

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7138563号

(P7138563)

(45)発行日 令和4年9月16日(2022.9.16)

(24)登録日 令和4年9月8日(2022.9.8)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/713

Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 13/12 (2006.01)

A 6 1 P 13/12

A 6 1 P 35/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/04

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 13 (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-513290(P2018-513290)

(86)(22)出願日 平成28年9月21日(2016.9.21)

(65)公表番号 特表2018-531224(P2018-531224 A)

(43)公表日 平成30年10月25日(2018.10.25)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/072458

(87)国際公開番号 WO2017/050842

(87)国際公開日 平成29年3月30日(2017.3.30)

審査請求日 令和1年9月18日(2019.9.18)

(31)優先権主張番号 15306469.6

(32)優先日 平成27年9月21日(2015.9.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 500539103

コミッサリア ア レネルジ アトミック
エ オー エネルジ アルターネイティブス
COMMISSARIAT A L' ENE
RGIE ATOMIQUE ET AUX
ENERGIES ALTERNATI
VESフランス、75015 パリ、リュ レブ
ラン バティメント <レ ポナント ディ
ー>、2525, rue Leblanc Bati
ment (Le Ponant D),
75015 PARIS, France

(73)特許権者 591100596

アンスティチュ ナショナル ドゥ ラ サ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 腎細胞癌を治療するための合成致死薬の組み合わせ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

CK2プロテインキナーゼ(CK2)を阻害する第1の薬剤と、毛細血管拡張性運動失調症変異(ATM)キナーゼを阻害する第2の薬剤との組み合わせ医薬であって、

第1の薬剤が、

19～23ヌクレオチドの二本鎖で構成された二本鎖オリゴヌクレオチドであって、センス鎖またはプラス鎖のRNA配列がCK2プロテインキナーゼの α 、 α' または β サブユニットの転写物の断片であることを特徴とし、以下：

a)細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、

b)マウス(番号NM 007787)またはヒト(番号NM 001895)のCK2 α サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから18位～74位、259位～279位、565位～585位、644位～664位、720位～750位、808位～831位および863位～885位に含まれる α サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、c)マウス(番号NM 009974)またはヒト(番号NM 001896)のCK2 α' サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから49位～69位、132位～142位、306位～326位、367位～387位、427位～447位、451位～471位、595位～615位、735位～755位、827位～847位、868位～888位、949位～969位および988位～1008位に含まれる α' サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサ

ブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、及び

d) ヒト(番号NM 001320)またはマウス(番号NP 034105)のCK2βサブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから80位～100位、116位～127位、164位～208位、369位～389位、400位～420位、527位～591位および613位～643位に含まれるβサブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片

からなる群より選択される二本鎖オリゴヌクレオチドであるか、又は

5-(3-クロロフェニルアミノ)ベンゾ[c][2,6]ナフチリジン-8-カルボン酸、5,11-ジメチル-6H-ピリド[4,3-b]カルバゾール、7-クロロ-10-メチル-11h-ベンゾ[g]ピリド[4,3-B]インドール-3-オール、2-ジメチルアミノ-4,5,6,7-テトラプロモ-1H-ベンゾイミダゾール、4,5,6,7-テトラプロモベンゾトリアゾール及びペプチドCIGB300からなる群より選択され、

第2の薬剤が、2-((2S,6R)-2,6-ジメチルモルホリノ)-N-(5-(6-モルホリノ-4-オキソ-4H-ピラン-2-イル)-9H-チオキサンテン-2-イル)アセトアミド及び2-モルホリン-4-イル-6-チアントレン-1-イル-ピラン-4-オンからなる群より選択される、組み合わせ医薬。

【請求項2】

前記第1の薬剤が、CK2αおよび/またはα'をコードしている遺伝子を標的とするsiRNA、およびCK2αおよび/またはα'をコードしている遺伝子を標的とするshRNAからなる群から選択される二本鎖オリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の組み合わせ医薬。

【請求項3】

前記第1の薬剤が、5-(3-クロロフェニルアミノ)ベンゾ[c][2,6]ナフチリジン-8-カルボン酸、および5,11-ジメチル-6H-ピリド[4,3-b]カルバゾールからなる群から選択され、前記第2の薬剤が2-((2S,6R)-2,6-ジメチルモルホリノ)-N-(5-(6-モルホリノ-4-オキソ-4H-ピラン-2-イル)-9H-チオキサンテン-2-イル)アセトアミドである、請求項1又は2に記載の組み合わせ医薬。

【請求項4】

前記第1の薬剤が5-(3-クロロフェニルアミノ)ベンゾ[c][2,6]ナフチリジン-8-カルボン酸であり、前記第2の薬剤が2-((2S,6R)-2,6-ジメチルモルホリノ)-N-(5-(6-モルホリノ-4-オキソ-4H-ピラン-2-イル)-9H-チオキサンテン-2-イル)アセトアミドである、請求項1～3のいずれかに記載の組み合わせ医薬。

【請求項5】

前記第1および第2の薬剤が組成物またはキット中に含まれる、請求項1～4のいずれかに記載の組み合わせ医薬。

【請求項6】

VHLが不活化している固形腫瘍を治療する医薬として使用するための、請求項1～5のいずれかに記載の組み合わせ医薬。

【請求項7】

淡明型腎細胞癌(ccRCC)を治療する医薬として使用するための、請求項1～5のいずれかに記載の組み合わせ医薬。

【請求項8】

前記RCCが転移性腎細胞癌(mRCC)である、請求項1～5のいずれかに記載の組み合わせ医薬。

【請求項9】

VHLが不活化している癌の治療における、

19～23ヌクレオチドの二本鎖で構成された二本鎖オリゴヌクレオチドであって、センス鎖またはプラス鎖のRNA配列がCK2プロテインキナーゼのα、α'またはβサブユニットの転写物の断片であることを特徴とし、以下：

a) 細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、

b) マウス(番号NM 007787)またはヒト(番号NM 001895)のCK2αサブユニットのcDN

10

20

30

40

50

A配列に関して、ATGコドンから18位～74位、259位～279位、565位～585位、644位～664位、720位～750位、808位～831位および863位～885位に含まれる α サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、

c)マウス(番号NM 009974)またはヒト(番号NM 001896)のCK2 α' サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから49位～69位、132位～142位、306位～326位、367位～387位、427位～447位、451位～471位、595位～615位、735位～755位、827位～847位、868位～888位、949位～969位および988位～1008位に含まれる α' サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、及び

d)ヒト(番号NM 001320)またはマウス(番号NP 034105)のCK2 β サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから80位～100位、116位～127位、164位～208位、369位～389位、400位～420位、527位～591位および613位～643位に含まれる β サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片

からなる群より選択される二本鎖オリゴヌクレオチドであるか、又は

5-(3-クロロフェニルアミノ)ベンゾ[c][2,6]ナフチリジン-8-カルボン酸、5,11-ジメチル-6H-ピリド[4,3-b]カルバゾール、7-クロロ-10-メチル-11h-ベンゾ[g]ピリド[4,3-B]インドール-3-オール、2-ジメチルアミノ-4,5,6,7-テトラプロモ-1H-ベンゾイミダゾール、4,5,6,7-テトラプロモベンゾトリアゾール及びペプチドCIGB300からなる群より選択されるCK2阻害剤の効果を高めるための、2-((2S,6R)-2,6-ジメチルモルホリノ)-N-(5-(6-モルホリノ-(4-オキソ-4H-ピラン-2-イル)-9H-チオキサンテン-2-イル)アセトアミド及び2-モルホリン-4-イル-6-チアントレン-1-イル-ピラン-4-オンからなる群より選択されるATMキナーゼ阻害剤を含む医薬組成物。

【請求項10】

RCC、ccRCC及びmRCCの中から選択される癌の治療におけるCK2阻害剤の効果を高めるための、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項11】

VHLが不活化している癌の治療における、2-((2S,6R)-2,6-ジメチルモルホリノ)-N-(5-(6-モルホリノ-(4-オキソ-4H-ピラン-2-イル)-9H-チオキサンテン-2-イル)アセトアミド及び2-モルホリン-4-イル-6-チアントレン-1-イル-ピラン-4-オンからなる群より選択されるATMキナーゼ阻害剤の効果を高めるための、

19～23ヌクレオチドの二本鎖で構成された二本鎖オリゴヌクレオチドであって、センス鎖またはプラス鎖のRNA配列がCK2プロテインキナーゼの α 、 α' または β サブユニットの転写物の断片であることを特徴とし、以下：

a)細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、

b)マウス(番号NM 007787)またはヒト(番号NM 001895)のCK2 α サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから18位～74位、259位～279位、565位～585位、644位～664位、720位～750位、808位～831位および863位～885位に含まれる α サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、

c)マウス(番号NM 009974)またはヒト(番号NM 001896)のCK2 α' サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから49位～69位、132位～142位、306位～326位、367位～387位、427位～447位、451位～471位、595位～615位、735位～755位、827位～847位、868位～888位、949位～969位および988位～1008位に含まれる α' サブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片、及び

d)ヒト(番号NM 001320)またはマウス(番号NP 034105)のCK2 β サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンから80位～100位、116位～127位、164位～208位、369

位～389位、400位～420位、527位～591位および613位～643位に含まれるβサブユニットの転写物の断片であって、細胞培養において、1～200nMの濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害する断片からなる群より選択される二本鎖オリゴヌクレオチドであるか、又は

5-(3-クロロフェニルアミノ)ベンゾ[c][2,6]ナフチリジン-8-カルボン酸、5,11-ジメチル-6H-ピリド[4,3-b]カルバゾール、7-クロロ-10-メチル-11h-ベンゾ[g]ピリド[4,3-B]インドール-3-オール、2-ジメチルアミノ-4,5,6,7-テトラブromo-1H-ベンゾイミダゾール、4,5,6,7-テトラブromoベンゾトリアゾール及びペプチドCIGB300からなる群より選択されるCK2阻害剤を含む医薬組成物。

【請求項12】

前記CK2阻害剤で予め治療された個体へ投与される、請求項9又は10に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記ATMキナーゼ阻害剤で予め治療された個体へ投与される、請求項11に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌治療の領域に関する。より具体的には、本発明は、腎細胞癌の新規組み合わせ療法に関する。

【0002】

腎細胞癌（RCC）は世界で8番目の主要な悪性腫瘍であり、すべての癌の4%を占めている。RCC患者の約30%が診断時に転移性疾患に罹患し、残りの半数近くが転移（mRCC）を発症する（Negrier、Escudierら、1998、McDermott、Reganら、2005）。

【0003】

淡明型腎細胞癌（ccRCCs）は、すべての症例の75%を占める腎臓癌の最も一般的な形態である（Lopez - Beltran、Scarpelliら2006）。

【背景技術】

【0004】

フォン・ヒッペル - リンドウ（VHL）腫瘍サプレッサー遺伝子を不活化または抑制する変異は、ccRCCの顕著な特徴を示す。

【0005】

正常酸素状態下では、酸素に高感度の低酸素誘導因子（HIF）αサブユニットは、VHL媒介ユビキチン化によって分解されることが示されている。しかし、低酸素状態下では、HIFαの分解が抑制され、HIFαの核局在化の促進、血管新生因子遺伝子VEGF（Kaelin 2008）および腫瘍の進行や転移に関与する他の遺伝子を含む、様々な標的遺伝子の転写をもたらす。

【0006】

RCCは、特に化学療法に対して非常に抵抗性がある。さらに、mRCCの治療は、放射線、化学療法、およびサイトカイン療法など従来の抗癌療法に対する反応性がないか、または反応が限定されているため、難しい（Figlin、Sternbergら。2012）。

【0007】

しかし、キナーゼを標的とする利用可能な薬剤のいくつかは、転移性腎細胞癌（mRCC）を持つ患者の治療に有益な効果を示している。その薬剤にはスニチニブ、ソラフェニブ、パゾパニブおよびアキシチニブのようなチロシンキナーゼ阻害剤（TKIs）、VEGF標的化抗体ベバシズマブ、哺乳類ラパマイシン標的（mTOR）阻害剤テムシロリムスおよびエベロリムス（Maj - Hes、Medioniら、2013）が含まれる。これらの標的化された薬剤は、抗腫瘍活性および長期間の無増悪生存（PFS）を示すが、それらを用いて治療された患者の一部は、疾患の進行を経験する。

【0008】

10

20

30

40

50

したがって、現行の治療法が長期の効能を欠いていることから、この壊滅的な疾患に関わる様々な経路に焦点を当てた他の治療法を見つける緊急の必要性が明らかである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

この目的のために、発明者らは、「合成致死性」と呼ばれる新しいアプローチを利用した。古典的遺伝学において、この用語は、個々の摂動だけでは致死性を与えないが、組み合わせた時に致死性を与える2つの遺伝的摂動の間の相互作用を指す。合成致死性は、一つの遺伝子の変異または不活化と化学化合物の作用との組み合わせが致死性を引き起こし、変異 / 不活化または化合物単独が非致死性である場合にも適用することができる。癌治療に対する合成致死性アプローチは、現在、化学療法および化学予防薬におけるオフターゲット効果を減少させるための標的療法を開発する手段として検討されている (McLornan, Listら、2014)。

【0010】

遺伝的または薬理的な干渉は、がんにおける合成致死性を得るための主要な仕組みの1つである。新薬の組み合わせは、低分子干渉RNA (siRNA)、ショートヘアピン型RNA (shRNA) および / または低分子化学阻害剤を用いたハイスループットスクリーニングから同定することができる。

【0011】

これを達成するために、本発明者らは新しいタイプのスクリーニングを行った。以下の実験の部で説明している通り、彼らは非常に攻撃的な786-O VHL ヌル (null) ccRCC ヒト細胞株と36のshRNA組み合わせを用い、80の薬物 (FDA承認および非承認) と共に、異なるタイプの癌に関与することが示されている異なる遺伝子をサイレントにした。そうすることによって、彼らは、シグナル伝達経路の成分と特異的キナーゼ阻害剤との間の合成 - 致死性相互作用を含むいくつかの遺伝子 - 薬物の相互作用を同定した。その中でも、CK2 α 発現のshRNA媒介性ノックダウンは、786-O VHL細胞の毛細血管拡張性運動失調症変異 (ATM) キナーゼの阻害剤であるKU-60019 (Selleckchem) への感受性を増強した。同じ効果は、KU-60019とプロテインキナーゼCK2阻害剤であるCX-4945との組み合わせで細胞を処理した場合にも認められた。さらに、その組み合わせによるこの相乗的抗増殖効果は、786-O VHL細胞において786-O VHL⁺細胞と比較してはるかに強力であった。この効果差は、RCC4 VHL⁻およびRCC4 VHL⁺細胞株でも認められ、このことはATMおよびCK2の同時薬理的阻害が相乗的な様式で作用し、個々の阻害剤単独よりも強力にVHL ヌルccRCC細胞増殖を特異的に妨げたことを示している。

【0012】

細胞生存シグナル伝達経路におけるCK2 (以前は「カゼインキナーゼII」と呼ばれていた) およびATMキナーゼの役割ならびにそれらの癌への影響は、刊行物に十分に記載されている。

【0013】

CX-4945は、いくつかのインビトロおよび前臨床研究において有効であることが示されている (Siddiqui - Jainら、Cancer Res December 15、2010 70; 10288)。その結果は、CX-4945がいくつかの癌のタイプにおいて疾患の安定化を誘導し得ることを示す。CX-4945は、腎癌を含むいくつかの固形腫瘍のタイプにおける第1相臨床試験で試験されている (Marschkeら、Mol Cancer Ther 2009; 8 (12 Suppl) : C39)。

【0014】

ATM阻害剤KU-60019は、神経膠腫細胞を放射線増感するために用いられ (Goldingら、2009)、前臨床試験でも試験された (Vechioら、2014)。

【0015】

両方のキナーゼが薬理的阻害剤の開発のための適切な標的とされているという事実にもかかわらず、以下に開示される結果はCK2およびATMの二重標的化が癌細胞の増殖 / 生存の相乗的阻害をもたらすという最初の実証となる。

【0016】

したがって、本発明は、医薬としての使用のための、プロテインキナーゼCK2（CK2）を阻害する第1の薬剤と、毛細血管拡張性運動失調症変異（ATM）キナーゼを阻害する第2の薬剤との組み合わせに関する。

【0017】

前記において、「CK2を阻害する第1の薬剤」は、前記CK2の発現または活性のいずれかを阻害する任意の分子であり得る。特に、第1の薬剤は、CK2のキナーゼ活性を阻害する化学分子、CK2 α および / または α' をコードしている遺伝子を標的とする（それによりその発現を阻害する）siRNAまたはCK2 α および / または α' をコードしている遺伝子を標的とする（それによりその発現を阻害する）shRNAであり得る。同様に、「ATMキナーゼを阻害する第2の薬剤」は、前記ATMキナーゼの発現または活性のいずれかを阻害する任意の分子であり得る。そのような薬剤の例は、ATMキナーゼのキナーゼ活性を阻害する化学分子、ATMキナーゼをコードしている遺伝子を標的とするsiRNA、およびATMキナーゼをコードしている遺伝子を標的とするshRNAである。

【0018】

特定の実施形態によれば、プロテインキナーゼCK2（CK2）を阻害する第1の薬剤は、WO 2005/005632に記載されている通りであり、すなわち、19～23ヌクレオチドの二本鎖で構成された二本鎖オリゴヌクレオチドであり、各鎖が5'から3'へ17～21リボヌクレオチドと2つのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドとの配列からなり、該鎖の17～21のリボヌクレオチドRNA配列は相補的であり、3'末端の2ヌクレオチドは突出しており、センス鎖またはプラス鎖のRNA配列がCK2プロテインキナーゼのサブユニット α 、 α' または β の転写物の断片であることが特徴で、以下からなる群から選択される：

a) 細胞培養において、1～200nM、好ましくは20nM未満の濃度で、対応するサブユニットの発現の80%以上を阻害するオリゴヌクレオチドに相当する断片、

b) マウス（番号NM 007787）またはヒト（番号NM 001095）のCK2 α サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンからの位置が18 - 74、259 - 279、565 - 585、644 - 664、720 - 750、808 - 831および863 - 885の間に含まれる α サブユニットの転写物の断片、

c) マウス（番号NM 009974）またはヒト（番号NM 001896）のCK2 α' サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンからの位置が49 - 69、132 - 142、306 - 326、367 - 387、427 - 447、451 - 471、595 - 615、735 - 755、827 - 847、868 - 888、949 - 969および988 - 1008の間に含まれる α' サブユニットの転写物の断片、

d) ヒト（番号NM 001320）またはマウス（番号NP 034105）のCK2 β サブユニットのcDNA配列に関して、ATGコドンからの位置が80 - 100、116 - 127、164 - 208、369 - 389、400 - 420、527 - 591および613 - 643の間に含まれる β サブユニットの転写物の断片、そして

e) a)、b)、c) およびd) にて定義された断片と少なくとも80%の同一性を示す17～21ヌクレオチドの断片。

【0019】

二本鎖オリゴヌクレオチドは、CK2プロテインキナーゼの対応するサブユニットの発現を阻害することができるsiRNAに相当する；センス鎖またはプラス鎖の17～21ヌクレオチドのRNA配列は、哺乳類CK2プロテインキナーゼの α 、 α' または β サブユニットの転写物の標的配列の配列である。

【0020】

本発明は、任意の生物、特に真核生物のCK2プロテインキナーゼを標的とする天然、合成、半合成または組み換えオリゴヌクレオチドを包括的に含む。ヒトおよびマウス配列に関連して提供される情報が与えられると、当業者は、配列データベースにおいてアクセス可能な他の真核生物、特に哺乳類の配列における等価な位置を見出すことができる。

【0021】

本発明によれば、参照配列に対するオリゴヌクレオチド配列の同一性は、それらの間の

10

20

30

40

50

最大の一致を得るように、配列が整列された時に同一であるヌクレオチドのパーセンテージの関数として評価される。

【0022】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドの有利な実施形態によれば、前記配列は、以下からなる群から選択される：

- a) 配列番号1～13の配列に相当するRNAによって規定される α サブユニットの断片、
- b) 配列番号14～25の配列に相当するRNAによって規定される α' サブユニットの断片、
- c) 配列番号26～40の配列に相当するRNAによって規定される β サブユニットの断片、

および

d) その5'および / または3'末端で1または2ヌクレオチド短縮された、a)、b) またはc) で定義される配列。

10

【0023】

本発明の目的において、「DNA配列に相当するRNA」という表現は、当該DNA配列のデオキシリボヌクレオチド (a、g、c、t) がリボヌクレオチド (a、g、c、u) で置換された配列を意味することを意図している。

【0024】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドの別の有利な実施形態によれば、各鎖は、5'に位置するリン酸基と3'に位置するヒドロキシル基を含む。

【0025】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドのさらに別の有利な実施形態によれば、前記3'末端の前記突出ヌクレオチドは、対ttおよびaaからなる群から選択される。

20

【0026】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドのさらに別の有利な実施形態によれば、それは19または20ヌクレオチドの二本鎖から構成される。

【0027】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドのこの実施形態の有利な改変 (arrangement) によれば、それは配列番号67または68の配列によって定義されるセンス鎖を含む。

【0028】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドのさらに別の有利な実施形態によれば、それは21～23ヌクレオチドの二本鎖から構成される。

30

【0029】

前記二本鎖オリゴヌクレオチドのこの実施形態の有利な改変によれば、配列番号41～66、69～81、83および86の配列によって定義されるセンス鎖を含む。

【0030】

以下の表I、IIおよびIIIは、配列番号1～86の配列の種々のオリゴヌクレオチドの特性をまとめている。

【0031】

40

50

【表 1】

表 I : 標的配列および SiRNA α

名称 および 番号	マウス標的配列 (センス配列)	SRNA	サイズ	Tm	%GC	位置 / ATG コドン NM_007787 マウスおよびヒト 配列の NM_001895	Hu * / マウス 相同性
CK2 α 1	cagacc c gaga g tactggga (配列番号:3)	gaccccgagaguacugggatt ttcuggggcucucaugacccu (配列番号:44)	21	61.5	57	54	2
CK2 α 2	aacacacacagaccccgagag (配列番号:2)	aaucacacagaccucgagtt ttuuaugugugucuggagcuc (配列番号:43)	21	61.7	52.4	46	2
CK2 α 3	aagcagggccagagtttacac (配列番号:1)	gcagggccagaguuacactt ttcguccggucucaaaugug (配列番号:41)	21	58.6	52.4	18	0
CK2 α 4	aacacacacagaccccgagag (配列番号:2)	cacacacagaccccgagagtt ttgugugugucuggggcucuc (配列番号:42)	21	59.3	52.4	46	2
CK2 α 5	aatttgagaggtagggccaac (配列番号:4)	uuugagagguggggccaactt ttaaacucuccaccggguug (配列番号:45)	21	59.8	52.4	259	2
CK2 α 6	aatgtccgagttgtctctga (配列番号:5)	uguccgaguugcuucgatt ttacaggcucaacgaagagcu (配列番号:46)	21	58.8	47.6	565	1
CK2 α 7	aacgatattctgggcagacac (配列番号:10)	cgaauauuugggcagacactt ttgcuauagaacccgucugug (配列番号:51)	21	57.9	47.6	808	1
CK2 α 8	aaaaccagcatctgtcagcc (配列番号:12)	aaccagcaccuugucagcctt ttuuggucguggaacgagcgg (配列番号:53)	21	60.3	47.6	863	2
CK2 α 9	aaccagcatctgtcagccct (配列番号:13)	ccagcaccuugucagccutt ttgguccguggaacgagcggga (配列番号:54)	21	62.0	52.4	865	2
CK2 α 10	aggatagccaaggtctgg (配列番号:9)	aggauagccaagguucgggtt ttuccuaucguuccuugacc (配列番号:50)	21	58.9	47.6	730	0
CK2 α 11	tgttgaggatagccaaggttc (配列番号:8)	gugaggauagccaagguuctt ttcacuccuaucguuccaag (配列番号:49)	21	57.1	47.6	725	0
CK2 α 12	tcagttggtgaggatagcca (配列番号:7)	caguuggugaggauagccatt ttgucaaccacuccuaucggg (配列番号:48)	21	58.8	47.6	720	0
CK2 α 13	gatatctgggcagacactcc (配列番号:11)	uauauugggcagacacucctt ttauagaacccgucugugagg (配列番号:52)	21	58.6	47.6	811	1
CK2 α 14	tgtggagctgggtgtatgc (配列番号:6)	uggagcuuggguugaugctt ttaccucgaaccaacauacg (配列番号:47)	21	61.8	47.8	644	1

*Hu=ヒト

注意 (NB) : ATG はマウス配列 (番号 NM 007787) の 1 位にあり、ヒト配列 (番号 NM 001095) の 277 位にある。

【 0 0 3 2 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 II : 標的配列および siRNA α'

名称	ヒト標的配列 (センス配列)	SiRNA	サイズ	Tm	%GC	位置	Hu/マウス 相同性
CK2 α' 1	aacagtctgaggagccgcgag (配列番号:14)	cagccugaggagccgcgagtt ttgucggacucccgccgcuc (配列番号:55)	21	66.5	66,7	49	1 ミスマッチ
CK2 α' 2	aaaacttggtcggggcaagta (配列番号:15)	aacuuggucggggcaaguatt ttuugaaccagccccguucau (配列番号:56)	21	59.5	47,6	132	2 ミスマッチ
CK2 α' 3	aaaggaccctgtgtcaagac (配列番号:16)	aggaccucugugucaaagactt ttuccugggacacaguucug (配列番号:57)	21	62.4	47,6	306	1
CK2 α' 4	aagcaactctaccagatcttg (配列番号:17)	gcaacucuaaccagauccugtt ttcuugagauaggucaggac (配列番号:58)	21	55.8	47,6	367	0
CK2 α' 5	aaagctctggattactgccac (配列番号:18)	agcucuggauuacugccactt ttucgagaccuaaugacggug (配列番号:59)	21	58.2	47,6	427	0
CK2 α' 6	aagggaatcatgcacagggat (配列番号:19)	gggaaucaugcacagggautt ttccuuaguacguguccua (配列番号:60)	21	62.8	47,6	451	0
CK2 α' 7	aagggaccagagctcctgtg (配列番号:20)	gggaccagagcuccuugutt ttccugugucgaggaacuc (配列番号:61)	21	65.2	57,1	595	1
CK2 α' 8	aattgccaaggtctgtgggac (配列番号:21)	uugccaagguucggggactt ttaacgguccaagaccucug (配列番号:62)	21	61.5	52,4	735	両端での2
CK2 α' 9	aacattcacggaagcgctggg (配列番号:22)	cauucacggaagcgcuggggt ttguaagugccuucgcgacc (配列番号:63)	21	66.4	57,1	827	1
CK2 α' 10	aacaggcacctgtcagcccg (配列番号:23)	caggcaccuugucagccgtt ttgucguggaacagucgggc (配列番号:64)	21	61.0	61,9	868	2 (内1つは 最後のnt)
CK2 α' 11	aaagaggccatggagcaccca (配列番号:24)	agaggccauggagcaccatt ttucuccguaccucgugggu (配列番号:65)	21	68.4	57,1	949	0
CK2 α' 12	aaggagcagtcacagcctgt (配列番号:25)	ggagcaguccagccuugutt ttccucgucaggucggaaca (配列番号:66)	21	64.6	57,1	988	0

注意: ATG は、マウス配列 (番号 NM 009974) の 99 位およびヒト配列 (番号 NM 001896) の 164 位にある。

【 0 0 3 3 】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 III : 標的配列および SiRNA β

名称	ヒト標的配列 (N°)	SiRNA	サイズ	Tm	%GC	位置	Hu/マウス 相溶性
CK2 β 1	aagacaacccaaccagagtg (配列番号:32)	aagacaacccaaccagagug ccuucugugggguuggucuc (配列番号:73)	21	61.2	52.4	188	0 ミス マッチ
CK2 β 2	tcaatgagcaggtccctcact (配列番号:27)	aaugagcaggucccucacu aguuacucgucaggaggu (配列番号:68)	21	62	52.4	116	0
CK2 β 3	acctggagcctgatgaagaac (配列番号:29)	accuggagccugaagaagaac ccuggaccucggacuacuuu (配列番号:70)	21	60.5	52.4	164	1
CK2 β 4	tggagcctgatgaagaactgg (配列番号:30)	uggagccugaagaagaacugg ggaccucggacuacuuuuga (配列番号:71)	21	62.5	52.3	167	1
CK2 β 5	ggagcctgatgaagaactgga (配列番号:31)	ggagccugaagaagaacugga gaccucggacuacuuuugac (配列番号:72)	21	62.5	52.3	168	1
CK2 β 6	caatgagcaggtccctcacta (配列番号:28)	caaugagcaggucccucacua gaguuacucgucaggagug (配列番号:69)	21	60.1	52.3	117*	0
CK2 β 7	ccaagagacctgccaaccagt (配列番号:35)	ccaagagaccugccaaccagu cgguuucucggacggguuggu (配列番号:76)	21	62	47.6	527	1
CK2 β 8	cctgtcggacatcccagg'tga (配列番号:33)	ccugucggacaucaccagguga cggacagccugagggucua (配列番号:74)	21	62.2	52.3	369	3
CK2 β 9	agcaactcaagagcccagtc (配列番号:38)	agcaacucaagagcccaguc ggucguugaaguucggguc (配列番号:79)	21	60.8	52.3	613	0
CK2 β 10	ccaggctctacgg'ttcaaga (配列番号:36)	ccaggctctacgg'ttcaaga cgguucgagagccaaaguu (配列番号:77)	21	60.5	52.3	554	1
CK2 β 11	agagcccagtcagacgattc (配列番号:40)	agagcccagtcagacgattc gttctcgggucaguuucgucua (配列番号:81)	21	60.6	52.3	623	0
CK2 β 12	aactcaagagcccagtcagag (配列番号:39)	aactcaagagcccagtcagag gcuugaaguucgggucagu (配列番号:80)	21	60.8	52.3	616	0
CK2 β 13	aagctctactccccaaag'tgc (配列番号:34)	gcucuaucgcccagugctt ttcgagagacgggucacg (配列番号:75)	21	63	52.4	400	1
CK2 β 14	aagatccatcgatggcctac (配列番号:37)	gauccaugggcuacggaactt ttcuagguaggcuacggag (配列番号:78)	21	62.3	42.9	571	2
CK2 β 15	aagactacatccaggacaat (配列番号:26)	gacuaucaggacaatt ttcugaugagguccugua (配列番号:67)	21	52.1	38.1	80	0
CK2 β 16	aagactacatccaggacaat (配列番号:26)	aagacuacauccaggacaatt ttuucugaugagguccuguu (配列番号:83)	21				
CK2 β 17	aagactacatccaggacaat (配列番号:26)	ugaagacuacauccaggacu uuacuucugaugagguccug (配列番号:86)	21				

注意 : ATG は、ヒト配列 (番号 NM 001320) の 341 位にある。

【0034】

プロテインキナーゼCK2 (CK2) を阻害する第1の薬剤は、一本鎖オリゴヌクレオチドでもあり、これは、上記で定義した二本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス鎖またはマイナス鎖によって定義されることを特徴とする。

【0035】

上記で定義した二本鎖または一本鎖オリゴヌクレオチドの有利な実施形態によれば、それは安定化されている。

【0036】

安定化されたオリゴヌクレオチドは、当業者に知られており、それらは、特にインビト

口合成の間に修飾された塩基を組み込むことによって、または前記オリゴヌクレオチドに予め組み込まれた塩基の修飾によって、安定化することができる。これら修飾の例を以下の表IVに示す。

【0037】

【表4】

修飾されたヌクレオチド	第1の適用	第2の適用
2' F - CTP	ヌクレアーゼ耐性	
2' F - UTP	ヌクレアーゼ耐性	
2' NH ₂ - CTP	ヌクレアーゼ耐性	
2' NH ₂ - UTP	ヌクレアーゼ耐性	
2' N ₃ - CTP	ヌクレアーゼ耐性	合成後修飾
2' N ₃ - UTP	ヌクレアーゼ耐性	合成後修飾
2 - チオ CTP	UV架橋	
2 - チオ UTP	修飾ハイブリダイゼーション	UV架橋
4 - チオ UTP	修飾ハイブリダイゼーション	UV架橋
5 - ヨード CTP	UV架橋	
5 - ヨード UTP	UV架橋	
5 - ブロモ UTP	UV架橋	
2 - クロロ ATP	UV架橋	
アデノシン5' - (1 - チオ三リン酸)	化学的に不安定	ヌクレアーゼ耐性
シチジン5' - (1 - チオ三リン酸)	化学的に不安定	ヌクレアーゼ耐性
グアノシン - 5' - (1 - チオ三リン酸)	化学的に不安定	ヌクレアーゼ耐性
ウリジン - 5' - (1 - チオ三リン酸)	化学的に不安定	ヌクレアーゼ耐性
擬 - UTP		
5 - (3 - アミノアシル) - UTP	合成後修飾	
5 - (3 - アミノアシル) - dUTP	合成後修飾	

表 IV

【0038】

プロテインキナーゼCK2 (CK2) を阻害する第一の薬剤はまた、上記で定義した二本鎖または一本鎖オリゴヌクレオチドの前駆体であり、以下からなる群から選択されることを特徴とする：

- 上記で定義したセンス鎖またはアンチセンス鎖に対応する一本鎖オリゴヌクレオチド、
- 上記で定義した二本鎖オリゴヌクレオチドのセンス鎖および / またはアンチセンス鎖に対応する二本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (DNA)、
- 上記で定義したセンスおよびアンチセンスRNA鎖の配列を含むヘアピン型オリゴリボヌクレオチド、および
- c) で規定されたオリゴリボヌクレオチドに相当するDNAに対応するセンス鎖とそれに相補的なアンチセンス鎖とからなる二本鎖DNA。

【0039】

本発明の目的において、「RNA配列に相当するDNA」という表現は、当該RNA配列のリボヌクレオチド (a、g、c、u) がデオキシリボヌクレオチド (a、g、c、t) で置換された配列を意味することを意図している。

【0040】

前駆体は、本発明による一本鎖および二本鎖オリゴヌクレオチドを、オリゴヌクレオチド合成および組み換えベクターを用いた転写の従来技術によって製造するのに有用である。

【0041】

siRNAの各鎖は別々に合成され、次に相補鎖はRNA二重鎖を形成するようにハイブリダイズされる。あるいは、siRNAの鎖を同時に合成することができる。

【0042】

10

20

30

40

50

siRNAはまた、Brummelkampら、Science、2002、296、550 - 553に記載された原理に従って、ヘアピン型RNA分子の形態で産生され得る。その後、ヘアピン型RNA分子は、前記RNA分子をトランスフェクトされるかまたは適切な転写ベクターで形質導入された細胞内で切断されて、siRNAが放出される。このヘアピン型RNA分子は、約3~12ヌクレオチドの非相補的オリゴヌクレオチドの短い配列によって分離された2本のsiRNA鎖配列を含み、約5~15ヌクレオチドのループを形成している。例えば、約10ヌクレオチドのループは、約8リボヌクレオチドの短い配列およびsiRNAのセンス鎖の3'末端に由来する2ヌクレオチドから形成される。

【0043】

一本鎖および二本鎖オリゴヌクレオチドは、化学合成またはインビトロ（試験管）もしくは細胞培養物での転写のいずれかで産生され、次いでインビボで投与され得るか、またはインビボで転写ベクター（遺伝子治療）または該siRNAをコードしているDNA（遺伝子導入）で修飾されている生物の細胞中で産生され得る。

【0044】

化学合成は、Elbashirら、Nature、2001、411、494 - 498に記載されている通常のホスホルアミダイト法に従って実施される。例えば、siRNAの各鎖は、リボヌクレオチドの位置2'を保護するための基として2'-O-tert-ブチルジメチルシリル（TBDMs）を用いて、固体支持体上でβ-シアノエチルホスホルアミダイト化学に従って合成することができる。他の保護基を使用することもできる；リボヌクレオチドの5'-ヒドロキシル末端を保護するシリルエーテルは、そのリボヌクレオチドの2'-ヒドロキシルを保護する不安定なオルトエステルと組み合わせて使用することができる。

【0045】

組み換えベクターによる転写は、siRNAの少なくとも一本鎖もしくは二本鎖または上記で定義したヘアピン型RNAをコードする二本鎖DNAを使用する。適切な発現ベクターにクローン化されたこのようなDNAは、それぞれSadherら、Biochem. Int., 1987: 14、1015およびCis Bio Internationalの名義の欧州特許EP 0618 966に記載されている通り、前記siRNAの2本の相補鎖を別々にまたは同時に転写することができる。例えば、欧州特許EP 0618 966に記載されている二重鎖RNAを調製する方法は、標的DNA配列の増幅（PCR）からなるステップの後に二重鎖RNAの形態での二本のRNA鎖の同時転写を可能にする支持体に付着したDNA鋳型を使用する。得られた二重鎖RNAを支持体に結合させ、いくつかの異なるsiRNA配列を同時に分析することができる。

【0046】

前駆体の状態にあるプロテインキナーゼCK2（CK2）を阻害する第1の薬剤は、適切な転写調節因子、特に誘導性または非誘導性プロモーターおよび転写ターミネーターの制御下にて、上記で定義した少なくとも1つの前駆体を含むことを特徴とする発現カセットに挿入することができる。

【0047】

本発明の目的のために、上記で定義したオリゴヌクレオチドからなる挿入物を含む真核または原核ベクターを使用することができ；好ましくは、前記ベクターは、上記で定義の発現カセットが挿入されている発現ベクターである。

【0048】

これらのベクターは、それ自体公知の従来の組み換えDNAおよび遺伝子治療法によって構築され、宿主細胞に導入される。目的の核酸分子が真核または原核宿主細胞中に導入し維持するために挿入され得る多くのベクターは、それ自体知られている；適切なベクターの選択は、このベクターに想定される用途（例えば、目的とする配列の複製、この配列の発現、染色体外の形態での配列の維持、でなければ宿主の染色体材料への組み込み）および宿主細胞の性質次第でもある。中でも目的の配列があらかじめ挿入されているアデノウイルス、レトロウイルス、レンチウイルスおよびAAVなどのウイルスベクター、またはプラスミドのような非ウイルスベクターを使用することができる。

【0049】

好ましくは、前記ベクターは、上記の二本鎖オリゴデオキシヌクレオチドを含むDNAベクター（組み換えプラスミドまたはウイルス）である；上記で定義したsiRNAをコードしているそのようなベクターは、前記siRNAのインビトロまたはインビボ産生に有用である。

【0050】

siRNAの安定した発現に特に適したベクターは、具体的には、T.R. Brummelkampら、Science、2002、296、550 - 553に記載されているものである。

【0051】

本発明による別の特定の組み合わせの実施形態によれば、第1の薬剤は、5 - (3 - クロロフェニルアミノ) ベンゾ[c] [2,6]ナフチリジン - 8 - カルボン酸 (CAS 1009820 - 21 - 6、以下の実験の部ではその商品名「CX - 4945」と称する)、5,11 - ジメチル - 6H - ピリド[4,3 - b]カルバゾール (CAS 519 - 23 - 3、商品名「エリプチシン」と称する)、または7 - クロロ - 10 - メチル - 11h - ベンゾ[g]ピリド[4,3 - B]インドール - 3 - オール (prudentら、Cancer Research 2010の刊行物中に「化合物18」として記載されている)、または2 - ジメチルアミノ - 4,5,6,7 - テトラブプロモ - 1H - ベンゾイミダゾール (DMAT)、または4,5,6,7 - テトラブプロモベンゾトリアゾール (TBBt)、またはペプチドCIGB300 (Pereaら、Mol Cell Biochem. 2008 Sep ; 316 (1 - 2) : 163 - 7) である。もちろん、このリストは限定的ではなく、他のCK2阻害剤を本発明に従って使用することができる。具体的には、これらの分子の誘導体が、引用した分子と少なくとも同程度効率的かつ選択的にCK2阻害効果を示すならば、使用することができる。

【0052】

第1の薬剤は、5 - (3 - クロロフェニルアミノ) ベンゾ[c] [2,6]ナフチリジン - 8 - カルボン酸および5,11 - ジメチル - 6H - ピリド[4,3 - b]カルバゾールからなる群から選択されることが好ましい。

【0053】

本発明による別の特定の組み合わせの実施形態によれば、第2の薬剤は、2 - ((2S, 6R) - 2,6 - ジメチルモルホリノ) - N - (5 - (6 - モルホリノ - (4 - オキソ - 4H - ピラン - 2 - イル) - 9H - チオキサンテン - 2 - イル) アセトアミド (CAS925701 - 49 - 1、以下の実験の部ではその商品名「KU - 60019」と称する) および2 - モルホリン - 4 - イル - 6 - チアントレン - 1 - イル - ピラン - 4 - オン (CAS 587871 - 26 - 9、以下の実験の部ではその商品名「KU - 55933」と称する) からなる群から選択される。もちろん、このリストは限定的ではなく、他のATMキナーゼ阻害剤を本発明に従って使用することができる。具体的には、引用した分子の誘導体が、これらの分子と少なくとも同程度効率的かつ選択的にATMキナーゼ阻害効果を示すならば、使用することができる。

【0054】

第2の薬剤は、2 - ((2S, 6R) - 2,6 - ジメチルモルホリノ) - N - (5 - (6 - モルホリノ - 4 - オキソ - 4H - ピラン - 2 - イル) - 9H - チオキサンテン - 2 - イル) アセトアミドであることが好ましい。

【0055】

本発明による特定の組み合わせは、第1の薬剤として5 - (3 - クロロフェニルアミノ) ベンゾ[c] [2,6]ナフチリジン - 8 - カルボン酸および第2の薬剤として2 - ((2S, 6R) - 2,6 - ジメチルモルホリノ) - N - (5 - (6 - モルホリノ - 4 - オキソ - 4H - ピラン - 2 - イル) - 9H - チオキサンテン - 2 - イル) アセトアミドである。

【0056】

上記の組み合わせにおいて、第1および第2の薬剤は、組成物（丸剤、錠剤、カプセル中に存在する粉末、液体などの、製薬上許容されるどのような形態でも）中にまたはキット中に含まれ得る。2つの薬剤は別々に提供することもでき、もし2つの薬剤の投与の間の時間が1週間、好ましくは48時間、より好ましくは24時間を超えなければ、同一の個体に一緒にまたは別々に投与されてすぐ後に、本発明の意味において「組み合わせた」とみなされる。

【0057】

上記のように、本発明者らは、VHL ヌル細胞株におけるCK2阻害剤とATMキナーゼ阻害剤との間の合成致死性相互作用を認めた。さらなる研究により、VHLが欠損していない細胞株では、2つの薬剤間に認められた相乗効果が弱いことが明らかになった。したがって、好ましい実施形態によれば、本発明による組み合わせは、VHLが不活化している固形腫瘍を治療するための医薬として使用される。そのような腫瘍の例は、ccRCCおよび血管芽細胞腫のようなフォン・ヒッペル・リンドウ（VHL）病で認められる腫瘍の散発性対応物だけでなく、網膜および中枢神経系の血管芽細胞腫、淡明型腎細胞癌、褐色細胞腫、内リンパ嚢腫、脾臓細胞腫瘍、および副睾丸（男性）または子宮広間膜（女性）の乳頭状嚢胞腺腫のようなフォン・ヒッペル・リンドウ病に罹患している被験体において生じるものである（KundoおよびKaelin、2001）。

10

【0058】

腎臓癌の中で、淡明型腎細胞癌（ccRCC）が最も頻発し最も攻撃的である。特定の実施形態によれば、本発明による組み合わせは、淡明型腎細胞癌（ccRCC）を治療するための医薬として使用される。

【0059】

腎細胞癌の第一選択の治療法は腎摘出である。腎摘出後でさえ、腫瘍がVHL欠損である場合には特に、転移リスクは高い。CK2阻害剤とATMキナーゼ阻害剤との間の相乗効果は、VHL細胞において特に強力であるので、本発明による組み合わせの投与は、転移の形成を防ぐために腎摘出の前、間および / または後に特に関心が高い。転移性腎細胞癌（mRCC）では、本発明による組み合わせは、（ほとんどが）VHL⁺環境においてVHL⁻である転移性細胞を選択的に殺すのに有用である。したがって、本発明のもう一つの側面は、転移性腎細胞癌（mRCC）を治療するため、または転移の出現を予防するために上記の組み合わせを使用することである。

20

【0060】

本発明の別の側面は、VHLが不活化している癌の治療におけるCK2阻害剤の効果を高めるための医薬として、ATMキナーゼ阻害剤を使用することである。前記において「高める」とは、CK2阻害剤の効果を高め、その結果、合成致死性の場合のように、各阻害剤単独の効果の合計よりも組み合わせの効果の方が大きくなることを意味する。

【0061】

本発明のこの側面に従って使用することができるATMキナーゼ阻害剤は、2 - （（2S,6R） - 2,6 - ジメチルモルホリノ） - N - （5 - （6 - モルホリノ - 4 - オキソ - 4H - ピラン - 4 - イル） - 9H - チオキサテン - 2 - イル）アセトアミド、2 - モルホリン - 4 - イル - 6 - チアントレン - 1 - イル - ピラン - 4 - オンおよびその誘導体（上記で定義した通り）であることが好ましい。

30

【0062】

ATMキナーゼ阻害剤は、好ましくは、5 - （3 - クロロフェニルアミノ）ベンゾ[c] [2,6]ナフチリジン - 8カルボン酸、5,11 - ジメチル - 6H - ピリド[4,3 - b]カルバゾール、7 - クロロ - 10 - メチル - 11h - ベンゾ[g]ピリド[4,3 - B]インドール - 3 - オールおよびその誘導体から選択されるCK2阻害剤の効果を高めるために使用される。

40

【0063】

好ましい実施形態によれば、ATMキナーゼ阻害剤は、好ましくは、RCC、ccRCCおよびmRCCから選択される癌の治療におけるCK2阻害剤の効果を高めるために使用される。

【0064】

本発明のさらに別の側面は、VHLが不活化している癌の治療におけるATMキナーゼ阻害剤の効果を高める医薬として使用するためのCK2阻害剤の使用である。

【0065】

本発明のこの側面に従って使用されるCK2阻害剤は、5 - （3 - クロロフェニルアミノ）ベンゾ[c] [2,6]ナフチリジン - 8 - カルボン酸、5,11 - ジメチル - 6H - ピリド[4,3 - b]カルバゾール、7 - クロロ - 10 - メチル - 11h - ベンゾ[g]ピリド[4,3 - B]インドール - 3

50

- オール、2 - ジメチルアミノ - 4,5,6,7 - テトラブロモ - 1H - ベンゾイミダゾール、4,5,6,7 - テトラブロモベンゾトリアゾールおよびそれらの誘導体であることが好ましい。

【0066】

CK2阻害剤は、786好ましくは、2 - ((2S,6R) - 2,6 - ジメチルモルホリノ) - N - (5 - (6 - モルホリノ - 4 - オキソ - 4H - ピラン - 2 - イル) - 9H - チオキサンテン - 2 - イル) アセトアミド、2 - モルホリン - 4 - イル - 6 - チアントレン - 1 - イル - ピラン - 4 - オンおよびそれらの誘導体から選択されるATMキナーゼ阻害剤の効果を高めるために使用される。

【0067】

好ましい実施形態によれば、CK2阻害剤は、RCC、ccRCCおよびmRCCから選択される癌の治療におけるATMキナーゼ阻害剤の効果を高めるために使用される。

10

【0068】

本発明は、培養細胞に対するATMキナーゼおよびCK2の組み合わせ阻害の効果を示す実施例ならびに添付の図面を参照する以下のさらなる説明から、より明確に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】図1：スクリーニングのフローチャート。

【図2A】図2：A) 示されたトランスフェクトされた786 - O細胞（黒色のshCTRLおよび白色のshCK2 α ）を、1、5または10 μ MのATM阻害剤、KU - 55933で48時間処理した。細胞生存を測定し、DMSOを0%として比較した増殖阻害のパーセンテージで表した。 $p = 0.44$ を表す。CTRLは「コントロール」を意味する。

20

【図2B】B) shCTRL 786 - O細胞を指示濃度のATM阻害剤、KU - 55933（白色のバー）、CX - 4945（灰色）または両方（黒色）で48時間処理し、細胞生存をAと同様に測定した。 p は、ATMiとCX - 4945の%細胞増殖阻害の合計と、両者の混合物との間の $p = 0.03$ を表す。

【図2C】C) 2つの異なるATM阻害剤（ATM阻害剤KU - 60019（Sellekchem）およびATM阻害剤KU - 55933、CAS 587871 - 26 - 9（Calbiochem））を使用した786 - O細胞の生存に対するCK2の2つの異なる阻害剤（CX - 4945またはエリプチシン）との相乗効果を研究した。（●：ATM阻害剤；□：CK2阻害剤；△：両方）。左上のパネル：CX - 4945およびKU - 55933；右上のパネル：CX - 4945およびKU - 60019；左下パネル：エリプチシンおよびKU - 60019。細胞生存を測定し、ビヒクル（DMSO）で処理した細胞の細胞生存率を100%として比較した生存率を表した。

30

【図3A】図3：A) 20% O₂（正常酸素状態）下で培養された786 - O細胞（VHL⁺上部パネルおよびVHL⁻下部パネル）を、漸増濃度のCX - 4945でKU - 60019（ATMi）の非存在下（点線）または存在下（丸付きの破線は2.5 μ M、三角付きの破線は5 μ M、および四角付きの直線10 μ M）に48時間処理した。細胞死を測定し、DMSOを0%として比較したパーセンテージで表した。

【図3B】B) 正常酸素状態下での5 μ MのKU - 60019または2.5 μ MのCX - 4945または両方（MIX：5 μ M KU60019 + 2.5 μ M CX - 4945）での処理による786 - O細胞（VHL⁺上部パネルおよびVHL⁻下部パネル）の細胞増殖阻害。

40

【図4A】図4：A) 1.5% O₂（低酸素状態）下で培養された786 - O細胞（VHL⁺上部パネルおよびVHL⁻下部パネル）を、漸増濃度のCX - 4945でKU - 60019（ATMi）の非存在下（点線）または存在下（2.5 μ M（丸付きの破線）、5 μ M（三角付きの破線）および10 μ M（四角付きの直線））に48時間処理した。細胞死を測定し、DMSOを0%として比較したパーセンテージで表した。

【図4B】B) 低酸素状態下での5 μ MのKU - 60019または2.5 μ MのCX - 4945または両方（MIX：5 μ M KU - 60019 + 2.5 μ M CX - 4945）での処理による786 - O細胞（VHL⁺上部パネルおよびVHL⁻下部パネル）の細胞増殖阻害。 $p = 0.019$ を表す。

【図4C】C) Caki - 2細胞を、正常酸素状態下（下のパネル）または低酸素状態下（上の

50

パネル)にて、示された濃度のKU - 60019で、CX - 4945の非存在下または2.5もしくは5 μ M (それぞれ白色、灰色および黒色のバー)の存在下に48時間処理した。細胞生存を測定し、DMSOを0%として比較した細胞死のパーセンテージで表した。*は $p = 0.16$ を表す。

【図4D】D) RPTEC細胞を、正常酸素状態下(下のパネル)または低酸素状態下(上のパネル)にて、示された濃度のKU - 60019で、CX - 4945の非存在下または2.5もしくは5 μ M (それぞれ白色、灰色および黒色のバー)存在下に48時間処理した。細胞生存を測定し、DMSOを0%として比較した細胞死のパーセンテージで表した。「Add mix」は、2つの阻害剤の組み合わせにおける測定された効果と、各阻害剤について別々に測定された効果の合算に相当する理論値との差に対応する。

【図5】図5: 1.5% O_2 (低酸素状態) 下で培養した786 - O細胞(VHL⁻およびVHL⁺)を、DMSO (CTRL)、5 μ M KU - 60019 (ATMi)、2.5 μ M CX - 4945またはその両方(混合物)で48時間処理した。ウエスタンブロット法により、ATMおよび α カテニンの発現(全体)およびリン酸化(P-)を評価した。ローディングコントロールとしてHSP90を使用した。

【図6A】図6:A) 低酸素状態下、示された化合物で48時間処理し、細胞周期分析のためにヨウ化プロピジウムで標識した786 - O VHL⁻細胞のFACS分析。

【図6B】B) 低酸素状態下、示された化合物で48時間処理した786 - O VHL⁻細胞のウエスタンブロット分析。HSP90をローディングコントロールとして使用した。

【図7-1】図7: 786 - O VHL⁻細胞をポリHEMAでブリコートしたU底ウェルに播種し、3日間増殖させ、続いて48時間示されたように処理した。A) 死細胞はヨウ化プロピジウムを用いて可視化した。

【図7-2】BおよびC) ArrayScan^{VTI} (ThermoScientific) で取得および分析を行った。

【図8A】図8: 材料及び方法(3Dアッセイにおける)に記載されているようにヨウ化プロピジウムによる定量化によって細胞死をモニターした。A) 786 - O shCTLおよび786 - O shCK2 α MTSを、ビヒクルまたは漸増濃度のKU - 60019 (5、7.5および10 μ M)を用いて処理した。CTLは「コントロール」を意味する。

【図8B】B) 786 - O shCTLおよび786 - O shATM MTSを、ビヒクルまたは漸増濃度のCX - 4945 (5、7.5および10 μ M)を用いて処理した

【図8C】C) ATM、CK2 α 、CK2 β およびローディングコントロールとしてのGAPDHに対する抗体を用いた、示された細胞株のウエスタンブロット分析。

【図9】図9: スフェロイド遊走アッセイ: スフェロイドを前述のように3日間増殖させた後、平底組織培養プレートに播種し、DMSO、KU - 60019 (ATMi)、CX - 4945 (CX) または両方(混合物)を0hに対応する時点で処理する。示された時点で写真を撮影し、広がっている細胞が占める面積をImageJを用いて測定した。168時間でのATMiと混合物との間のステューデン検定は0.05未満である。

【図10A】図10:A) 786 - O - Luc細胞(300万個)を腎被膜下に注射した。4週間増殖させた垂直向性マウス腎腫瘍を切片(300 μ m)に切り出し、ビヒクル(DMSO)、KU - 60019 (10 μ M)、CX - 4945 (10 μ M) またはそれらの組み合わせのいずれかで48時間処理した。注射した786 - O LUC細胞を追跡し、ルシフェラーゼ発光を測定した。写真A、治療前後。右パネル: 48時間の処理後のコントロールにおける変化と比較して、各条件のルシフェラーゼ比倍率変化(* $p < 0.05$)。マン・ホイットニー検定。

【図10B】B) (写真に示した) 腫瘍および正常な腎臓組織を有する組織切片培養物(厚さ300 μ m)を、a. ビヒクル、b. KU - 60019 10 μ M、c. CX - 4945 10 μ Mおよびd. KU 10 μ M + CX 10 μ Mで48時間処理した後にLive and Deadキット(ThermoFisher)を用いてマークした。Apotome装備のツァイス顕微鏡で撮影した画像上の正常および腫瘍領域の両方について、赤色マーカー強度(臭化エチジウム=死細胞)を測定した。B1、左下パネル: KU - 60019 (** $p \leq 0.0001$)、CX - 4945 (** $p \leq 0.001$) 単独とKU + CXの間に有意差は見られなかった(すべての条件についてマン・ホイットニー検定) (

10

20

30

40

50

CTL対MIX = ***、ここでは表されていない) ; B2、右パネル：正常組織におけるPI強度は、薬剤の混合に対して各条件単独とを比較した場合、有意差を示さない。バースケール 100 μ m。

【図11】図11：786-O細胞を、示された阻害剤で48時間処理した。細胞生存を測定し、DMSOを0%として比較した増殖阻害のパーセンテージで表した。「Add mix」は、2つの阻害剤の組み合わせにおける測定された効果と、各阻害剤について別々に測定された効果の合算に相当する理論値との差に対応する。A) 5 μ MのKU55933および5 μ MのDMAT。B) 5 μ MのKU60019および5 μ MのDMAT。

【実施例】

【0070】

実施例1

材料および方法

化学薬品

純粋なDMSOにすべての化合物を10mMの濃度で溶解した。CX-4945は、(Pierre, Chuaら、2010)によって記載された方法に従って、Plateau Synthse Organique, De partement de Chimie moleculaire, UJF, Grenobleにて合成された。化合物ライブラリーは、1つはENZOのもの(screen-wellキナーゼ阻害剤)およびもう一方はSelleckchemのもの(チロシンキナーゼ阻害剤)である2つの商用ライブラリーから構成され、それらは他の阻害剤で補完された(表V参照)。

【0071】

【表5】

分子	標的	分子	標的	分子	標的	分子	標的
U0126	MEK	PHA665752	MET	CHIR 99021	GSK3b	ラパチニブ (Lapatinib)	EGFR
AG370	PDGF R	AT9283	AURORA A/B	チルホスチン25	EGFR	TSU 68	TGFbR/ FGFR1
SP600125	JUNK	TIE 2	ANGR	ML-7	MLCK	CP 690550	JAK3
ゲフィチニブ	EGFR	GDC0941	PI3K	ラバマイシン	mTOR	STF 62247	オートファジー 誘導物質
スニチニブ	VEGFR	ルキシソリチニブ (Roxolitinib)	JAK/ STAT	OSI 930	cKIT	バラセルチブ (Barasertib)	
ラパチニブ (APATINIB)	VEGFR	RG1462	EGFR	KRN633	VEGFR	AG 490	JAK2
ドキシソルビシン	トポイソメラーゼ	H89	PKA	GSK 1838705	IGFR	SU 4312	FLK1
ベムラフェニブ	ERK	ケンパウロン (Kempollone)	GDK3b	TGFb R inhib	TGFbR	ボスチニブ	ABL
SB203580	P38 MAPK	SU11274	MET	ATM inhib	ATM	パゾパニブ	VEGFR
LY294002	PI3K	AG490	EGFR	ビスアタンノール	SYK	AZ 960	JAK
インジルビン	GSK3b	PF562271	FAK	ロスコビチン	CDK	CX4945	CK2
PF2341066	MET	イニバリブ	PARP	アキシチニブ	VEGFR & PDGFR	テムシロリムス	mTOR
SXG523	MET	エンザスタウリン	PKC	イマチニブ	ABL	Aurora 1 inhib	AURORA A
WP1130	DUB/ABL	チルホスチン1	CTRL inactif	INCB018424	JAK/ STAT	AG 126	IRAK
ファセンチン (FASENTIN)	GLUT1	KN62	CamK	クレノラニブ	PDGFR alpha	GW 5074	cRAF
YM155	サバイビン	BML257	AKT	サラカチニブ	SRC	ダサチニブ	ABL
ラベンダスチン	EGFR	NVP-ADW742	IGF1R	GSK1120212	MEK	ソラフェニブ	VEGFR
セベリシン	PKC	MK1775	WEE1	PP1	SRC	Cyt 387	JAK
Y27632	ROCK	KX2 - 391	SRC	ZM 336372	cRAF	5FU	ADN
バクリタキセル	チューブリン	ペリホシン	AKT	AZD 0530	SRC/ABL	トザセルチブ	オーロラ

表V：化合物ライブラリー

レンチウイルス粒子は、異なる遺伝子を標的とする異なるshRNA配列を含むPLKO1ベクターHpγgk - puro - cMV - tGFP由来のSigma - Aldrichによって提供された(表VI参照)。

表V：化合物ライブラリー

レンチウイルス粒子は、異なる遺伝子を標的とする異なるshRNA配列を含むPLKO1ベ

クターHpgk - puro - cMV - tGFP由来のSigma - Aldrichによって提供された（表VI参照）。

【0072】

【表6】

遺伝子	受入番号	遺伝子	受入番号
PDK1	NM_002610	BCL2A1	NM_004049
PLK2	NM_006622	TP53	NM_000546
PNCK	NM_198452	ATM	NM_000051
HCK	NM_002110	ATR	NM_001184
NEK6	NM_014397	CHEK1	NM_001274
TRIB3	NM_021158	CHEK2	NM_007194
PCTK3 / CDK18	NM_002596	MAPK14	NM_001315
MET	NM_000245	CDK6	NM_001259
MELK	NM_014791	PTK2	NM_005607
AURKB	NM_004217	SRC	NM_198291
KIT	NM_000222	PAX2	NM_000278
PRKCD	NM_006254	CSF1R	NM_005211
PXK	NM_017771	FGFR1	NM_015850
PDGFRL	NM_006207	CA9	NM_001216
LCK	NM_005356	AURORA	NM_003600
PIM2	NM_006875	FLT1	NM_002019
MAPK1	NM_138957	CSNK2A1	NM_001895
AURKB	NM_004217	CSNK2B	NM_001320

表 VI : shRNA が標的とする遺伝子

Sh - CTLは、空のベクターHpgk - puro - cMV - tGFPに対応する；

Sh - CK2 α は、配列CAATTGTACCAGACGTTAA（配列番号：87）でクローニングされたベクターHpgk - puro - cMV - tGFPに対応する；

Sh - ATMは、配列TGATGGTCTTAAGGAACATCT（配列番号：88）でクローニングされたベクターHpgk - puro - cMV - tGFPに対応する。

【0073】

細胞培養

ccRCC細胞株786 - O、RCC4およびCaki - 2、ならびに正常腎近位尿細管上皮細胞株RPTECをATCCおよびEvercyte（ドイツ）それぞれから得た。細胞は加湿インキュベーター（37℃、5% CO₂）内の直径10cmのプレート中で、786 - Oに関しては、10%ウシ胎仔血清、ペニシリン[100U / mL]、ストレプトマイシン[100 μ g / mL]を含有するRPMI 1640培地（Gibco）で増殖させた。10%ウシ胎仔血清、ペニシリン[100U / mL]、ストレプトマイシン[100 μ g / mL]を含むDMEN培地グルタマックス4,5mg / mL（Gibco）をRCC4細胞に用い、10%ウシ胎仔血清、ペニシリン[100U / mL]、ストレプトマイシン[100 μ g / mL]を含有するマッコイ培地をCaki - 2細胞株に用いた。

【0074】

RPTECをProXup（Evercyte）で培養した。786 - OおよびCaki2細胞は2～3日おきに、そしてRPTECについては週に1回だけ継代した。

【0075】

VHLヌル細胞の親株を用いて、空の発現ベクターHA - pBABEまたは機能的VHL構築物HA - VHL（VHL⁺細胞）のいずれかを含有するその誘導株を生成した。安定したトランスフェクタントを、ピューロマイシン2 μ g / mLを補充した培地中に維持した。

【0076】

786 - O細胞におけるshRNAの形質導入

感染のため、786 - O細胞を6ウェルプレート（血清補充RPMI1640培地2mL中に 8×10^5 ）に播種した。翌日、接着細胞を、 $8 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ のポリブレンを含有する血清補充培地100 μL で希釈したレンチウイルス粒子（1~5 MOI）と共にインキュベートした。4時間後、培地1mLを培養物に添加し、形質導入を16時間維持した後、細胞を洗浄し、培地を交換した。安定した形質導入のために、ピューロマイシンによる選択は感染後36時間で開始し（濃度 $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ ）、すべての細胞培養の間維持された。

【0077】

スフェロイド培養

3D培養（スフェロイド）のために、スフェロイドの形成を可能にするようにポリHEMAをウェル当たり20mg / mLコーティングした低蒸発蓋（Microtest（商標）、Becton Dickinson Labware、San Jose、CA）を有する96ウェルU底組織培養プレート中でスフェロイドを調製した。腎臓癌細胞786 - O WT、786 - O pBABEおよび786 - O VHL（指数増殖中の培養物から採取）を、10%FCSを補充したRPMI中に 1×10^3 細胞 / mLの密度で播種した。これらの細胞懸濁液90 μL （ 9×10^2 細胞）を各ウェルに入れ、次いで組織培養プレートを 37°C および5% CO_2 で3日間インキュベートした後、さらに薬剤処理を48時間行った。

【0078】

生存アッセイ

PrestoBlueアッセイ（Invitrogen、Carlsbad、CA）を用いて細胞毒性を測定した。96ウェルマイクロタイタープレートに濃度 5×10^4 細胞 / mLで細胞株を播種した。細胞を 37°C および5% CO_2 で24時間接着させた。細胞を陰性コントロールDMSOまたは陽性薬CX - 4945に20 μM で48時間曝露、または他の分子に指示濃度で曝露した。

【0079】

ウェスタンブロット分析

プロテアーゼ阻害剤カクテル（Sigma P8340）とホスファターゼ阻害剤カクテル1および2（Sigma P2850、P5726）とを含むプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤のカクテル（トリスHCl pH 7.4 10mM、NaCl 150mM、SDS 0.1%、デオキシコール酸Na 0.5%、EDTA 1mM、トリトンX100 1%を含むRIPAバッファー中で、15分間細胞を溶解し、15分間16,000gで清澄化した。ホモジネートをBCAタンパク質アッセイキット（Thermo Scientific）を用いて定量した。4~12%グラジエントプレキャストゲル（Bio - Rad）を用いてSDS - PAGEを行い、NuPAGEバッファーにて150Vで75分間電気泳動にかけた。20 $\mu\text{g} / \text{レーン}$ の分離タンパク質をPVDFメンブレンに移した（100Vで60分間）。ブロッティングしたメンブレンは飽和バッファー（TBST中1%BSA）を用いて室温で1時間ブロックした後、飽和バッファーで希釈した一次抗体と1時間30分インキュベートした。二次抗体を1時間添加した。Luminata Forte Western HRP基質（Millipore）およびFusion FX取得システムを用いて検出を達成した。抗 β アクチン（Abcam）、GAPDH（Ambion）またはHSP90（Cell Signaling）を使用して、タンパク質ローディングが等しくなるようコントロールした。

【0080】

完全自動化ハイスループットスクリーニングアッセイ

96ウェルプレートに、Ctrlのまたは標的のshRNAを発現する786 - O細胞の懸濁液（ 5.5×10^3 細胞 / mL）を90 μL 播種し、プレートを5% CO_2 、 37°C の加湿環境下で一晩インキュベートした。次いで、10 μL の各化合物を、示された濃度（最終濃度1、5または20 μM ）でCMBAのロボットプラットフォームを用いて添加した。DMSOを陰性コントロールとして使用し、20 μM CX - 4945を陽性コントロールとして用いた。プレートをさらに48時間培養した。細胞をPrestoblueと共にバイタルHoechst（33342）で標識し、TecanのInfinite M100リーダーで蛍光読み取りを行った。図1のフローチャート参照。

【0081】

データ処理とヒットの選択

一次および二次ハイスループットスクリーニングアッセイは、単純な統計パラメーター、Z'因子 (Zhang、Chungら、1999) を用いて評価および検証した。

【0082】

未処理のデータは、解析に使われる自社製解析ソフトウェアTAMISのデータベースにまずインポートした。各試験プレートおよびアッセイタイプ (PrestoBlueまたはバイタルHoechst) について、8つのDMSO陰性コントロール値の平均を活性0%と見なし、8つのCX-4945陽性コントロール値の平均を活性100%と見なした。次に、各化合物X関連の未処理の値を、DMSO (0%) およびCX-4945 (100%) と比較した活性パーセントに変換した。最後に、各化合物X / 標的shRNA Y対およびアッセイについて、化合物X / Ctrl-shRNAで得られた活性パーセンテージと、化合物X / 標的shRNA Y対が化合物X / Ctrl-shRNA対と比較して、相加効果または相乗効果さえ示していることを同定するために、化合物X / 標的shRNA Y活性パーセンテージから差し引いた。

10

【0083】

統計分析

全ての値を平均±SEMとして表した。グループ間の統計的有意性は、GraphPad Prism v6.0dを用いて決定した。

【0084】

3Dアッセイ

3日間予備形成されたスフェロイドを、異なる薬物で示された濃度にて48時間処置した。その後、Hoechst (200ng / mL) およびヨウ化プロピジウム (1 μg / mL) をそれぞれ細胞核および細胞死のマーカーとして添加した。IPおよびHoechst蛍光の画像を、自動顕微鏡ArrayScanVTI (ThermoScientific) を用いてCMBAPラットフォームに取得した。ArrayScanVTIは、異なる倍率で96ウェルマイクロプレート内の固定細胞または生細胞の画像を迅速かつ完全に自動取得することを可能にする蛍光顕微鏡である。専用ソフトウェアを使用して、スフェロイド面積測定、各染色の蛍光強度測定、および死細胞数の計数のようなハイコンテンツ画像解析を自動的に行う。

20

【0085】

細胞遊走アッセイ

Gunterら (2003) に記載されているように、細胞遊走アッセイを実施した。ポリHemaでコーティングした丸底96ウェルプレート中で3日間静置培養した後、個々の多細胞スフェロイドを平底96ウェル培養プレートに入れ、DMSO、CX-4945、KU-60019または両者の混合物で処理した。固体支持体に付着すると、スフェロイドは分離し、放出された細胞は初期位置から放射状に移動した。細胞をHoechstでマークし、AXIObserver ツァイス顕微鏡で画像を撮影した。細胞によって覆われた面積を、24時間毎に7日間に渡って測定した。細胞によって覆われた面積を細胞移動能力の指標とした。

30

【0086】

生体外モデル

マウスの同所性異種移植腫瘍モデル

動物実験の全ては、当研究所の定めたガイドラインおよび実験動物使用のため欧州共同体によって策定されたガイドラインによって承認された。平均体重18~20gの4~6週齢のBALB / cヌードマウス (Charles River Laboratories) を用いて、同所性異種移植腫瘍モデルを確立した。マウスは、特定の病原体のない条件下に収容し飼育した。腫瘍を産生するために、0.25%トリプシン-EDTAへの短時間の曝露によって、サブコンフルエントな培養物から腎臓癌細胞786-O lucを採取した。10%FBSを含む培地でトリプシン処理を停止させ、細胞を無血清培地で1回洗浄し、PBS 500 μLに再懸濁した。786-O luc細胞を3×10⁶個、無胸腺ヌードマウスの右の腎臓に注射することにより腎臓の同所性移植を行った。移植の7週間後、異種移植された腎臓を取り出して組織切片を調製した。

40

【0087】

新鮮な組織切片

ビブラトームVT1200 (Leica Microsystems) を使用して、新鮮な組織から薄い (30

50

0~500 μm) 切片を切り取った (異種移植腫瘍モデル参照)。試料を氷冷滅菌平衡塩類溶液に浸し、位置を定めて載せ、シアノアクリレート接着剤を用いて固定化した。速度は、組織の密度およびタイプに従って最適化された; 一般に、より柔らかい組織では薄切速度はより遅く、その逆も同様であった (0.03~0.08mm / s 腫瘍性組織; 0.01~0.08mm / s 正常組織)。振幅は2.95~3.0mmに設定した。

【0088】

器官型組織培養

組織切片を、最大120時間、器官インサート (インサートあたり1切片; Millipore) 上で培養した。器官型インサートは、0.4 μm の孔を有するテフロン膜であり、培養中の3D組織構造の保存を可能にする。組織培養は、20%不活化FBS (GIBCO)、100U / mLペニシリン (Invitrogen) を補充した1mlのDMEM培地を用いて、37°Cの5%CO₂加湿インキュベーターで行い、ローターアジテーターに入れて、培地とのガスおよび液体交換を可能にする。組織切片を基準時間 (T0) に採取し、その後24時間間隔で採取した; 組織切片を、示された濃度の薬剤とともにインキュベートし、24時間後および48時間後にルシフェリン含有培地を添加し、IVISを用いて癌細胞786-O lucの発光を画像化した。ROIレベルで、薬物療法の有効性を定量化することが可能になった。一方、推奨されるようにLive&Dead キット (Promega) を用いて切片の細胞生存を分析した。

【0089】

結果

ccRCCにおける潜在的な新規治療標的を同定するための最初のステップとして、スクリーニングプラットフォームを用い、786-O VHL-細胞株を用いて薬剤-遺伝子相互作用を調べた。癌関連遺伝子異常は、文献およびデータベース検索を用いて選択した。これにより、ccRCCを含むいくつかの癌に関連付けられている36の遺伝子のリストが得られた (表VI)。癌におけるこれらの遺伝子の阻害の影響を評価するために、本発明者らは、RNA干渉 (RNAi) を用いてそれらの発現を操作した。化合物ライブラリーは主に80の小分子を併せて含む臨床的に関連するキナーゼ阻害剤 (一連のFDA承認治療薬を含む) から成っていた (表V)。次に、薬剤-遺伝子相互作用を探索するために、本発明者らは、化合物ライブラリーに応じた、shRNAで操作された細胞株の細胞適応性を分析する多重化分析を確立した。この方法は、36×80の薬剤-遺伝子マトリックスを照会することを可能にし、これにより、ほぼ2,880の薬剤-遺伝子対の照会が可能となった。ライブラリーを3つの濃度でスクリーニングし、8,640を超えるデータポイントを得た (図1)。前述したように、細胞生存マーカーを使用して、各細胞株における各組み合わせの効果をコントロールと比較して測定した。

【0090】

データ解析により、シグナル伝達経路の成分と特異的キナーゼ阻害剤との間の合成-致死性相互作用を含むいくつかの遺伝子-薬剤相互作用が明らかになった。それらの中で、本発明者らは、CK2 α 発現のshRNA媒介性ノックダウンが、786-O VHL-細胞の毛細血管拡張性運動失調症変異 (ATM) キナーゼKU-55933 (Calbiochem) (図2A) の阻害剤に対する感受性を高めることを見出した。同様の相乗効果は、細胞が、ATM阻害剤KU-55933およびプロテインキナーゼCK2阻害剤であるCX-4945の組み合わせで処理された場合にも見られ、合成致死性相互作用を示唆した (図2B)。標的化キナーゼの特異性を確認するために、本発明者らは別のATM阻害剤KU-60019 (Selleckchem製) ならびにエリプチシンという名のもう一つのCK2阻害剤を使用した (図2C)。KU-60019が有意により効率的であることが示されたので、このATM阻害剤を追跡実験に使用した。次に本発明者らは、786-O細胞に腫瘍サプレッサーVHLを安定に再導入し、これらの細胞のCK2およびATM阻害剤に対する感受性を測定した。本発明者らは、この組み合わせの相乗的抗増殖効果が、786-O VHL-細胞において、786-O VHL⁺細胞と比較してはるかに強力であることを見出した (図3A、B)。VHLの役割の1つは、正常酸素状態下でHIF因子の分解を促進することである。実際、VHL複合体はHIF-1 α をユビキチンでタグ付加し、それにより26Sプロテアソームによる分解のためにマークする。腫瘍において、細胞環境は低

10

20

30

40

50

酸素状態であることが認められている。その結果、低酸素状態において異なるVHL状態によって薬効に差があることが以前に示されている。したがって、本発明者らは、低酸素（1.5%）におけるCK2およびATM阻害剤の効果を検討した。図4ABに示すように、低酸素状態下で培養して処理した786-O VHL⁺は、各阻害剤単独に対して感受性が低い。しかしながら、最も顕著に見られたのは、VHL⁺細胞と比較してVHL⁻細胞におけるこの組み合わせの強力な相乗効果であった。両阻害剤の算定された理論上の細胞死の相加効果は~10%であったが、認められた効果は37%であり、明らかに合成致死性プロセスを示していた。

【0091】

Caki2細胞株は初代ccRCCから単離され、フォン・ヒッペル-リンドウ（VHL）腫瘍サプレッサータンパク質において機能喪失変異を有する。これらの細胞は、免疫無防備状態のマウスにおいて腫瘍を形成することが知られている。Caki2のようなccRCC細胞のVHL変異型でも、この相乗効果は存在した（図4C）。比較すると、「正常な」腎上皮細胞として記載されているRPTECは、正常酸素状態ではこれら阻害剤に対して786-O VHL⁺細胞と同程度の感受性があり（図4D）、低酸素状態ではさらに感受性が上がり、この応答におけるHIFの役割を示唆している。

【0092】

KU-60019およびCX-4945それぞれによる786-O細胞株におけるATMおよびCK2の低酸素状態での阻害を視覚化するために、ウエスタンブロット分析を行った（図5）。ATMは、標準的なリン酸化形態におけるP-ATM Ser1981の減少によって証明されるように、VHL^{+/+}、1.5%O₂条件下でKU-60019によって明らかに阻害された。P- α -Catenin Ser641を用いて、786-O VHL⁻におけるCK2についても同じことが見られた。驚くべきことに、基質のリン酸化は、正常酸素状態と低酸素状態の両方の混合物において影響を受けにくかった。

【0093】

細胞生存が治療によってどのような影響を受けるかを理解するために、本発明者らはアポトーシスマーカーについて調べた。PARP切断もカスパーゼ活性化も検出されず、阻害剤がアポトーシスを誘導しなかったことを示した（データ示さず）。細胞周期分析は、ヨウ化プロピジウム標識を用いたFACSによって行った。図6Aは、コントロール（0.46%）と比較して、阻害剤の組み合わせ（1.73%）によって誘発されるわずかに検出可能な細胞死が存在することを示す。しかし、ATMが阻害された細胞ではG1期が延長されたが、CX4945は効果がなかった。さらに、ATMおよびCK2の阻害剤の組み合わせは、DMSO処理細胞と比較して、G1期停止細胞の量を増加させ（65%）、SおよびG2 / M期の細胞を減少させた（それぞれ15および16%）。これらのデータは、増殖関連マーカー（p38 MAPKおよびp42 / p44 MAPK）ならびに細胞周期停止マーカー（P53およびBAX）のウエスタンブロット分析によって確認した（図6B）。

【0094】

腫瘍環境に近づくために、癌細胞株単層よりも厳密に微小腫瘍を模倣することが知られている多細胞性腫瘍スフェロイド（MTS）で薬物治療を行った。確かに、MTSは、無血管性充実腫瘍の現実の3-D増殖および組織化を示し、結果として、腫瘍に見られる細胞-細胞相互作用および微小環境条件（特に栄養および酸素勾配）を、より正確にシミュレートする。いくつかの研究において、腫瘍スフェロイドで実施された薬物感受性試験によって、患者における新しい抗腫瘍化合物の有効性を効果的に予測することができ、化学療法剤の効果を特徴づけることにおいて大変興味深いものであることが数多くの研究において証明されていることを示した（Dubessy, Merlinら、2000）。この文脈において、腫瘍スフェロイドモデルは、細胞-細胞相互作用に関連する多細胞性抵抗性（MCR）、低薬物浸透、深部および低酸素領域に位置する静止細胞の抵抗性を再現するので、特に興味深い（Desoize 2000、Hirschhaeuser, Menneら、2010）。786-O VHL⁻細胞から生成された腫瘍スフェロイドを、ATMもしくはCK2阻害剤またはそれらの組み合わせで48時間処理した。図7に示すように、ヨウ化プロピジウム染色で可視化したときには、10 μ M

10

20

30

40

50

のATM阻害剤KU - 60019および7.5 μ MのCX - 4945が、786 - O VHL細胞の生存に相乗効果を示す最適濃度であった。

【0095】

ビヒクルまたは薬物で48時間処理する前に、示された7856 - O sh形質導入細胞株で多細胞性腫瘍スフェロイド (MTS) を3日間予め形成した。shCK2 α MTSのビヒクル (DMSO) での処理と5 μ MのKU - 60019での処理を比較したとき、またはshATM MTSのビヒクルでの処理と5 μ MのCX - 4945での処理を比較すると、有意差 (**** $P \leq 0.0001$) が認められた (クラスカル - ワリス ノンパラメトリック検定) (図8Aおよび8B)。安定したshATMおよびshCK2 α 細胞株のウエスタンブロット分析は、shRNAの形質導入および選択後のATMまたはCK2 α のタンパク質発現レベルの低下を示す。CK2 β レベルは変化せず、CK2 α に対するshRNAの特異性を示す。GAPDHを用いてローディングを正規化した (図8C)。

【0096】

このアッセイは、ATM阻害剤とCK2 α 阻害剤との任意の組み合わせが、腫瘍細胞の生存を効率的に低下させることを示す。

【0097】

癌細胞の遊走能力に対する組み合わせの阻害剤の効果を評価するために、本発明者らはスフェロイド遊走アッセイを行った。図9に示す予備データは、2つの阻害剤の組み合わせのみが、処理されたスフェロイドの細胞拡散を低減させることを示唆している。

【0098】

CK2 α およびATMの共阻害は、生体外モデルにおける細胞死を誘導する

【0099】

前臨床腎臓癌研究の大部分は、確立された細胞株に基づいている。しかしながら、これらの細胞株は、しばしばそれらの生物学的挙動に影響を及ぼす複数の変化を受け、したがってもはや起源の原発性腫瘍を反映しない。対照的に、新たに単離された初代上皮細胞は、腫瘍の悪性上皮細胞とより密接に関連している可能性がある。しかし、分離された腫瘍細胞は、インビトロでは異なる挙動を示す可能性が最も高い。なぜならば細胞 - 細胞相互作用および細胞 - マトリックス相互作用の両方がインビボ状況と比較して非常に異なるからである。従って、生体外での腫瘍細胞の挙動を調べるためには、腫瘍組織に酷似した環境を維持または再構成する必要がある。

【0100】

これを達成するために、本発明者らは、予め誘導された腎臓腫瘍の異種移植片の切断における専門知識を利用した (Vaira, Fedeleら、2010)。簡潔には、786 - Oルシフェラーゼ細胞をヌードマウスの腎被膜下に注射し、IVISイメージングリーダーを用いてルシフェラーゼ強度により腫瘍の増殖をモニターした。6週間の増殖後、マウスを安楽死させ、ビブラトム (Leica) を用いて腫瘍から組織切片を生成した。酸素ガス交換を可能にする特別な支持体に組織切片を入れ、異なる薬物濃度で48時間処理した。腫瘍切片に対する薬物効果の読み取りは、IVISイメージングリーダーによる免疫蛍光法 (cell live & dead キット) またはルシフェラーゼ活性測定のいずれかを用いてインビボで行った (図10)。

【0101】

結論として、CK2阻害剤CX - 4945がいくつかのタイプの癌の治療について現在評価されていることを考慮すると、上記の知見は、ATM阻害剤との併用療法によってRCCにおけるCK2阻害の有効性を強力に改善する戦略を示す。CK2阻害剤とATM阻害剤とを組み合わせる進行期のRCCを治療することは、強力な前臨床的根拠があり、臨床的評価について直接的な示唆もある。

【0102】

実施例2

材料および方法

化学薬品

すべての化合物を純粋なDMSOに10mMの濃度で溶解した。DMAT (カタログ番号218

10

20

30

40

50

699) および KU - 55933 (カタログ番号 118500) は Calbiochem 製であり、KU - 60019 (カタログ番号 S1570) は Selleckchem 製である。

【0103】

細胞培養

ccRCC 細胞株 786 - O を ATCC から入手し、加湿インキュベーター (37°C、5%CO₂) 内の直径 10cm のプレート中で、10%ウシ胎仔血清、ペニシリン [100U / mL]、ストレプトマイシン [100 µg / mL] を含有する RPMI 1640 培地 (Gibco) で増殖させた。

【0104】

生存アッセイ

細胞株を 96 ウェルマイクロタイタープレートに 5×10^4 細胞 / mL の濃度で播種した。細胞を 37°C および 5%CO₂ で 24 時間付着させた。細胞を陰性コントロール DMSO または示された分子に低酸素状態 (1.5%O₂、37°C で 5%CO₂) 下で 48 時間暴露した。PrestoBlue アッセイ (Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いて細胞毒性を測定した。

【0105】

結果

本発明者らは、第 1 の薬剤としての CK2 α 阻害剤と第 2 の薬剤としての ATM 阻害剤のいくつかの組み合わせを試験した。

【0106】

それらの中で、細胞増殖の阻害についての 2 - ジメチルアミノ - 4,5,6,7 - テトラブロモ - 1H - ベンゾイミダゾール (DMAT) と KU - 60019 または KU - 55933 との組み合わせの結果を図 11 に示す。

【0107】

細胞を DMAT と KU - 60019 の組み合わせおよび DMAT と KU - 55933 との組み合わせで処理した場合、同じ相乗効果が認められた。

【0108】

これらの結果は、CK2 α 阻害剤および ATM 阻害剤の組み合わせが細胞増殖阻害に対して効率的であることを証明する。

【0109】

参考文献

Brummelkamp et al., Science, 2002, 296, 550 - 553 Desoize, B. (2000). "Contribution of three - dimensional culture to cancer research." Crit Rev Oncol Hematol 36(2 - 3): 59 - 60.

Dubessy, C., J. M. Merlin, C. Marchal and F. Guillemin (2000). "Spheroids in radiobiology and photodynamic therapy." Crit Rev Oncol Hematol 36(2 - 3): 179 - 192.

Elbashir et al., Nature, 2001, 411, 494 - 498.

Figlin, R., C. Sternberg and C. G. Wood (2012). "Novel agents and approaches for advanced renal cell carcinoma." J Urol 188(3): 707 - 715.

Golding Sarah E. et al, Improved ATM kinase inhibitor KU - 60019 radiosensitizes glioma cells, compromises insulin, AKT and ERK prosurvival signaling, and inhibits migration and invasion; Mol Cancer Ther October 2009 8; 2894

【0110】

Gunther W, Pawlak E, Damasceno R, Arnold H and AJ.Terzis (2003). "Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. Br J Cancer. 2003 Feb 10;88(3):463 - 9.

Hirschhaeuser, F., H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller - Klieser and L. A. Kunz - Schughart (2010). "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again." J Biotechnol 148(1): 3 - 15.

Kundo, K. and Kaelin, W.G. (2001). "The von Hippel - Lindau Tumor Suppressor Gene." Experimental Cell Research 264, 117 - 125.

10

20

30

40

50

Lopez - Beltran, A., M. Scarpelli, R. Montironi and Z. Kirkali (2006). "2004 WHO classification of the renal tumors of the adults." *Eur Urol* 49(5): 798 - 805.

Maj - Hes, A., J. Medioni, F. Scotte, M. Schmidinger, G. Kramer, P. Combe, Y. Gornadha, R. Elaidi and S. Oudard (2013). "Rechallenge with mTOR inhibitors in metastatic renal cell carcinoma patients who progressed on previous mTOR inhibitor therapy." *Oncology* 85(1): 8 - 13.

[O 1 1 1]

Marschke Robert F. et al, Abstract C39: Phase I clinical trial of CX - 4945: A first - in - class orally administered small molecule inhibitor of protein kinase CK2; *Mol Cancer Ther* December 2009 8; C39

McDermott, D. F., M. M. Regan, J. I. Clark, L. E. Flaherty, G. R. Weiss, T. F. Logan, J. M. Kirkwood, M. S. Gordon, J. A. Sosman, M. S. Ernstoff, C. P. Tretter, W. J. Urbas, J. W. Smith, K. A. Margolin, J. W. Mier, J. A. Gollob, J. P. Dutcher and M. B. Atkins (2005). "Randomized phase III trial of high - dose interleukin - 2 versus subcutaneous interleukin - 2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* 23(1): 133 - 141.

McLornan, D. P., A. List and G. J. Mufti (2014). "Applying synthetic lethality for the selective targeting of cancer." *N Engl J Med* 371(18): 1725 - 1735.

Negrier, S., B. Escudier, C. Lasset, J. Y. Douillard, J. Savary, C. Chevreau, A. Ravaud, A. Mercatello, J. Peny, M. Mousseau, T. Philip and T. Tursz (1998). "Recombinant human interleukin - 2, recombinant human interferon alfa - 2a, or both in metastatic renal - cell carcinoma. Groupe Francais d'Immunotherapie." *N Engl J Med* 338(18): 1272 - 1278.

[O 1 1 2]

Perea SE., Reyes O., Baladron I., Perera Y., Farina H., Gil J., Rodriguez A., Bacardi D., Marcelo J.L., Cosme K., Cruz M., Valenzuela C., Lopez - Saura P.A., Puchades Y., Serrano J.M., Mendoza O., Castellanos L., Sanchez A., Betancourt L., Besada V., Silva R., Lopez E., Falcon V., Hernandez I., Solares M., Santana A., Diaz A., Ramos T., Lopez C., Ariosa J., Gonzalez L.J., Garay H., Gomez D., Gomez R., Alonso D.F., Sigman H., Herrera L., Acevedo B. (2008). "CIGB - 300, a novel proapoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo." *Mol Cell Biochem.* 316(1 - 2):163 - 7.

Pierre, F., P. C. Chua, S. E. O'Brien, A. Siddiqui - Jain, P. Bourbon, M. Haddach, J. Michaux, J. Nagasawa, M. K. Schwaebe, E. Stefan, A. Vialettes, J. P. Whitten, T. K. Chen, L. Darjania, R. Stansfield, K. Anderes, J. Bliesath, D. Drygin, C. Ho, M. Omori, C. Proffitt, N. Streiner, K. Trent, W. G. Rice and D. M. Ryckman (2010). "Discovery and SAR of 5 - (3 - Chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine - 8 - carboxylic acid (CX - 4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase CK2 for the treatment of cancer." *J Med Chem* 54(2): 635 - 654.

Prudent R, Moucadet V, Nguyen CH, Barette C, Schmidt F, Florent JC, Lafanchere L, Sautel CF, Duchemin - Pelletier E, Spreux E, Filhol O, Reiser JB and C. Cochet (2010). "Antitumor activity of pyridocarbazole and benzopyridoindole derivatives that inhibit protein kinase CK2." *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9865 - 74.

Sadher et al., *Biochem. Int.*, 1987: 14, 1015.

[O 1 1 3]

Siddiqui - Jain et al., "CX - 4945, an orally bioavailable selective inhibitor of protein kinase CK2, inhibits prosurvival and angiogenic signaling and exhibits antitumor efficacy"; *Cancer Res* December 15, 2010 70; 10288.

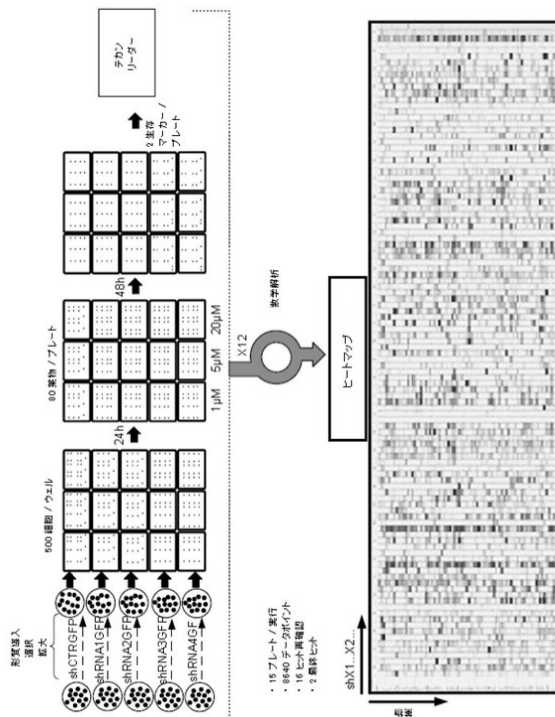
Vaira, V., G. Fedele, S. Pyne, E. Fasoli, G. Zadra, D. Bailey, E. Snyder, A. Fav ersani, G. Coggi, R. Flavin, S. Bosari and M. Loda (2010). "Preclinical model o f organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(18): 8352 - 8356.

Vecchio, D. et al, (2014), Predictability, efficacy and safety of radiosensiti zation of glioblastoma - initiating cells by the ATM inhibitor KU - 60019. *Int. J. Cancer*, 135: 479-491.

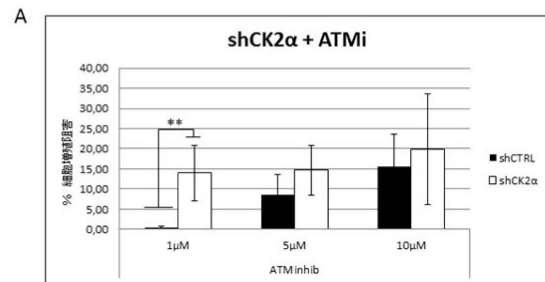
Zhang, J. H., T. D. Chung and K. R. Oldenburg (1999). "A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays." *J Biomol Screen* 4(2): 67 - 73.

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

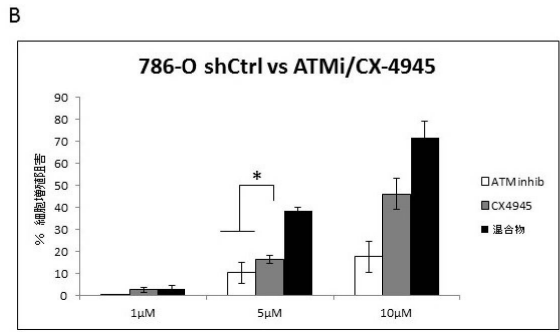
20

30

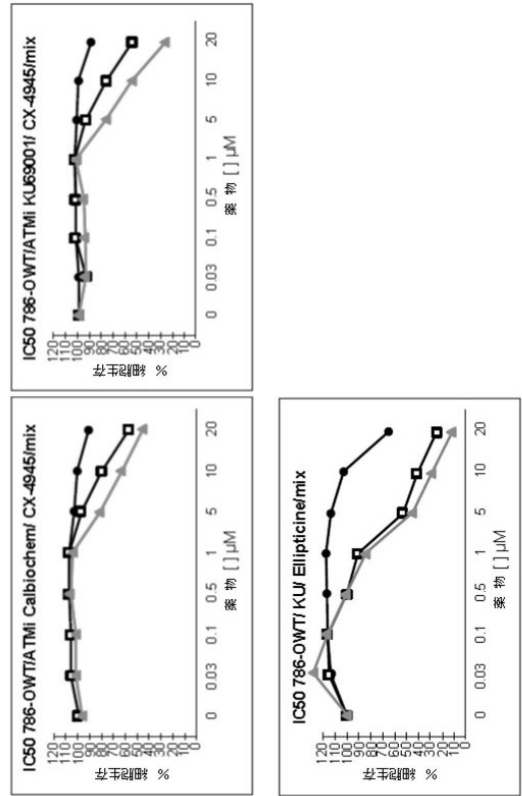
40

50

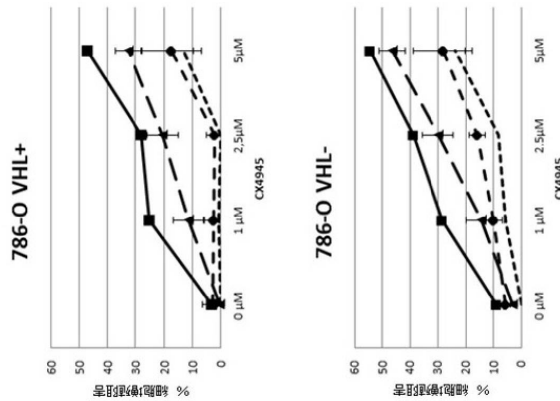
【図 2 B】



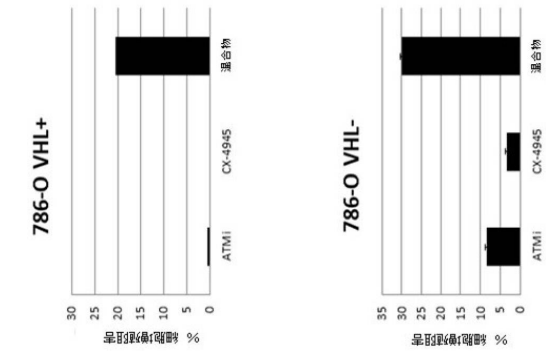
【図 2 C】



【図 3 A】



【図 3 B】



10

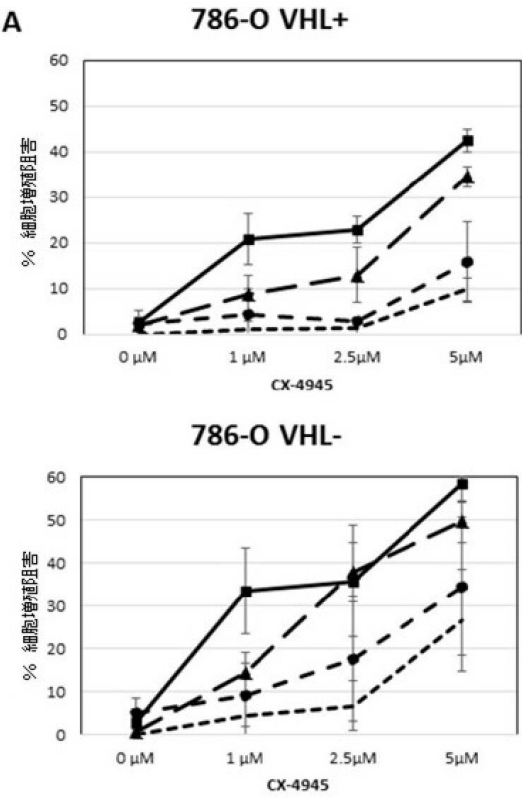
20

30

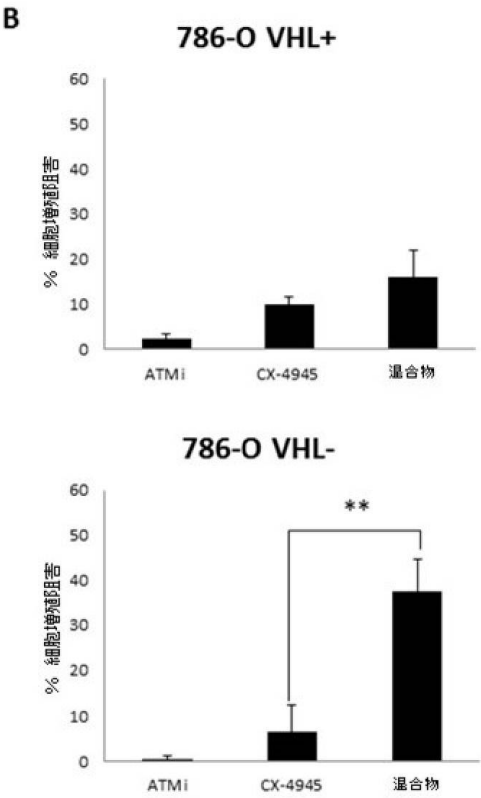
40

50

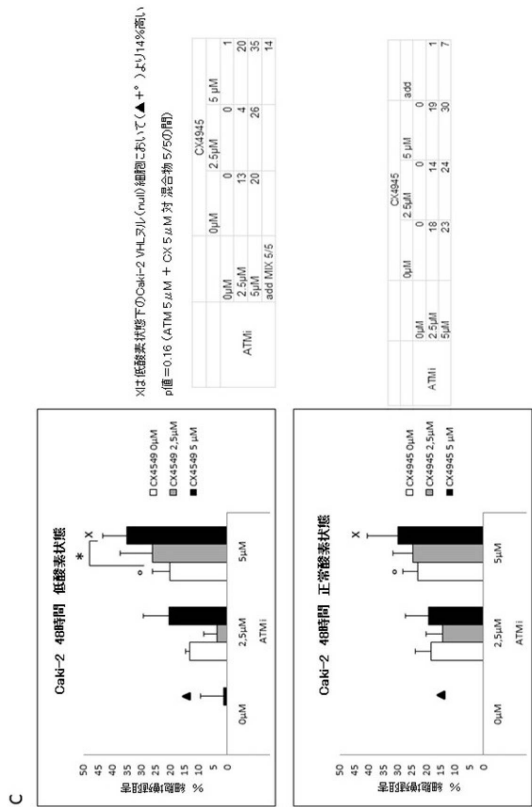
【図 4 A】



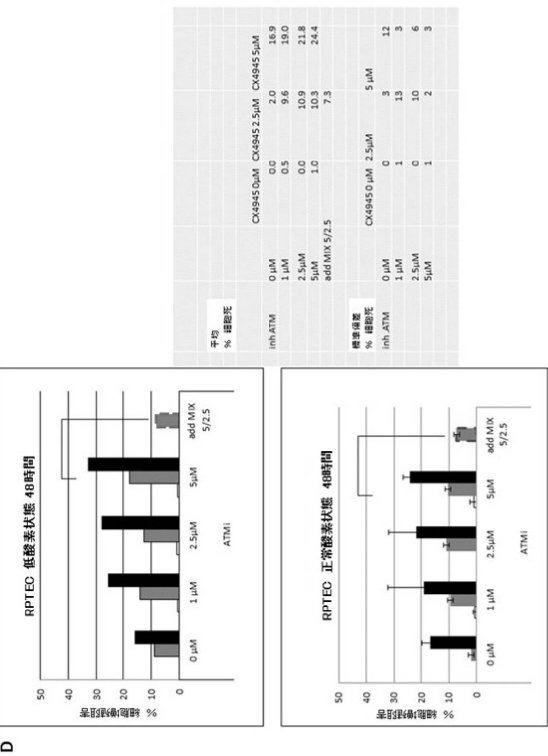
【図 4 B】



【図 4 C】



【図 4 D】



10

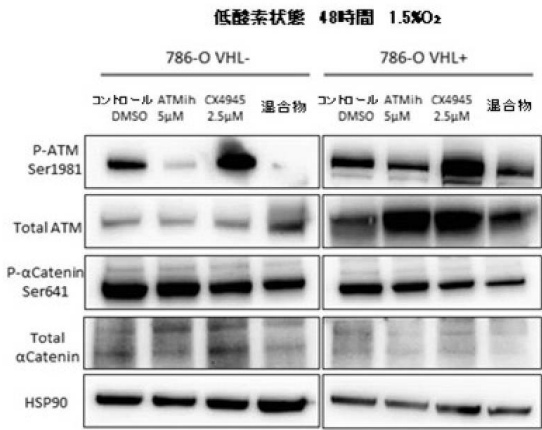
20

30

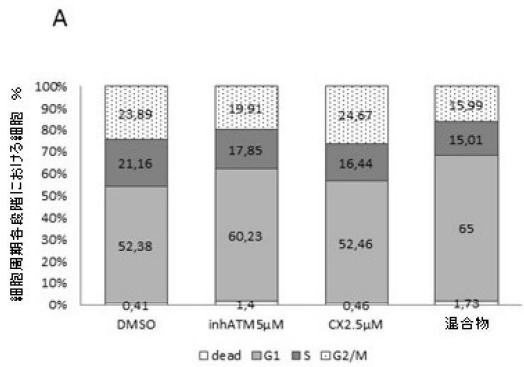
40

50

【図 5】

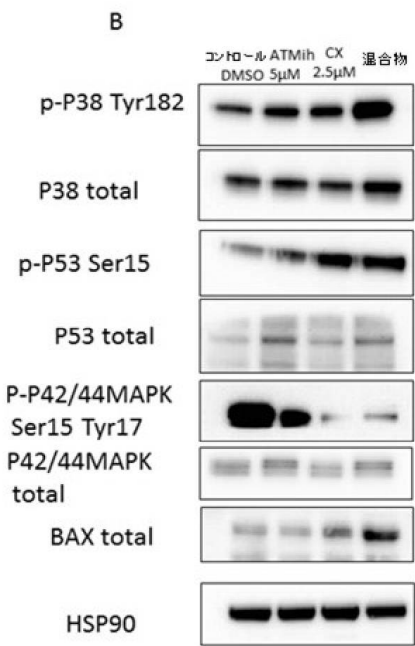


【図 6 A】

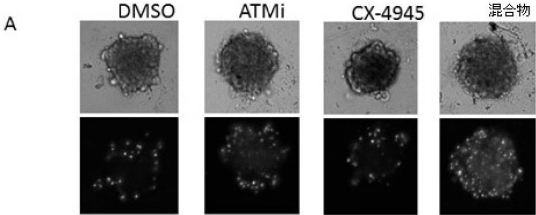


10

【図 6 B】



【図 7 - 1】



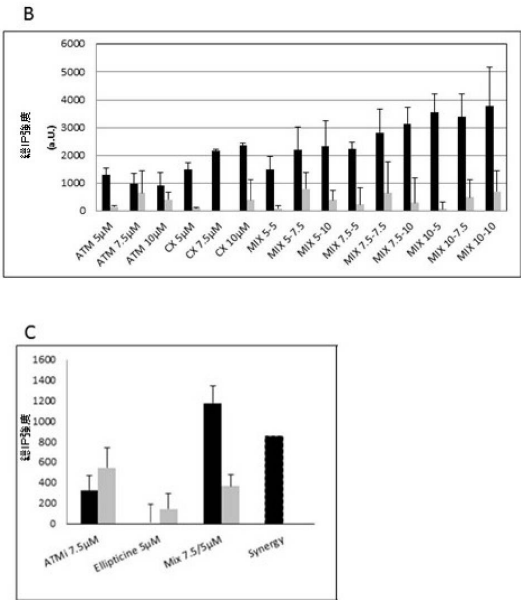
20

30

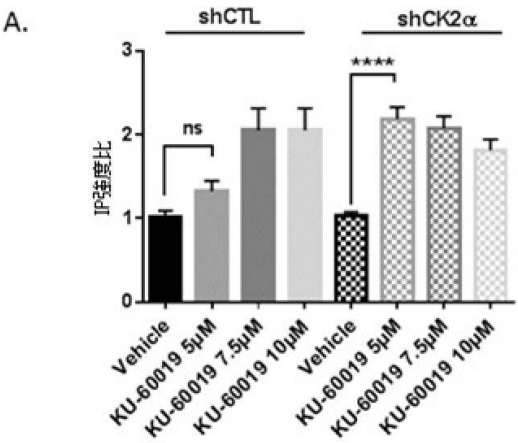
40

50

【図 7 - 2】

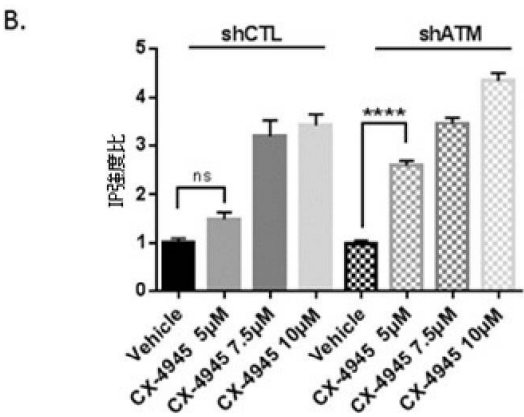


【図 8 A】

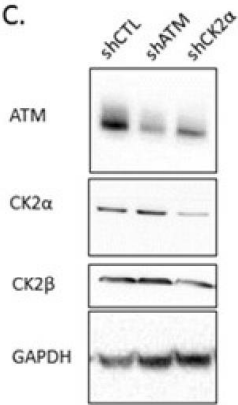


10

【図 8 B】



【図 8 C】



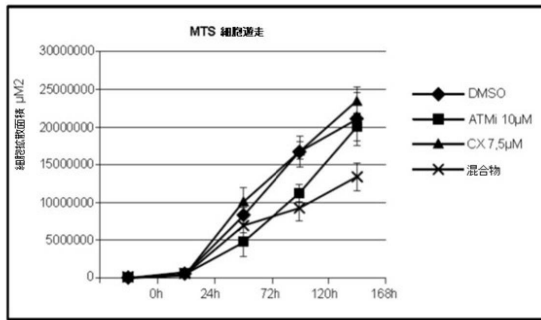
20

30

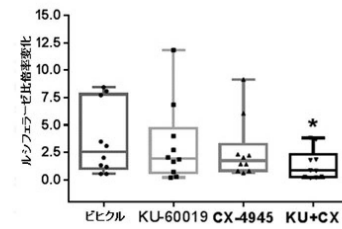
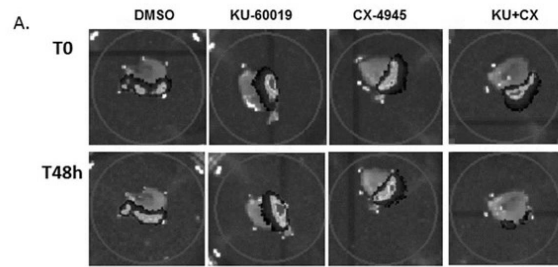
40

50

【図 9】

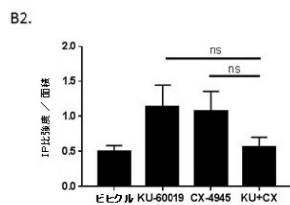
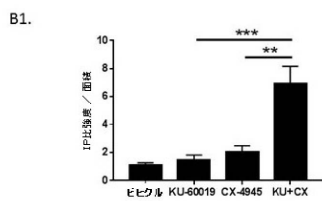
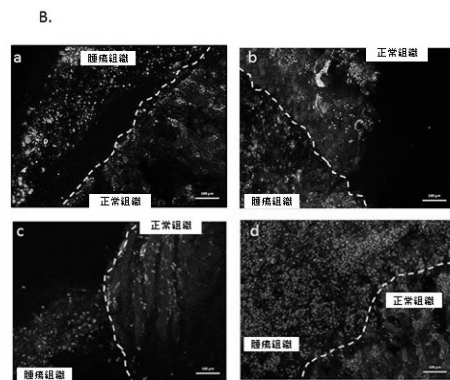


【図 10 A】

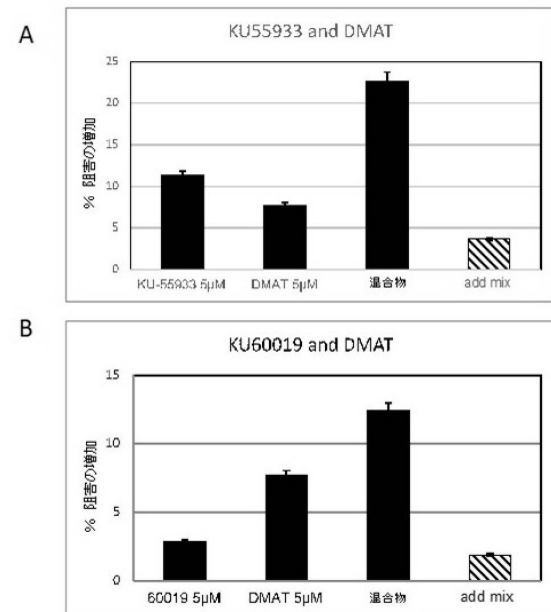


10

【図 10 B】



【図 11】



20

30

40

【配列表】

0007138563000001.app

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	31/7105(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/4745(2006.01)	A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	31/437(2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	31/4184(2006.01)	A 6 1 K	31/437	
A 6 1 K	31/4192(2006.01)	A 6 1 K	31/4184	
A 6 1 K	31/5377(2006.01)	A 6 1 K	31/4192	
A 6 1 K	45/06 (2006.01)	A 6 1 K	31/5377	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/06	
A 6 1 K	31/475 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
C 1 2 N	9/99 (2006.01)	A 6 1 K	31/475	
		C 1 2 N	9/99	

ンテ エ ドゥ ラ ルシェルシュ メディカル

フランス国、エフー 7 5 0 1 3 パリ、リュ・ドゥ・トルビアック 1 0 1

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(72)発明者 ジャコーザ, ソフィア

フランス、3 8 1 1 0 ラ トゥール デュ パン、リュ ド イタリー 8 0

(72)発明者 ビレット, カトリーヌ

フランス、3 8 4 5 0 ビフ、リュ メルラティエール 3

(72)発明者 コシェ, クロード

フランス、3 8 6 4 0 クレ、アレ デュ ソルビエ 1

(72)発明者 フィロール, オディル

フランス、3 8 6 4 0 クレ、アレ デュ ソルビエ 1

(72)発明者 バレッタ, カロリーヌ

フランス、3 8 3 6 0 サッスナーージュ、リュ デュ プレ デュ ブール 6

(72)発明者 ソレイユアック, エマニュエル

フランス、3 8 9 6 0 サン テティエンヌ ド クロセ、シュマン ド ラ ガトリエール 1 7 7

審査官 長谷川 茜

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 9 9 1 9 1 (US, A 1)

国際公開第 2 0 0 9 / 0 3 2 2 1 3 (WO, A 1)

米国特許出願公開第 2 0 0 9 / 0 0 5 4 5 0 7 (US, A 1)

国際公開第 2 0 1 1 / 1 3 3 6 6 8 (WO, A 1)

ARTEAGA C L, ELLIPTINIUM, A DNA INTERCALATING AGENT WITH BROAD ANTITUMOR ACTIVITY IN A HUMAN TUMOR CLONING SYSTEM, EUROPEAN JOURNAL OF CANCER AND CLINICAL ONCOLOGY, 1987年11月, VOL:23, NR:11, PAGE(S):1621 - 1626, [http://dx.doi.org/10.1016/0277-5379\(87\)90440-8](http://dx.doi.org/10.1016/0277-5379(87)90440-8)

Cancer Res, 2010年, Vol.70, No.24, pp.10288-10298

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

A 6 1 K

A 6 1 P

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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

N)