - S T A T 3 (Y 7 0 5) のリン酸化に対するルキシソリチニブの効果を描く。特に、ウエスタンブロットは、ルキシソリチニブ (1 2 . 5 m M) の 4 時間後の p - S T A T 3 (Y 7 0 5) を描く。

【図 2 7】図 2 7 は、腫瘍成長遅延に対する側腹部共培養モデルにおける R u x + A P X の併用治療の効果を描く。

【図 2 8】図 2 8 A 及び図 2 8 B は、併用治療が共培養腫瘍において C A F を死滅させなかったことを描く。

【図 2 9】図 2 9 A ~ 図 2 9 G は、オキサリプラチンと組み合わせた A P X 3 3 3 0 の抗腫瘍性効力を描く。

【図 3 0】図 3 0 A 及び図 3 0 B は、マウス結腸細胞株 M C - 3 8 における S T A T 3 阻害剤ナバブカシン及び A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 2 0 1 4 の薬物組み合わせ効果を描く。

【図 3 1 - 1】図 3 1 A は、ヒト腺癌結腸浮遊細胞株 C o l o - 2 0 1 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 1 A は単剤効果を描く。

【図 3 1 - 2】図 3 1 B ~ 図 3 1 E は、ヒト腺癌結腸浮遊細胞株 C o l o - 2 0 1 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 1 B は併用治療剤効果を描く。図 3 1 C は、組み合わせ E C 5 0 (μ M) を描く。図 3 1 D は、用量組み合わせのチョウータラレイ指数 (C h o u - T a l a l a y I n d e x) を描く。図 3 1 E は相乗作用用量を描く。

【図 3 2 - 1】図 3 2 A は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 (本明細書中で E 3 3 3 0 と呼ばれる) の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 2 A は単剤効果を描く。

【図 3 2 - 2】図 3 2 B ~ 図 3 2 E は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 (本明細書中で E 3 3 3 0 と呼ばれる) の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 2 B は併用治療剤効果を描く。図 3 2 C は、組み合わせ E C 5 0 (μ M) を描く。図 3 2 D は、用量組み合わせのチョウータラレイ指数を描く。図 3 2 E は相乗作用用量を描く。

【図 3 3 - 1】図 3 3 A は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 3 A は単剤効果を描く。

【図 3 3 - 2】図 3 3 B ~ 図 3 3 E は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 3 B は併用治療剤効果を描く。図 3 3 C は、組み合わせ E C 5 0 (μ M) を描く。図 3 3 D は、用量組み合わせのチョウータラレイ指数を描く。図 3 3 E は相乗作用用量を描く。

10

20

30

40

50

【図 3 4 - 1】図 3 4 A は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 2 0 1 4 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 4 A は単剤効果を描く。

【図 3 4 - 2】図 3 4 B ~ 図 3 4 E は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における P D H 及び α - K D H 代謝阻害剤 C P I - 6 1 3 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 2 0 1 4 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 4 B は併用治療剤効果を描く。図 3 4 C は、組み合わせ E C 5 0 (μ M) を描く。図 3 4 D は、用量組み合わせのチョウータラレイ指数を描く。図 3 4 E は相乗作用用量を描く。

【図 3 5 - 1】図 3 5 A は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における G L S 1 代謝阻害剤 C B - 8 3 9 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 5 A は単剤効果を描く。

【図 3 5 - 2】図 3 5 B ~ 図 3 5 E は、ヒト癌腫結腸細胞株 H C T - 1 1 6 における G L S 1 代謝阻害剤 C B - 8 3 9 並びに A p e 1 レドックス阻害剤 A P X 3 3 3 0 の相乗的な薬物組み合わせ効果を描く。図 3 5 B は併用治療剤効果を描く。図 3 5 C は、組み合わせ E C 5 0 (μ M) を描く。図 3 5 D は、用量組み合わせのチョウータラレイ指数を描く。図 3 5 E は相乗作用用量を描く。

【図 3 6】図 3 6 A 及び図 3 6 B は、シスプラチン耐性膀胱細胞株 B L C A b 0 0 1 に対する A P X 2 0 1 4 + / - シスプラチンの 3 日間の処置の効果を描く。

【図 3 7】図 3 7 A 及び図 3 7 B は、シスプラチン耐性膀胱細胞株 B L C A b 0 0 2 に対する A P X 2 0 1 4 + / - シスプラチンの 3 日間の処置の効果を描く。

【図 3 8】図 3 8 A 及び図 3 8 B は、膀胱細胞株 T 2 4 に対する A P X 2 0 1 4 + / - ナパブカシンの効果を描く。

【図 3 9】図 3 9 A 及び図 3 9 B は、膀胱細胞株 T 2 4 に対する A P X 2 0 0 9 + / - ナパブカシンの効果を描く。

【図 4 0】図 4 0 A 及び図 4 0 B は、膀胱細胞株 S C a B E R に対する A P X 2 0 1 4 + / - ナパブカシンの効果を描く。

【図 4 1】図 4 1 A 及び図 4 1 B は、膀胱細胞株 S C a B E R に対する A P X 2 0 0 9 + / - ナパブカシンの効果を描く。

【図 4 2】図 4 2 A ~ 図 4 2 H は、P D A C 細胞における A P E 1 / R e f - 1 - H I F - 1 - C A 9 シグナル伝達軸 (シグナル経路) の重要性を描く。図 4 2 A は、0 . 2 % 酸素に 2 4 時間曝露された、患者由来の P D A C 腫瘍細胞株 1 0 . 0 5、P a 0 2 C、及び P a 0 3 C、並びに膵臓 C A F 細胞株 C A F 1 9 を示す。C A 9 タンパク質レベルがウエスタンブロットにより比較された (酸素正常状態と低酸素との間のすべての細胞株差につき $p < 0 . 0 5$) 。図 4 2 B は、低酸素条件 (0 . 2 % O_2) 下での P D A C 細胞株における S L C - 0 1 1 1 についての L C 5 0 値が各細胞株において C A 9 誘導と逆相関する ($R^2 > 0 . 9 9$) ことを示す。図 4 2 C は、単層 (二次元) で成長し、酸素正常状態又は 0 . 2 % O_2 で 2 4 時間培養され、ウエスタンブロット解析のために採取された 1 0 . 0 5 細胞を描く。1 0 . 0 5 細胞単独又は C A F 1 9 細胞との共培養における 1 0 . 0 5 細胞は、三次元培養物において 1 2 日間成長し、ウエスタンブロット解析のために採取された。すべての 4 つの試料から等しい量のタンパク質が使用された。単独及び C A F を伴う三次元培養物中の C A 9 レベルは、低酸素曝露の単層培養物におけるよりも (それぞれ) 2 . 5 倍及び 6 . 2 倍大きかった。図 4 2 D ~ 図 4 2 F は、示された s i R N A でトランスフェクトされ三次元スフェロイドの中で培養された 1 0 . 0 5 細胞を示す。細胞は、ノックダウンを確認するために 8 日目にウエスタンブロット解析用に採取された (図 4 2 D、C A 9 に対する s i A P E 1 / R e f - 1 及び s i C A 9 効果並びに A P E 1 / R e f - 1 に対する s i A P E 1 / R e f - 1 効果につき $p < 0 . 0 5$) 。蛍光強度 (図 4 2 E) 及び面積 (図示せず) を三次元培養物成長の 4 日目、8 日目、及び 1 2 日目に測定した (1 2 日目のノックダウン群と S C との間の差につき $p < 0 . 0 0 1$ 、1 2 日目の s i A P E 1 / R e f - 1 と s i C A 9 との差につき $p < 0 . 0 5$) 。各群からの代表的な蛍光像は 1 2 日目に記録された (図 4 2 F) 。図 4 2 G ~ 図 4 2 H は、A P X 3 3 3 0 で処

10

20

30

40

50

置され、タンパク質-DNA架橋及び採取に先立って0.2%O₂に12時間曝露された10.05細胞を描く。HIF1α及び非特異的結合についての対照(ウサギIgG; DMSO+低酸素試料に対して実施された)のIPが、核エキスをを使用して実施された。CA9プロモーターのHBS含有領域に対するqPCRが実施された(図42G、*p<0.01)。CA9プロモーターのHBS含有領域に対するPCRが、IP試料並びにインプット(input)DNA(IPにロードした量の1%; DMSO+低酸素試料に対して実施された)及び陰性対照(H₂O)を使用して実施され、これらの試料は、臭化エチジウムを用いて1%アガロースゲル上で検出された(図42H、予想される産物サイズ=249bp)。

【図43-1】図43A~図43Eは、APE1/Ref-1又はCA9の阻害によるCA9の遮断を描く。図43A及び図43Bは、APX3330、APX2009、APX2014、及び負の類似体RN7-58で処置され、採取並びにCA9 mRNA(図43A)レベル及びタンパク質(図43B)レベルの分析に先立って0.2%O₂に24時間曝露された10.05細胞を示す(各APE1/Ref-1阻害剤の試験した最高濃度でのCA9 mRNAレベル及びタンパク質レベルの差につきDMSOに対してp<0.01)。図43Cは、採取及びウエスタンブロット解析に先立って三次元スフェロイドにおいて12日間培養された10.05細胞を示す。培養物は、4日目及び8日目に、示された濃度のAPX3330、APX2009、APX2014、及び負の類似体RN7-58で処置された(各APE1/Ref-1阻害剤の試験した最高濃度でのCA9発現の差につきDMSOに対してp<0.05)。図43D及び図43Eは、示されたsiRNAでトランスフェクトされたか又は示された濃度のAPX2009又はAPX2014で処置され、0.2%O₂に48時間に曝露された10.05細胞を示す。細胞内pHの変化は、pH感受性蛍光染料(pHrodo Redチャネル、図43D)を使用して定量され、pH媒介性蛍光変化は、盲検の第三者によって撮像された(図43E)。

【図43-2】図43F~図43Iは、APE1/Ref-1又はCA9阻害を介したCA9の遮断を描く。図43F~図43Iは、10.05(図43F及び図43H)又はPa03C(図43G及び図43I)の腫瘍細胞(CAFを伴う)を用いた三次元共培養物が、増加する濃度のAPX3330、APX2009、及びAPX2014(F~G)又はSLC-0111及びFC12-531A(図43H及び図43I)で12日間処置され、蛍光強度が測定されたことを示す。

【図44】図44A~図44Fは、三次元培養物の特性解析並びにAPE1/Ref-1及びCA9を二重標的とすることの効果を描く。図44A~図44Fは、CAFとともに12日間培養され、IHC用に採取された10.05細胞又はPa03C細胞からなるスフェロイドを描く。これらの培養物に由来する切片を有するスライドは、示された抗体/染料で染色された。抗体染色物(図44B及び図44D~図44F)はヘマトキシリンを用いて対比染色された。画像は1,600倍の拡大率で示されている。

【図45】図45A~図45Rは、APE1/Ref-1レドックスシグナル伝達阻害が、第二世代阻害剤を用いたCA9阻害に対する三次元PDAC腫瘍スフェロイドの感受性を高めることを描く。10.05細胞及びPa03C細胞は、CAF19細胞とともに三次元培養物中へプレーティングされ、これらのスフェロイドにおける細胞成長が、プレーティング後4日目、8日目、12日目、及び16日目に蛍光強度によって測定された。スフェロイド共培養物におけるCAF細胞の成長に対する腫瘍細胞の成長が、異なる蛍光標識を使用してこの2つの細胞型において別個に評価された。三次元培養物は、測定後4日目、8日目、及び12日目に、FC12-531A+APX3330(図45A~図45F)、APX2009(図45G~図45L)、又はAPX2014(図45M~図45R)を用いて処置された。各実験内の蛍光強度データは16日目のDMSO対照(Control)に対して規格化され、16日目の読み取り値が比較された。群間の差は、チューキー(Tukey)の多重比較検定を使用して決定された:*p<0.05対DMSO;**p<0.01対DMSO;***p<0.001対DMSO;+p<0.05対APE1/Ref-1阻害剤;++p<0.01対APE1/Ref-1阻害剤;+++p<0.

10

20

30

40

50

0 0 1 対 A P E 1 / R e f - 1 阻害剤； $^{\Delta} p < 0.05$ 対 F C 1 2 - 5 3 1 A； $^{\Delta \Delta} p < 0.01$ 対 F C 1 2 - 5 3 1 A； $^{\Delta \Delta \Delta} p < 0.001$ 対 F C 1 2 - 5 3 1 A。グラフは $N = 3$ の標準偏差を伴う平均である。これらのスフェロイドにおける腫瘍（赤色チャンネル）細胞及び C A F（緑色チャンネル）細胞の蛍光像は、16日目に記録した。

【図46】図46は経路概略である。A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達は、H I F - 1 及び特定の他の転写因子のトランス活性化に寄与する。H I F 1 α は低酸素条件下で安定化され、H I F - 1 の形成及びその後の C A 9 の発現につながる。C A 9 は、炭酸水素イオントランスポーター及び細胞内 C A と協調し、細胞内 p H を安定化する。（A P X 3 3 3 0、A P X 2 0 0 9、又は A P X 2 0 1 4 を用いた）A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達阻害は、H I F - 1 媒介性 C A 9 発現を減弱させ、（S L C - 0 1 1 1 又は F C 1 2 - 5 3 1 A を用いた）C A 9 阻害に対する腫瘍細胞の感受性を高める。

10

【発明を実施するための形態】

【0016】

特段の記載がない限り、本願明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって通常理解される意味と同じ意味を有する。本願明細書に記載される方法及び材料と類似又は等価のいずれの方法及び材料も本開示の実施又は試験において使用することができるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。

【0017】

癌

20

R e f - 1 の多機能性は、疾患、特に癌におけるその広範囲の役割を示唆する。R e f - 1 は癌において上方制御される（表1、図4）。この増加は、しばしば、腫瘍形成（腫瘍化）、癌の悪性度、血管新生の増加、放射線治療に対する抵抗性及び化学療法に対する抵抗性、並びに全体的な予後不良と関連付けされる。このため、R e f - 1 及び R e f - 1 が制御する転写因子は、抗癌治療についての第1標的となる。

【0018】

【表 1】

表1: Ref-1発現の増加をともなう腫瘍組織/細胞

Ref-1発現の増加をともなう癌	
前立腺癌	
膵臓癌	
子宮頸癌	10
卵巣癌	
骨肉腫	
胚細胞性腫瘍	
結腸癌/結腸直腸癌	
膀胱癌	
頭頸部癌	20
胃癌/胃食道癌	
神経外胚葉性腫瘍	
横紋筋肉腫	
膵胆管癌	
成人神経膠腫	
非小細胞肺癌	30
肝細胞癌	
多発性骨髄腫	
食道癌	
乳癌	
小児上衣腫	
黒色腫	40

【0019】

前立腺癌

Ref-1 過剰発現を呈するもっとも広く研究されている癌のうちの1つは、前立腺癌である。過剰発現は、免疫組織学的には、細胞質におけるRef-1についてポジの細胞染色のより高い百分率、及びRef-1核染色の強度の増大として見られる。

【0020】

前立腺癌におけるRef-1レドックスシグナル伝達の主要標的の1つはSTAT3であり、STAT3は前立腺癌において構成的に活性である。STAT3阻害は、前立腺癌細胞の成長を抑制する。逆に、STAT3活性化は、全生存率に悪影響を及ぼし、無再発

生存期間（RFS）を縮める。去勢抵抗性前立腺癌で亡くなった患者から採取した転移性試料の95%はpSTAT3について陽性であり、最も高い発現は骨転移試料で見られた。まとめて考えると、これは、前立腺癌の悪性度及び進行におけるpSTAT3の非常に重要な役割を支持する。

【0021】

STAT3の下流標的はサバイビンであり、その発現の増加も、前立腺癌の悪性度と関連付けられる。前立腺生検組織におけるサバイビンのmRNA発現レベルは、癌性組織における有意に高いサバイビン発現を示し、このことは、より高いグレードの癌及び高悪性の表現型と相関する。前立腺癌細胞株におけるサバイビンのsiRNAノックダウンは、細胞増殖を低下させ、アポトーシス誘導剤シスプラチンに対する化学療法感受性を高める。サバイビン発現の減少の効果はインビボにも広がる。siRNAサバイビンノックダウン細胞を皮下注射されたマウスは、対照と比較して有意に小さい腫瘍を呈する。

10

【0022】

興味深いことに、Ref-1レドックス特異的阻害剤APX3330及びAPX2009は、NF-κB活性に影響を及ぼすことにより、前立腺癌細胞においてサバイビンmRNAレベル及びタンパク質レベルを低下させた。これらの阻害剤は、細胞増殖も低下させた。インビボで、APX2009は、サバイビンタンパク質レベル及び細胞増殖を低下させた。

【0023】

このエビデンスに基づき、STAT3及びサバイビンの両方が、抗前立腺癌治療のための第1標的として見えてくる。しかしながら、これまでは、それらは、単剤治療としてはほとぼの成功を収めてきたにすぎない。それゆえ、Ref-1レドックス機能及びSTAT3／サバイビンの両方を阻害することという有望な組み合わせは、前立腺癌に不可欠な抗アポトーシス経路の包括的な制御因子及び下流エフェクターの両方を標的とする道を提供する。

20

【0024】

1つの好適な実施形態では、本開示は、前立腺癌を処置するための、APE1／Ref-1阻害剤（5-（2，3-ジメトキシ-6-メチル-1，4-ベンゾキノイル）-2-ノニル-2-プロペン酸（APX3330）、[（2E）-2-[(3-メトキシ-1，4-ジオキソ-1，4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N，N-ジエチルペンタンアミド]（APX2009）、（2E）-2-[(3-メトキシ-1，4-ジオキソ-1，4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]-N-メトキシペンタンアミド]（APX2014））と、STAT3阻害剤（例えば、ナバブカシン）との組み合わせに関する。別の実施形態では、前立腺癌を処置するための、APE1／Ref-1阻害剤とサバイビン阻害剤（例えば、YM155）との組み合わせが開示される。

30

【0025】

結腸癌

米国における癌関連死の2番目に多い原因である結腸癌は、細胞質内Ref-1のレベルの上昇を呈する。転移した結腸直腸癌の肝臓腫瘍組織において、Ref-1発現の増加は患者予後の低さに対応する。コロニー形成アッセイでは、siRNA Ref-1ノックダウンは、電離放射線照射（IR）に対する結腸癌細胞の感受性を有意に高める。さらには、インビボでの皮下異種移植片も、腫瘍組織内Ref-1 siRNA処置の後の腫瘍成長の低下及び放射線増感を示す。

40

【0026】

結腸癌におけるRef-1レドックスシグナル伝達の重要性は、Ref-1レドックス阻害剤APX3330が結腸癌幹細胞（CCSC）に及ぼす効果によって強調される。APX3330（以降、「APX」と呼ばれる）は、インビトロでCCSC成長を有意に低下させ、代謝拮抗性化学療法剤である5-フルオロウラシル（5-FU）の細胞毒性を増強する。CCSCを皮下注射された異種移植マウスにおいて、APX3330の腫瘍内投与は、腹腔内に送達された5-フルオロウラシル（5-FU）に対する腫瘍応答を高める

50

。これは、A P X 3 3 3 0 が R e f - 1 の非常に重要なレドックス活性を阻害することにより、他の結腸癌処置を増強するすることができるということを示す。

【0027】

加えて、以下に示すように、A P X 3 3 3 0 が、ミトコンドリア酵素ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (P D H) 及び α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (K D G H) を阻害することが知られているリポ酸類似体である C P I - 6 1 3 と組み合わせられた場合、結腸癌細胞において有意な死滅効果があった。

【0028】

1つの好適な実施形態では、本開示は、結腸癌を処置するための、A P E 1 / R e f - 1 阻害剤 (A P X 3 3 3 0、A P X 2 0 0 9 及び A P X 2 0 1 4) と、化学療法剤 (例えば、5 - F U) との組み合わせに関する。別の実施形態では、結腸癌を処置するための、A P E 1 / R e f - 1 阻害剤と P D H 及び / 又は K D G H の阻害剤 (例えば、C P I - 6 1 3) との組み合わせが開示される。

【0029】

卵巣癌

卵巣癌における R e f - 1 発現は広く研究されている。R e f - 1 発現は、悪性の患者組織試料において増加するが、この増加の場所に関して研究は様々である。

【0030】

いくつかの研究は、主に、細胞質における発現の増加を示す。それらの研究では、R e f - 1 の細胞質内の場所は、卵巣腫瘍進行と相関する。加えて、進行した (ステージ I I I / I V の) 癌を有する患者は、ステージ I / I I の患者よりも、有意に高い R e f - 1 発現及び有意に低い全生存率を有する。細胞質内 R e f - 1 が増加した患者は、白金製剤である化学療法剤に対してより抵抗性もある。別の研究は、R e f - 1 核発現の増加を認め、ここでもステージ I / I I の患者と比べてステージ I I I / I V の患者で増加は大きかった。他の研究では、核内 R e f - 1 発現及び細胞質内 R e f - 1 発現の両方が増加したが、R e f - 1 発現と癌ステージとの間で相関は見られなかった。まとめて考えると、これらの研究は、R e f - 1 発現は明らかに卵巣癌において役割を果たすが、組織試料の不均一性のために、R e f - 1 の役割が核内の場所におけるのか細胞質内の場所におけるのかを判別することは困難であるということを強調する。

【0031】

しかしながら、R e f - 1 の発現の低下は、卵巣癌細胞に対して明確な効果を有する。A 2 7 8 0 (核内 A P E 1) 細胞及び C P 7 0 (細胞質内 A P E 1) 細胞における R e f - 1 ノックダウンは、ともにシスプラチンへの感受性を高める。S K O V 3 細胞及び A 2 7 8 0 細胞では、R e f - 1 s i R N A は、細胞増殖、コロニー形成、遊走及び浸潤を有意に低下させる。同様に、S K O V - 3 x 卵巣細胞の R e f - 1 s i R N A 処置は、その成長を有意に低下させ、同じことが A P X 3 3 3 0 レドックス阻害によって起こる。マウスに皮下移植された R e f - 1 s i R N A 細胞は、対照腫瘍と比べて著しく低下した成長、つまり腫瘍倍加時間の 3. 2 倍増 (5 日間から 1 5 日間超へ) を示す。この腫瘍はグルコース代謝の低下も呈する。合わせて考えると、成長を阻害するため、及び他の抗癌剤の活性を増強するための手段として卵巣癌において R e f - 1 を標的とすることにつ

【0032】

非小細胞肺癌

R e f - 1 は、非小細胞性肺癌 (N S C L C) における予後マーカーと長らく考えられてきた。というのも、患者腫瘍試料において R e f - 1 タンパク質レベルは上方制御されるからである。組織試料における核内 R e f - 1 発現は、患者にとってよりよい生存の機会を提示する。細胞質内の R e f - 1 及び m R N A 発現は、患者生存の悪さ及びより短い R F S と強く相関する。免疫組織化学及び免疫プロットの両方が、ステージ I N S C L C が再発した患者において細胞質内 R e f - 1 発現の増加及び核内 R e f - 1 発現の減少を示す。処置後の血清 R e f - 1 レベルは、全生存と逆相関している。

【0033】

Ref-1は、NSCLCで一般に使用される白金系薬物に影響を及ぼす。NSCLCにおけるRef-1発現の増加はシスプラチン処置に対する抵抗性をもたらすが、A549癌細胞におけるRef-1 siRNAノックダウンは、シスプラチン細胞毒性を有意に増強する。Ref-1を発現しない腫瘍を有する患者は、白金-パクリタキセル療法及びシスプラチン-ドセタキセル-ゲムシタビン処置に対してより良好に応答し、進行及び全生存の時間がより長くなる。

【0034】

Ref-1を低下させることでNSCLCにおける他の抗癌処置の効力を高めるというエビデンスが存在する。インビトロ及びインビボにおいてA549細胞中でRef-1レベルを低下させると、光線力学療法の有効性を高める。shRNAによるRef-1ノックダウンは、A549細胞の増殖を阻害するアルカロイド化合物であるオキシマトリンの抗腫瘍活性を増強する。

10

【0035】

まとめて考えると、これは、Ref-1がNSCLC進行において極めて重要な役割を果たすということを実証し、これを標的とすることは、種々の化学療法的処置と組み合わせた場合に、より良好な患者予後につながるであろう。

【0036】

1つの実施形態では、本開示は、NSCLCを処置するためのAPE1/Ref-1阻害剤（例えば、APX3330、APX2009及びAPX2014）と、化学療法剤（例えば、パクリタキセル、シスプラチン、ドセタキセル、ゲムシタビン）との組み合わせに関する。別の実施形態では、NSCLCを処置するためのAPE1/Ref-1阻害剤と光線力学療法との組み合わせが開示される。

20

【0037】

悪性末梢神経鞘腫

悪性末梢神経鞘腫（MPNST）は、致死的になりうる、一般的ではない神経起源の癌である。これまでの多くの研究にもかかわらず、既存の化学療法剤は、MPNST処置において成功を収めていない。最近の研究は、Ref-1レドックス標的HIF-1α及び特にSTAT3を、MPNSTを進行させることに関与させている。

【0038】

30

リン酸化STAT3発現は、疾患発症段階で悪性の疾患を示唆しうる。組織マイクロアレイは、原発性MPNSTにおけるSTAT3発現が、より悪い疾患特異的な全生存及び無イベント生存（期間）と関連付けられるということを示した。EGFR過剰発現のマウスモデルでは、JAK/STAT3阻害剤及びshRNAによるSTAT3ノックダウンの両方が腫瘍形成を予防した。

【0039】

別の研究では、4つのMPNST株におけるSTAT3活性化の阻害は、癒傷、細胞遊走、浸潤、及び腫瘍形成の低下を生じた。このSTAT3活性化の阻害は、HIF-1α発現も低下させた。独立のshRNA媒介性HIF-1αノックダウンも癒傷、細胞遊走、浸潤、及び腫瘍形成を低下させ、これは、STAT3/HIF-1αシグナル伝達経路がMPNSTにおける腫瘍形成を担うことを示した。

40

【0040】

さらには、STAT3の下流標的サバイビンは、MPNSTにおいて増幅される。サバイビンは、MPNST組織試料において高く発現される。siRNAによるサバイビンノックダウンは、細胞成長を低下させ、細胞周期の進行を阻害し、アポトーシスを増加させる。加えて、サバイビン阻害剤YM155は、インビボで、MPNST異種移植成長及び転移を抑制する。

【0041】

MPNSTにおけるSTAT3-HIF-1α経路の役割は、MPNSTを処置するための有望な方法としてのSTAT3及び/又はHIF-1α阻害の考えを支持する。サバ

50

イビンのような下流マーカーも、有望な標的として見えてくる。R e f - 1 は S T A T 3 及び H I F - 1 α を制御する。それゆえ、R e f - 1 を標的にすることは、複数の標的を阻害することになり、M P N S T についての実行可能な処置に対する期待を提供することになる。加えて、R e f - 1 及び S T A T 3 又は H I F - 1 α のいずれかの二重標的化の可能性は、M P N S T 進行に不可欠である経路を完全に取り除くことの潜在力を示唆する。

【0042】

1つの実施形態では、本開示は、M P N S T を処置するための、A P E 1 / R e f - 1 阻害剤（例えば、A P X 3 3 3 0、A P X 2 0 0 9 及び A P X 2 0 1 4）と、S T A T 3 阻害剤（例えば、ナバブカシン）との組み合わせに関する。別の実施形態では、M P N S T を処置するための、A P E 1 / R e f - 1 阻害剤と H I F - 1 α との組み合わせが開示される。さらに別の実施形態では、本開示は、M P N S T を処置するための、A P E 1 / R e f - 1 阻害剤と、サバイビン阻害剤（例えば、Y M 1 5 5）との組み合わせに関する。

10

【0043】

白血病

白血病における R e f - 1 の役割に焦点を合わせた研究はほとんどない。これまで、唯一の公開された研究は、急性前骨髄球性白血病（A P L）における R e f - 1 の役割及び R e f - 1 と全トランスレチノイン酸（A T R A、又は R A）及びレチノイン酸受容体（R A R）転写因子との関係に集中している。R A R α は、レドックス依存的にその D N A 結合部位（R A R E）に結合する。研究は、R A R - R A R E 結合は A P X 3 3 3 0 を用いた R e f - 1 レドックス阻害を通してブロックされるということを明示する。加えて、A T R A に A P X 3 3 3 0 を添加すると、A P L 細胞のアポトーシス及び細胞分化が3倍増加する。これらの結果は、A T R A との併用治療において A P X 3 3 3 0 を使用することの潜在力を示す。これは、2つのこと、つまり第一に、A T R A が使用される、白血病についての新しい処置の組み合わせ、及び第二に、同様か又は増加した治療効果を維持しながらの A T R A 用量の減少を成し遂げうる。この後者の点は重要である。というのも、より少量の R A を用いて R A 誘導前骨髄球分化を増加させることができることによって、R A 分化症候群の毒性を回避することができるはずだからである。R A の用量を減らすことは重要な臨床的意味を有し、この治療法の望ましくない副作用のいくつか、例えば分化症候群を取り除くのに役立つであろう。

20

30

【0044】

最近の研究は、R e f - 1 が T 細胞急性リンパ芽球性白血病（T - A L L）において高く発現されるということを示す。レドックス特異的阻害剤 A P X 3 3 3 0 による R e f - 1 の遮断は、初代細胞、再発し化学療法耐性である細胞、及び T - A L L のマウスモデル由来の細胞を含めた白血病 T 細胞の生存能を強力に阻害する。白血病細胞のアポトーシスは生存促進性遺伝子の下方制御と関連付けられるが、R e f - 1 レドックス阻害はこの白血病細胞のアポトーシスを促す。これらのデータは、T 細胞 A L L での複数の転写プログラムの制御における R e f - 1 の役割を明示し、かつ R e f - 1 レドックス機能の崩壊は、高リスクの再発した白血病を含めた白血病 T 細胞を標的にするための効率的な戦略を代表するということを示唆する。

40

【0045】

最後に、T E T 2 変異を用いて前白血病の急性骨髄性白血病（A M L）細胞を末期の A M L に変換することを研究している研究者は、このプロセスにおける R e f - 1 の重大な役割を特定している。T e t 2 欠損幹細胞は、野生型対照と比べて一次レシピエント及び二次レシピエントの両方におけるより高い再増殖及び生着能力によって明らかにされおり、炎症性負荷に対する抵抗性を実証している。野生型対照は、ストレスを受けると、生着全体において著しい減退を示す。このプロセスは、N F - κ B 経路を呼び起こし、R e f - 1 がこの経路を制御する。A P X 3 3 3 0 は N F - κ B 機能をブロックし、これは、クローン性造血を持つ健康な個体でたびたび見られる A M L 関連のエピジェネティック

50

変異を保有するマウスにおいて、炎症を減少させ、前AMLからAMLそのものへの進行を逆転させる。これらのデータは、APX3330処置が、クローン性造血の徴候を示すTET2変異を保有する正常な個体、並びに急性骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患及び骨髄異形成症候群を有するTET2変異を持つ患者にとって臨床的に有益であろうということを示唆する。

【0046】

要約すれば、白血病におけるRef-1についての研究は固形腫瘍について実施された研究のあとをついて行っているが、最近の研究は、それらの研究された白血病におけるRef-1レドックスシグナル伝達の重要な役割及びAPX3330の有効性を明らかにしつつある。

10

【0047】

1つの実施形態では、本開示は、T-ALLを処置するための、APE1/Ref-1阻害剤（例えば、APX3330、APX2009及びAPX2014）と、NF-κB阻害剤（例えば、ナバブカシン）との組み合わせに関する。いくつかの特定の実施形態では、処置対象の患者は、クローン性造血の徴候を示すTET2変異を保有している。

【0048】

いくつかの実施形態では、APE1/Ref-1阻害剤（例えば、APX3330、APX2009及びAPX2014）と、NF-κB阻害剤との組み合わせは、急性骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患又は骨髄異形成症候群をも有するTET2変異を持つ患者を処置するために使用することができる。

20

【0049】

網膜疾患

Ref-1のレベルの上昇は癌に限定されない（図4）。高められたRef-1は、加齢性白内障において示唆されてきた。Ref-1レベルは、対照よりも、患者の水晶体上皮細胞においてより高く、不透明度が悪くなるほどRef-1レベルは下がる。

【0050】

Ref-1は、発育中のマウスの網膜、並びに網膜色素上皮（RPE）細胞、網膜周皮細胞、脈絡膜内皮細胞（CEC）及び網膜血管内皮細胞（RVEC）において高く発現される。Ref-1阻害剤APX3330を使用することは、Ref-1レドックス活性がインビトロでRVEC増殖、遊走及び血管新生のために必要とされるということを示す。同様に、APX3330処置は、インビトロにおいて、霊長類細胞でCECにおける増殖、遊走及び血管新生を低下させ、そしてベバシズマブと組み合わせられた場合に付加的効果を有していた。酸化された低密度リポタンパク質（oxLDL）を使用してストレスを受けたRPEは、APXによって増殖減退及び老化から助け出された。

30

【0051】

成人のヒトRPE細胞株では、APX3330は、血管新生における炎症と関連付けられる主要な要因であるNF-κBの転写活性を低下させた。APX3330は、HIF-1αの活性化もブロックし、その下流標的VEGFの発現を低下させた。NF-κB及びHIF-1αを介したVEGF発現は、血管新生を伴う加齢性黄斑変性症（AMD）、これは滲出型AMDとしても知られる、の特徴である脈絡膜新生血管（CNV）を主に担う。

40

【0052】

超低密度リポタンパク質受容体（VLDLR）ノックアウトマウスがAPXの単回の硝子体注射で処置されると、CNVが減少する。APX3330は、レーザー誘導CNVを有するマウスにおいても抗血管新生効果を示す。

【0053】

血管新生は、未熟児網膜症（ROP）及び糖尿病性網膜症（DR）を含めた他の網膜疾患の主要要素でもある。血管新生を調節するためのRef-1のレドックス能により、血管新生は、それらの疾患において研究する価値があるものになっている。興味深いことに、HIF-1α及びVEGFの両方がROP及びDRにおいて増加する。ROP及びDR

50

のマーカーである網膜血管新生は、H I F - 1 α 又は V E G F を標的とする s i R N A で処置されると、虚血性網膜症を持つマウスにおいて著しく低下した。

【0054】

しかしながら、H I F - 1 α についての、新薬開発につながるような標的を創出する困難さが論じられてきた。加えて、眼球の抗 V E G F 治療は常に有効であるとは限らず、望まれない副作用につながる可能性がある。R e f - 1 のレドックス活性を阻害することは、滲出型 A M D、R O P 及び D R のような網膜疾患において H I F - 1 α 及び V E G F を調節することができる、より有効な独立の処置又は補助的処置であると思われる可能性がある。

【0055】

他の疾患

R e f - 1 は、いくつかの他の疾患において役割を果たすことも示されている。心血管疾患及び血圧の制御における R e f - 1 の関与は、R e f - 1 発現レベルの増加を示す大動脈縮窄誘導過敏性ラットモデルによって説明される。さらには、ヘテロ接合 R e f - 1 + / - マウスは高血圧及び弱まった内皮依存性血管弛緩を呈する。R e f - 1 は、自殺的なオートインテグレーション (a u t o i n t e g r a t i o n) を阻害することにより H I V 病変形成に関与するタンパク質の S E T 複合体の一部である。この結果、R e f - 1 をノックダウンすることは H I V 感染を阻害する。

【0056】

R e f - 1 は、ヘリコバクター・ピロリ (ピロリ菌) 感染に対する胃細胞応答にも示唆されている。R e f - 1 発現レベルは、ヒトの胃の上皮細胞においてピロリ菌感染後に上昇する。ピロリ菌誘導 R O S 及び下流の活性化された遺伝子は、R e f - 1 欠損細胞においては対照と比べて高く、R e f - 1 過剰発現はこれらの効果を逆転させる。加えて、R e f - 1 s i R N A ノックダウンは、胃上皮細胞においてピロリ菌及び T N F - α に誘導される A P - 1 及び N F - K B D N A 結合、並びに I L - 8 m R N A 発現及びタンパク質分泌を阻害した。まとめて考えると、このことは、胃の炎症性障害及び敗血症において R e f - 1 を示唆する。

【0057】

別の特に興味を引く領域は、神経変性疾患 (N D) である。アルツハイマー病 (A D)、パーキンソン病 (P D)、筋萎縮性側索硬化症 (A L S) 及び脳虚血等の N D は、すべて A P E 1 / R e f - 1 機能障害によって影響を受ける。

【0058】

R e f - 1 タンパク質レベルは、A D 患者の中前頭皮質及び大脳皮質由来の核エキスでは、対照と比べて上昇し、R e f - 1 レドックス活性は、増加した酸化的ストレスに対する代償機構と見られる。しかしながら、A D 患者の末梢血単核球では A P E 1 エンドヌクレアーゼ活性の低下が見られ、これは、塩基除去修復 (B E R) の悪化を示唆する。これは、R e f - 1 が特定の疾患内で有することができる異なる役割を強調する。同様に、上昇した酸化的ストレス及び D N A 損傷を呈する疾患である A L S の患者の中樞神経系において R e f - 1 レベルは上昇する。P D では、遺伝子変異体を介した R e f - 1 機能の喪失は、それが、後根神経節 (D R G) ニューロンの喪失につながる増加した酸化的ストレスに寄与する危険因子であるということを示唆する。ロテノン及び M P P ⁺ (1 - メチル - 4 - フェニルピリジニウム) はともに P D モデルを模擬するために使用されるが、このロテノン及び M P P ⁺ (1 - メチル - 4 - フェニルピリジニウム) で処置された細胞において、R e f - 1 は上方制御される。R e f - 1 の上方制御はこれらの細胞においてニューロン死から保護する。

【0059】

脳虚血後、R e f - 1 の上方制御は、海馬神経細胞を細胞減少及び D N A 断片化から保護する。逆に、D N A 修復を失った R e f - 1 を有する遺伝子導入ラットは、虚血傷害から保護されない。R e f - 1 コンディショナルノックアウトマウスは、より大きい梗塞量 (i n f r a c t v o l u m e) 及び脳虚血後の空間機能及び認知機能の回復の減少を

10

20

30

40

50

呈する。

【0060】

これらの知見は、R e f - 1 によって影響を受ける幅広い範囲の疾患を強調し、このことは、R e f - 1 が多くの疾患を処置及び管理するための有望な標的であることを示唆する。

【0061】

併用治療剤

さらに、これらの知見は、これらの第2治療剤との併用治療剤における、A P X 3 3 3 0 及び A P X 2 0 0 9 等の R e f - 1 特異的阻害剤の使用を支持する。具体的には、A P X 3 3 3 0 及び／又は A P X 2 0 0 9 は、S T A T 3、H I F 1 α 、C A 9、V E G F、N F κ B、J A K 2、B c l - 2、P T E N、W N T / β - カテニン、エンドスタチンの阻害剤、5 - フルオロウラシル (5 - F U)、及び光線力学療法 (P D T) など、並びにこれらの組み合わせと組み合わせることができる。より具体的には、例示的な組み合わせとしては、表2及び表3に記載されたものから選択される第2治療剤のうちの1以上を伴う A P X 3 3 3 0 及び／又は A P X 2 0 0 9 が挙げられる。

【0062】

【表2】

表2

ボルテゾミブ	メシル酸イスピネシブ
SN-38	トポテカン
パクリタキセル	ブリオスタチン1
トラメチニブ	LAQ824
ビンブラスチン	BEZ235
パノビノスタット	メトトレキサート
テムシロリムス	FK866
アフアチニブ	トザセルチブ
イリノテカン	GSK2126458

【0063】

本開示の併用治療剤において使用するための上記 R e f - 1 阻害剤（例えば、A P X 3 3 3 0）及び第2治療剤の好適な投薬量は、例えば、個体の年齢及び体重、処置を必要とする少なくとも1つの正確な癌／疾患、疾患の重症度、組み合わせられるべき具体的な R e f - 1 阻害剤及び／又は第2治療剤、組成物の性質、投与経路並びにこれらの組み合わせを含めたいくつかの因子に依存することになる。最終的に、好適な投薬量は、例えば、医師、獣医、科学者、及び他の医療の専門家及び研究の専門家等の当業者によって容易に決定されうる。例えば、当業者は、低投薬量で開始して、これを、所望の処置予後又は結果に到達するまで増やすことができる。あるいは、当業者は、高投薬量で開始して、これを、所望の処置予後又は結果を成し遂げるために必要な最少投薬量に到達するまで減らすことができる。

【0064】

加えて、いくつかの好適な実施形態では、当該併用治療剤は、薬学的に許容できる担体、例えば、賦形剤、ビヒクル、希釈剤、及びこれらの組み合わせを含むことができる。例

えば、当該併用治療剤が経口投与されることになる場合には、当該併用治療剤は錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、若しくはシロップとして処方されてもよく、又は非経口投与のためには、当該併用治療剤は、注射剤（筋肉内、皮下、髄内、髄腔内、心室内、静脈内、硝子体内）、点滴調剤、又は座薬として処方されてもよい。これらの組成物は、従来の手段によって調製することができ、所望に応じて、上記活性化化合物（すなわち、APX3330及び第2治療剤）は、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味剤、溶解補助剤、懸濁補助剤、乳化剤、コーティング剤、又はこれらの組み合わせ等のいずれの従来の添加剤と混合されてもよい。

【0065】

本開示のRef-1阻害剤及び第2治療剤並びに／又は医薬担体を含む併用治療剤は、必要としている個体のサブセットに投与することができる。1つの実施形態では、本願明細書で使用する場合、「必要としている個体」は、癌、特に表1に記載されている前立腺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、骨肉腫、結腸癌、膀胱癌、膵臓癌、神経膠腫等のリスクにあるか、又はそれらの癌を有している個体を指す。他の実施形態では、「必要としている個体」は、網膜疾患（例えば、脈絡膜新生血管（CNV）、加齢性黄斑変性症（AMD）、未熟児網膜症（ROP）、糖尿病性網膜症（DR））のリスクにあるか、又はこれらの網膜疾患を有している個体を指す。さらに他の実施形態では、「必要としている個体」は、心血管疾患、細菌性感染症、胃の炎症性障害、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、脳虚血）のリスクにあるか、又はそれらの疾患を有している個体を指す。加えて、「必要としている個体」は、本願明細書で、これらの疾患及び／又は障害のうちのいずれか1つのリスクにあるか、又は医療専門家によってこれらの疾患及び／又は障害のうちのいずれか1つを有していると診断された個体を指すためにも使用される。従って、いくつかの実施形態では、本願明細書に開示される方法は、母集団のサブセットに向けられ、その結果、これらの実施形態において、母集団のすべてが当該方法から利益を受けるわけではない可能性がある。上記のことに基づき、本開示の方法実施形態のうちのいくつかは、特定された個体の特定のサブセット又はサブクラス（つまり、本明細書に注記される1以上の具体的な状態に対処することにおいて援助を「必要としている」個体のサブセット又はサブクラス）に向けられるので、すべての個体が本願明細書に記載される個体のサブセット又はサブクラスの中に入るとは限らない。特に、上記必要としている個体はヒトである。例えば、この必要としている個体は、例えば非ヒト霊長類、マウス、ラット、ウサギ、乳牛、ブタ、及び当業者に公知の他の種類の研究用動物等の研究用動物であってもよい。

【0066】

コンビナトリアル薬物アプローチのための追加的経路の特定

分子治療の限定的な成功における提案された要因は、腫瘍試料、とりわけ膵腫瘍又は神経膠芽腫等の悪性の腫瘍試料において見られる不均一性である。これは、複数の経路に影響を及ぼすことができる中心的な（節点となる）タンパク質、例えばRef-1を標的とする戦略の必要性を明確に示す。Ref-1を含む新規な標的及び合理的に設計された併用治療剤の評価が、相関性バイオマーカー研究を含めて、癌において非常に重要である。なぜなら、一部の癌患者のための治療法の選択肢は限られたままになっているからである。

【0067】

化学療法剤の高められた致死的なペアを解明するために、2つの包括的アプローチが利用される。それらには、化合物の作用機序に基づく合理的な仮説主導の組み合わせ、並びに組み合わせで使用すると癌細胞を脆弱にしうる特定の遺伝子発現プロファイル又はプロテオミクスシグネチャーを明らかにする「ビッグデータ」の応用が含まれる。本明細書では、上昇した致死率をもたらすRef-1調節を引き起こす併用治療剤に注目する。

【0068】

多くの研究は、Ref-1阻害と組み合わせたDNA傷害剤の相乗作用を調べてきた。おそらくは、これらの研究における相乗作用の支配的な機構は、Ref-1のDNA修復

機能の遮断に起因しており、この遮断は、細胞を化学療法剤によって引き起こされるDNA損傷に応答することができないようにする。本明細書中以降、Ref-1レドックス機能の阻害又はRef-1 siRNAを用いた処置（表3）の公開された研究が論じられる。

【0069】

癌細胞における公知の機能に基づいて治療薬をRef-1とペアにすること

第一に、仮説主導のアプローチを使用して、Ref-1阻害剤と組み合わせた化学療法剤を試験して、増加した致死率についてスクリーニングする。このアプローチは、腫瘍細胞生存についてRef-1機能と相互作用するかRef-1機能に依存する別の鍵となる経路と合わせて、同時にRef-1シグナル伝達に作用することを伴う。この2つの組み合わせは、単独で投与された場合のそれらの効果と比べて、上昇した致死率、劇的に高められた細胞死を作り出すはずである。

【0070】

【表3】

表3

分子標的/Ref-1とペアにされる治療剤	影響を受ける経路	モデル系
ドキソルビシン	低酸素 / ABCトランスポーター発現	結腸癌
STAT3	生存能 / 遊走	PDAC
アバスタチン	血管新生	網膜症
DNA損傷(シスプラチン) / Bcl-2阻害剤	増殖 / 遊走 / アポトーシス	NSCLC
白金製剤 (シスプラチン/オキサリプラチン/カルボプラチン)	感覚神経の血管拡張作用の減弱	化学療法剤誘発ニューロパチー
CA9	低酸素	PDAC
WNT/ β -カテニン	ROS / 増殖	PDAC
エンドスタチン	血管新生	骨肉腫
5-FU	増殖/腫瘍成長	結腸癌
CPI-613	エネルギー産生経路; ミトコンドリア代謝 経路	結腸癌及び膵臓癌
Notch3 (γ -セクレターゼ阻害剤, DLL4抑制抗体)	Notchシグナル伝達経路 — 細胞生存, 増殖, 分化, 発育, 恒常性維持	膵臓癌
レチノイン酸	分化	前骨髄球性白血病
光線力学療法 (PDT)	増殖 / TFAM (転写因子 A, ミトコンドリア) 結合	NSCLC

【0071】

このアプローチを使用して、Ref-1シグナル伝達と組み合わせてSTAT3シグナル伝達に作用することが、膵臓癌細胞株の生存率及び遊走能に劇的に影響を及ぼすということが見いだされた（図3）。

【0072】

異なる癌のいくつかの研究は、低酸素症又は血管新生等の腫瘍促進プロセスにおけるRef-1の阻害を伴う併用治療剤が有効であるという考えを支持する。低酸素症及び血管新生によって特徴づけられる骨肉腫モデルでは、エンドスタチンと組み合わせたRef-

1 の阻害は V E G F 発現及び微小血管密度の低下を伴いインビボ効力を実証する。

【0073】

R e f - 1 及び低酸素を伴う別の高められた致死的なペアは、R e f - 1 阻害と H I F - 1 α 標的 C A 9 の阻害との組み合わせである。脾臓三次元共培養モデルを使用すると、R e f - 1 及び C A 9 を用いた二重標的化（図 2）の後に腫瘍スフェロイド面積が減少する。増強の機構は、同時の C A 9 及び R e f - 1 の遮断によって持続される p H の上昇並びに低酸素条件に適応する能力が腫瘍において遮断されることに起因すると考えられる。

【0074】

最後に、ドキソルビシン感受性結腸癌細胞とドキソルビシン耐性結腸癌細胞とを比較する研究は、低酸素が P g p（P-糖タンパク質）及び B C R P（乳癌抵抗性タンパク質）の発現を増強すること、並びに低酸素条件下でドキソルビシンに A P X 3 3 3 0 を添加することは、H I F 活性を有意に減弱することができ、P g p 及び B C R P の上方制御をブロックすることができるということを明示する。P g p 及び B C R P 発現のこの減少は、とりわけ親細胞において、観察されたドキソルビシン蓄積の増加に役割を果たす可能性がある。これらの結果は、R e f - 1 のレドックス機能の遮断が H I F シグナル伝達を遮断すると、ドキソルビシンに対する結腸癌細胞の応答が増強される可能性があるということを示唆する。

【0075】

最近の研究は、A T - 1 0 1（ゴシポール）をシスプラチンと逐次的に使用することにより、シスプラチンに対する N S C L C 細胞株の感受性を高めようとした。A T - 1 0 1 は、多くの様式で抗腫瘍性効果を奏する。A T - 1 0 1 は、B H 3 模倣物であり、R e f - 1 の D N A 修復及びレドックス活性を阻害することも示されている。S T A T 3 活性の R e f - 1 のレドックス阻害を通しての抗アポトーシス性タンパク質 B c l - 2 及び B c l - X L の遮断は、この組み合わせで見られる増強された細胞死滅及び腫瘍成長に寄与する。さらには、N S C L C 細胞株 A 5 4 9 では、A P E 1 発現の s i R N A 阻害は、シスプラチンに対する A 5 4 9 細胞の感受性を有意に高め、細胞アポトーシスを増加させた。これらの研究の両方が、R e f - 1 機能を、シスプラチンに対する細胞の応答において、とりわけ S T A T 3 を通してのアポトーシスシグナル伝達において非常に重要であると指摘する。

【0076】

対照的に、A P E 1 修復又は R e f - 1 レドックス活性のいずれかの阻害剤と組み合わせたシスプラチンに曝露された乳癌細胞株における最近の研究では、シスプラチン耐性が上昇した。それらの結果が、R e f - 1 が同時に阻害されるときシスプラチンに対するより大きい応答を明示する他の研究と異なる理由を、ミスマッチ修復タンパク質（M S H 2、M S H 6、M L H 1、及び E R C C 1）の同時の下方制御が説明する可能性があることと著者らは推測する。テーラーメイド医療を追求して、これらの前臨床研究は、化学療法後の細胞特異的シグナル伝達及び D N A 傷害剤の後に起こる D N A 修復経路間のクロストークを解明することの重要性を明示する。シスプラチンレジメンへの R e f - 1 阻害剤の追加を考慮することなど新しい処置の組み合わせが提案されるときには、これらの要因は考慮される必要があるだろう。

【0077】

最後に、A P X 3 3 3 0 を介した R e f - 1 阻害及び R e f - 1 の s i R N A ノックダウンはともに、脾臓癌細胞において β -カテニンを上方制御する。W N T / β -カテニン阻害剤である I W R - 1 が A P X とペアにされるとき、増強された細胞毒性が起こった。

【0078】

これらの研究は、癌生存経路の見かけ上「離れた走路」がどのように交差することができるか、それらの交差点がどのように R e f - 1 を伴うか、そしてこれらの交差点から生じる非常に興味を惹く治療可能性を示す。

【0079】

R e f - 1 を伴う併用治療剤を予測するためのビッグデータのマイニング

新しい処置選択肢を見出すための第2の選択肢は、TCGA (The Cancer Genome Atlas) 及びCCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) 等の公的に入手可能なデータセットをマイニングして、癌処置の状況において利用するための有効な併用治療を(コンピューター上で)解明することである。ゴールは、特に処置の選択肢がほとんどない悪性の癌について、増加しているようである致命的な標的の選択を加速することである。

【0080】

例えば、歴史的には膀胱癌において、新しい標的薬は標準治療薬、ゲムシタビンとペアにされたであろう。しかし、複数の癌関連経路の選択的な阻害剤をゲムシタビンに添加することは、生存を有意に延ばさず、統計的に有意であるが、5年生存率を延ばすこともしなかった。現在のオミクスの時代では、ショットガンアプローチではなく、「ビッグデータ」を、増加した致死率及び有効な薬物組み合わせを予測するために使用することができる。

10

【0081】

HeLa細胞におけるRef-1ノックダウン後の転写プロファイリング及びプロテオミクスプロファイリングを組み合わせた研究は、Ref-1調節後に差別的に発現されるいくつかの経路を明らかにする。これらの経路としては、DNA損傷、ミトコンドリア機能、及び微小管安定化が挙げられる。Ref-1ノックダウン後のDNA修復タンパク質の下方制御は、DNA傷害剤へのRef-1阻害剤の添加が癌細胞にとって有害であるということの別の立証である。

20

【0082】

上述の研究は、ミトコンドリア機能における下方制御も明示する。ミトコンドリアは、Ref-1調節後の細胞の疾患又は健康の重要な指標として浮かび出てくる。それゆえ、抗アポトーシスの機構を標的とする薬物は、Ref-1阻害と組み合わせられると、有効である可能性がある。このような薬物としては、Bcl-2阻害剤又はYM-155(サバイビン阻害剤)が挙げられよう。最後に、上記プロテオミクスの研究は、Ref-1阻害が増加した致死率として有用である可能性がある別の領域を示唆する。Ref-1発現の欠如は、アクチン等の微小管安定化タンパク質に影響を及ぼし、線維の適正な組織化を妨げる。ドセタキセル、パクリタキセル、及びビンブラスチンを含めたいくつかの一般に使用される化学療法剤は微小管動力学を混乱させる。それゆえ、これらの薬剤は、Ref-1阻害とペアにすることができるという明るい見通しを示す。

30

【0083】

Ref-1 DNA修復及びCIPN;レドックス機能を変えることによる間接的な連結

化学療法剤誘発末梢ニューロパチー(CIPN)は、抗癌治療の最も高頻度に見られる用量制限毒性の1つである。癌患者の90%までが、抗癌処置の間又は抗癌処置の後のどこかの時点で化学療法剤誘発末梢ニューロパチー(CIPN)を経験する。実際、6つの最も一般的な悪性腫瘍に対して使用される抗癌剤は、CIPNに対する実質的なリスクをもたらす。これらの薬物としては、限定はされないが、白金剤、タキサン類、ビンカルカロイド類、プロテアソーム阻害剤、免疫刺激剤及びさらに新しくは、標的治療薬が挙げられる。目下のところ、CIPNを予防又は処置するための承認された処置はなく、従って、神経毒性は、一部の患者にとっては用量を制限するものとなりうる。白金薬物、特にシスプラチン及びオキサリプラチンは、小児及び成人の癌に対する多くの標準治療処置(SOC)レジメンの重要な成分である。例えば、オキサリプラチンは、FOLFIRINOX及びFOLFOXプロトコルの一部である。

40

【0084】

CIPNは、処置が完了した後も持続する可能性がある。癌患者の40%までが、処置が終わった後5年CIPNと格闘し続け、10%が20年を超えた後も症候を示したままとなる。従って、CIPNは、癌サバイバーシップ、生活の質に直接影響を及ぼし、癌が再発した場合に将来の処置の選択肢を限定する可能性がある。

50

【0085】

培養した感覚神経の実験モデルを使用した以前の研究では、C I P NとD N Aの損傷及び修復との間に因果関係が確立された。A P E 1の発現を低下させることによりD N A塩基除去修復（B E R）経路の活性を低下させることで、抗癌処置によって生み出される神経毒性が増加し、他方、A P E 1の活性を増大させることで、その神経毒性が低下することが実証された。加えて、A P E 1のレドックスシグナル伝達機能ではなくてA P E 1のD N A修復機能が感覚神経の生存及び機能にとって非常に重要であることが実証された。小分子レドックス阻害剤A P X 3 3 3 0が電離放射線（I R）、シスプラチン、及びオキサリプラチンによって引き起こされる酸化的D N A損傷から感覚神経を保護するということがさらに実証された（図5）。

10

【0086】

これは疑問を投げかける。R e f - 1レドックス特異的阻害剤はD N A修復活性にどのように影響を及ぼすのか？と。A P X 3 3 3 0はA P E 1 / R e f - 1のレドックス機能の標的阻害剤であるが、感覚神経の状況では、A P X 3 3 3 0はこのタンパク質のD N A修復（A Pエンドヌクレアーゼ）活性も増強することができるように思われる（図6）。これは直観に反したように思われるが、A P X 3 3 3 0は、上記タンパク質を経時的にほどこせる（アンフォールドの状態にする）。このアンフォールディングは、第一にA P E 1 / R e f - 1のアミノ末端を変えて、そのタンパク質のフォールド / アンフォールドの状態の平衡を攪乱させ、修復活性を促進することにより、そのタンパク質と下流の転写因子標的との相互作用に影響を及ぼす。R e f - 1レドックス活性からのA P E 1のこの離脱は、A P E 1修復エンドヌクレアーゼ活性を増強しうる。単離された感覚神経がA P X 3 3 3 0に曝露されると、R e f - 1エンドヌクレアーゼ活性の濃度依存的な増加が起こるが、これは腫瘍細胞では認められない。本願明細書で論じられるように、A P X 3 3 3 0は、電離I R、シスプラチン及びオキサリプラチン等の剤によって誘発されるD N A損傷及び活性酸素種（R O S）産生から感覚神経を保護するということが見出された。

20

【0087】

神経毒性に対するあらゆる推定上の治療薬の非常に重要な特性は、投与された処置（1種又は複数種）の抗癌機能を損なわないということである。重要なことには、A P X 3 3 3 0によるD N A修復活性の増強は、有糸分裂細胞では認められなかった。A P X 3 3 3 0が、腫瘍細胞株、患者由来の細胞株、及び動物モデルにおける腫瘍の成長及び／又は生存に悪影響を及ぼすということが示された。それゆえ、A P X 3 3 3 0は、腫瘍細胞に対する抗癌剤の効果を变えることなく、分裂終了細胞を保護することができるであろうという可能性がある（図6）。加えて、A P X 3 3 3 0は、インビボでシスプラチン又はオキサリプラチンの腫瘍死滅効力に影響を及ぼさず、その上、A P X 3 3 3 0は、酸化的D N A損傷からD R Gニューロンを保護する。さらなるトランスレーショナルリサーチがさらにこれらの知見を裏付けると、A P X 3 3 3 0は、酸化的D N A損傷のB E R修復を促進し感覚神経を保護する、ヒトにおける神経防護作用機構として提案されうる。健康な細胞では、A P E 1 / R e f - 1のレドックス機能ではなく、D N A修復機能が感覚神経の生存 / 機能のために必要であるように思われる。そのことは腫瘍細胞とは反対である。まとめて考えると、これらのデータは、A P X 3 3 3 0が、処置を損なうことなく癌治療に対して神経防護作用を有することができるという考えを支持する。

30

40

【実施例】

【0088】

実施例 1

いくつかの研究がA P E 1によって制御される遺伝子、及び具体的にはそのレドックスシグナル伝達機能を検討しているが、A P E 1によって制御される遺伝子の包括的なリストを作成することは困難であることが明らかになっている。というのも、A P E 1は細胞生存能にとって必須であるからである。特に、マウスにおけるA P E 1ノックアウトは、着床後5日齢～9日齢の間に胚性致死をもたらす。従って、安定なA P E 1ノックアウト細胞株を生成することはこれまでに可能ではない。

50

【0089】

このジレンマを回避するためのアプローチは、コンディショナルノックアウト及びs iRNAノックダウンを利用してきた。s iRNAによるA P E 1ノックダウンは有用であるが、このアプローチは不均一な母集団を生み出し、異なる量のA P E 1タンパク質を持つ細胞を生じる。加えて、s iRNAノックダウンは一過性であり、A P E 1発現は経時的に回復する。この結果、混合母集団でA P E 1 s iRNAを使用して得られる情報の量には限界がある可能性がある。

【0090】

この問題に対処して、A P E 1によって制御される有望な多くのエフェクターに対する変化をより正確に検出するために、この実施例では、単細胞RNA配列決定（s cRNA-seq）を利用して、以前はA P E 1に結び付けられていなかった新しい経路を特定する。

10

【0091】

方法

細胞培養

P a 0 3 C、P a 0 2 C、P a n c 1 0 . 0 5及びP a n c 1 9 8（P a 2 0 C）をジョンズ・ホプキンス大学（The Johns Hopkins University）のAnirban Maitra博士から得た。すべての細胞を37℃で5%CO₂の中で維持し、10%血清（Hyclone；ローガン（Logan）、ユタ州）を伴うDMEM（インビトロジェン（Invitrogen）；カールスバッド（Carlsbad）、カリフォルニア州）の中で成長させた。細胞株の同一性は、種についてのDNAフィンガープリント分析（IDEXX BioResearch、コロンビア（Columbia）、ミズーリ州）及びベースライン短鎖縦列反復配列分析試験によって確認した。すべての細胞株は、100%ヒトであり、9マーカー短鎖縦列反復配列分析が記録されている。それらは、Mycoplasma（マイコプラズマ）を含まないことも確認した。

20

【0092】

A P E 1及びスクランブルs iRNAを用いた形質移入

使用したs iRNAは、スクランブル（Scrambled：SCR）（5' CCAUGAGGUCAGCAUGGUCUG 3'、5' GACCAUGCUGACCUCAUGGAA 3'）（配列番号1）及びs iA P E 1（5' GUCUGGUACGACUGGAGUACC 3'（配列番号2）、5' UACUCCAGUCGUACCA GACCU 3'）（配列番号3）であった。すべてのs iRNAトランスフェクションを、6穴プレートの1ウェルあたり1×10⁵細胞をプレーティングし、その細胞を一晩接着させることにより実施した。翌日、リポフェクタミンRNAiMAX試薬（インビトロジェン（Invitrogen）、カールスバッド（Carlsbad）、カリフォルニア州）を使用して、製造業者が示したプロトコルに従って10～50nMの濃度でA P E 1及びSCR s iRNAの中でトランスフェクトした。Opti-MEM、s iRNA、及びリポフェクタミンをその細胞に16時間残し、次いで10%血清を伴う通常のDMEM培地を添加した。トランスフェクション（形質移入）の3日後に細胞をRNA及びタンパク質の発現についてアッセイした。

30

40

【0093】

ウェスタンブロット解析

細胞可溶化物全体に対して、細胞を回収し、RIP A緩衝液（サンタクルーズバイオテクノロジー（Santa Cruz Biotechnology）、サンタクルーズ（Santa Cruz）、カリフォルニア州）に溶解し、タンパク質を定量し、電気泳動にかけた。以下の抗体を使用して免疫ブロットを実施した：A P E 1（Novus Biologicals、リトルトン（Littleton）、コロラド州）及びピンキュリン（シグマ（Sigma）、セントルイス（St. Louis）、ミズーリ州）。qRT-PCR実験については、さらなる分析について考慮されるために、A P E 1発現はスクランブル対照と比べて少なくとも80%減少させた。

50

【0094】

単細胞RNA配列決定

形質移入から3日後、SCR/siAPE1細胞を採取し、96穴マイクロ流体C1フリーダイム(Fluidigm)アレイ(フリーダイム(Fluidigm)、サウスサンフランシスコ(South San Francisco)、カリフォルニア州、米国)にロードした。すべてのチャンバーを視覚的に評価し、死細胞又は複数の細胞を含有するすべてのチャンバーを排除した。SMARTerシステム(クロンテック(Clontech)、マウンテンビュー(Mountain View)、カリフォルニア州)を使用して、捕捉した単細胞からcDNAを生成した。ds cDNAの量及び質を、高感度DNAチップ(High Sensitivity DNA Chip)とともにアジレントバイオアナライザー(Agilent Bioanalyzer)(アジレントテクノロジー(Agilent Technologies)、サンタクララ(Santa Clara)、カリフォルニア州、米国)を使用して評価した。全部で48のSCR及び48のsiAPE1細胞を配列決定のために選んだ。Purdue Genomics Facilityが、Nexteraキット(イルミナ(Illumina)、サンディエゴ(San Diego)、カリフォルニア州)を使用してライブラリーを準備した。ストランドネスを特定しない(unstranded)2×100bpのリードを、HiSeq2500を使用して、ラピッドランモードにて1レーンで配列決定した。RNA-seqデータは、未決定の受入番号を通して、遺伝子発現オムニバス(Gene Expression Omnibus: GEO)で入手可能である。

10

20

【0095】

バイオインフォマティクス及び統計解析

リードクオリティ(read quality)をFastQCバージョン0.11.2を使用して観察し、その後、FastX-Toolkitバージョン0.0.13.2を使用してクオリティトリミング(quality trimming)を実施した。30のFastXトリムスコア(trim score)及び50のトリム長を使用した。Tophat2を使用して、トリミングしたリードをヒトゲノムと配列比較した(ENSEMBLバージョンGrCh38, p7)。1つのミスマッチを許容した。HTSeqバージョン0.6.1のhtseq-countスクリプトを実行して、各遺伝子に位置するリードの数をカウントした。この分析では、HTSeqは、Biopythonバージョン2.7.3を使用した。どの遺伝子が差別的に発現されたかを決定するために、RパッケージBPSCを使用した。これは、単細胞RNA-seqデータを解析するために特に設計されている。Ingenuity Pathway Analysisを利用して、ネットワーク分析を実施した(IPA、キアゲン(QIAGEN)、レッドウッドシティ(Redwood City)、www.qiagen.com/ingenuity)。IPAを使用して、上流制御因子分析(upstream regulator analysis)、標準経路分析(canonical pathway analysis)、機械的ネットワーク分析(mechanistic networks analysis)、因果ネットワーク分析(causal network analysis)、及び下流効果分析(downstream effects analysis)を実施した(p値<0.05について、結果を有意とみなした)。各タイプのネットワーク分析のアルゴリズム及び詳細は、Kramer, A. ら、Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis、Bioinformatics、2014年、30(4):523-30頁に提示されている。

30

40

【0096】

qRT-PCR反応

qRT-PCRを使用して、上記scRNA-seq分析から特定した種々の遺伝子のmRNA発現レベルを測定した。形質移入後、Qiagen RNeasy Miniキット(キアゲン(Qiagen)、バレンシア(Valencia)、カリフォルニア州

50

）を製造業者の使用説明書に従って使用して、全RNAを細胞から抽出した。ランダムヘキサマー及びMultiScribe逆転写酵素（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）、フォスターシティ（Foster City）、カリフォルニア州）を使用して、RNAから第一鎖cDNA（first-strand cDNA）を得た。CFX96 Real Time検出システム（バイオラッド（Bio-Rad）、ハーキュリーズ（Hercules）、カリフォルニア州）でSYBR Green Real Time PCRマスターミックス（アプライドバイオシステムズ（Applied Biosystems）、フォスターシティ（Foster City）、カリフォルニア州）を使用して、定量PCRを実施した。リボソームタンパク質L6（RPL6）（Pa03C）又はアクチン（Panc10.05、Panc198、Pa02C）を基準遺伝子として使用する比較Ct（comparative Ct）法を使用して、相対定量的mRNAレベルを決定した。qRT-PCRのために使用したプライマーは、表4に詳細に記載されている。各試料につき実験を少なくとも三重に実施した。 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法及び共分散（ANCOVA）モデルの分析を使用して統計解析を実施した。

10

【0097】

【表 4 - 1】

表4:qRT-PCRのために使用したプライマー

遺伝子	プライマー	配列	配列番号
アクチン	順方向	CACCATTGGCAATGAGCGGTTC	4
	逆方向	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT	5
RPL6	順方向	ATTGCTTATAGACCGGAAGCCG	6
	逆方向	AACTTTTTTCACCCGCCATCTTG	7
BCRP/ABCG2	順方向	GTTCTCAGCAGCTCTTCGGCTT	8
	逆方向	TCCTCCAGACACACCACGGATA	9
CIRBP	順方向	GTCAGAGTGGTGGCTACAGTG	10
	逆方向	GCCCTCGGAGTGTGACTTAC	11
COMMD7	順方向	GAGCAGCGAATTGGAGAAAGTGG	12
	逆方向	TCCATCTCGTGCAGGAAGCTGT	13
ISYNA1	順方向	GCCAGACCAAAGTCAAGTCCGT	14
	逆方向	CTTAGAGCGGAACTGCAATGGC	15
ITGA1	順方向	CCGAAGAGGTACTTGTTGCAGC	16
	逆方向	GGCTTCCGTGAATGCCTCCTTT	17
NOTCH3	順方向	CCAGATGGCTTCACCCCGC	18
	逆方向	TCAGTTGGCATTGGCTCCAG	19
PPIF	順方向	CGACTTCACCAACCACAATGGC	20
	逆方向	GGTGTTAGGACCAGCATTAGCC	21
PRDX5	順方向	TGATGCCTTTGTGACTGGCGAG	22
	逆方向	CCAAAGATGGACACCAGCGAATC	23

【表 4－2】

RAB3D	順方向	ACGTGTTGTGCCTGCTGAGGAT	24
	逆方向	CTTCTCGCAGATGACATCCACC	25
SIPA1	順方向	GTGTCCACGATGCTGCCTTACA	26
	逆方向	CTTGCTGCCAGGCTCCTGGAA	27
TAPBP	順方向	GAGCCTGTTCTCATCACCATGG	28
	逆方向	GTAGGCAAAGCTCAAGTCCAGC	29
TNFAIP2	順方向	TGCTCCAGAACCTGCATGAGGA	30
	逆方向	AACTCAGGCAGCCTCGTGTCTA	31

【0099】

結果

A P E 1 ノックダウン細胞の s c R N A－s e q 分析

A P E 1 の s i R N A ノックダウンは、ウエスタンブロット法によって検出されたとおり、A P E 1 タンパク質の完全喪失をもたらさず、s i A P E 1 試料において、図 8 A に示す代表的なウエスタンブロットによって示されるとおり、スクランブル対照（S C R）と比べて 10～20% の A P E 1 タンパク質発現が観測された。20 nM s i R N A を使用した。というのも、これよりも高いレベルはオフターゲット（非特異的）効果、及び A P E 1 機能と関連しない細胞死滅をもたらすからである。それゆえ、それぞれの個々の細胞内の A P E 1 タンパク質の量に特異的に関連する遺伝子発現の変化を明瞭に特定するために、A P E 1 s i R N A ノックダウン後の細胞に対して単細胞 R N A－s e q を実施した。

【0100】

細胞周期注釈付き遺伝子を使用したバッチ効果の補正

試料調製の制約に起因して、s i A P E 1 細胞及び S C R 細胞を 3 バッチに分けた。1 つのバッチは s i A P E 1 を含有し、2 つのバッチは S C R 細胞（S C R 1 及び S C R 2）を含有していた。細胞バッチ間の差を、s c L V M R パッケージを適用することにより補正した。s c L V M と併用して、B i o m a r t R パッケージを使用して、細胞周期注釈付き遺伝子（c e l l c y c l e－a n n o t a t e d g e n e）のリストを得た。具体的には、遺伝子オントロジー（G e n e O n t o l o g y：G O）用語 G O：0007049 を使用して、「細胞周期」という注釈名（a n n o t a t i o n n a m e）を付けて 189 個の遺伝子を特定した。これらの 189 遺伝子のうち、すべての細胞にわたって低発現を呈する遺伝子の除去（遺伝子検出率品質管理フィルタリング（g e n e d e t e c t i o n r a t e q u a l i t y c o n t r o l f i l t e r i n g））に起因して、102 個だけが、分析にとどまっている遺伝子と合致した。細胞周期交絡を考慮するために潜在変数モデルをフィッティングし、処置及び対照の共変量もそのモデルに組み込んだ。フィッティング後の潜在変数モデルを使用すると、細胞周期交絡を低減して、補正後のデータセットを計算することが可能であった。

【0101】

実例として、図 8 B のプロットは、細胞周期について補正する前の 2 つの主成分を明示

し、このデータにおける最も影響を及ぼす変動因（すなわち、x 軸は 6.84% の全変動を表す）が、SCR1 細胞及び SCR2 細胞が分離される際に沿う軸に対応するというを示す。対照的に、2 番目に影響を及ぼす変動因（すなわち、y 軸は 4.57% の全変動を表す）が、siAPE1 細胞及び SCR 細胞が分離される際に沿う軸に対応する。

【0102】

細胞周期補正後の主成分プロット（図 8C）では、SCR1 細胞及び SCR2 細胞はより高い類似性を示し、これは、今回は siAPE1 及び SCR 細胞が分離する際に沿う軸に対応する最大の変動因（すなわち、横軸は 4.88% の全変動を表す）を生じる。細胞周期補正を使用して、細胞周期注釈付き遺伝子に帰属される変動を、siAPE1 処置とスクランブル対照との間の差に帰属される変動を除去することなく、有効に除去した。従って、細胞間の最大の変動因は APE1 ノックダウンに帰属した。

10

【0103】

siAPE1 ノックダウン及び SCR 対照細胞における遺伝子の差別的発現

最初に、48 個の SCR 細胞及び 48 個の siAPE1 細胞を、配列決定のために捕捉した。2 つの SCR 及び siAPE1 細胞を、それぞれ、捕捉部位に複数の細胞が存在したため、配列決定の前に廃棄した。細胞検出率（各細胞において検出された遺伝子の百分率）及び遺伝子検出率（与えられた遺伝子が発現された細胞の百分率）を統計的品質管理のために使用した。5% という閾値を両方の検出率について使用し、これにより 94 個の細胞及び 15,351 個の遺伝子のデータセットを得た。1 細胞あたりのメジアン数リードを 0.95 百万として、1 細胞あたりのリードの総数を 1 百万に規格化した。上述の細胞周期補正を実施した後、さらに 3 つの異常（外れ）細胞を除去した。というのも、それらは、いくつかの遺伝子について極端に高い発現カウントを有して PCR バイアスの徴候を明示したからである。すべての品質管理手段及び外れ値（細胞）の除去の後、1 細胞あたりに検出した遺伝子の数は、元の（すなわち、細胞周期交絡について補正する前の）遺伝子発現カウントを使用して、7095.7 と平均した。各遺伝子について、ゼロではない遺伝子カウントの平均細胞数は、元の遺伝子発現カウントを使用して、42.1 であった。

20

【0104】

SCR 群の中の残りの 46 細胞における平均 APE1 発現は、百万あたり 101.6 リードであった。siAPE1 細胞（n = 45）のうちで、25 細胞は APE1 発現が検出できず、APE1 カウントはゼロであった。残りの 20 細胞は、弱められた APE1 発現を示し、百万あたり平均で 37.7 リードだった。これらの群の各々における細胞の分布を示すバイオリンプロットは、図 9A で見ることができる。

30

【0105】

発現差異解析のために一般に使用される利用可能なソフトウェアパッケージは多く存在するが、RNA-seq 実験から生じるカウントデータの分布についてどのような仮定がなされているかという点に関して、それらソフトウェアパッケージ間で重要な差がある。正規分布していないデータをモデル化するために一般化線形モデルを使う 2 つのそのような R パッケージは、edgeR 及び BPSIC である。パッケージ edgeR は、過分散（より大きい分散）のポアソン分布（負の二項分布としても知られる）を用いてカウントをモデル化し、このことは、バルクの RNA-seq と比べてこのデータにははるかに多くのゼロカウントが存在する（ゼロ過剰と呼ばれる現象）ため、単細胞 RNA-seq データには適切ではない可能性がある。edgeR を使った実験結果は、非常に多くの差別的に発現される遺伝子を生じ、潜在的に高い偽発見率（データは示さず）を伴った。あるいは、R パッケージ BPSIC は、上記モデルにおいて追加のパラメータを使用して単細胞データにおけるゼロ過剰を十分に考慮することができるより柔軟な β -ポアソン分布においてカウントをモデル化する。それゆえ、この実施例では、SCR 細胞（n = 46）と siAPE1 ノックダウン細胞（n = 45）との間の発現差異解析のために BPSIC R パッケージを使用した。

40

【0106】

50

この実施例の後半で追加の実験計画の比較を容易にするために、ベースライン発現差異解析のために使用した一般化モデルの線形成分の明確な数式表現は、下記によって与えられる。

【数 1】

$$\mu_{ij} = \beta_{0j} + \beta_{1j}[\text{siAPE1}]_i$$

【0107】

上記式において、 μ_{ij} は、 j 番目の遺伝子についての i 番目の細胞の β -ポアソンカウント分布の期待値であり、 β_0 は切片であり、 β_1 は $\log$ (百万あたりのカウント) による遺伝子発現である。表現 $I[\text{siAPE1}]_i$ は、細胞が siAPE1 ノックダウン群に属するときに 1 という値をとる指標変数である。このとき、 j 番目の遺伝子の差別的発現は、以下のとおりの帰無仮説 (H_0 と表す) 及び対立仮説 (H_1 と表す) を使用して検定できる。

【数 2】

$$H_0: \beta_{1j} = 0$$

$$H_1: \beta_{1j} \neq 0$$

【0108】

上記の統計的設計のための 1 つの表現だけしか含まれていないが、このモデルは単純線形回帰よりも精緻であるということを強調する価値がある。というのも、データについて行った分布の仮定が基本的に異なるからである。この統計的設計を用いて、BPSC R パッケージは、偽発見率カットオフ 5 % を用いて、上記 siAPE1 細胞と SCR 細胞との間の 1, 950 個の差別的に発現される遺伝子 (DEG) を報告した。

【0109】

これらの差別的に発現される遺伝子の 71.7 % が、 siAPE1 細胞においてより低い発現レベルを有した。比較では、配列決定したすべての遺伝子の 58.5 % が siAPE1 細胞においてより低い発現を有していたが、これらの遺伝子の多くは、全体的に非常に低い発現を有していた (図 9B)。有意でない発現の変化を示した遺伝子に対する統計的に有意な増加／減少した発現を示した遺伝子の数に関してフィッシャーの正確確率検定 (Fisher's Exact Test) を使用すると、 10^{-16} という p 値が得られ、非常に有意な結果となった。このことは、上記 DEG に対する APE1 ノックダウンの支配的な阻害効果が、外的要因 (細胞生存率等) に起因して引き起こされる可能性があるあらゆる全体的な発現の減少よりも大きいということを示した。

【0110】

細胞内の APE1 レベルに関する差別的に発現される遺伝子の特定

scRNA-seq を実施することの利点の 1 つは、 scRNA-seq によってそれぞれの個々の細胞における APE1 発現を見ることが可能になることである。それゆえ、この情報を使用して、検出不能 APE1 (APE1 のゼロ発現を示す細胞と定義する) 又は検出可能 APE1 (ゼロより大きい APE1 の発現を示す細胞と定義する) のいずれかを有するとして、 siAPE1 群内の細胞を分類することが可能であった。すでに触れたように、 siAPE1 群内で、25 個の検出不能 APE1 を示す細胞 (以降、検出不能 siAPE1 と呼ぶ) 及び 20 個の検出可能だが低下した APE1 発現を呈する細胞 (本明細書中で以降、検出可能 siAPE1 と呼ぶ) が存在した。

【0111】

siAPE1 細胞の上記概要説明によって、3 つの異なるカテゴリとして、SCR 対照、検出可能 siAPE1 及び検出不能 siAPE1 細胞を考慮することが可能になった。検出可能 siAPE1 細胞が検出不能 siAPE1 細胞及び SCR 対照細胞の両方と区別できると考えられるならば、このようなモデルは適切である。この場合のモデルは下記に

よって与えられる。

【数 3】

$$\mu_{ij} = \beta_{0j} + \beta_{1j}I[s i A P E 1]_i I[A P E 1 > 0]_i + \beta_{2j}I[s i A P E 1]_i I[A P E 1 = 0]_i$$

上記式中、表現 $I[s i A P E 1]_i I[A P E 1 > 0]_i$ は、 i 番目の細胞が $s i A P E 1$ 群に属しかつゼロではない $A P E 1$ 発現を有する（検出可能 $s i A P E 1$ ）ときに、1 という値をとる。表現 $I[s i A P E 1]_i I[A P E 1 > 0]_i$ は、 i 番目の細胞が $s i A P E 1$ 群に属しかつ検出可能 $A P E 1$ の発現を有しない（検出不能 $s i A P E 1$ ）ときに、1 という値をとる。 j 番目の遺伝子の差別的発現についての検定を、帰無仮説及び対立仮説を使用して実施した。

10

【数 4】

$$H_0: \beta_{1j}=0, \beta_{2j}=0$$

$$H_1: \beta_{1j} \neq 0 \text{ 又は } \beta_{2j} \neq 0 \text{ のうちの少なくとも 1 つ}$$

【0 1 1 2】

このモデルは、結合有意性（joint significance）について検定できる 2 つのパラメータを有しているが、最初の $S C R / s i A P E 1$ モデルは、検定するための 1 つのパラメータしか有していなかった。両方のパラメータの単一の検定で結合有意性を見積もることは可能であるが、 $S C R$ 対照に対する検出不能 $s i A P E 1$ 群と検出可能 $s i A P E 1$ 群との間の個々の差異を把握するために、パラメータ特異的な有意性を計算した。実際に、これらのパラメータの各々を別々に検定し、それらの結合有意性を、フィッシャー法（Fisher's method）を使用して得られた p 値として報告した。 j 番目の遺伝子に対する β_{1j} 、 β_{2j} の検定に対応する 2 つの p 値 p_{1j} 、 p_{2j} については、統合検定統計量（combined test statistic）は下記として記述される。

20

【数 5】

$$F = -2 \log(p_{1j}) - 2 \log(p_{2j}) \sim \chi_4^2$$

上記式中、 F は、帰無仮説のもとでは、自由度 4 のカイ二乗確率変数として分布する。統合 p 値（combined p -value） p^* は、それゆえ下記として計算される。

30

【数 6】

$$p^* = 1 - P\chi_4^2(F^* < F)$$

上記式中、 $P\chi_4^2$ は χ_4^2 確率変数の累積分布関数を表し、 F^* は、各遺伝子についての計算された p 値を使用するだけの F と同様に計算される経験的な検定統計量である。フィッシャー法は、上記のとおり、対照と比べたときの 2 つの群の差別的発現の一貫した方向の仮定を強制しないということに触れておく価値がある。差別的発現の方向（正又は負）は検出可能 $s i A P E 1$ 群及び検出不能 $s i A P E 1$ 群の間で一貫しているはずだという仮定を直接上記分析の統計的設計に組み込むことは有用であるかもしれないが、これらのアイデアは、さらには追求しなかった。

40

【0 1 1 3】

この分析は、 $S C R$ 細胞と検出可能 $s i A P E 1$ 細胞との間、 $S C R$ 細胞と検出不能 $s i A P E 1$ 細胞との間、又は $S C R$ 細胞と $s i A P E 1$ 細胞の両カテゴリとの間に存在する可能性がある差異の検出を可能にする。共同解析（joint analysis）は、1 つのパラメータが有意でないと報告され、他は有意であると報告される可能性がある場合に、単独の異常値（外れ値）を警戒し、遺伝子が差別的に発現されると報告されるのを防ぐ。加えて、 $S C R$ 群から検出可能 $s i A P E 1$ 群へ、検出不能 $s i A P E 1$ 群へ移動するにつれて $D E G$ の発現変化の方向が一貫していると予想されるので、この実験計画

50

は、結果の解釈を支援し、外れ値によって潜在的に影響を受ける遺伝子进行特定するのに役立つ。このSCR／検出可能 si A P E 1／検出不能 si A P E 1の分析は、5%の偽発見率を用いて2, 837個の遺伝子进行特定した。上記SCR／si A P E 1分析で特定した1, 950個のDEGのうちで、1, 945個(99.7%)がこの引き続く分析において差別的に発現されることが判明した。加えて、このDEGの72.1%は下方制御され(図9C)、SCR／si A P E 1分析で下方制御された71.7%と同様であった。この一貫性は、特定したDEGの数の増加がこのより正確な統計モデルに起因することを示しており、それを好ましい分析にすることを示す。

【0114】

どの遺伝子が発出可能 si A P E 1細胞と検出不能 si A P E 1細胞との間で差別的に発現されるかを検討するためにも分析を実施した。この分析は、上記2つの細胞群のより少ない試料サイズに起因して、統計的に力不足であった。それは、60個だけのDEGが特定されるという結果を生じ、これは、とりわけSCR対照細胞と比べた場合には、検出可能 si A P E 1細胞及び検出不能 si A P E 1細胞が同様の遺伝子発現パターンを有することを示唆していた。DEGをSCR／検出可能 si A P E 1／検出不能 si A P E 1の結果と比較すると、42個の遺伝子重複することが判明し、他方、SCR／si A P E 1分析では、6個の遺伝子だけが重複していた(図10A)。これらの6つの遺伝子(TM E M 4 5 A、T M E M 1 2 6 A、T M E M 1 5 4、C O M M D 7、I S Y N A 1及びT N F A I P 2)は、すべての3つの分析の間で重複する数少ない遺伝子であった。1細胞あたりのA P E 1発現に関するこれらの遺伝子の発現を図示するバイオリンプロットを図11B～図11Gに示す。すべての3つの分析におけるこれらの6つの遺伝子の存在は、A P E 1レベルが低下するにつれて、これらの6つの遺伝子の発現レベルがさらに変化するということを確認した。

【0115】

差別的に発現される遺伝子の臨床的関連の決定

この実施例の1つの包括的な目的は、A P E 1阻害と、改変されたA P E 1発現によって大きな影響を受ける経路に作用する臨床的に承認された薬物との有望な組み合わせを、最初は膵臓癌において、しかし最終的には他の癌において確認することであった。このゴールに向かって、異なる分析によって特定したDEGの臨床的関連を、癌ゲノムアトラス(The Cancer Genome Atlas: TCGA)を使用して検討した。TCGAは、癌患者由来の腫瘍遺伝子発現及び臨床成績等のデータを含んでいる。検出可能 si A P E 1／検出不能 si A P E 1分析で検出した少数のDEGに起因して、検出可能 si A P E 1／検出不能 si A P E 1分析をこのTCGA分析から除外した。SCR／si A P E 1分析及びSCR／検出可能 si A P E 1／検出不能 si A P E 1分析の両方を利用した。このTCGA分析を実施することで、この実施例で特定したDEGの臨床的関連の測定が可能になり、上記2つの分析のための性能測定基準も提供された。

【0116】

R T C G Aツールボックスを使用して、TCGAからのデータを解析した。この解析では、配列決定の時点での遺伝子の発現レベルが膵臓癌を有する患者の死までの日数に統計的に有意に関連する場合に、その遺伝子は臨床的に関連するとして定義される。遺伝子の統計的有意性は、臨床試験及び生物統計学における一般に使用されるモデルであるコックス比例ハザード回帰モデル(Cox proportional hazards regression model)を使用して決定する。具体的には、(配列決定の時点でまだ生きている患者に起因する打ち切りを考慮する)死までの日数の成績を、Rパッケージ生存を使用するバルクRNA-Se qを介して、患者腫瘍試料の規格化された遺伝子発現データ上に回帰した。上記分析における発現レベルのみを使用し、すべての腫瘍の種類及びステージにわたって、一回に1つの遺伝子をモデル化した。すべてにおいて、178個の患者腫瘍試料が含まれ、全部で20, 501個の遺伝子を考慮した。命名規則及び品質管理手順に起因して、10, 292個だけが、scRNA-se q分析において配列決定した遺伝子の総数と生存成績のTCGA分析との間で共通していた。それゆえ、この解

析については、考察はこれらの10, 292個の遺伝子だけに限定する。この理由のため、両方の発現差異解析について下記で報告した差異的に発現される遺伝子の総数は、これまでの節で報告したものよりも少ない。

【0117】

TCGA分析は、5%の偽発見率を使用して、死までの時間に統計的に有意に関連する1, 627個の遺伝子を生じた。SCR/siAPE1分析から考慮した1, 486個のDEGのうち、246個の遺伝子(16.6%)が臨床的に関連すると判明した。SCR/検出可能siAPE1/検出不能siAPE1分析は、利用可能な2, 115個のDEGのうち、345個の臨床的に関連する遺伝子(16.3%)を特定した。

【0118】

SCR/検出可能siAPE1/検出不能siAPE1分析は、臨床的に関連する遺伝子の全体百分率に変化がなく臨床的に関連するより多くのDEGを特定した。これは、この解析にユニークな856個の遺伝子が統計的例外ではなく、より厳格な統計モデルに起因して特定された信頼のおける結果であることをさらに立証する。この結果のため、すべての以下の分析を、上記SCR/検出可能siAPE1/検出不能siAPE1の結果を用いて実施した。

【0119】

癌関連経路における遺伝子発現パターン

インジェヌイティーパスウェイアナリシス(Ingenuity pathway analysis: IPA)を使用して、上記SCR/検出可能siAPE1/検出不能siAPE1分析でこれまでに特定したDEGに基づいて、APE1によって制御される経路を決定した。全経路解析結果を表5に示す。全部で104個の標準経路を、片側のフィッシャーの正確確率検定を使用して、過剰出現と特定した。図11Aに提示したデータは、20個の最も統計的に有意な過剰出現経路を明示し、そのうちの6個は、これまでAPE1に結び付けられていなかった。70個のDEGを伴うEIF2シグナル伝達経路(p 値 = 1.58×10^{-18})は、APE1ノックダウンによって最も影響を受ける経路であることが判明した。影響を受けた遺伝子を伴う経路の概説を図11Bに提示し、70個のDEG及び各細胞におけるそれらの発現を強調するヒートマップを図11Cに示す。他のこれまでに結び付けられていなかった経路は、55個のDEGを伴うmTOR経路(p 値 = 3.98×10^{-12})並びに42個のDEGを伴うEIF4及びp70S6Kシグナル伝達の制御経路(p 値 = 3.63×10^{-9})であった。これらの経路は、エンドサイトーシス経路を介するウイルス侵入、Rhoによるアクチンベースの運動性の制御及びプロテイン分解経路とともに、今では、scRNA-seqデータに基づいて推定的にAPE1に結び付けられており、細胞内のAPE1のすでに多様な役割を広げている。全体では、これまでAPE1と関連付けられていなかった44個の経路を、この実施例で特定した。これらの結果は、明確な遺伝子発現及び経路相互作用を決定する上での単細胞RNA-seqの重要性を強調する。

【0120】

10

20

30

【表 5 - 1】

表5:IPA経路分析の全結果

インジェヌイティー標準経路	p値
EIF2シグナル伝達	1.58x10 ⁻¹⁸
mTORシグナル伝達	3.98x10 ⁻¹²
eIF4及びp70S6K シグナル伝達の制御	3.63x10 ⁻⁹
ミトコンドリア機能障害	8.12x10 ⁻⁶
酸化的リン酸化	1.02x10 ⁻⁵
SUMO化経路	2.63x10 ⁻⁵
上皮細胞におけるアルドステロンシグナル伝達	1.41 x10 ⁻⁴
ILKシグナル伝達	3.71 x10 ⁻⁴
ハンチントン病シグナル伝達	4.07 x10 ⁻⁴
エンドサイトーシス経路を介するウイルス侵入	5.5 x10 ⁻⁴
アポトーシスシグナル伝達	5.5 x10 ⁻⁴
タンパク質キナーゼAシグナル伝達	5.89 x10 ⁻⁴
タンパク質ユビキチン化経路	7.08 x10 ⁻⁴
解糖I	7.41 x10 ⁻⁴
CDK5 シグナル伝達	9.12 x10 ⁻⁴
NADH修復	0.001
プトレシン分解 III	0.001
アンドロゲンシグナル伝達	0.001
Rhoによるアクチンベースの運動性の制御	0.002
アリール炭化水素受容体シグナル伝達	0.002
Polo様キナーゼの有糸分裂的役割	0.002
ホスホリパーゼCシグナル伝達	0.002
細胞周期チェックポイント制御におけるCHKタンパク質の役割	0.003
G1 $\pm$ qシグナル伝達	0.003
PI3K/AKTシグナル伝達	0.003
ERK/MAPKシグナル伝達	0.003

【表 5 - 2】

スペルミン及びスペルミジン分解I	0.004
シナプスの長期増強	0.005
カベオラ媒介性エンドサイトーシスシグナル伝達	0.005
インテグリンシグナル伝達	0.005
好中球におけるfMLPシグナル伝達	0.005
RAR活性化	0.006
HIF1 β シグナル伝達	0.006
ピリミジンデオキシリボヌクレオチドデノボ合成I	0.006
線維芽細胞におけるIL-17Aシグナル伝達	0.007
小胞体ストレス応答	0.007
NRF2媒介性酸化的ストレス応答	0.007
マクロファージにおける一酸化窒素及び活性酸素種の産生	0.007
スタスミン1による乳癌制御	0.009
3-ホスホイノシチド分解	0.009
細胞周期: G2/M DNA損傷チェックポイント制御	0.009
ARP-WASP複合体によるアクチン核形成	0.01
ピリミジンリボヌクレオチド相互変換	0.01
非相同末端再結合による二本鎖DNA切断修復	0.01
グリコーゲン分解 III	0.01
グアニン及びグアノシンサルベージI	0.01
アデニン及びアデノシンサルベージI	0.01
神経膠腫侵襲性シグナル伝達	0.01
エタノール分解II	0.011
トリプトファン分解 X (哺乳類, トリプタミンを介する)	0.011
エタノール分解 IV	0.011
GNRHシグナル伝達	0.011
14-3-3-媒介性シグナル伝達	0.012
マクロファージ及び単球におけるFc γ 3 受容体媒介性食作用	0.012
抗原提示経路	0.012

【表 5 - 3】

LPS刺激MAPKシグナル伝達	0.013
p70S6Kシグナル伝達	0.013
ピリミジンリボヌクレオチドデノボ合成	0.014
ATMシグナル伝達	0.015
酸化エタノール分解III	0.016
小胞体ストレス経路	0.016
インスリン受容体シグナル伝達	0.016
CXCR4シグナル伝達	0.017
RhoGDIシグナル伝達	0.017
ノルアドレナリン及びアドレナリン分解	0.018
ニューロンにおけるnNOSシグナル伝達	0.018
RhoファミリーGTPアーゼによるシグナル伝達	0.018
密着結合シグナル伝達	0.019
Bリンパ球におけるPI3Kシグナル伝達	0.020
IL-3シグナル伝達	0.020
D-ミオイノシトール-5-リン酸代謝	0.022
癌における組織因子の役割	0.023
イノシトールリン酸化合物のスーパーパスウェイ	0.023
PPARシグナル伝達	0.026
コレシストキニン/ガストリン媒介性シグナル伝達	0.027
生体異物代謝シグナル伝達	0.027
セラミド合成	0.027
グリコーゲン分解II	0.027
RNAポリメラーゼII複合体の会合体	0.028
ソニックヘッジホッグシグナル伝達	0.029
D-グルクロン酸分解I	0.029
胚細胞-セルトリ細胞間結合シグナル伝達	0.029
心血管系における低酸素シグナル伝達	0.031
ピリミジンリボヌクレオチドのサルベージ経路	0.031

【表 5 - 4】

遺伝性乳癌シグナル伝達	0.031
UVB誘発性MAPKシグナル伝達	0.034
成長ホルモンシグナル伝達	0.034
エストロゲン受容体シグナル伝達	0.036
乾癬におけるIL-17Aの役割	0.036
B細胞受容体シグナル伝達	0.037
軸索ガイダンスシグナル伝達	0.037
ヒスタミン分解	0.038
脂肪酸 β -酸化	0.039
トロンビンシグナル伝達	0.041
tRNA荷電	0.041
RhoAシグナル伝達	0.042
ファゴソーム形成	0.042
エンドセリン-1シグナル伝達	0.042
癌の分子機構	0.042
ニューロトロフィン/TRKシグナル伝達	0.043
神経筋接合部におけるアグリン相互作用	0.046
レチノール生合成	0.047
AMPKシグナル伝達	0.047
視覚サイクル	0.047

【0124】

APE1ノックダウンによって影響を受けるいくつかの重要な経路は、以前の観察を確認し、それゆえ上記結果に対する検証を与えた。例えば、APE1によって制御されることが示されているHIF1 α シグナル伝達経路は、上記経路分析で有意に（p値＝0.006）下方制御されることが判明した。同様に、ミトコンドリア機能障害（p値＝8.12 $\times$ 10⁻⁶）及びハンチントン病シグナル伝達（p値＝4.07 $\times$ 10⁻⁴）経路は、ともに、トップ10の、APE1ノックダウンによって影響を受ける有意に過剰出現された経路である。ミトコンドリア機能障害経路は37個のDEGを有し、他方で、ハンチントン病シグナル伝達経路には42個のDEGがある。ミトコンドリア機能障害は、ハンチントン病の病態において役割を果たすと考えられており、先行研究は、APE1がミトコンドリア機能の維持にとって重要であることを明示している。APE1が、ミトコンドリアのDNA修復機能に関与することも公知である。APE1がこれらの経路に影響することが知られているが、この実施例は、APE1ノックダウンによって影響を受ける経路における遺伝子を示唆することにより、細胞内のAPE1の理解を広げる。

【0125】

qRT-PCRを使用したscRNA-seq結果の検証

SCR/siAPE1分析のscRNA-seq結果は、siRNAノックダウン後のPa03C細胞においてqRT-PCRを実施することにより検証した。明確な経路由来でかつノックダウン後に様々な変化を示す遺伝子のパネルを選んだ(図12A)。これらの遺伝子は、SCR/siAPE1分析及びSCR/検出可能siAPE1/検出不能siAPE1分析の両方において存在した。siRNAノックダウンの効率を、選んだスクランブル対照と比べてAPE1発現の80%を超える低下を呈した試料のみを用いて、ウェスタンブロットを使用して評価した。

【0126】

加えて、すべての分析(SCR/siAPE1、検出可能siAPE1/検出不能siAPE1及びSCR/検出可能siAPE1/検出不能siAPE1)において差別的に発現され統計的に有意であった3つの遺伝子の検証を実施した。すべての3つの分析でのこれらの遺伝子の存在(図12B)は、APE1ノックダウンが大きいほど、それらの発現がより劇的に変化することを示す。

【0127】

scRNA-seqにおいて統計的に有意な、増加又は減少した発現を示した遺伝子は、qRT-PCR後に同じ方向の変化を呈し(図12C)、CIRBP、COMMD7、ISYNA1、ITGA1、NOTCH3、PRDX5、RAB3D、SIPA1、TAPBP及びTNFAIP2のmRNAレベルにおいて減少が見られた。BCRP及びPP1Fの発現は、ノックダウン後に有意に増加した。scRNA-seqからの倍率変化をqRT-PCR倍率変化に対して図12Dにプロットした。 R^2 値0.82及び $p < 0.0001$ (線形回帰分析)で、倍率変化は一貫しており、上記単細胞scRNA-seq研究の正当性を立証することを確認した。

【0128】

加えて、「関連性マップ(connectivity map)」プロジェクトは、クエリ遺伝子発現シグネチャーを、ヒト細胞を種々の薬剤で処置することから導かれた遺伝子発現プロファイルのデータベースに対して比較して、類似性を特定し薬物の機構を予測した。類似の遺伝子発現プロファイルを有する細胞株の薬物感受性データを組み込むことを使用して、有効な併用治療を予測した。Cancer Cell Line Encyclopedia(CCLE、<https://portals.broadinstitute.org/ccle/home>)は、1,036個の癌細胞株のベースライン遺伝子発現データ及び504個の細胞株にわたって抗癌剤に対する薬理学的プロファイル(IC₅₀、AUC)を備えている。基準としてのCCLE遺伝子発現プロファイルセットを、Genomics of Drug Sensitivity in Cancer(GDSC)及びCancer Therapeutics Response Portal(CTRP、<http://portals.broadinstitute.org/ctrp/>)からのデータとともに使用した。CCLE細胞株の遺伝子発現及びRef-1ノックダウン単細胞の遺伝子発現を規格化し、ランク付けした。高い相関は、CCLE細胞で有効である薬物は、Ref-1シグナル伝達が阻害される細胞において有効であるという相対的に高い可能性を有するであろうということを示した。Ref-1単細胞と有意に高い相関(相関>0.5)を持つCCLE細胞株を特定した後、これらのCCLE細胞株に対して高い効力(IC₅₀<1μM)を有するこれらの薬物の頻度を数えた。この計算的なスクリーニング戦略を使用して、表6は、Ref-1阻害に最も有効であると予測される薬物を、最大数の細胞株を有していた薬物の順に記載する。表6中の薬剤は、さらなる分析のためにAPX3330との併用治療において利用されることになる。

【0129】

【表 6 - 1】

表6:CCLE及び単細胞RNAseqに基づいたAPX3330と相乗作用しそうな化合物のリスト

薬物の種類		P値
HDAC阻害剤	パノビノスタット	2.60E-07
	エンチノスタット	1.00E-06
	ポリノスタット	1.87E-06
	Merck60	1.13E-10
	アピシジン	2.31E-08
	BRD-K66532283	2.16E-07
ヌクレオシド類似体	デシタビン	4.97E-09
	ゲムシタビン	4.20E-07
	クロファラビン	1.83E-06
	Ara-C	6.36E-08
DNA傷害剤	ドキソルビシン	1.66E-10
	エトポシド	5.42E-07
	トポテカン	8.36E-07

10

20

30

40

【表 6 - 2】

	ベンダムスチン	1.18E-06
	ダカルバジン	1.66E-06
	マイトマイシンC	6.78E-06
	クロラムブシル	6.65E-06
RTKi (受容体チロシンキナーゼ)	アキシチニブ	3.32E-09
	スニチニブ	4.91E-09
	KW-2449	9.39E-09
	MGCD-265	3.46E-07
	イマチニブ	5.93E-07
	パゾパニブ	2.65E-07
BRDi (ブロモドメイン)	I-BET151	6.99E-09
	GSK525762A	9.65E-08
	JQ-1	1.48E-07
Jak2	NVP-BSK805	1.50E-07
	モメロチニブ	3.29E-07

【表 6 - 3】

チューブリン重合	ビンクリスチン	7.59E-08
	CHM-1	4.05E-07
PLKi (Polo様キナーゼ)	GSK461364	6.66E-08
	BI-2536	9.46E-07
Mdm2i	セルデメタン (Serdemetan)	1.11E-06
	HLI 373	6.22E-06
S1Pi	FTY720	1.46E-06

10

20

【0132】

実施例 2

この実施例では、ドセタキセル及びトラメチニブと組み合わせた Ref-1 阻害を分析した。

30

【0133】

Arpin, C. ら、Mol Cancer Ther 15、794-805 (2016) ; Logsdon, P. ら、Mol Cancer Ther 15、2722-2732 (2016) ; Cardoso, A. ら、Plos one 7、e4742 (2012) ; 及び Kelley, M. ら、The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 359、300-309 (2016) で調製された標準の三次元 (3D) 共培養アッセイを使用して、腫瘍細胞及び癌関連線維芽細胞に対する上記組み合わせの細胞毒性を評価した。

【0134】

40

図 14 に示すように、ドセタキセル及びトラメチニブと組み合わせた Ref-1 阻害は、いずれの薬剤単独よりも有効であることが示された。ドセタキセルは Ref-1 阻害と相乗作用しそうな最大数の CCL2 細胞株 (115 株) を与えたため、ドセタキセルを選んだ。トラメチニブは、CCL2 株における PDAC 株の存在率 (prevalence) (14%) が上記計算的なスクリーニング戦略から明らかになったため、選んだ。

【0135】

実施例 3

この実施例では、ゲムシタビンと組み合わせた APX3330 による Ref-1 の阻害を分析した。

【0136】

50

実施例 2 に記載した標準の三次元共培養アッセイを使用して、腫瘍細胞及び癌関連線維芽細胞に対する上記組み合わせの細胞毒性を評価した。

【0137】

このアプローチの科学的仮定は、1) P D A C 死滅に対して増大した効果を生じる A P X 3 3 3 0 と組むべき化学療法剤を与える計算的アプローチ；及び 2) A P X 3 3 3 0 の添加がゲムシタビンの効果を高めたことを実証する、A P X 3 3 3 0 及びゲムシタビンを用いた三次元研究及びインビボ研究、に基づく。三次元スフェロイドモデル（図 1 4 A 及び図 1 4 B）では、C A F との共培養における患者由来の腫瘍株 P a 0 3 C に対するゲムシタビン及び A P X 3 3 3 0 の用量依存的組み合わせ効果が実証された。A P X 3 3 3 0 単独による C A F の面積の減少があったが、この効果は、ゲムシタビンの添加によって増強されなかった（緑の棒参照、図 1 4 B）。

10

【0138】

加えて、インビボで A P X 3 3 3 0 をゲムシタビンと組み合わせることの有益な効果が実証された（図 1 4 C）。A P X 3 3 3 0（25 mg / kg）を標準用量のゲムシタビン（35 mg / kg）と組み合わせ、腫瘍量を低下させることにおける A P X 3 3 3 0 の「相加」効果を実証した。図 1 4 C 中のデータは、屠殺時の腫瘍量である。併用治療剤は刺激性が良好であった。単剤のみと比べて、A P X 3 3 3 0 とゲムシタビンとの併用治療においては、腫瘍量が有意に減少した。単剤であれ組み合わせであれ、すべての処置は、ビヒクル対照とは有意に異なった。これらのデータは、異種移植モデルにおいて A P X 3 3 3 0 がゲムシタビンと組み合わせられたときの新規な組み合わせ効果を実証するだけでなく、A P X 3 3 3 0 及び表 6 中の F D A 承認薬を用いる併用療法を調べることを支持する。

20

【0139】

実施例 4

この実施例では、P D H / K D G H 阻害剤 C P I - 6 1 3 と組み合わせた A P X 3 3 3 0 による R e f - 1 の阻害を分析した。

【0140】

実施例 2 に記載した標準の三次元共培養アッセイを使用して、腫瘍細胞及び癌関連線維芽細胞に対する上記組み合わせの細胞毒性を評価した。

【0141】

図 1 5 A ~ 図 1 5 C に示すように、100 μ M 及び 75 μ M の C P I - 6 1 3 と組み合わせたときの 0.2 μ M、0.8 μ M、1.6 μ M、3.1 μ M、6.3 μ M の A P X 3 3 3 0 を使用すると、H C T - 1 1 6 結腸癌細胞の、50%を超える死滅があった。

30

【0142】

実施例 5

この実施例では、A P E 1 s i R N A ノックダウンに応答した P D A C 細胞株の遺伝子発現の差を分析した。

【0143】

次に、A P E 1 s i R N A ノックダウンの効果を、他の P D A C 低継代患者由来細胞において分析した。これらの遺伝子に対する A P E 1 ノックダウンの効果は、図 1 6 A ~ 図 1 6 D に示すように、異なる患者株間で異なり、P D A C 患者の肝転移から生成した細胞株である P a 0 2 C は、同様に P D A C 肝転移から単離した P a 0 3 C 細胞とほぼ類似の遺伝子発現パターンを示した。P a 0 2 C 細胞では、B C R P、C O M M D 7、I S Y N A 1、I T G A 1、P R D X 5、R A B 3 D、S I P A 1 及び T N F A I P 2 がすべて発現の低下をはっきり示したのに対し、N O T C H 3 及び P P I F は、ノックダウン後に有意に増加した（図 1 6 A）。興味深いことに、B C R P 及び N O T C H 3 の発現の変化は有意であったが、それらは、P a 0 3 C 細胞で見られた変化と反対方向であった。

40

【0144】

初代 P D A C 腫瘍由来の P a n c 1 0.05 細胞は、P a 0 3 C 細胞と類似の結果を呈し、12 個の遺伝子のうち 8 つが類似の発現の変化を示した（図 1 6 B）。C O M M D 7

50

、ITGA1、RAB3D、SIPA1、TAPBP及びTNFAIP2は減少を示したが、BCRP及びPPIF発現を増加させた。対照的に、CIRBP、ISYNA1、NOTCH3及びPRDX5は、Panc10.05細胞では、発現の変化を示さない。

【0145】

同じく初代腫瘍由来のPanc198細胞は、最も異なる結果を生成した(図16C)。BCRP、CIRBP、ISYNA1、NOTCH3、PRDX5、PPIF、SIPA1及びTAPBPについては、発現の変化が見られなかった。COMMD7、ITGA1、RAB3D及びTNFAIP2は、すべて有意に低下した発現を示した。COMMD7、ITGA1、RAB3D及びTNFAIP2は、試験したすべての4つの患者由来の細胞株において有意に変化した(図16D)。

10

【0146】

6つの遺伝子だけが上記3つの分析の間で重複し(TMEM45A、TMEM126A、TMEM154、COMMD7、ISYNA1及びTNFAIP2)(図10A)、これは、これらの6つの遺伝子のみが、APE1レベルが低下するにつれて、さらに影響を受けたことを明示する。これは予期されない結果であった。というのも、多数の遺伝子は、APE1レベルが低下するにつれてさらに変化すると予想されたからである。従って、これらの結果は、APE1が(s i APE1細胞中のAPE1転写物の数に対して)少なくとも80%低下するとき、APE1ノックダウン後のほとんど遺伝子の発現の変化は明らかであること、及びAPE1のさらなる低下は、ほとんどの遺伝子をさらに有意に増加又は減少させないことを示す。いくつかの下方制御された遺伝子の場合、これは、最初のAPE1ノックダウン(検出可能s i APE1細胞)がそれらの発現をほとんどゼロまですでに低下させたからであり、これは、APE1のさらなる低下(検出不能s i APE1細胞)がそれらの遺伝子に対して効果を及ぼさないということ意味する。

20

【0147】

考察

BCRP(乳癌耐性タンパク質)/ABCG2は、癌細胞の多剤耐性を担うタンパク質の1つであるATP結合カセット(ABC)トランスポーターである。PDACでは、高いBCRP発現は、発癌、腫瘍進行、早期再発及び低い生存に対応する。いくつかの化学療法薬はBCRPに対する基質であり、このことは、細胞からのそれら化学療法薬の排出及び細胞内でのそれら化学療法薬の蓄積の減少を生じる。特に興味を惹く影響を受ける薬物は5-フルオロウラシル(5-FU)であり、この5-FUは、現在ではPDAC患者に対する治療レジメンの一部である。それゆえ、APE1ノックダウンがBCRP発現に影響を及ぼすという発見は、PDACにおいて生存を改善するための将来の薬物の組み合わせを見据えた場合、非常に重要である。Pa02Cと遺伝子的に類似の腫瘍においてAPE1標的薬を5-FUと組み合わせることは、BCRP発現の減少に起因して、この組み合わせに良好に反応するはずである。結腸癌幹細胞における研究は、5-FU及びAPE1の阻害剤APX3330をインビボで使用する場合、実際に劇的に増加した細胞死滅を示した。

30

【0148】

名の由来となったNotchシグナル伝達経路の高度に保存されたメンバーであるNOTCH3は、細胞生存、増殖、分化、発育及び恒常性維持に関与するとされてきた。Notch3タンパク質レベルの上昇は、PDAC患者についての予後マーカーとして特定されており、腫瘍浸潤の増加、転移及び患者生存の短縮につながる。このため、Notch3は、新規な癌治療のための標的になっている。γ-セクレターゼ阻害剤及びDLL4抑制抗体はともに、Notch3の上流のタンパク質を標的にし、Notchシグナル伝達経路の阻害につながる。Notch3をAPE1によって影響を受けると特定することは、APE1標的治療をこれらの阻害剤と組み合わせ、PDACにおけるNOTCH3の発現及び機能に対するAPE1阻害の効果を増強する(Pa03Cにおいて)か又は弱める(Pa02Cにおいて)という可能性を開く。

40

【0149】

50

検証した10個の他の遺伝子のうちで、それらのうちの4つ、COMMD7、ITGA1、RAB3D及びTNFAIP2は、すべての4つの患者細胞株において発現の減少を示した(図16D)。COMMD7、ITGA1、RAB3D及びTNFAIP2はすべて、PDACを含めて種々の癌において上方制御されることが示されている。これらの変化がすべてのPDAC試料において共通であろうと想定することはできないが、この一貫性は、これらの遺伝子のいくつかは、複数のPDAC腫瘍亜型にわたって、及び他の型の腫瘍において潜在的に有用であると思われる、APE1ベースの治療又は併用治療に対する有望な標的又はバイオマーカーを作製することができるだろうということを示唆する。さらには、これらの遺伝子は、APE1ノックダウンによって影響を受けるこの最初の実施例で特定した遺伝子の一部分を代表する。以前はAPE1と関連付けられていなかった経路の特定、及び以前はAPE1と結び付けられていなかったDEGを呈する公知の経路の特定は、APE1ベースの併用治療剤に対する新規な標的を開く。実際に、特定した経路のいくつかをAPE1阻害と組み合わせることで標的にする初期実験は、有望であるように思われる。

10

【0150】

実施例6

APX3330及び関連ファミリー(系統群)の化合物に基づくさらなるReference1ドックス阻害剤の開発に着手した。構造活性相関(SAR)に基づいていくつかの類似体を合成した。変更点としては、ジメトキシベンゾキノンのナフトキノロン環への変更、カルボン酸の修飾、二重結合上の炭素鎖の短縮、及び水素又は種々のハロゲンによる環構造上のメチル基の置換が挙げられる。APX3330は生理的pHでは帯電した分子として存在し、カルボン酸のアミド誘導体追加は、APX3330の物理的特性を変えた。また、親油性炭素鎖が二重結合上で短縮され、これにより、新しい化合物の親油性はより低くなる。これらの変更点は、インビトロ試験の際にAPX3330よりも大きい効力を呈する新しい化合物(例えば、APX2009及びAPX2014)を与えた。

20

【0151】

この実施例では、類似体、APX2009及びAPX2014、並びにAPX3330、の効力を膵臓癌の三次元スフェロイドモデルにおいて分析した。

【0152】

共培養モデル：三次元スフェロイドモデルを作製するために、Semperera、Cancer biology & therapy 2011、12(3)、198-207; Arpinら、Mol Cancer Ther 2016、15(5)、794-805; 及びLogsdonら、Mol Cancer Ther 2016、15(11)、2722-2732に記載されている超低接着96穴プレート(コーニングライフサイエンス(Corning Life Sciences))中の5%FBS(Hyclone、ローガン(Logan)、ユタ州)が追加され3%成長因子低減マトリゲル(Reduced Growth Factor Matrigel: RGF、ビーディーバイオサイエンス(BD Biosciences))を含有するDMEM成長培地の中で、三次元腫瘍スフェロイド培養物を成長させた。これらのスフェロイド培養物を、腫瘍細胞単独で、又はCAF(癌関連線維芽細胞)の存在下で腫瘍細胞を用いて成長させた。培養時間全体にわたって成長を追跡し、培養物中の細胞型を識別するために、腫瘍細胞をTdTomato(赤色チャンネル)で安定的に形質導入し、CAFをEGFP(緑色チャンネル)で安定的に形質導入した。患者細胞の不均一性及びユニークな遺伝子的特徴を保存するために、これらの修飾を新鮮な低継代細胞で実施し、成長速度は非感染細胞と同様であった。三次元スフェロイド培養物を、Logsdon、Mol Cancer Ther 2016、15(11)、2722-2732及びLindblomら、Toxicologic pathology 2012、40(1)、18-32に記載されているThermo Array Scanハイコンテンツイメージングシステムを使用して、プレティング後4日目、8日目及び12日目に分析した。TdTomato及びEGFPについてのフィルターを用い、Array Scanシステムによって2.5倍

30

40

50

の拡大率で三次元培養物画像を得た。腫瘍及びCAFの強度及び面積の定量化を、これらの三次元画像の二次元投影図を使用して成し遂げた。スフェロイドを、Array Scan分析／撮像後4日目及び8日目に処置した。三次元スフェロイド培養物の共焦点画像を、Logsdonら、Mol Cancer Ther 2016、15(11)、2722-2732にこれまでに記載されたとおり、共焦点／2光子Olympus Fluoview FV-1000 MPEシステム（オリンパスサイエンティフィックソリューションズアメリカ（Olympus Scientific Solutions America）；ウォルサム（Waltham）、マサチューセッツ州）を用い、Indiana Center for Biological Microscopy施設（インディアナポリス、インディアナ州）で記録した。

10

【0153】

これらのスフェロイド培養物を、Panc10.05腫瘍細胞単独で、又はCAF（癌関連線維芽細胞）の存在下でPanc10.05腫瘍細胞を用いて成長させた。Pa03C細胞を、単独で、又はCAF19細胞とともに三次元培養物へとプレーティングした。スフェロイドを、Array Scan分析／撮像後4日目及び8日目に、増加する濃度のナバブカシン、ビヒクル（DMSO）、25 μ M又は35 μ MのAPX3330で、又はナバブカシン及びAPX3330の組み合わせで処置した。これらのスフェロイドにおける腫瘍細胞成長を、プレーティング後4日目、8日目、及び12日目に、蛍光強度（及び面積、データは示さず）によって測定した。三次元培養物を、測定後4日目及び8日目に、APX3330（一番上の列）、APX2009（真ん中の列）、又はAPX2014（一番下の列）で処置した。グラフは、N=3の標準偏差を伴う平均である。

20

【0154】

図17に示すように、APX3330及びその第二世代化合物は、細胞成長、細胞増殖を低下させた。さらに、APX2009及びAPX2014は、より低い投薬量で投与される場合であっても、APX3330と同程度に有効であるように思われた。

【0155】

実施例7

この実施例では、APX3330及びSTAT3阻害剤ナバブカシン（BB1-608-STAT3阻害剤）の組み合わせを、その腫瘍死滅能について、実施例6に記載した膵臓癌の患者由来の三次元スフェロイドモデルにおいて分析した。

30

【0156】

図18に示すように、APX3330及びナバブカシンの組み合わせは、相乗的な腫瘍死滅効果を有していた。

【0157】

実施例8

この実施例では、実施例6で調製したPDAC三次元共培養モデルにおけるAPE1／Ref-1阻害剤との併用治療剤を分析した。

【0158】

Pa03C腫瘍細胞及びPanc10.05腫瘍細胞を、CAFの存在下で、三次元培養物において成長させた。スフェロイドを、4日目及び8日目に（黒矢印）、単剤、ビヒクル（DMSO）又は標的薬の組み合わせのいずれかで処置し、腫瘍（赤色）及びCAF（緑色）の強度を、3～4日ごとに培養物中で、実施例7に記載したように定量した。

40

【0159】

図19A及び図19Bに示すように、APX3330及びナバブカシンの組み合わせは、膵腫瘍細胞に対して相乗的な腫瘍死滅効果を有していた。

【0160】

加えて、APX3330、又はその類似体APX2009、及びSTAT3阻害剤ナバブカシン（BB1-608-STAT3阻害剤）の組み合わせを、同じ方法論を使用して、その腫瘍死滅能についてPDAC三次元共培養モデルにおいて分析した。図20A及び図20Bに示すように、APX3330及びナバブカシンの組み合わせも、APX2009

50

及びナパブカシンの組み合わせもともに、いずれの薬剤単独と比べて相乗的な腫瘍死滅効果を有していた。

【0161】

実施例 9

この実施例では、APX330及びSTAT3阻害剤ナパブカシンの組み合わせを、インビトロ及びインビボで、その腫瘍死滅能について遺伝的PDACモデルにおいて分析した。

【0162】

GEMM由来のマウスKPC (Kras^{L S L}・G12D/+; Trp^{53 R172 H}/+; Pdx1^{Cre tg}/+) 細胞において、Napa誘発細胞毒性の増強を、APX3330をナパブカシンに添加した場合に観察した (図21A)。アラマーブルー (Alamar Blue) 増殖ベースのアッセイは、APX及びナパブカシンの組み合わせとの3日間のインキュベーションの後のこれらの薬剤の相乗性を実証する。

10

【0163】

患者由来の腫瘍細胞 (Pa03C) 及びCAFと一緒に注入して使用した非常に増殖性が高く悪性度が高いインビボ共培養モデルを用いた試験的研究において、APX3330及びNapaの共処置は、腫瘍成長を有意に46%阻害した (図21B、 $p=0.012$)。併用治療の効果を見るために亜致死性用量の単剤を使用し、併用治療は、マウスでは刺激性良好であった。腫瘍量は、処置の2週間後に有意に低下する。

20

【0164】

実施例 10

この実施例では、APX330及びCA9阻害剤SLC-0111の組み合わせを、その腫瘍死滅能について、実施例6に記載したように調製した三次元共培養膵臓癌腫瘍モデルにおいて分析した。

【0165】

Pa03C細胞及び10.05細胞を、CAF19細胞とともに三次元培養物中へプレATINGし、これらのスフェロイドにおける腫瘍細胞成長を、プレATING後4日目、8日目、12日目、及び16日目に蛍光強度によって測定した。三次元培養物を、測定後4日目、8日目、及び12日目に、APX3330及びSLC-0111で処置した。群の間の差を、チューキー (Tukey) の多重比較検定を使用して判定した：*** $p<0.001$ 対DMSO；++ $p<0.01$ 対APX3330；+++ $p<0.001$ 対APX3330；^{△△} $p<0.01$ 対SLC-0111；^{△△△} $p<0.001$ 対SLC-0111。グラフはN=3の標準偏差を伴う平均である。これらのスフェロイドにおけるPa03C腫瘍細胞 (赤色チャネル) 及びCAF (緑色チャネル) の蛍光像を12日目に記録した。

30

【0166】

図22A～図22Cに示すように、CA9及びAPE1の二重標的化は、いずれの薬剤単独よりも良好にPDAC腫瘍を死滅させる。

【0167】

実施例 11

この実施例では、APX330及び1つの他の治療薬 (例えば、Bcl2拮抗薬、HDAC1及び3阻害剤、TKI阻害剤) の組み合わせを、その腫瘍死滅能について、実施例6に記載したように調製した三次元共培養膵臓癌腫瘍モデルにおいて分析した。

40

【0168】

Pa03C腫瘍細胞及びPanc10.05腫瘍細胞を、CAF (癌関連線維芽細胞) の存在下で、三次元培養物において成長させた。スフェロイドを、4日目及び8日目に、単剤、ビヒクル (DMSO) 又は標的薬の組み合わせのいずれかで処置し、腫瘍 (赤色) 及びCAF (緑色) の面積を、12日後に培養物中で定量した。結果を、図23A～図23Eに示す。

【0169】

50

実施例 1 2

この実施例では、A P X 3 3 0 と、S T A T 3 阻害剤ナバブカシン又は T C A 回路阻害剤 C P I - 6 1 3 のいずれか 1 つとの組み合わせを、その腫瘍死滅能について、実施例 6 に記載した三次元共培養膵臓癌腫瘍モデルにおいて分析した。

【0170】

P a 0 3 C 腫瘍細胞及び P a n c 1 0 . 0 5 腫瘍細胞を、C A F の存在下で、三次元培養物において成長させた。スフェロイドを、4 日目及び 8 日目（黒矢印）に、単剤、ビヒクル（D M S O）又は標的薬の組み合わせのいずれかで処置し、腫瘍（赤色）及び C A F（緑色）の面積を、1 2 日後に培養物中で定量した。結果を図 2 4 A ~ 図 2 4 C に示す。

【0171】

10

実施例 1 3

この実施例では、A P X 3 3 3 0 及び S T A T 3 阻害剤ルキシソリチニブの併用治療剤を、P D A C 腫瘍成長を阻害することについて分析した。

【0172】

最初に、ルキシソリチニブが上記三次元共培養モデルにおいて p - S T A T 3（Y 7 0 5）のリン酸化をブロックすることを確認した。S T A T 3 活性化の阻害の確認は、プレティング後 8 ~ 1 0 日の三次元アッセイにおいて、ルキシソリチニブ処置（1 2 . 5 μ M）の 4 時間後に p S T A T 3 Y 7 0 5 残渣についての免疫プロットによって行った。全 S T A T 3 タンパク質を、負荷対照として、及び両方の細胞型における S T A T 3 のレベルの基準として提供する。n = 3 から代表的なウエスタンプロットを示す（図 2 6 参照）。

20

【0173】

実施例 6 に記載した三次元共培養膵臓癌腫瘍モデルを使用して、低継代患者由来腫瘍細胞、P a 0 3 C を、C A F の存在下及び不存在下で三次元培養物において成長させた。スフェロイドを、ルキシソリチニブ単独で、及び A P X 3 3 3 0（4 0 μ M）と組み合わせたルキシソリチニブで処置し、腫瘍（赤色チャンネル）及び C A F 1 9 番号 1（緑色チャンネル）の面積を、1 2 日後に培養物中で n = 4 で定量したが、これは代表的なプロットである。

【0174】

図 2 5 に示すように、R e f - 1 / A P E 1 及び J a k / S T A T シグナル伝達の二重標的化は、上記三次元共培養モデルにおいて P D A C 腫瘍成長を阻害した。

【0175】

30

実施例 1 4

この実施例では、A P X 3 3 3 0 及び S T A T 3 阻害剤ルキシソリチニブの併用治療剤を、側腹部共培養モデルにおいて、腫瘍成長を遅らせることについて分析した。

【0176】

特に、図 2 7 に示すように、患者由来の P a 0 3 C 腫瘍を用いたインビボ効力実験は、インビボで有意な腫瘍成長遅延を示した。A P X 3 3 3 0 と組み合わせたルキシソリチニブ（R u x）は、患者由来の株及び C A F を用いたこの高悪性度の共培養モデルにおいて、腫瘍量の減少も示した。

【0177】

実施例 1 5

40

この実施例では、A P X 3 3 3 0 及び S T A T 3 阻害剤ルキシソリチニブの併用治療剤を、この処置がマウスの P D A C の共培養モデルにおいてすべての C A F を死滅させるわけではないことを確認するために分析した。

【0178】

C A F に対するマーカーとしてのビメンチンを用いる免疫組織化学（I H C）を使用して、上記併用治療が、共培養モデルにおいてすべての C A F を死滅させるわけではないことを確認した。ビメンチンに対する染色を、屠殺時に実施した。

【0179】

腫瘍組織の免疫組織化学染色の方法：組織を、1 0 % N B F 中で、室温で一晩固定し、その後、この組織を、L e i c a A u t o m a t e d V a c u u m T i s s u e

50

Processorの内部で段階的濃度のアルコールを経由してキシレンに移した。組織をパラフィン中に包埋し、その後、厚さ5mmの切片に切断し、正に帯電したスライド上に載置し、60℃で加熱した。次に、このスライドをキシレン中で脱パラフィンし、段階的濃度のアルコールを経由して水へと再水和した。このスライドをTarget Retrieval Solution (ダコ (Dako)) に、90℃ (水浴中) で20分間浸漬することにより抗原賦活化を実施し、室温で10分間冷却し、水中で洗浄し、次いで免疫染色に進んだ。スライドを、タンパク質ブロッキング溶液 (ダコ (Dako)) で30分間ブロックした。後のすべての染色工程を、自動化Immunostainer上でDako FLEX SYSTEMを使用して実施し、インキュベーションを室温で行い、0.05% Tween 20を加えたTris緩衝生理食塩水、pH 7.4 (TBS - Dako Corp) をすべての洗浄及び希釈のために使用した。一次抗体は抗マウスビメンチン及びp-STAT3であった。染色特異性を確認するために、一次抗体と同じ濃度を使用して、アイソタイプ対照で対照切片を処置した。スライド全体のデジタル撮像のために、Aperio ScanScope CSシステムを使用した。このシステムは、すべてのスライドを20倍で撮像した。次に、対照及び処置群を統計学的差異について評価した。結果を図28A及び図28Bに示す。

10

【0180】

移植した腫瘍の処置を、移植後11日目に開始した。特に、移植した共培養物は、 2.5×10^6 腫瘍細胞 $\pm 5 \times 10^6$ CAFを含んでおり、腫瘍細胞：CAFの比が1：2になっていた。この腫瘍は、約200mm³の初期平均腫瘍サイズを有していた。次に、このマウスに4% Cr：EtOH中の50mg/kg APX3330 BID、4% Cr：EtOH中の50mg/kg Rux SID pm、又はこれらの薬剤の組み合わせのいずれかを投与した。処置スケジュールは、腫瘍が2000mm³の平均サイズに到達するまで、5日間処置すること、次いで処置しない2日間を与えることになっていた。処置しない場合には、このマウスは、26日目に2700mm³の平均腫瘍サイズに到達し、Rux又はAPX3330の処置だけでは、マウスは、28日目に1750mm³の平均サイズに到達し、併用治療剤の場合には、マウスは、31日目に1200mm³の平均サイズに到達した。

20

【0181】

実施例16

この実施例では、結腸癌同所性腫瘍におけるAPX3330を伴うオキサリプラチンの抗癌効力を分析した。

30

【0182】

免疫正常 (immune competent) マウスに、マウスC26結腸癌細胞を盲腸に注射した (図29A)。動物をオキサリプラチン、又はAPX3330を伴うオキサリプラチンのいずれかで処置し、腫瘍サイズを、ビヒクル対照と比べて決定した (図29B)。オキサリプラチン及びAPX3330で処置したマウスにおいては、オキサリプラチン単独で処置したマウスと比べて、劇的かつ有意に増加した腫瘍細胞死滅があった (図29B及び図29D)。加えて、APX3330処置は、CRCマウスの結腸におけるオキサリプラチン誘発性の筋層間神経細胞減少を軽減した (図29C)。

40

【0183】

実施例17

この実施例では、APX2014及びSTAT3阻害剤ナバブカシンの併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、マウス結腸細胞株MC-38において分析した。

【0184】

MC-38細胞 (Yunhua Liu) を、96穴組織培養プレートに、DMEM+10% FBS中、1ウェルあたり2000細胞で播種し、37℃、5% CO₂で一晩成長させた。培地を、750nM~47nMの5点広がり系列的に1：2に希釈しつつEC30 (3.0μM) のAPX2014、若しくはEC10 (2.0μM) のAPX2014を加えた (spiked) ナバブカシン (SELLECK CHEMICALS)、又

50

は単剤のみを含有するDMEM+5%FBS薬物培地に交換した。細胞を、37℃、5%CO₂で72時間インキュベーションした。培地を、DMEM+5%FBS+10%アラマブルー（Alamar Blue）蛍光性細胞生存指示薬（インビトロジェン（Invitrogen）（商標））に交換し、37℃、5%CO₂で4時間インキュベーションし、次いで蛍光リーダー（SYNERGY（商標）H4 BioTek）上で読み取った。結果を図30Aに示す。図30Bは、APX2014単剤の効果を示す。示したデータは、3つの別個の細胞毒性アッセイの平均であり、各アッセイは培地のみ対照に対して規格化している。

【0185】

実施例18

この実施例では、APX3330並びにPDH及びα-KDH代謝阻害剤CPI-613の併用治療剤、を、その腫瘍死滅能について、ヒト腺癌結腸浮遊細胞株Colo-201において分析した。

【0186】

Colo-201（Yunhua Liu）を、96穴組織培養プレートに、RPMI+ビルビン酸ナトリウム+10%FBS中、1ウェルあたり2000細胞で播種し、37℃、5%CO₂で一晩成長させた。2倍（2×）薬物培地RPMI+ビルビン酸ナトリウム+5%FBSを、CPI-613（Apexbio Technology）75μM若しくは50μMを加えた75μM～6.3μMの5点広がりのAPX3330（Apexian）の投薬量、又は単剤のみで添加した。細胞を、37℃、5%CO₂で72時間インキュベーションし、次いで10%Alamar Blue（アラマブルー）蛍光性細胞生存指示薬（インビトロジェン（INVITROGEN）（商標））をプレートに直接添加した。指示薬を37℃、5%CO₂で4時間インキュベーションし、次いで蛍光リーダー（SYNERGY（商標）H4 BioTek）上で読み取った。図31Aは、APX3330及びCPI-613の単剤の効果を示す。図31Bは、APX3330及びCPI-613の相乗的な組み合わせ効果を示す。図31Cは、APX3330及びCPI-613 EC50（CalcuSyn）を示す。図31Dは、用量組み合わせのチョウタラレイ指数（Chou-Talalay Index：CI）（CalcuSyn）を描く。図31Eは、50μM CPI-613又は75μM CPI-613を加えたAPX3330の相乗的な薬物組み合わせ（CalcuSyn）を描く。薬物組み合わせの相乗作用は、50μM CPI-613を加えた場合に、75μM及び50μMのAPX3330投薬量で認められた。75μM CPI-613を加えた場合に、1つのAPX3330投薬量（6.3μM）を除きすべてで相乗作用が認められた。示したデータは、3つの別個の細胞毒性アッセイの平均であり、各アッセイは培地のみ対照に対して規格化している。

【0187】

実施例19

この実施例では、APX3330並びにPDH及びα-KDH代謝阻害剤CPI-613の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、ヒト癌腫結腸細胞株HCT-116において分析した。

【0188】

HCT-116（Yunhua Liu）を、96穴組織培養プレートに、DMEM+10%FBS中、1ウェルあたり2000細胞で播種し、37℃、5%CO₂で一晩成長させた。薬物培地DMEM+5%FBSを、CPI-613（Apexbio Technology）75μM若しくは50μMを加えた75μM～6.3μMの5点広がりのAPX3330（Apexian）の投薬量、又は単剤のみで添加した。細胞を、37℃、5%CO₂で72時間インキュベーションした。培地を、DMEM+5%FBS+10%Alamar Blue蛍光性細胞生存指示薬（インビトロジェン（INVITROGEN）（商標））に交換し、37℃、5%CO₂で4時間インキュベーションし、次いで蛍光リーダー（SYNERGY（商標）H4 BioTek）上で読み取った。図32

Aは、APX3330及びCPI-613の単剤の効果を示す。図32Bは、APX3330及びCPI-613の相乗的な組み合わせ効果を示す。図32Cは、APX3330及びCPI-613 EC50 (CalcuSyn)を示す。図32Dは、用量組み合わせのチョウタレイ指数(CI) (CalcuSyn)を描く。図32Eは、50 μ M CPI-613又は75 μ M CPI-613を加えたAPX3330の相乗的な薬物組み合わせ (CalcuSyn)を描く。薬物組み合わせの相乗作用は、50 μ M CPI-613を加えた場合に、75 μ M及び50 μ MのAPX3330投薬量で認められた。75 μ M CPI-613を加えた場合に、1つのAPX3330投薬量(6.3 μ M)を除きすべてで相乗作用が認められた。示したデータは、3つの別個の細胞毒性アッセイの平均であり、各アッセイは培地のみ対照に対して規格化している。

10

【0189】

実施例20

この実施例では、APX3330並びにPDH及び α -KDH代謝阻害剤CPI-613の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、ヒト癌腫結腸細胞株HCT-116において分析した。

【0190】

HCT-116 (Yunhua Liu)を、96穴組織培養プレートに、DMEM+10% FBS中、1ウェルあたり2000細胞で播種し、37℃、5% CO₂で一晩成長させた。薬物培地DMEM+5% FBSを、CPI-613 (Apexbio Technology) 100 μ M若しくは75 μ Mを加えた100 μ M~0.4 μ Mの10点広がり(10 point)のAPX3330 (Apexian)の投薬量、又は単剤のみで添加した。細胞を、37℃、5% CO₂で72時間インキュベーションした。培地を、DMEM+5% FBS+10% Alamar Blue 蛍光性細胞生存指示薬(インビトロジェン (Invitrogen) (商標))に交換し、37℃、5% CO₂で4時間インキュベーションし、次いで蛍光リーダー (SYNERGY (商標) H4 BioTek) 上で読み取った。図33Aは、APX3330及びCPI-613の単剤の効果を示す。図33Bは、APX3330及びCPI-613の相乗的な組み合わせ効果を示す。図33Cは、APX3330及びCPI-613 EC50 (CalcuSyn)を示す。図33Dは、用量組み合わせのチョウタレイ指数(CI) (CalcuSyn)を描く。図33Eは、100 μ M CPI-613又は75 μ M CPI-613を加えたAPX3330の相乗的な薬物組み合わせ (CalcuSyn)を描く。100 μ M CPI-613を加えた場合に、すべてのAPX3330投薬量で薬物組み合わせの相乗作用が認められた。75 μ M CPI-613を加えた場合に、100 μ M~12.5 μ MのAPX3330投薬量で相乗作用が認められた。示したデータは、3つの別個の細胞毒性アッセイの平均であり、各アッセイは培地のみ対照に対して規格化している。

20

30

【0191】

実施例21

この実施例では、APX2014並びにPDH及び α -KDH代謝阻害剤CPI-613の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、ヒト癌腫結腸細胞株HCT-116において分析した。

40

【0192】

HCT-116 (Yunhua Liu)を、96穴組織培養プレートに、DMEM+10% FBS中、1ウェルあたり2000細胞で播種し、37℃、5% CO₂で一晩成長させた。薬物培地DMEM+5% FBSを、CPI-613 (Apexbio Technology) 75 μ M若しくは50 μ Mを加えた25 μ M~1.6 μ M 5点広がり(5 point)のAPX2014 (Apexian)の投薬量、又は単剤のみで添加した。細胞を、37℃、5% CO₂で72時間インキュベーションした。培地を、DMEM+5% FBS+10% Alamar Blue 蛍光性細胞生存指示薬(インビトロジェン (Invitrogen) (商標))に交換し、37℃、5% CO₂で4時間インキュベーションし、次いで蛍光リーダー (SYNERGY (商標) H4 BioTek) 上で読み取った。図34A

50

は、APX2014及びCPI-613の単剤の効果を示す。図34Bは、APX2014及びCPI-613の相乗的な組み合わせ効果を示す。図34Cは、APX2014及びCPI-613 EC50 (CalcuSyn)を示す。図34Dは、用量組み合わせのチョウタレイ指数CI) (CalcuSyn)を描く。図34Eは、50 μ M CPI-613又は75 μ M CPI-613を加えたAPX2014の相乗的な薬物組み合わせ (CalcuSyn)を描く。50 μ M CPI-613を加えた場合に、APX2014投薬量では薬物組み合わせの相乗作用は確認できなかった。75 μ M CPI-613を加えた場合に、1つのAPX2014投薬量 (12.5 μ M) のみで相乗作用が認められた。示したデータは、3つの別個の細胞毒性アッセイの平均であり、各アッセイは培地のみ対照に対して規格化している。

10

【0193】

実施例22

この実施例では、APX3330及びGLS1代謝阻害剤CB-839の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、ヒト癌腫結腸細胞株HCT-116において分析した。

【0194】

HCT-116 (Yunhua Liu)を、96穴組織培養プレートに、DMEM+10% FBS中、1ウェルあたり2000細胞で播種し、37℃、5% CO₂で一晩成長させた。薬物培地DMEM+5% FBSを、CB-839 (シグマアルドリッチ (Sigma-Aldrich))を1000 nM、又は500 nM加えたか又は単剤のみの100 μ M~0.4 μ Mの10点広がりのAPX3330 (Apexian)の投薬量で添加した。細胞を、37℃、5% CO₂で72時間インキュベーションした。培地を、DMEM+5% FBS+10% アラマブルー (Alamar Blue) 蛍光性細胞生存指示薬 (インビトロジェン (INVTROGEN) (商標))に交換し、37℃、5% CO₂で4時間インキュベーションし、次いで蛍光リーダー (SYNERGY (商標) H4 BioTek) 上で読み取った。図35Aは、APX3330及びCB-839単剤の効果を描く。図35Bは、APX3330及びCB-839の相乗的な組み合わせ効果を描く。図35Cは、APX3330及びCB-839 EC50 (CalcuSyn)を示す。図35Dは、用量組み合わせのチョウタレイ指数CI) (CalcuSyn)を示す。図35Eは、1000 nM CB-839又は500 nM CB-839 (5点のみ)を加えたAPX3330の相乗的な薬物組み合わせ (CalcuSyn)を描く。1000 nMを加えた場合に、APX3330投薬量100 μ M~25 μ Mで薬物組み合わせの相乗作用が認められた。500 nM CB-839を加えた場合に、APX3330投薬量100 μ M~50 μ Mで相乗作用が認められた。示したデータは、3つの別個の細胞毒性アッセイの平均であり、各アッセイは培地のみ対照に対して規格化している。

20

30

【0195】

実施例23

この実施例では、APX3330及びシスプラチンの併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、シスプラチン耐性膀胱細胞株BLCAb001において分析した。

【0196】

BLCAb001 (シスプラチン耐性)細胞株を、増加する濃度のAPX2014及びシスプラチンで、単剤として及び組み合わせで処置し、96時間生存率アッセイでアッセイした。APX2014の濃度は、示したシスプラチン用量と組み合わせで6 mM~0.38 mMの範囲である (図36A)。6 mM~3 mMの用量が併用効果 (combination index) > 1.0で、相乗的であることが示された。単剤としてのシスプラチンの濃度は、2.5 mM~0.04 mMの範囲である (図36B)。

40

【0197】

実施例24

この実施例では、APX3330及びシスプラチンの併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、シスプラチン耐性膀胱細胞株BLCAb002において分析した。

【0198】

50

B L C A b 0 0 2 (シスプラチン感受性)細胞株を、増加する濃度の A P X 2 0 1 4 及びシスプラチンで、単剤として及び組み合わせで処置し、96時間生存率アッセイでアッセイした。A P X 2 0 1 4 の濃度は、示したシスプラチン用量と組み合わせで 6 m M ~ 0 . 3 8 m M の範囲である (図 3 7 A)。6 m M ~ 1 . 5 m M の用量が併用効果 > 1 . 0 で、相乗的であることが示された。単剤としてのシスプラチンの濃度は 2 . 5 m M ~ 0 . 0 4 m M の範囲である (図 3 7 B)。

【0199】

実施例 25

この実施例では、A P X 2 0 1 4 及びナパブカシン (S T A T 3 阻害剤) の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、膀胱細胞株、T 2 4 において分析した。

10

【0200】

T 2 4 膀胱癌細胞を、A P X 2 0 1 4 (2 . 5 m M 又は 5 . 0 m M) の存在下又は不存在下で、増加する濃度のナパブカシンで 7 2 時間処置した。次いで、この細胞を固定し、メチレンブルーで染色し、相対細胞数を分光測光によって算出した。結果を図 3 8 A 及び図 3 8 B に示す。

【0201】

実施例 26

この実施例では、A P X 2 0 0 9 及びナパブカシン (S T A T 3 阻害剤) の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、膀胱細胞株 T 2 4 において分析した。

20

【0202】

T 2 4 膀胱癌細胞を、A P X 2 0 0 9 (2 . 5 m M 又は 5 . 0 m M ; 3 . 5 m M 又は 7 m M) の存在下又は不存在下で、増加する濃度のナパブカシンで 7 2 時間処置した。次いで、この細胞を固定し、メチレンブルーで染色し、相対細胞数を分光測光によって算出した。結果を図 3 9 A 及び図 3 9 B に示す。

【0203】

実施例 27

この実施例では、A P X 2 0 1 4 及びナパブカシン (S T A T 3 阻害剤) の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、膀胱細胞株 S C a B E R において分析した。

【0204】

S C a B E R 膀胱癌細胞を、A P X 2 0 1 4 (2 . 5 m M 又は 5 . 0 m M) の存在下又は不存在下で、増加する濃度のナパブカシンで 7 2 時間処置した。次いで、この細胞を固定し、メチレンブルーで染色し、相対細胞数を分光測光によって算出した。結果を図 4 0 A 及び図 4 0 B に示す。

30

【0205】

実施例 28

この実施例では、A P X 2 0 0 9 及びナパブカシン (S T A T 3 阻害剤) の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、膀胱細胞株 S C a B E R において分析した。

【0206】

S C a B E R 膀胱癌細胞を、A P X 2 0 0 9 (2 . 5 m M 又は 5 . 0 m M ; 3 . 5 m M 又は 7 m M) の存在下又は不存在下で、増加する濃度のナパブカシンで 7 2 時間処置した。次いで、この細胞を固定し、メチレンブルーで染色し、相対細胞数を分光測光によって算出した。結果を図 4 1 A 及び図 4 1 B に示す。

40

【0207】

実施例 29

この実施例では、A P X 2 0 0 9 及び C A 9 阻害の併用治療剤を、その腫瘍死滅能について、膵管腺癌 (P D A C) において分析した。

【0208】

細胞培養：この実施例で使用した低継代患者由来 P D A C 細胞株及び膵臓癌関連線維芽細胞を A n i r b a n M a i t r a 博士 (ジョンズ・ホプキンス大学 (The J o h n s H o p k i n s U n i v e r s i t y)) から受け取り、L o g s d o n ら (2

50

016 Mol Cancer Ther 15 (11) : 2722-2732)、Fishelら (2011 Mol Cancer Ther 10 (9) : 1698-1708)、Suら (2011 Biochem 50 : 82-92)、及びZhangら (2013 Biochem 52 (17) : 2955-2966) に記載されるように維持した。細胞をSTR分析 (IDEXX BioResearchによるCell Check) のために提出し、Mycoplasma (マイコプラズマ) 混入について規定どおりに試験した。細胞株は、12回以上は継代させず、その後は新鮮なストックを蘇生させた。単層実験における低酸素条件は、Ruskin Invivo₂ 200低酸素ワークステーション (Baker Ruskin; サンフォード (Sanford)、メイン州) 中で、0.2%酸素で発生させた。単層培養物における細胞増殖及び生存率を、アラマブルー (AlamarBlue) アッセイを用いて測定した。三次元腫瘍スフェロイド培養物の成長を、Logsdonら (2016 Mol Cancer Ther 15 (11) : 2722-2732)、Sempereraら (2011 Cancer Biol & Ther 12 (3) : 198-207)、及びArpinら (2016 Mol Cancer Ther 15 (5) : 794-805) に記載されているように実施し、定量した。

10

【0209】

ウエスタンブロット解析：免疫ブロットを、APE1/Ref-1 (Novus Biologicals; リトルトン (Littleton)、コロラド州)、CA9 (Santa Cruz; ダラス (Dallas)、テキサス (Texas))、アクチン (NeoMarkers; フリーモント (Fremont)、カリフォルニア州)、及びビンキュリン (シグマ (Sigma); セントルイス (St. Louis)、ミズーリ州) に対する抗体を使用して実施した。すべての試料を、Logsdonら (2016 Mol Cancer Ther 15 (11) : 2722-2732) 及びFishelら (2011 Mol Cancer Ther 10 (9) : 1698-1708) に記載されているように、処理し、同時並行で実施した。

20

【0210】

siRNAトランスフェクション：PDAC細胞を、Logsdonら (2016 Mol Cancer Ther 15 (11) : 2722-2732)、Fishelら (2011 Mol Cancer Ther 10 (9) : 1698-1708)、及びArpinら (2016 Mol Cancer Ther 15 (5) : 794-805) にこれまでに記載されたとおりにsiRNAを用いてトランスフェクトした。使用したsiRNAは、スクランブル対照及びsiAPE1/Ref-1 (配列番号1～配列番号3)、並びにOriGene (ロックビル (Rockville)、メリーランド州) Trisilencer siCA9であった。

30

【0211】

阻害剤：小分子阻害剤を、Logsdonら (2016 Mol Cancer Ther 15 (11) : 2722-2732)、Fishelら (2011 Mol Cancer Ther 10 (9) : 1698-1708)、Suら (2011 Biochem 50 : 82-92)、及びZhangら (2013 Biochem 52 (17) : 2955-2966) にこれまでに記載されたとおりに調製し、使用した。APX3330、APX2009、及びAPX2014 (Apexian Pharmaceuticals; インディアナポリス、インディアナ州) を、構造的には類似しているがAPE1/Ref-1レドックスシグナル伝達活性を阻害しない (Shahら、2017 NPJ Precision Oncology 1; Kelleyら、2017 Neural Regen Res 12 (1) : 72-74; Kelleyら、2016 J Pharmacol Exp Ther 359 (2) : 300-039; Fishelら、2011 Mol Cancer Ther 10 (9) : 1698-1708) 陰性対照として使用したRN7-58 (Apexian Pharmaceuticals) とともに使用して、APE1/Ref-1レドックスシグナル伝達を阻害した。C

40

50

A9阻害は、SLC-0111及びFC12-531A(Logsdonら(2016 Mol Cancer Ther 15(11):2722-2732);Supuranら、2015 Expert Opinion on Drug Discovery 10(6):591-597;Chenら、2017 Am Soc Hematology;Koenigら、2017 Experimental Hematology 53、S88;Fishelら(2011 Mol Cancer Ther 10(9):1698-1708)を用いて成し遂げた。これらの化合物のすべてを最小毒性でマウスに投与したが、進行中の研究は、それらの安全性及び効力を、単独で、及び他の薬剤と組み合わせてインビボで評価している。

【0212】

ChIPアッセイ：クロマチン免疫沈降(ChIP)を、Magna ChIPキット(ミリポア(Millipore))を使用して実施した。免疫沈降(IP)を、HIF1 α (Novus)に対するポリクローナル抗体又はウサギIgG対照(ミリポア(Millipore))を使用して実施した。CA9プロモーター中のHIF-1結合部位(HBS)への結合を、CFX96 Real-Time System(バイオラッド(Bio-Rad))においてSYBR Greenマスターミックス(アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems))を使用してqPCRによって測定した。ChIP qPCRのために使用したプライマー配列は以下のとおりであった：CA9 HBS-Fwd(5' - CTCACCTCCACCCCAATCCTA - 3') (配列番号32)及びCA9 HBS-Rev(5' - GGACCGAGGGAAGACAACCTAG - 3') (配列番号33)。各試料からの架橋DNAの1%を、試料にわたってqPCRシグナルを規格化するための対照(インプット)として評価した(IPなし)。

【0213】

pHアッセイ：細胞内pHを、Logsdonら(2016 Mol Cancer Ther 15(11):2722-2732)に記載されているとおり、pHrodo Red AM Intracellular pH Indicator(Life Technologies)を用いて測定した。pHrodo Red AMに曝露した細胞の蛍光像を、Logsdonら(2016 Mol Cancer Ther 15(11):2722-2732)にこれまでに記載されたとおり、Indiana Center for Biological Microscopy施設(インディアナポリス、インディアナ州)にある共焦点/2光子Olympus Fluoview FV-1000MPEシステム((オリンパスサイエンティフィックソリューションズアメリカ(Olympus Scientific Solutions America));ウォルサム(Waltham)、マサチューセッツ州)を用いて記録した。

【0214】

qRT-PCR：mRNAレベルを、Logsdonら(2016 Mol Cancer Ther 15(11):2722-2732)、Fishelら(2011 Mol Cancer Ther 10(9):1698-1708)、Fischerら(2015 J Biol Chem 290(5):3057-3068)にこれまでに記載されたとおり、qRT-PCRを使用して測定した。比較Ct定量法(comparative Ct method)を使用して、RPLP0及びB2Mを基準遺伝子として用いてmRNAレベルを定量化した。CA9、RPLP0、及びB2Mに対するプライマーは市販されている(アプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems))。実験を、各試料につき三重に実施した。

【0215】

免疫組織化学(IHC)：プレーティング後12日目に三次元スフェロイド培養物を採取し、4%パラホルムアルデヒド(PFA)(Electron Microscopy Sciences;ハットフィールド(Hatfield)、ペンシルベニア州)で固定し、70%エタノールで透過処理した。固定/透過処理した三次元培養物をHisto

10

20

30

40

50

Gel (Life Tech) 中で凝固させた。Hist oGel プラグをパラフィンに包埋し、Keith Condon 博士 (インディアナ大学医学部 (Indiana University School of Medicine) ; インディアナポリス、インディアナ州) の研究室によってスライドを調製した。試料を、特定の抗体を用いてインディアナ大学医学部研究免疫組織化学施設 (Indiana University School of Medicine Research Immunohistochemistry Facility) (インディアナポリス、インディアナ州) によって染色した。

【0216】

統計解析: 3 群以上を用いた実験における比較は、事後の多重比較検定 (適宜、Tukey、Dunnett、又は Sidak) を用いて解析した。Logsdon ら (2016 Mol Cancer Ther 15 (11): 2722-2732)、McHugh (2011 Biochem 21 (3): 203-209)、及び Stevens ら (2017 PloS One 12 (4): e0176124)。 $p < 0.05$ の場合に、群間の差は有意であると考えた。統計解析は、マイクロソフトエクセル (Microsoft Excel) 及びプリズム (Prism) (バージョン 6.0f、著作権 2014 グラフパッドソフトウェア (GraphPad Software Inc.)、ラホヤ (La Jolla)、カリフォルニア州) を用いて実施した。

【0217】

結果

PDAC 細胞における APE1 / Ref-1 - HIF-1 - CA9 シグナル伝達軸 (シグナル経路)

APE1 / Ref-1 及び / 又は CA9 阻害に対する異なる PDAC 患者株の応答を特徴づけるために、小分子阻害剤 SLC-0111 又は siRNA による CA9 の阻害の効果を、患者由来の細胞において評価した。CA9 は低酸素調節性酵素として十分に確立されているが、低酸素条件下で誘導される CA9 発現のレベルは、患者株間でばらつく。それゆえ、低継代患者由来 PDAC 細胞株 (10.05、Pa02C、及び Pa03C) の選択物における相対的 CA9 発現を、0.2% 酸素への曝露の 24 時間後に、正常酸素圧状態でインキュベーションした細胞と比べて決定した。低酸素曝露は、癌関連線維芽細胞 (CAF19) を含めてすべての細胞株で有意に CA9 タンパク質レベルを誘導した (2.5 ~ 21.5 倍) (図 42A)。しかしながら、CA9 は、10.05 細胞 (酸素正常状態に対して 21.5 倍) において最も強く誘導され、Pa03C 細胞は、最低レベルの低酸素誘導 CA9 タンパク質 (酸素正常状態に対して 2.5 倍) を有していた。注目すべきことに、APE1 / Ref-1 発現は、これらの細胞において、低酸素曝露によって有意な影響を受けなかった。10.05 細胞の強い CA9 誘導が理由で大多数の機能的実験を 10.05 細胞において評価し、CA9 が弱い Pa03C 細胞の中で繰り返し、応答を確認し比較した。

【0218】

フェーズ I 臨床試験を最近終了した CA9 阻害剤である SLC-0111 の効力を、比較のために、低酸素条件下で異なる PDAC 細胞株中で評価した。試験した患者由来の PDAC 細胞株の 3 つすべてが、低酸素曝露の間、100 μ M 未満の SLC-0111 についての LC_{50} を有していたのに対し (図 42B)、最も感受性が高い細胞株は 10.05 であり、10.05 は低酸素曝露後に最高レベルまで CA9 発現を誘導する (図 42A)。実際、低酸素下での CA9 タンパク質の誘導は、試験した細胞株では、低酸素下での SLC-0111 の LC_{50} と逆相関し ($R^2 > 0.99$) (図 42B)、これは、CA9 誘導の増加が PDAC 細胞における CA9 阻害に対する感受性の上昇を予測しようということを示す。

【0219】

単層で成長した膵臓癌細胞と三次元腫瘍スフェロイドで成長した膵臓癌細胞とにおける CA9 の誘導を比較した。10.05 単層培養物における低酸素チャンバーを用いた 0.

10

20

30

40

50

2%低酸素への曝露後、CA9は約2.1倍誘導された(図4.2A及び図4.2C)。CAFを伴うか又は伴わない三次元腫瘍スフェロイド系を用いると、CA9発現は、これらのスフェロイド培養物が正常酸素圧状態で成長したにもかかわらず、低酸素性単層培養物に対してそれぞれ2.5倍及び6.2倍さらに増加した(図4.2C)。この三次元培養物モデルの関連性に基づき、CA9及びAPE1/Ref-1の阻害の効果をこの系でさらに評価した。

【0220】

APE1/Ref-1及びCA9の発現のノックダウンを三次元スフェロイド培養物において評価し、この関連する微小環境におけるPDAC細胞の成長及び生存がCA9及びAPE1/Ref-1の発現に依存するか否かを判定した。スフェロイドを8日目に採取して、CA9及びAPE1のノックダウンが続いていることを確認した。各siRNAはその標的遺伝子/酵素産物の発現を有意に低下させ、このことは、この三次元培養物の継続期間全体にわたって、これらの酵素のノックダウンが続くことを確認した。APE1/Ref-1ノックダウンも、siCA9培養物で見られた程度と同程度にCA9発現を減少させた(図4.2D、図1D)。APE1/Ref-1及び/又はCA9の低下したレベルは、蛍光強度及び面積によって測定した三次元腫瘍スフェロイド成長を有意に約50~80%($p < 0.001$)遅延させた(図4.2E及び図4.2F)。これらの結果は、PDAC腫瘍成長におけるAPE1/Ref-1及びCA9発現の重要性を確認する。加えて、APE1/Ref-1ノックダウンは、三次元腫瘍スフェロイド成長をCA9ノックダウンよりも有意に大きく遅延させ、このことは、PDAC腫瘍成長を減弱することについて、CA9の阻害だけでは、これらの酵素を二重標的にすることほどには効率的ではない可能性があるということを示した。

【0221】

APE1/Ref-1レドックスシグナル伝達の阻害は、HIF-1媒介性CA9転写及びその後の発現を減少させた(図4.2D)。これが、HIF1 α がCA9プロモーターに結合することに対する直接の効果の結果であるか否かを判定するために、クロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイを実施して、HIF-1-DNA相互作用を検討した。10.05細胞をAPE1/Ref-1レドックスシグナル伝達阻害剤APX3330で処置し、0.2%O₂に12時間曝露した。HIF1 α の免疫沈降(IP)は、CA9プロモーター中のHIF-1結合部位(HBS)に結合するHIF1 α の、低酸素条件下での4.3倍増加を明らかにしたが、CA9プロモーター中のHIF-1結合部位(HBS)に結合するHIF1 α は、APX3330で処置した細胞では約60%減少した(図4.2G及び図4.2H)。これらのデータは、HIF1 α とCA9プロモーターとの相互作用が低酸素によって誘導されること、及びこれらの低酸素誘導相互作用がAPE1/Ref-1レドックスシグナル伝達阻害によって減弱されたことを明らかにし、このことは、APE1/Ref-1レドックスシグナル伝達が低酸素条件下でHIF-1媒介性CA9転写を制御する作用機序をさらに確認させる。

【0222】

APE1/Ref-1又はCA9の阻害によるCA9の遮断

標的選択性を判定するために、APX3330の類似体であるAPX2009及びAPX2014、並びにSLC-0111の類似体であるFC12-531Aを使用した。これらの類似体のすべてが、低酸素条件下でそれらの親化合物に勝る改善された細胞毒性を明確に示した(表7)。

【0223】

低酸素誘導のCA9 mRNAレベル及びタンパク質レベルを、10.05細胞においてAPX3330、APX2009、APX2014、及び不活性な類似体RN7-58を用いた処置の後に評価した。すべての3つの阻害剤によるAPE1/Ref-1の阻害は、低酸素誘導のCA9 mRNAレベル及びタンパク質レベルの濃度依存的減少を生じ、APX2009及びAPX2014ではAPX3330よりも10倍少なく必要とされ(図4.3A及び図4.3B)、このことは、これらの類似体がAPX3330よりも強力な

A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達の阻害剤であることを示した。不活性な類似体 (R N 7 - 5 8) は、1 0 0 μ M であっても低酸素誘導 C A 9 発現に影響を及ぼさず、このことは、他の化合物で見られた効果に A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達活性が選択的に寄与していることをさらに確認した。

【0224】

C A 9 タンパク質発現に対する A P E 1 / R e f - 1 レドックス阻害の効果も、三次元腫瘍スフェロイドにおいて測定した。1 0 . 0 5 細胞を12日間三次元培養物において成長させ、4日目及び8日目に A P X 3 3 3 0、A P X 2 0 0 9 及び A P X 2 0 1 4、又は不活性な類似体 (R N 7 - 5 8) で処置した。A P E 1 / R e f - 1 レドックス阻害は、三次元腫瘍培養物における C A 9 の発現タンパク質を濃度依存的に有意に減少させた (図 4 3 C)。重要なことに、A P X 2 0 0 9 及び A P X 2 0 1 4 A P E 1 / R e f - 1 阻害剤は、スフェロイド培養物において C A 9 発現を減弱させるためには、A P X 3 3 3 0 と比べて10倍少ない濃度しか必要とされず、このことは、これらの化合物の効力をさらに検証する。不活性な類似体 (R N 7 - 5 8) は、P D A C スフェロイド培養物における C A 9 発現に影響を及ぼさず、このことは、H I F 1 α 活性に対する A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達阻害剤の効果の特異性を再び裏付ける。

【0225】

C A 9 発現は、腫瘍細胞成長にとって重要であり、C A 9 は、細胞内 p H を安定させて、低酸素条件下で代謝変化に応答して起こる酸性化を弱めることにより機能する。C A 9 活性についての機能的マーカーとして、細胞内 p H に対する C A 9 の効果を評価した。低酸素曝露 (0 . 2 % O₂ に48時間) は、1 0 . 0 5 細胞において細胞内 p H に有意な影響を及ぼさず (図 4 3 D 及び図 4 3 E)、このことは、これらの細胞が p H に対する低酸素の効果を補うことを示す。しかしながら、C A 9 発現が s i R N A によって低下するとき、結果は、p H 感受性の p H r o d o Red AM 染料の蛍光の増加によって測定されるとおり、低酸素曝露細胞における細胞内 p H の有意な低下であった (図 4 3 D 及び図 4 3 E)。これらのデータは、C A 9 がこれらの細胞において p H を制御することを担うという結論を支持する。

【0226】

A P X 3 3 3 0 及び S L C - 0 1 1 1 は、単剤では、A P X 3 3 3 0 は 5 0 μ M 以下、又は S L C - 0 1 1 1 は 1 0 0 μ M 以下の濃度で細胞内 p H に影響を及ぼさず、低酸素性 P D A C 細胞を酸性化するために両方の化合物の組み合わせが必要である。それゆえ、A P X 3 3 3 0 類似体、A P X 2 0 0 9 及び A P X 2 0 1 4、を使用して、十分に強力な阻害剤が与えられれば A P E 1 / R e f - 1 レドックス阻害だけで低酸素性 P D A C 細胞において細胞内 p H をシフトさせることができるか否かを判定した。8 μ M A P X 2 0 0 9 又は 5 μ M A P X 2 0 1 4 のいずれかをを用いた処置だけで有意な蛍光 (細胞生存に対して規格化した) の増加を生じ、単剤の A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達阻害による細胞内 p H の低下を示す (図 2 D ~ 図 2 E)。A P E 1 / R e f - 1 阻害後の C A 9 発現の減少に起因して、これらのデータは、細胞を酸性化するには A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達阻害だけで十分であったことを示す。合わせて考えると、図 4 3 D 及び図 4 3 E のデータは、s i R N A 又は A P E 1 / R e f - 1 レドックス阻害のいずれかによる C A 9 発現の減少が低酸素性 P D A C 細胞において細胞内酸性化を生じるということを示していた。

【0227】

これらの機構的結果に従って、A P E 1 / R e f - 1 レドックスシグナル伝達阻害剤 A P X 2 0 0 9 及び A P X 2 0 1 4 の効果を、1 0 . 0 5 (図 4 3 F) 又は P a 0 3 C (図 4 3 G) 腫瘍細胞を使用した三次元 P D A C 腫瘍及び C A F の共培養物において A P X 3 3 3 0 と比較した。これらの類似体の各々が、この三次元腫瘍スフェロイドモデルにおいて A P X 3 3 3 0 よりも 4 ~ 5 0 倍低い L C₅₀ を呈し (表 7)、このことは、それらが、その腫瘍成長阻害効果において A P X 3 3 3 0 と比べて改善された効力を有するということを示唆する。同様に、C A 9 阻害剤 S L C - 0 1 1 1 のより強力な類似体 F C 1 2 -

531Aは、この三次元腫瘍スフェロイドモデルにおいて、SLC-0111よりも約15倍低い LC_{50} を呈し（図43H及び図43I、表7）、その腫瘍成長阻害効果におけるSLC-0111に勝る改善された効力を実証した。驚くべきことに、表7に示すように、APX2009及びAPX2014は、親化合物APX3330と比べて単剤としてはより強力であった。組み合わせ研究において、類似体APX2009及びAPX2014は、より良好な組み合わせ効果を成し遂げるためにはるかに低い濃度で 사용할 ことができる。

【0228】

【表 7】

表7

			Panc10.05	Pa03C
単層 (低酸素症)		APX3330	40.3	50.2
		APX2009	4.9	6.7
		APX2014	1.3	3.5
		SLC-0111	63.9	90.8
		FC12-531A	1.4	1.1
三次元培養物	腫瘍単独	APX3330	44.5	37.9
		APX2009	9.4	6.9
		APX2014	0.3	1.1
		SLC-0111	64.0	51.9
		FC12-531A	4.8	3.0
	腫瘍 + CAFs	APX3330	57.9	41.6
		APX2009	13.0	8.4
		APX2014	1.2	2.4
		SLC-0111	70.8	64.1
		FC12-531A	4.9	3.8
	CAFs	APX3330	59.4	57.3
		APX2009	14.1	13.1
		APX2014	6.3	7.1
		SLC-0111	98.2	97.0
		FC12-531A	4.6	5.3

*N = 3

** すべての濃度はμM単位である

****三次元培養物データはD12 曲線から算出した

【0229】

三次元培養物におけるAPE1 / Ref-1 及びCA9の二重標的化の効果

H & E 染色、ビメンチン（共培養内でCAFを検出するため）、及びMasson's Trichrome（マッソントリクローム）を使用して三次元スフェロイド培養物の

10

20

30

40

50

特性解析を実施した（図44A～図44C）。これらのデータは、三次元共培養物において腫瘍細胞がCAFよりも密に充填されていることを示し、マッソントリクローム染色は、CAFがコラーゲン等の細胞外マトリクス（ECM）成分を沈着させていることを示し、PDAC患者で見られた線維性腫瘍を表すものとしてのこのモデルの妥当性を示した。注目すべきことに、試験したすべての三次元培養物において、APE1／Ref-1染色は主として核で起こり、培養物全体にわたって腫瘍細胞において均一であるように見えた（図44D）。さらには、低酸素マーカーCA9及びグルコーストランスポーター1（Glut-1）は、異なる領域で陽性を示し（図44E及び図44F）、スフェロイド培養物内の低酸素の差別的ゾーンを示した。これらのデータは、この三次元腫瘍スフェロイドモデルにおいてPDAC細胞を培養することは、低酸素状態を外部から誘導する必要なしにCA9を発現する低酸素性細胞を生じるということを明らかにした。

10

【0230】

APE1／Ref-1レドックスシグナル伝達阻害は、第二世代阻害剤を用いたCA9阻害に対する三次元PDAC腫瘍スフェロイドの感受性を高めた。

【0231】

APX3330及びSLC-0111を用いた併用治療は、PDAC腫瘍細胞及びCAFとともに含有する三次元共培養物において、共培養の12日目に、スフェロイド共培養物中のCAFに対する最小効果を伴って腫瘍細胞成長を有意に減弱した。上記化合物の経時的な成長阻害効果の特徴づけて、最適のレジメンを決定するために、培養の時間を16日間に延ばし、各処置後の成長についてアッセイした。両方の患者由来の細胞株において、上記併用治療剤は、単独療法よりも有効であった。SLC-0111も、三次元共培養物において10μMのAPX2009又は0.6μMのAPX2014と組み合わせたところ、これらは50μMのAPX3330と同様の結果を示した。

20

【0232】

PDAC細胞におけるCA9阻害及びAPE1／Ref-1阻害の効果をさらに判定するために、SLC-0111類似体FC12-531Aを用いた。このFC12-531Aは、このモデルにおいて、上記腫瘍細胞におけるSLC-0111と同じ傾向を示したが、同様の効果を成し遂げるためには実質的により低い濃度しか必要でなかった（3μM FC12-531A対50μM SLC-0111）。具体的には、3μM FC12-531A単独療法は、Pa03C共培養物において腫瘍細胞成長に有意に影響を与えたが、10.05共培養物では有意な影響を与えず、FC12-531Aは、10.05共培養物及びPa03C共培養物の両方において、三次元腫瘍細胞成長に対するAPX3330、APX2009、及びAPX2014の効果を有意に増強した（図45A～図45R）。これらのデータは、APE1／Ref-1レドックスシグナル伝達及びCA9活性の二重標的化による増強されたPDAC腫瘍細胞死滅を示す一方で、改善された効力を有する新規な阻害剤を推進する結果の妥当性を示し、このことは、最も強力な組み合わせ（0.6μM APX2014＋3μM FC12-531A、図4M～図4R）のように、使用する各薬物のナノモル～低マイクロモル濃度を可能にする。

30

【0233】

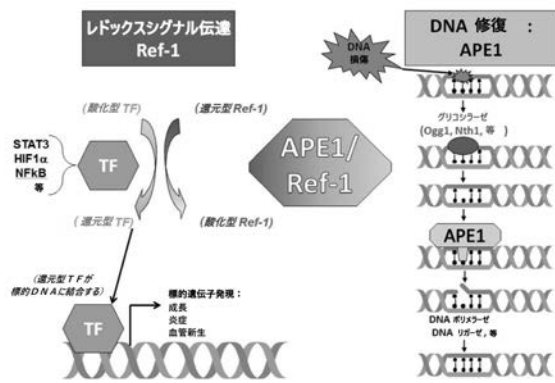
これらの結果は、APE1／Ref-1レドックスシグナル伝達を、HIF-1媒介性転写を経由してCA9の発現及び活性へとつなぐAPE1／Ref-1調節ノード（regulatory node）の腕を明らかにする（図46）。具体的には、本明細書中に提示した結果は、三次元PDAC腫瘍培養物においてAPE1／Ref-1レドックスシグナル伝達及びCA9活性を二重標的にして、スフェロイド共培養物において腫瘍細胞の増強された死滅を生じるために、臨床化合物の新規な類似体を使用して、このシグナル伝達軸（シグナル経路）の重要性を広げる。本明細書中に提示した結果は、HIF-1とその主要な転写標的のうちの1つのプロモーターとの、低酸素に誘導される相互作用がAPE1／Ref-1レドックスシグナル伝達阻害後に低下することを初めて示し（図42C）、HIF-1媒介性転写に対するAPE1／Ref-1の寄与を理解する上で鍵となる橋を提供する。

40

50

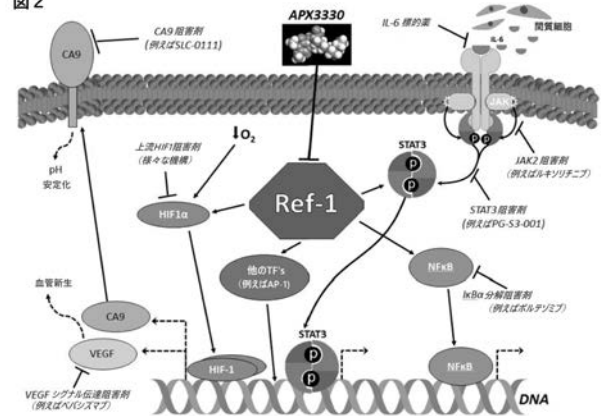
【図 1】

図 1



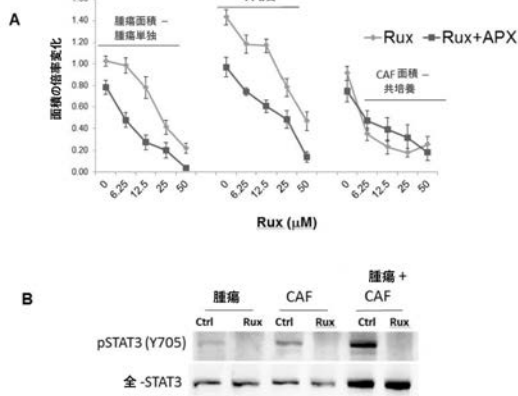
【図 2】

図 2



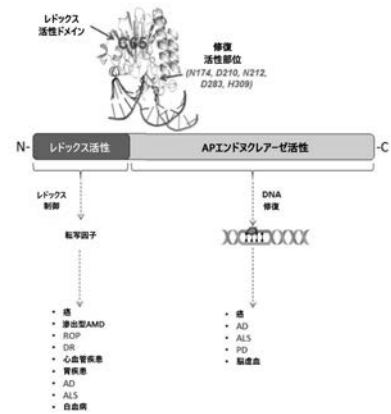
【図 3】

図 3 A-3 B

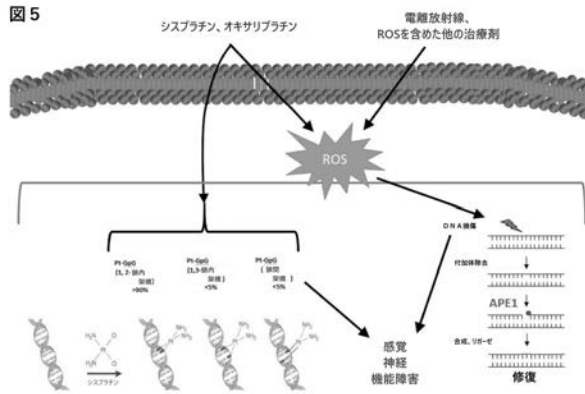


【図 4】

図 4

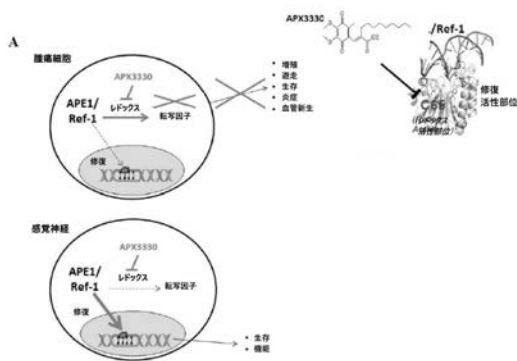


【図 5】



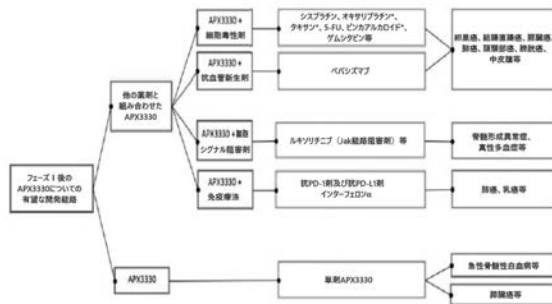
【図 6 - 1】

図 6 A



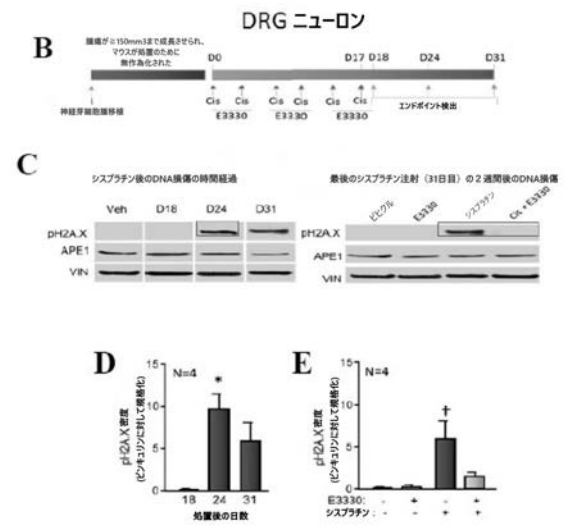
【図 7】

図 7



【図 6 - 2】

図 6 B - 6 E



【図 8】

図 8 A - 8 C

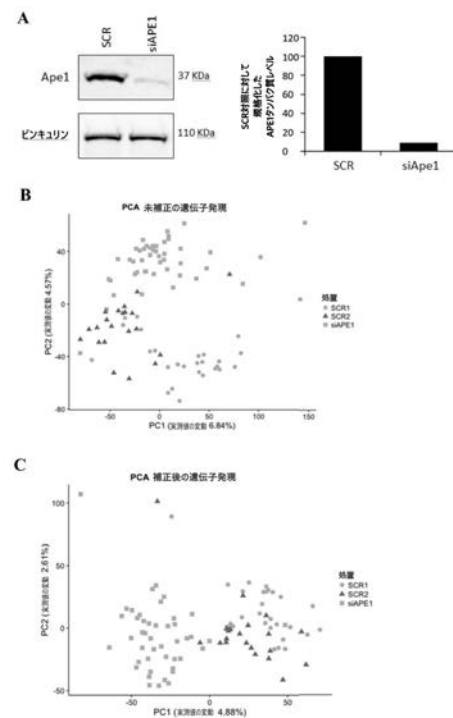
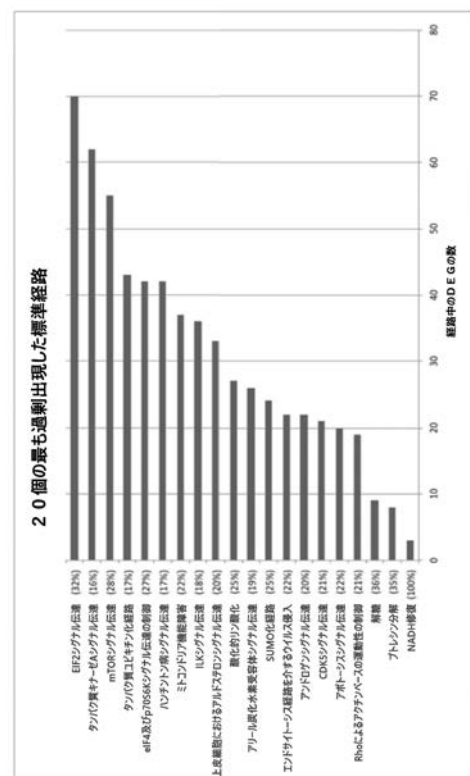
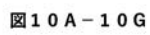
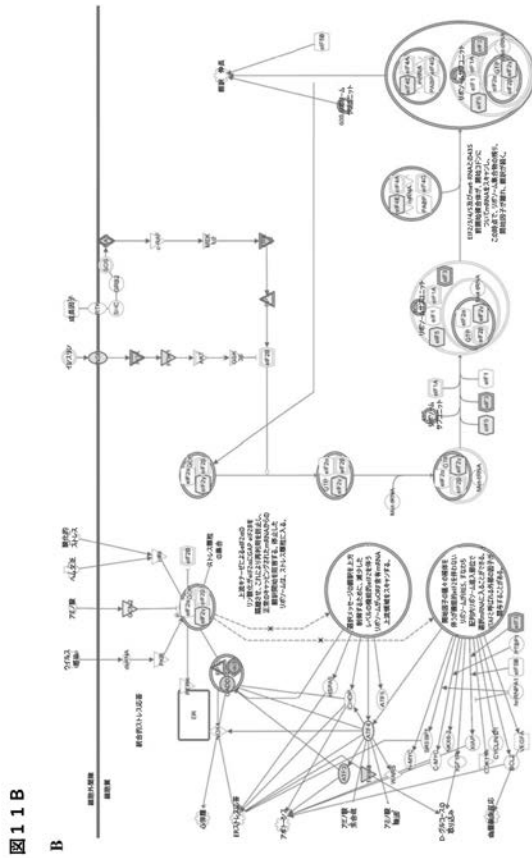


图 9 A - 9 B

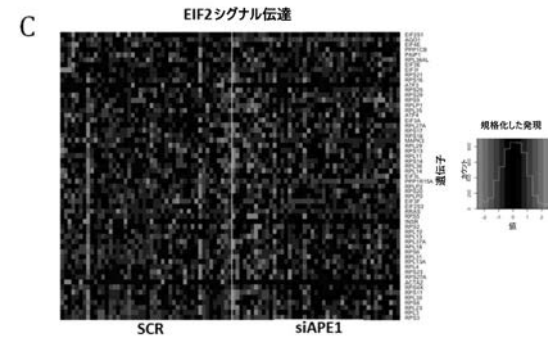


【図 1 1 - 2】



【図 1 1 - 3】

図 1 1 C



【図 1 2 - 1】

図 1 2 A - 1 2 B

図 1 2 A - 1 2 B

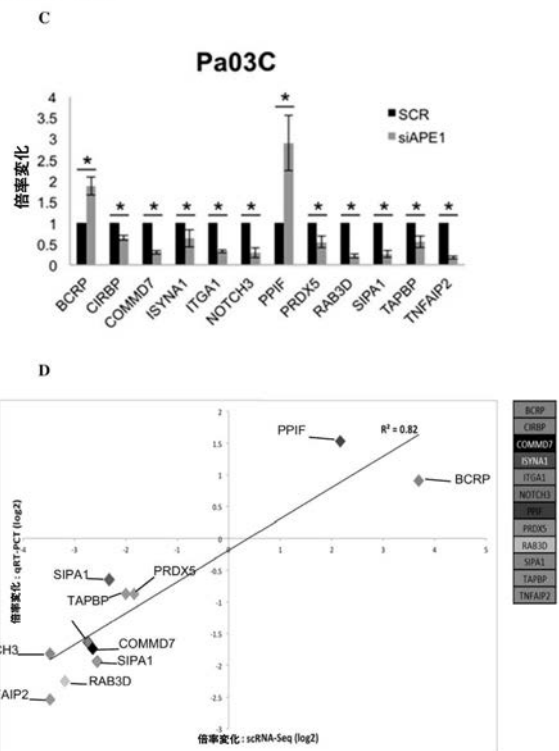
影響を受ける遺伝子	経路/役割	倍率変化	有意性 (調整済みp値)
BCRP	ATP結合カセット 輸送	12.9	0.011
CIRBP	低温ショック応答	0.20	7.92×10^{-7}
ITGA1	エンドサイトーシス経路を介するウイルス侵入	0.15	0.015
NOTCH3	シグナル伝達	0.09	4.87×10^{-7}
PPIF	ミトコンドリアタンパク質の折りたたみ及び膜透過	4.48	0.008
PRDX5	ミトコンドリア機能障害 経路	0.28	6.86×10^{-13}
RAB3D	細胞内輸送	0.11	1.29×10^{-7}
SIPA1	GTPアーゼ活性化	0.17	1.33×10^{-6}
TAPBP	ペプチド-ディンク複合体、抗原提示経路	0.25	1.81×10^{-10}

B

遺伝子	SCR/siAIP1		検出可能 siAIP1/検出不能 siAIP1		SCR/検出可能 siAIP1/検出不能 siAIP1	
	倍率変化	有意性 (調整済みp値)	倍率変化	有意性 (調整済みp値)	倍率変化	有意性 (調整済みp値)
COMMD7	0.16	0.003	0.06	0.038	6.18×10^{-6}	
ISYNA1	0.2	0.013	0.019	0.046	0.0005	
TNFAIP2	0.09	0.004	0.01	0.034	5.15×10^{-6}	

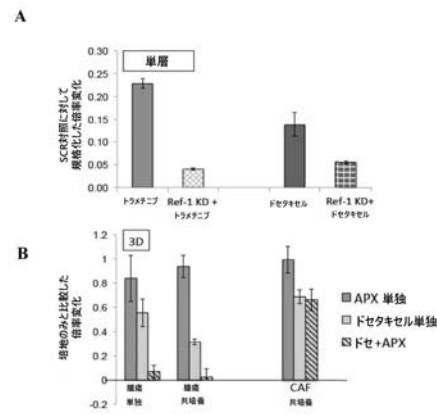
【図 1 2 - 2】

図 1 2 C - 1 2 D



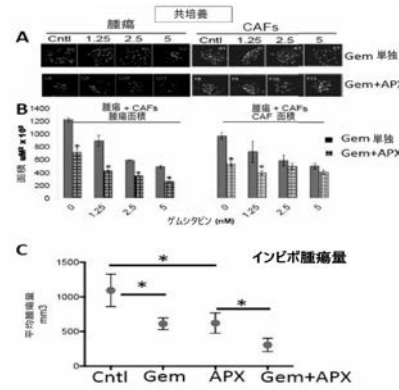
【図 13】

図13A-13B



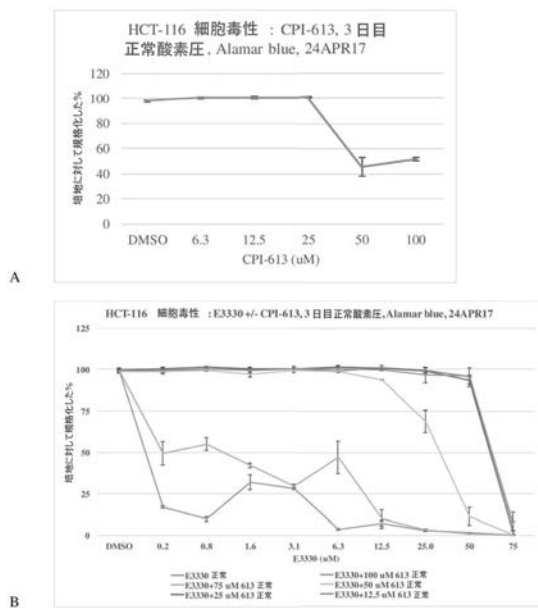
【図 14】

図14A-14C



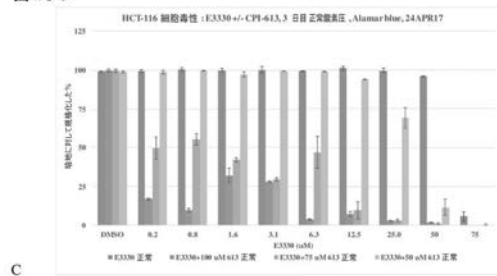
【図 15 - 1】

図15A-15B



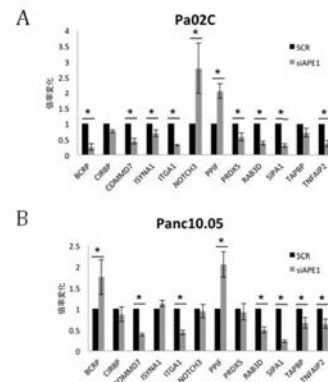
【図 15 - 2】

図15C



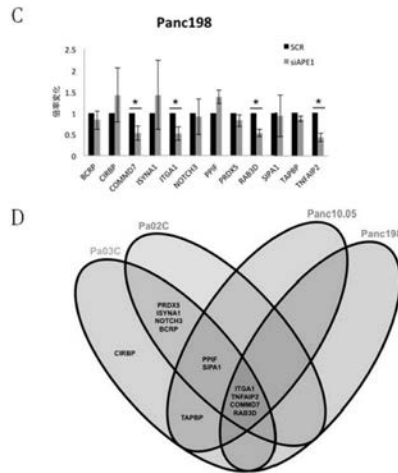
【図 16 - 1】

図16A-16B



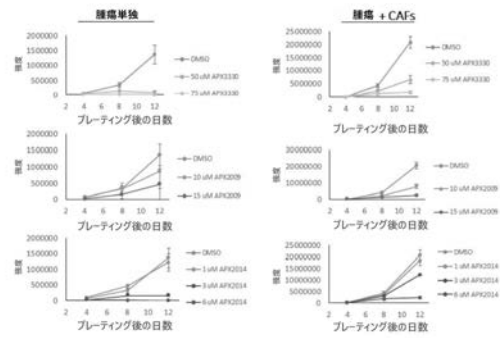
【図 16-2】

図 16C-16D



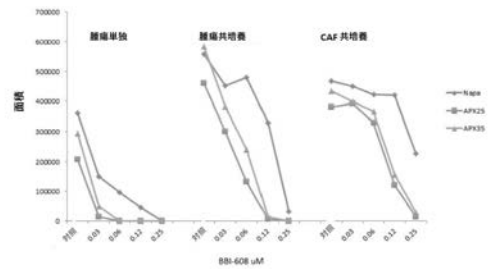
【図 17】

図 17



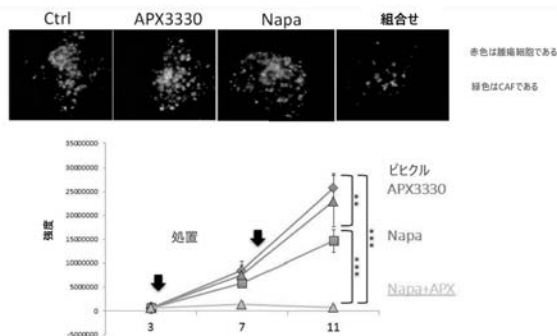
【図 18】

図 18



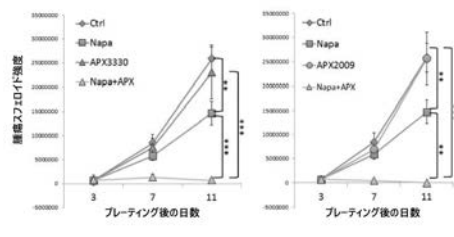
【図 19】

図 19



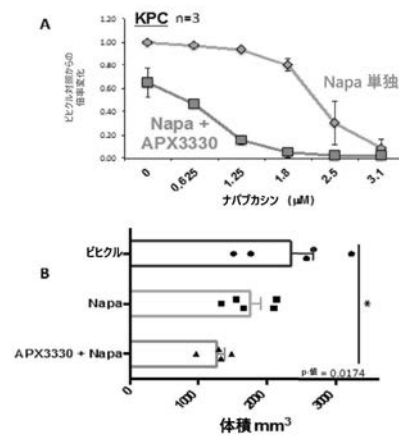
【図 20】

図 20A-図 20B



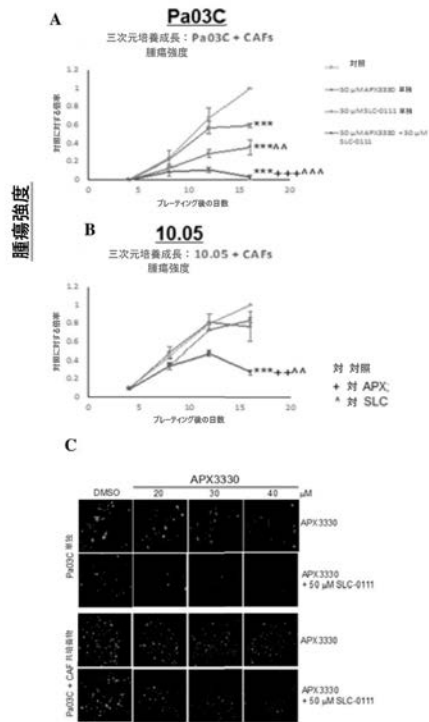
【図 21】

図 21A-21B



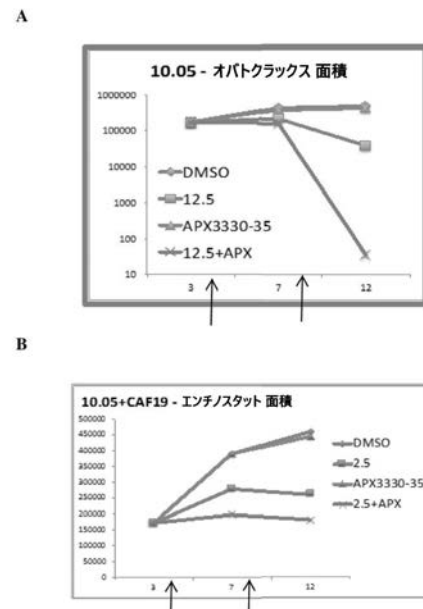
【図 2 2】

図 2 2 A-2 2 C



【図 2 3 - 1】

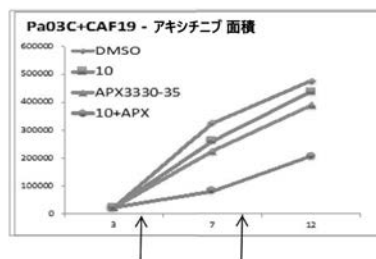
図 2 3 A-2 3 B



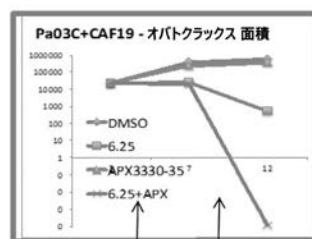
【図 2 3 - 2】

図 2 3 C-2 3 D

C

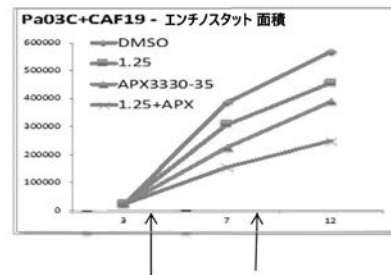


D



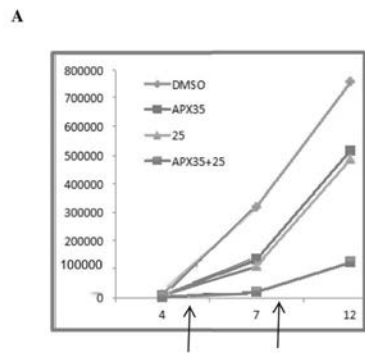
【図 2 3 - 3】

図 2 3 E



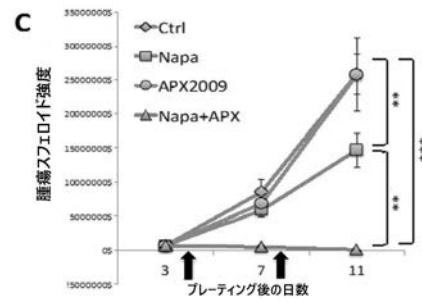
【図 2 4 - 1】

図 2 4 A-2 4 B



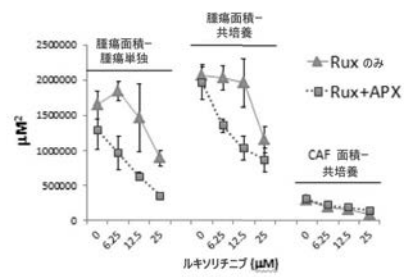
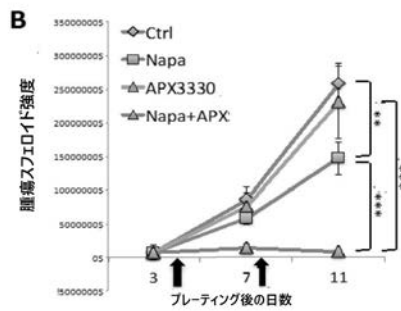
【図 2 4 - 2】

図 2 4 C



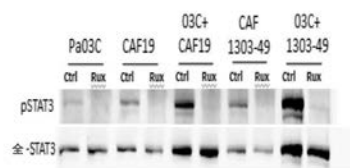
【図 2 5】

図 2 5



【図 2 6】

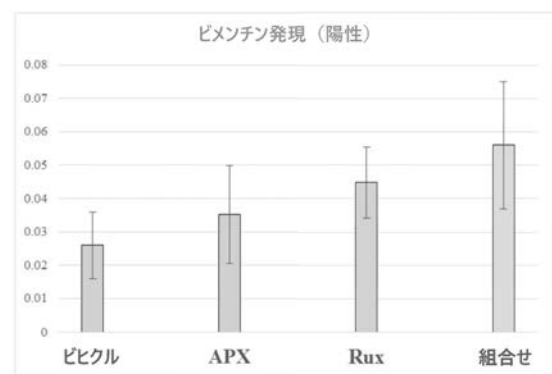
図 2 6



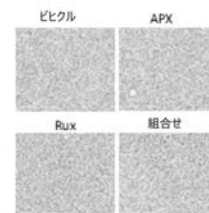
【図 2 8】

図 2 8 A-2 8 B

A

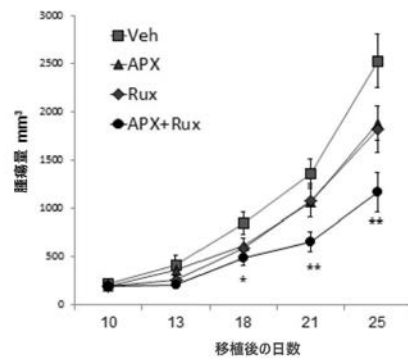


B



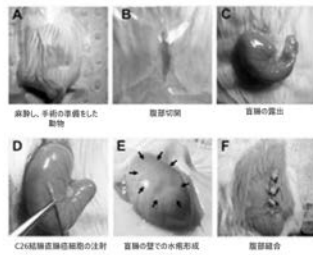
【図 2 7】

図 2 7

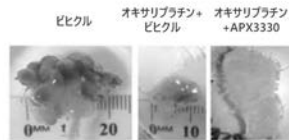


【図 29】

図 29 A-29 G

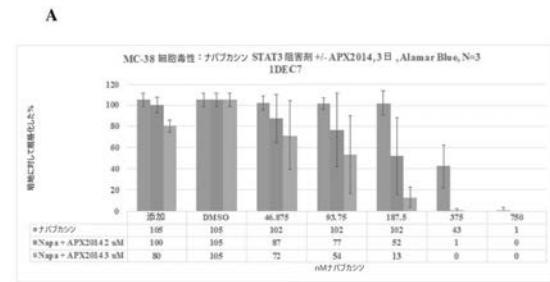


G



【図 30】

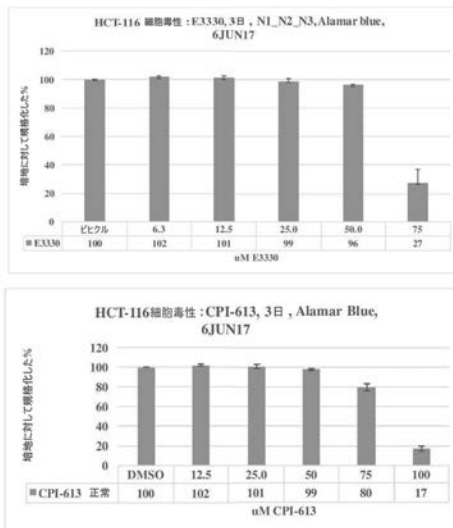
図 30 A-30 B



【図 3 2 - 1】

図 3 2 A

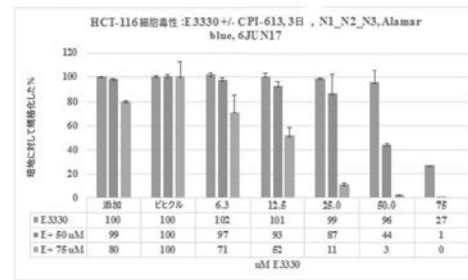
A



【図 3 2 - 2】

図 3 2 B-3 2 E

B



C

E3330: 68;
+50 uM CPI-613: 32
+75 uM CPI-613: 11

CPI-613: 85

D

一定でない組合せに対するCIデータ: E+C50 (E+C)					一定でない組合せに対するCIデータ: E+C75 (E+C)				
用量 E	用量 C	効果	CI		用量 E	用量 C	効果	CI	
75.0	50.0	0.01	0.12081		75.0	75.0	1.064	0.02239	
50.0	50.0	0.44	0.72217		50.0	75.0	0.08	0.22684	
25.0	50.0	0.87	1.41279		25.0	75.0	0.11	0.34277	
12.5	50.0	0.93	1.51038		12.5	75.0	0.52	0.76599	
6.3	50.0	0.97	1.93914		6.3	75.0	0.71	0.98328	

E

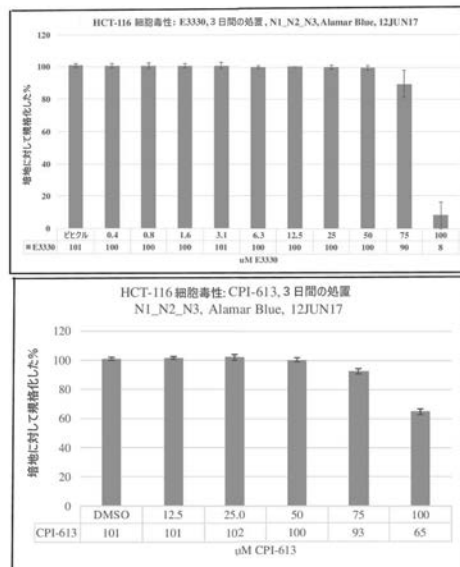
50-75uM E3330で相乗的
(50uM CPI-613)

12.5-75uM E3330で相乗的
(75uM CPI-613)

【図 3 3 - 1】

図 3 3 A

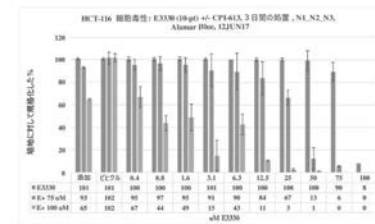
A



【図 3 3 - 2】

図 3 3 B-3 3 E

B



C

EC50 (uM) APX3330: 80;
+75 uM CPI-613: 13
+100 uM CPI-613: 3.0

CPI-613: >100

D

D Calcium										E Calcium										
一定でない組合せに対するCIデータ: A+C100 (E+C100)										一定でない組合せに対するCIデータ: A+C100 (E+C100)										
用量 E	用量 C	効果	CI		用量 E	用量 C	効果	CI		用量 E	用量 C	効果	CI		用量 E	用量 C	効果	CI		
100.0	75.0	1.064	0.02239	8.3	75.0	0.8	0.87708	100.0	100.0	1.064	0.02239	8.3	100.0	0.43	0.28813	100.0	100.0	1.064	0.02239	8.3
75.0	75.0	0.06	0.04583	3.1	75.0	0.81	1.00332	75.0	100.0	1.064	0.02239	3.1	100.0	0.15	0.11101	75.0	100.0	1.064	0.02239	3.1
50.0	75.0	0.13	0.07683	1.8	75.0	0.85	1.45875	50.0	100.0	0.01	0.01887	1.8	100.0	0.48	0.30828	50.0	100.0	0.01	0.01887	1.8
25.0	75.0	0.87	0.40171	0.8	75.0	0.87	1.88915	25.0	100.0	0.08	0.03897	0.8	100.0	0.44	0.27272	25.0	100.0	0.08	0.03897	0.8
12.5	75.0	0.84	0.72209					12.5	100.0	0.11	0.08983									

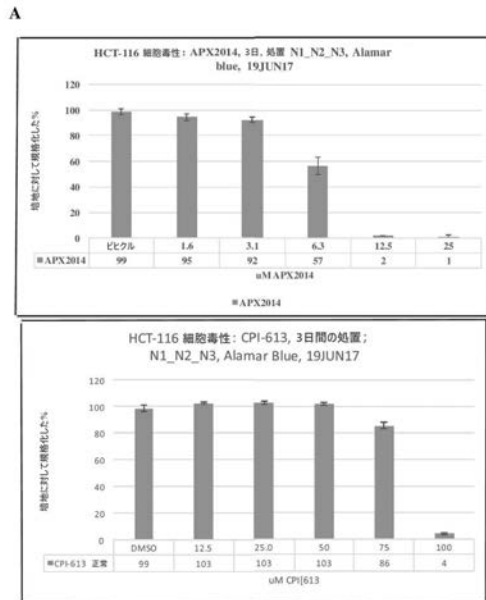
E

相乗作用 12.5-100uM APX3330で相乗的
投与量 (75uM CPI-613)

0.4uM-100uM APX3330で相乗的
(100uM CPI-613)

【図 3 4 - 1】

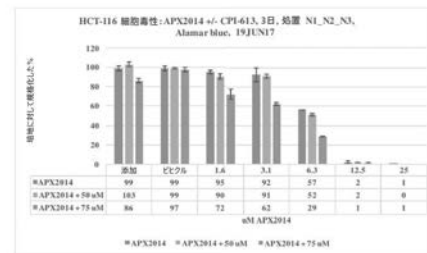
図 3 4 A



【図 3 4 - 2】

図 3 4 B - 3 4 E

B



C

APX2014: 5.0;
+50 uM CPI-613: 4.2
+75 uM CPI-613: 3.0

CPI-613: 69

D

一定でない組み合わせに対するCI値: A+C80 (E+C)				一定でない組み合わせに対するCI値: A+C75 (E+C)			
用量 A	用量 C	効果 C	CI	用量 A	用量 C	効果 C	CI
25.0	50.0	1.064	0.27186	25.0	75.0	0.01	1.24269
12.5	50.0	0.02	0.82883	12.5	75.0	0.01	0.71799
6.3	50.0	0.52	1.78087	6.3	75.0	0.28	1.48405
3.1	50.0	0.81	2.88447	3.1	75.0	0.62	1.63279
1.6	50.0	0.8	1.72483	1.6	75.0	0.72	1.50748

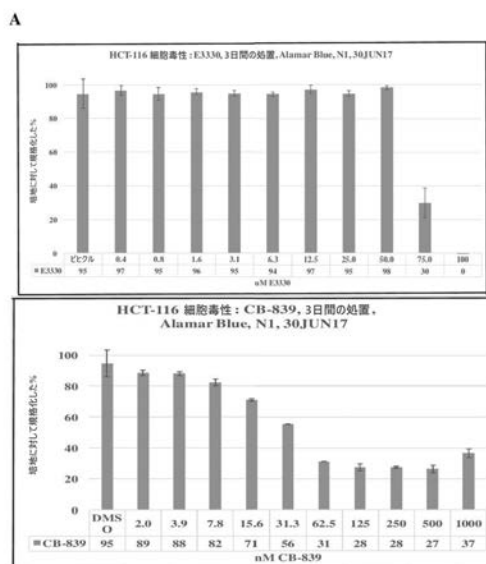
E

12.5-25uM APX2014で相乗的
(50uM CPI-613)

12.5uM APX2014で相乗的
(75uM CPI-613)

【図 3 5 - 1】

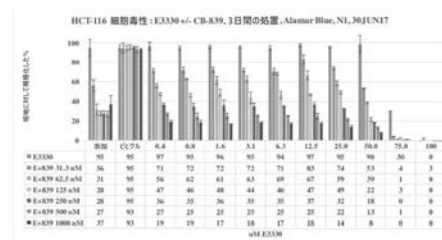
図 3 5



【図 3 5 - 2】

図 3 5 B - 3 5 E

B



C

APX3330: 73 uM;
+1000 nM CB-839: 0.0
+500 nM CB-839: 13

CB-839: 70 nM

D

一定でない組み合わせに対するCI値: E+C1000nM (E+C)				一定でない組み合わせに対するCI値: E+C500nM (E+C)			
用量 E	用量 C	効果 C	CI	用量 E	用量 C	効果 C	CI
100.0	1.0	1.084	0.00103	100.0	0.8	1.084	0.00103
75.0	1.0	1.084	7.70584	75.0	0.8	0.01	0.04809
50.0	1.0	0.08	0.88579	50.0	0.8	0.18	0.51706
25.0	1.0	0.14	0.70217	25.0	0.8	0.22	0.88673
12.5	1.0	0.18	1.04011	12.5	0.8	0.28	1.34210

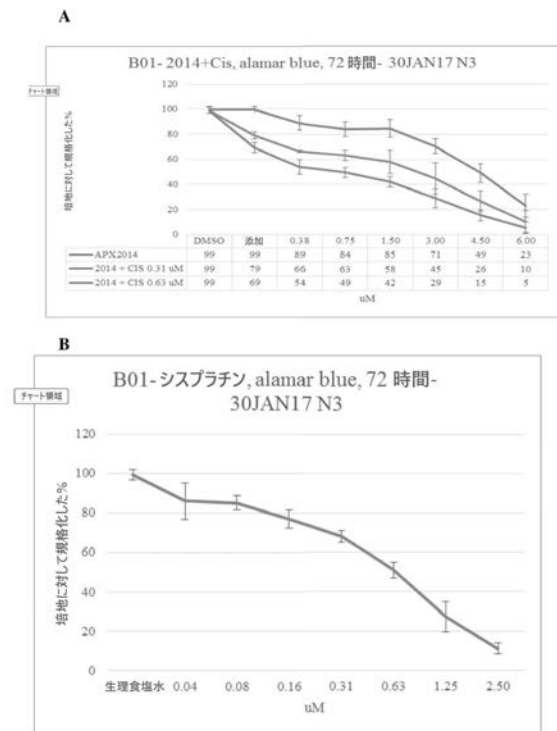
E

25-100uM APX3330で相乗的
(1000nM CB-839)

50-100uM APX3330で相乗的
(500nM CB-839)

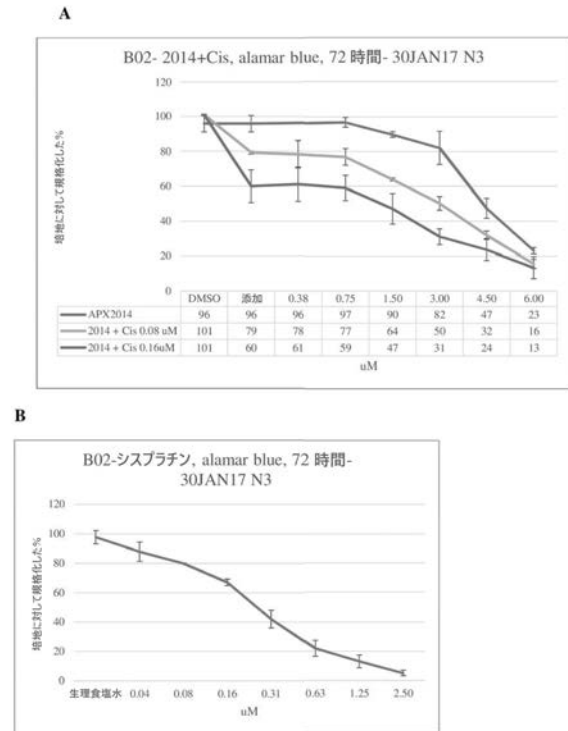
【図 3 6】

図 3 6 A - 3 6 B



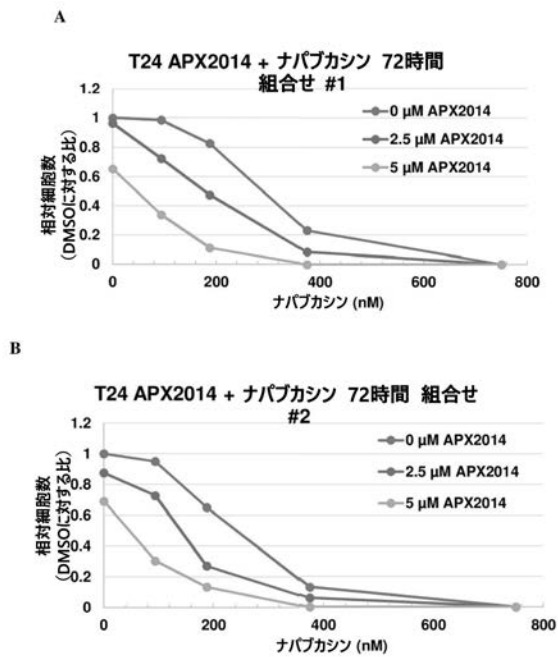
【図 3 7】

図 3 7 A - 3 7 B



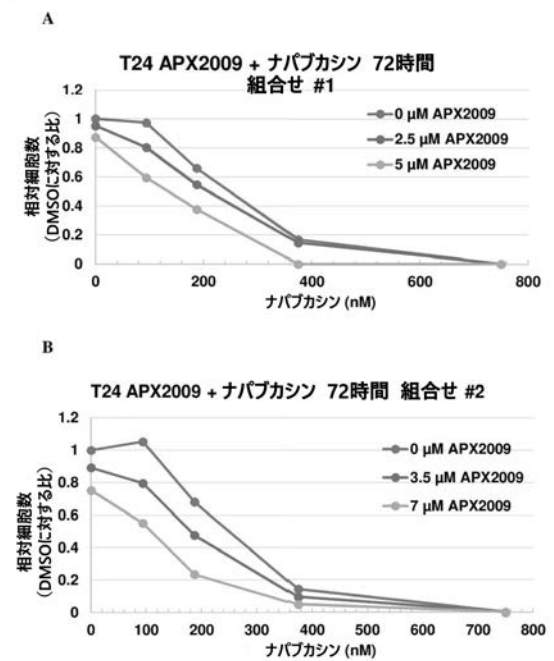
【図 3 8】

図 3 8 A - 3 8 B



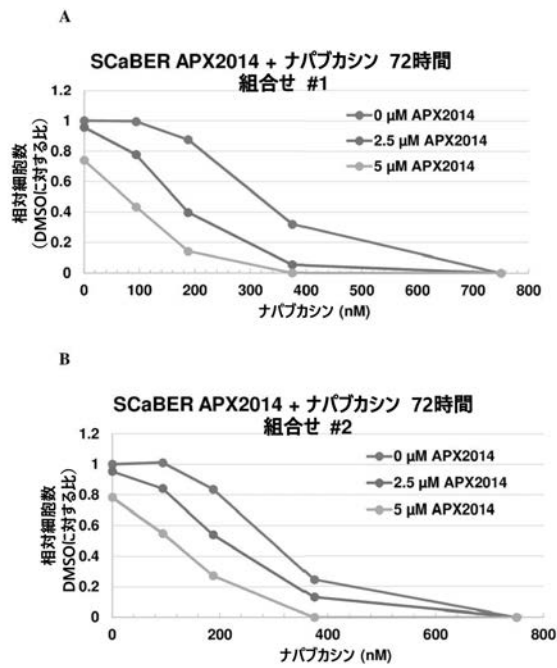
【図 3 9】

図 3 9 A - 3 9 B



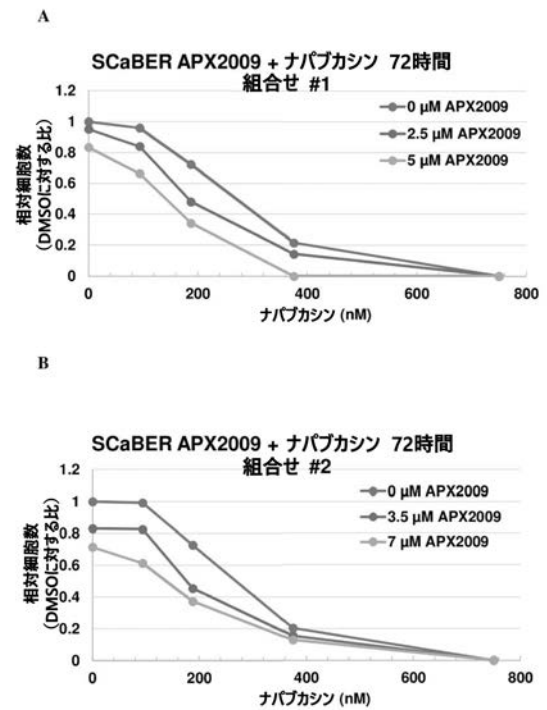
【図 4 0】

図 4 0 A - 4 0 B



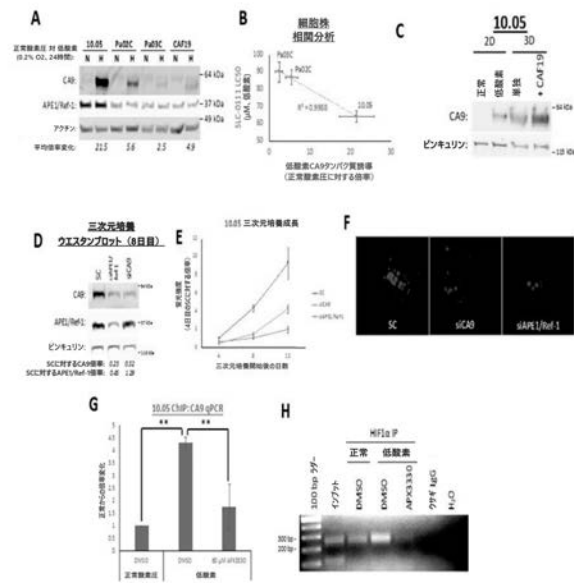
【図 4 1】

図 4 1 A - 4 1 B



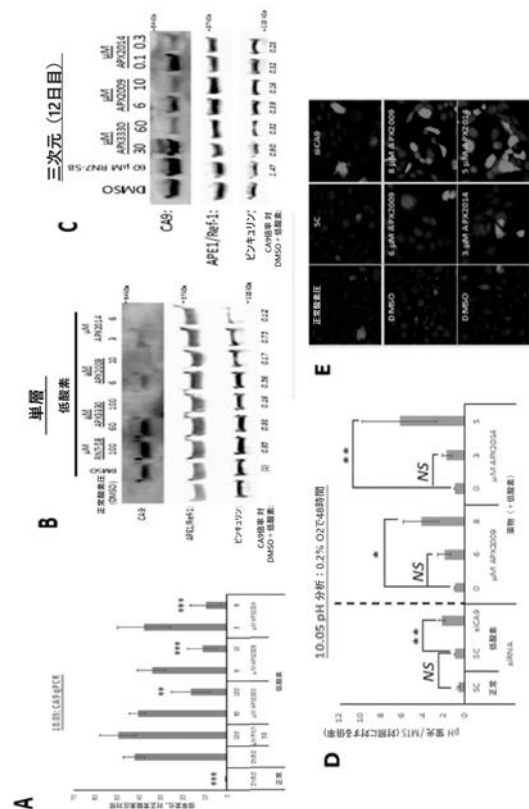
【図 4 2】

図 4 2 A - 4 2 H



【図 4 3 - 1】

図 4 3 A - 4 3 E



【図 4 3 - 2】

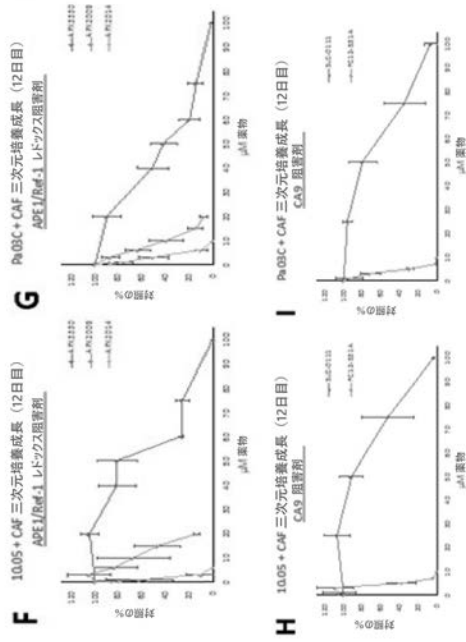
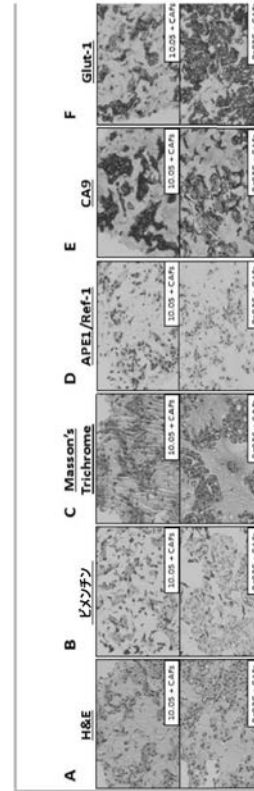


図 4 3 F - 4 3 I

【図 4 4】

図 4 4 A - 4 4 F



【図 4 5】

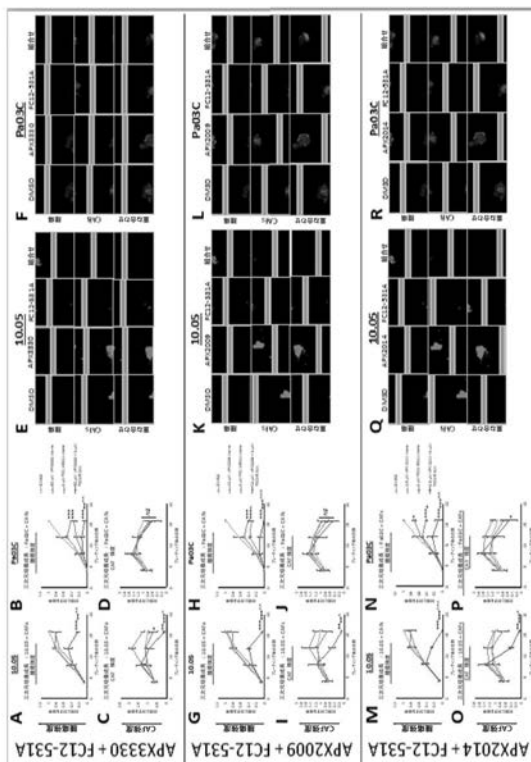
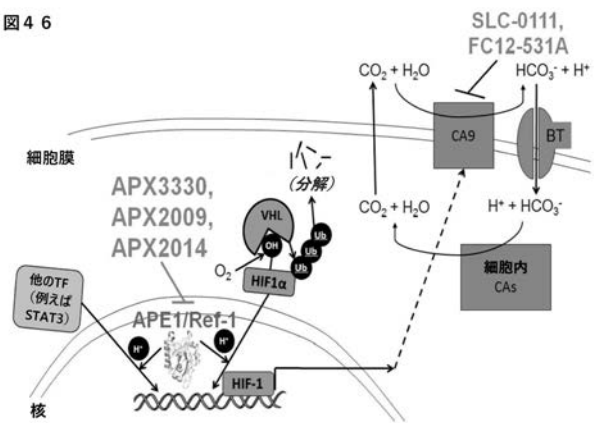


図 4 5 A - 4 5 R

【図 4 6】

図 4 6



【配列表】

2020514349000001.app

【手続補正書】

【提出日】 令和1年11月12日 (2019.11.12)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許請求の範囲

【補正対象項目名】 全文

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脱プリン脱ピリミジン部位エンドヌクレアーゼ／酸化還元（レドックス）因子 1（A P E 1／R e f－1）阻害剤と第 2 治療剤とを含む併用治療剤であって、前記 A P E 1／R e f－1 阻害剤が A P E 1／R e f－1 のレドックス機能を阻害し、前記第 2 治療剤が、B 細胞リンパ腫 2（B c l－2）阻害剤、P T E N 阻害剤、W N T／β－カテニン阻害剤、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（P D H）阻害剤、α－ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ阻害剤、N o t c h 3 阻害剤、光線力学療法（P D T）、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される併用治療剤。

【請求項 2】

前記 A P E 1／R e f－1 阻害剤が、5－（2，3－ジメトキシ－6－メチル 1，4－ベンゾキノイル）－2－ノニル－2－プロペン酸（A P X 3 3 3 0）、〔（2 E）－2－〔（3－メトキシ－1，4－ジオキソ－1，4－ジヒドロナフタレン－2－イル）メチリデン〕－N，N－ジエチルペンタンアミド〕（A P X 2 0 0 9）、（2 E）－2－〔（3－メトキシ－1，4－ジオキソ－1，4－ジヒドロナフタレン－2－イル）メチリデン〕－N－メトキシペンタンアミド〕（A P X 2 0 1 4）及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 3】

前記第 2 治療剤が炭酸脱水酵素 9（C A 9）阻害剤、シグナル伝達性転写因子 3（S T A T 3）阻害剤、白金製剤及びこれらの組み合わせからなる群から選択される請求項 1 に記載の併用治療剤。

【請求項 4】

前記第 2 治療剤が、S L C－0 1 1 1、F C 1 3－5 5 5 A、F C 1 2－5 3 1 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される C A 9 阻害剤である請求項 3 に記載の併用治療剤。

【請求項 5】

前記第 2 治療剤がナバブカシン、ルキシロチニブ、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される S T A T 3 阻害剤である請求項 3 に記載の併用治療剤。

【請求項 6】

前記第 2 治療剤が、シスプラチン、オキサリプラチン、カルボプラチン、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される 白金製剤である請求項 3 に記載の併用治療剤。

【請求項 7】

前立腺癌、膵臓癌、膵管腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、骨肉腫、胚細胞性腫瘍、結腸癌／結腸直腸癌、膀胱癌、頭頸部癌、胃癌／胃食道癌、神経外胚葉性腫瘍、横紋筋肉腫、膵胆管癌、成人神経膠腫、非小細胞肺癌、肝細胞癌、多発性骨髄腫、食道癌、乳癌、小児上衣腫、及び黒色腫からなる群から選択される癌の処置のための、請求項 1 から請求項 6 のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

【請求項 8】

前記癌が結腸癌であり、前記併用治療剤が、5－（2，3－ジメトキシ－6－メチル 1，4－ベンゾキノイル）－2－ノニル－2－プロペン酸（A P X 3 3 3 0）、〔（2 E）－2－〔（3－メトキシ－1，4－ジオキソ－1，4－ジヒドロナフタレン－2－イ

ル)メチリデン]ーN, N-ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるAPE1/Ref-1阻害剤と、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル(5-FU)、CPI-613、オキサリプラチン、ナパブカシン、CP-839及びこれらの組み合わせからなる群から選択される第2治療剤とを含む請求項7に記載の使用。

【請求項9】

前記癌が白血病であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル1, 4-ベンゾキノイル)-2-ノニル-2-プロペン酸(APX3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]ーN, N-ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるAPE1/Ref-1阻害剤と、レチノイン酸である第2治療剤とを含む請求項7に記載の使用。

【請求項10】

前記癌が悪性末梢神経鞘腫であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル1, 4-ベンゾキノイル)-2-ノニル-2-プロペン酸(APX3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]ーN, N-ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるAPE1/Ref-1阻害剤と、サバイビン阻害剤である第2治療剤とを含む請求項7に記載の使用。

【請求項11】

前記癌が非小細胞肺癌であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル1, 4-ベンゾキノイル)-2-ノニル-2-プロペン酸(APX3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]ーN, N-ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるAPE1/Ref-1阻害剤と、Bcl-2阻害剤、光線力学療法及びこれらの組み合わせからなる群から選択される第2治療剤とを含む請求項7に記載の使用。

【請求項12】

前記癌が前立腺癌であり、前記併用治療剤が、5-(2, 3-ジメトキシ-6-メチル1, 4-ベンゾキノイル)-2-ノニル-2-プロペン酸(APX3330)、[(2E)-2-[(3-メトキシ-1, 4-ジオキソ-1, 4-ジヒドロナフタレン-2-イル)メチリデン]ーN, N-ジエチルペンタンアミド] (APX2009) 及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるAPE1/Ref-1阻害剤と、サバイビン阻害剤である第2治療剤とを含む請求項7に記載の使用。

【請求項13】

脈絡膜新生血管(CNV)、加齢性黄斑変性症(AMD)、未熟児網膜症(ROP)、糖尿病性網膜症(DR)及び虚血性網膜症からなる群から選択される網膜疾患の処置のための、請求項1から請求項6のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

【請求項14】

心血管疾患、細菌性感染症、胃の炎症性障害及び神経変性疾患からなる群から選択される疾患の処置のための、請求項1から請求項6のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

【請求項15】

化学療法剤誘発末梢ニューロパチー(CIPN)の処置のための、請求項1から請求項6のいずれか一項に記載の併用治療剤の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US18/23346

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-Please See Within the Next Supplemental Box-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-21; APX3330 (APE1/Ref-1 redox inhibitor), a BCL2 inhibitor (second therapeutic agent); cancer (disorder)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US18/23346

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C07K 16/28, 16/30; A61K 31/195, 51/1045, 51/1057 (2018.01)
CPC - C07K 16/28, 16/30; A61K 31/195, 51/1045, 51/1057

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(MCELYEA, KC et al.) Efficacy Study of APX3330, a Ref-1 Redox Inhibitor, and Gemcitabine in a Mouse Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Model. Cancer Research. July, 2016; Vol. 76, No. 14; abstract; DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-5183	1-2, 11/1-2, 12/11/1-2, 16/11/1-2
Y	(MASOOD, A et al.) Small Molecule Inhibitors of Bcl-2 Family Proteins for Pancreatic Cancer Therapy. Cancers. 01 June, 2011; Vol. 3, No.2; pages 1527-1549; page 1534, paragraph 3; DOI: 10.3390/cancers3021527	1-2, 11/1-2, 12/11/1-2, 16/11/1-2
Y	(REN, T et al.) Sequential Treatment with AT-101 Enhances Cisplatin Chemosensitivity in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells Through Inhibition of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1-Activated IL-6/STAT3 Signaling Pathway. Drug Design, Development and Therapy. 12 December, 2014; Vol. 8; pages 2517-2529; abstract; page 2525, column 1, paragraph 2; DOI: 10.2147/DDDT.S71432	16/11/1-2
P, X	(SHAH, F et al.) Exploiting the Ref-1-APE1 Node in Cancer Signaling and Other Diseases: from Bench to Clinic. NPJ Precision Oncology. 08 June, 2017; Vol. 1, No. 19; pages 1-19; whole document; DOI: 10.1038/s41698-017-0023-0	1-2, 11/1-2, 12/11/1-2, 16/11/1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2018 (21.06.2018)

Date of mailing of the international search report

06 JUL 2018

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-9300

Authorized officer

Shane Thomas

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT ODP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US18/23346

---Continuation of Box No. III - Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-21, APX3330 (APE1/Ref-1 redox inhibitor), a BCL2 inhibitor (second therapeutic agent); and cancer (disorder) are directed toward combination therapies and uses thereof.

The combination therapies and uses thereof will be searched to the extent they encompass APX3330 (APE1/Ref-1 redox inhibitor), a BCL2 inhibitor (second therapeutic agent); and cancer (disorder). Applicant is invited to elect additional APE1/Ref-1 redox inhibitor(s) and/or second therapeutic agent(s) and/or disorder(s), to be searched. Additional APE1/Ref-1 redox inhibitor(s) and/or second therapeutic agent(s) and/or disorder(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 11 (in-part), 12 (in-part), and 16 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass APX3330 (APE1/Ref-1 redox inhibitor), a BCL2 inhibitor (second therapeutic agent); and cancer (disorder). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected APE1/Ref-1 redox inhibitor(s) and/or second therapeutic agent(s) and/or disorder(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a PTEN inhibitor (second therapeutic agent).

Group II, Claims 22 and 23 are directed toward a siRNA for reducing APE1/Ref-1 expression and use thereof to treat pancreatic ductal adenocarcinoma.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical features of Groups I+ include a BCL2 inhibitor, not present in Group II; the special technical features of Group II include siRNA, not present in any of Groups I+.

Groups I+ and II share the technical features including: a modulator of APE1/Ref-1 expression or activity; and treatment of cancer.

However, these shared technical features are previously disclosed by the article 'Regulation of HIF1alpha under Hypoxia by APE1/Ref-1 Impacts CA9 Expression: Dual Targeting in Patient-Derived 3D Pancreatic Cancer Models' by Logsdon et al. (hereinafter 'Logsdon').

Logsdon discloses a modulator of APE1/Ref-1 expression or activity (APX3330 (a modulator of APE1/Ref-1 expression or activity); page 2723, first column, fourth paragraph); and treatment of cancer (treatment of PDAC (cancer); abstract, page 2730, second column, second paragraph).

No technical features are shared between the APE1/Ref-1 redox inhibitors and/or second therapeutic agents and/or disorders of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features including: a combination therapy comprising an Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/reduction-oxidation (redox) Factor-1 (APE1/Ref-1) inhibitor, wherein the APE1/Ref-1 inhibitor inhibits the redox function of APE1/Ref-1 and a second therapeutic agent; and use of the combination therapy for the treatment of a disorder; these shared technical features are previously disclosed by Logsdon, as above.

Logsdon discloses a combination therapy comprising an Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/reduction-oxidation (redox) Factor-1 (APE1/Ref-1) inhibitor (dual targeting of APE1/Ref-1 redox activity and CA9 (a combination therapy comprising an Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/reduction-oxidation (redox) Factor-1 (APE1/Ref-1) inhibitor; abstract, page 2727, first column, third paragraph), wherein the APE1/Ref-1 inhibitor inhibits the redox function of APE1/Ref-1 (wherein the APE1/Ref-1 inhibitor inhibits the redox function of APE1/Ref-1; abstract, page 2727, first column, third paragraph) and a second therapeutic agent (and SLC-0111, a CA9 inhibitor (and a second therapeutic agent); page 2727, first column, third paragraph); and use of the combination therapy for the treatment of a disorder (use of the combination therapy for the treatment of cancer (a disorder); abstract, page 2727, second column, third paragraph- page 2728, second column, first paragraph).

Since none of the special technical features of the Groups I+ and II inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Logsdon reference, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)		A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 K 33/24 (2019.01)		A 6 1 P 9/00	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)		A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/519 (2006.01)		A 6 1 K 31/282	
A 6 1 K 31/343 (2006.01)		A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/201 (2006.01)		A 6 1 K 31/343	
A 6 1 K 31/165 (2006.01)		A 6 1 K 31/201	
A 6 1 K 31/18 (2006.01)		A 6 1 K 31/165	
		A 6 1 K 31/18	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 ケリー マーク アール.
 アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 2 インディアナポリス インディアナ アヴェニュー
 5 1 8 インディアナ ユニバーシティー リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション内
 (72)発明者 フィッシュェル メリッサ エル.
 アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2 0 2 インディアナポリス インディアナ アヴェニュー
 5 1 8 インディアナ ユニバーシティー リサーチ アンド テクノロジー コーポレーション内

Fターム(参考) 4C084 AA19 AA20 NA05 NA14 ZA151 ZA152 ZA331 ZA332 ZA361 ZA362
 ZA681 ZA682 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZB351 ZB352 ZC201 ZC202
 ZC411 ZC412 ZC751 ZC752
 4C086 AA01 AA02 BA05 CB05 HA12 HA24 HA26 HA28 MA02 MA04
 NA05 NA14 ZA15 ZA33 ZA36 ZA68 ZB26 ZB27 ZB35 ZC20
 ZC41 ZC75
 4C206 AA01 AA02 DA22 GA07 GA22 HA16 JA15 JB16 KA01 MA02
 MA04 NA05 NA14 ZA15 ZA33 ZA36 ZA68 ZB26 ZB27 ZB35
 ZC20 ZC41 ZC75