

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6952594号  
(P6952594)

(45) 発行日 令和3年10月20日(2021.10.20)

(24) 登録日 令和3年9月30日(2021.9.30)

(51) Int.Cl.

F 1

A 61 K 38/17	(2006.01)	A 61 K 38/17
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K 45/00
A 61 P 43/00	(2006.01)	A 61 P 43/00
A 61 P 1/04	(2006.01)	A 61 P 43/00

請求項の数 5 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-240652 (P2017-240652)
(22) 出願日	平成29年12月15日 (2017.12.15)
(65) 公開番号	特開2019-108277 (P2019-108277A)
(43) 公開日	令和1年7月4日 (2019.7.4)
審査請求日	令和2年8月17日 (2020.8.17)

早期審査対象出願

前置審査

(73) 特許権者	507106135 新津 洋司郎 北海道札幌市中央区北3条西30丁目2-1-901
(74) 代理人	100131705 弁理士 新山 雄一 新津 洋司郎 北海道札幌市中央区北3条西30丁目2-1-901
審査官	渡邊 潤也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】細胞増殖抑制剤及びそれを含むがんの治療若しくは予防用医薬組成物

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

G S T P 1 と、 C R A F の N 末端部分との相互作用を競合的に阻害する薬物を含み、前記 C R A F の N 末端部分が、アミノ酸残基 61 ~ 192 位の C R 1 ドメインを含むアミノ酸残基 1 ~ 192 位であり、

前記 G S T P 1 と C R A F の相互作用を阻害する薬物が、 C R A F デコイペプチド又はこれを発現するベクターであり、

前記 C R A F デコイペプチドが、

( a ) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

( b ) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、

( c ) 配列番号 9 に示されるアミノ酸配列に対して 90 % 以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び

( d ) ( a ) ~ ( c ) のいずれかに記載されるポリペプチドの N 末端又は C 末端に 1 ~ 50 個のアミノ酸が付加されたポリペプチド

からなる群から選択される、

R A S / R A F / M E K / E R K シグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤。

## 【請求項 2】

前記 R A S / R A F / M E K / E R K シグナルカスケードが活性化されているがんが、

10

20

R A S に活性化変異を有するがんである、請求項 1 に記載の細胞増殖抑制剤。

【請求項 3】

前記がんが、大腸がんである、請求項 1 又は 2 に記載の細胞増殖抑制剤。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞増殖抑制剤を含む、R A S / R A F / M E K / E R K シグナルカスケードが活性化されているがんの治療又は予防用医薬組成物。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の細胞増殖抑制剤を含む、R A S / R A F / M E K / E R K シグナルカスケードが活性化されているがんの治療又は予防用キット。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、細胞増殖抑制剤、特にGSTP1の抑制と関連した細胞増殖抑制剤、並びにそれを含むがんの治療若しくは予防用医薬組成物等に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

がんは人類が直面している最も重要な疾患の一つであり、その治療のために多大な研究努力がなされている。がんは、遺伝子の突然変異又はエピジェネティックな異常などにより、細胞が無制御に増殖する疾患である。がんにおける遺伝子異常としてはすでに数多くのものが報告されており(例えは、非特許文献 1 など)、その多くが、細胞の増殖、分化、生存に関するシグナル伝達に何らかの関連を有していると考えられている。また、かかる遺伝子異常により、正常な分子で構成される細胞内のシグナル伝達が異常を来し、これが特定のシグナルカスケードの活性化又は不活性化をもたらし、最終的に細胞の異常増殖を引き起す一因となることがある。初期のがん治療は、細胞増殖自体の抑制に主眼がおかれていたが、かかる治療は生理的に正常に増殖する細胞の増殖をも抑制してしまうため、脱毛、消化器障害、骨髄抑制などの副作用を伴っていた。そこで、かかる副作用を抑えるため、がん特有の遺伝子異常や、シグナル伝達の異常を標的とした分子標的薬などの新たな発想に基づくがん治療薬の開発が進められている。

20

【0 0 0 3】

グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)は、グルタチオンを薬物などの物質に付加するグルタチオン抱合を触媒する酵素である。GSTは生体内で、例えは生合成又は薬物代謝分解において、重要な役割を果たす。GSTは一次構造の相同性及び基質特異性に基づいて複数のクラス(例えは、 $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ など)に分類される。

30

【0 0 0 4】

特にGSTP1(glutathione S-transferase pi、GST- $\pi$ ともいう)の発現が、種々のがん細胞において増大しており、これが一部の抗がん剤に対する耐性の一因となっている可能性が指摘されている。実際、GSTP1を過剰発現しており、薬物耐性を示すがん細胞系に、GSTP1に対するアンチセンスDNA又はGSTP1阻害剤を作用させると、薬剤耐性が抑制されることが知られている(非特許文献 2 ~ 4)。さらに、GSTP1を過剰発現するアンドロゲン非依存性前立腺がん細胞系にGSTP1に対するsiRNAを作用させるとその増殖が抑制され、アポトーシスが増大することが報告されている(非特許文献 5)。

40

【0 0 0 5】

またGSTP1に関して、特許文献 1 は、GSTP1を抑制する薬物と、3-メチルアデニン等のオートファジー阻害剤とを活性成分として、がん細胞のアポトーシスを誘導できることを開示している。特許文献 2 は、GSTP1とAktの発現を同時に阻害すると、細胞増殖が抑制され、細胞死が誘導されること、GSTP1の発現阻害により誘導されたオートファジーが、Aktの発現を同時に阻害することにより顕著に抑制されることを開示している。特許文献 3 は、GSTP1を抑制する薬物と、RB1CC1を抑制する薬物を含むアポトーシスを誘導するための剤を開示している。特許文献 4 は、GSTP1を抑制する薬物を含む、BRAF遺伝子に変異を有する細胞の細胞死誘導剤を開示している。特許文献 5 は、GSTP1を抑制する薬物と

50

、GSTP1とともに抑制されると合成致死性を示す恒常性維持関連タンパク質を抑制する薬物とを含む、がん細胞の細胞死誘導剤を開示している。

#### 【0006】

しかしながら、GSTP1と細胞増殖やアポトーシスとの関係、GSTP1の分子機構、種々の細胞内シグナル伝達におけるGSTP1の役割などについては未だ殆ど明らかにされておらず、さらなる研究努力が求められている。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0007】

【特許文献1】国際公開第2012/176282号

10

【特許文献2】国際公開第2014/098210号

【特許文献3】特開2016-20337号公報

【特許文献4】特開2016-204365号公報

【特許文献5】特開2017-14185号公報

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【非特許文献1】Futreal et al., Nat Rev Cancer. 2004;4(3):177-83

【非特許文献2】Takahashi and Niitsu, Gan To Kagaku Ryoho. 1994;21(7):945-51

【非特許文献3】Ban et al., Cancer Res. 1996;56(15):3577-82

【非特許文献4】Nakajima et al., J Pharmacol Exp Ther. 2003;306(3):861-9

20

【非特許文献5】Hokaiwado et al., Carcinogenesis. 2008;29(6):1134-8

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0009】

本発明は、がん細胞において効果的に細胞増殖を抑制することができる薬剤を提供することを課題とする。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明者は、上記課題を解決するため、銳意検討を重ねた結果、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの活性化により誘導されるGSTP1が、CRAFと結合してその活性を増強することを見出した。さらに、本発明者は、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの活性化(図4の黒色の矢印)によりGSTP1が誘導されると、そのシグナルカスケードの上流からの刺激とは無関係に、GSTP1が当該シグナルカスケードの成分であるCRAFの活性を増強し(GSTP1のオートクライブループ；図4の白色の矢印)、その結果、当該シグナルカスケードが両経路によって異常に活性化されることを見出した。

30

#### 【0011】

これに基づき、本発明者は、GSTP1を抑制する薬物(例えば、GSTP1遺伝子に対するsiRNA)と、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物(例えば、KRAS遺伝子に対するsiRNA)とを併用し、GSTP1のオートクライブループと、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの両方を阻害することにより、それぞれの薬物単独よりも、がん細胞の増殖を効果的に抑制できることを見出した。さらに、本発明者は、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードとGSTP1のオートクライブループとの接合点である、GSTP1とCRAFの相互作用をCRAFデコイペプチドなどの薬物によって阻害することにより、がん細胞の増殖が抑制されることを見出した。これらの知見に基づいて、本発明者は本発明を完成するに至った。

40

#### 【0012】

すなわち本発明は以下を包含する。

(1) GSTP1を抑制する薬物と、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物とを組み合わせて含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤。

(2) RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物と組み合わせて投与するため

50

の、GSTP1を抑制する薬物を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤。

(3) GSTP1を抑制する薬物と組み合わせて投与するための、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤。

(4) 前記RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんが、RASに活性化変異を有するがんである、(1)～(3)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

(5) 前記がんが、大腸がんである、(1)～(4)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

(6) 前記RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物が、RASを抑制する薬物である、(1)～(5)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。 10

(7) 前記GSTP1を抑制する薬物が、GSTP1に対するsiRNAである、(1)～(6)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

(8) 前記RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物が、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分に対するsiRNAである、(1)～(7)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

(9) GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤。

(10) 前記RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんが、RASに活性化変異を有するがんである、(9)に記載の細胞増殖抑制剤。 20

(11) 前記がんが、大腸がんである、(9)又は(10)に記載の細胞増殖抑制剤。

(12) 前記GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物が、CRAFデコイペプチド又はこれを発現するベクターである、(9)～(11)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤。

(13) 前記CRAFデコイペプチドが、

(a)配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(b)配列番号9に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、

(c)配列番号9に示されるアミノ酸配列に対して90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び

(d)(a)～(c)のいずれかに記載されるポリペプチドのN末端又はC末端に1～50個のアミノ酸が付加されたポリペプチド。 30

からなる群から選択される、(12)に記載の細胞増殖抑制剤。

(14) (1)～(13)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんの治療又は予防用医薬組成物。

(15) (1)～(13)のいずれかに記載の細胞増殖抑制剤を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんの治療又は予防用キット。

### 【発明の効果】

#### 【0013】

本発明により、がん細胞において効果的に細胞増殖を抑制することができる薬剤が提供される。 40

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0014】

【図1】図1は、実施例1に示すGSTP1との共免疫沈降実験で用いたプラスミドが発現するタンパク質の構造を示す模式図である。

【図2】図2は、実施例1に示すGSTP1との共免疫沈降実験の結果を示す写真である。

【図3】図3は、実施例2に示すGSTP1によるCRAF活性への影響を調べた、インビトロキナーゼアッセイの結果を示す写真である。

【図4】図4は、KRAS変異陽性がん細胞における、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの促進を示す模式図である。

【図5】図5は、実施例3に示すCRAFタンパク質断片による細胞増殖への影響を調べた結果。 50

を示すグラフである。

【図6】図6は、実施例4に示すGSTP1とKRASの二重抑制による細胞増殖への影響を調べた結果を示すグラフである。星印はP<0.01を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

1. GSTP1を抑制する薬物とRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物の併用による細胞増殖抑制

本発明は、GSTP1を抑制する薬物と、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物とを組み合わせて含む、細胞増殖抑制剤に関する。本発明は、後述の実施例に示されるように、GSTP1を抑制する薬物と、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物とを併用し、GSTP1のオートクラインループと、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの両方を阻害することにより、それぞれの薬物単独よりも、がん細胞の増殖を効果的に抑制できるという本発明者の知見に基づく。

【0016】

本明細書において、「GSTP1」(GSTP1タンパク質)は、GSTP1遺伝子によりコードされる、グルタチオン抱合を触媒する酵素を指す。GSTP1はヒトを含む種々の動物に存在し、その配列情報も公知である。GSTP1の配列情報は、例えば、NCBIデータベースなどの公のデータベースから入手できる。

【0017】

GSTP1の具体例として、配列番号1で示される210残基のアミノ酸配列(NCBIアクセション番号NP\_000843.1)からなるヒト由来のGSTP1(ヒトGSTP1)タンパク質が挙げられる。また、GSTP1には、配列番号1で示されるGSTP1と機能的に同等の活性を有するGSTP1バリエント及び他生物種のGSTP1オルソログも含まれる。GSTP1は、グルタチオン抱合触媒活性を有し、当該活性の測定方法は当業者には知られている。具体的には、GSTP1には、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、あるいは配列番号1で示されるアミノ酸配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するGSTP1タンパク質が含まれる。

【0018】

本明細書において、アミノ酸若しくは塩基の欠失、置換又は付加に関する「複数個」とは、例えば、2~20個、2~15個、2~10個、2~7個、2~5個、2~4個又は2~3個をいう。また、アミノ酸の置換は、保存的アミノ酸置換が望ましい。「保存的アミノ酸置換」とは、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似するアミノ酸間の置換をいう。性質の類似するアミノ酸は、例えば、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジン、ヒスチジン)、酸性アミノ酸(アスパラギン酸、グルタミン酸)、無電荷極性アミノ酸(グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン)、無極性アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、アラニン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン)、分枝鎖アミノ酸(ロイシン、バリン、イソロイシン)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン)等に分類することができる。

【0019】

本明細書において、「配列同一性」とは、2つの核酸間の塩基配列又は2つのタンパク質間のアミノ酸配列の同一性をいう。配列同一性は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。比較対象の核酸又はタンパク質は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失(例えばギャップ等)を有していてもよい。配列同一性は、BLAST又はFASTA等の検索システムを用いて算出することができる。

【0020】

「GSTP1遺伝子」は、前記GSTP1をコードする遺伝子である。GSTP1遺伝子の具体例として、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるヒトGSTP1をコードするヒトGSTP1遺伝子

10

20

30

40

50

が挙げられる。より具体的には、GSTP1遺伝子は、配列番号2で示される塩基配列(NCBIAクセッション番号NM\_000852.3)からなる遺伝子であってよい。また、GSTP1遺伝子には、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるヒトGSTP1と機能的に同等の活性を有するGSTP1バリエント又は他生物種のGSTP1オルソログをコードするGSTP1遺伝子も包含される。具体的には、配列番号2で示される塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列、あるいは配列番号2で示される塩基配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するGSTP1遺伝子が包含される。

#### 【0021】

本明細書において、「GSTP1を抑制する薬物」には、限定されないが、例えば、GSTP1の産生及び/又は活性を抑制する薬物、並びにGSTP1の分解及び/又は不活性化を促進する薬物などが含まれる。

#### 【0022】

GSTP1の産生を抑制する薬物としては、限定されないが、例えばGSTP1遺伝子に対する阻害性核酸、例えばRNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチド等、及びこれを発現するベクター等が挙げられる。このような阻害性核酸及びこれを発現するベクターは、特異性が高く、副作用の可能性が低いために好ましい。

#### 【0023】

本明細書において、RNAi分子は、RNA干渉をもたらす任意の分子を指し、限定されないが、siRNA(small interfering RNA)、miRNA(micro RNA)、shRNA(short hairpin RNA)、ddRNA(DNA-directed RNA)、piRNA(Piwi-interacting RNA)、rasiRNA(repeat associated siRNA)などの二重鎖RNA及びこれらの変形体などを含む。これらのRNAi分子は市販されているか、公知の配列情報、例えば、配列番号2に示した塩基配列の情報に基づいて設計及び作製することが可能である。

#### 【0024】

本明細書において、アンチセンス核酸は、標的遺伝子の転写産物(センス鎖)に対して相補的な塩基配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドを指す。アンチセンス核酸は、RNA、DNA、PNA(ペプチド核酸)、LNA(ロックド核酸)又はこれらの複合物で構成されていてもよい。

#### 【0025】

本明細書において、DNA/RNAキメラポリヌクレオチドは、限定されないが、例えば、特開2003-219893号公報に記載の、標的遺伝子の発現を阻害するDNAとRNAとからなる2本鎖ポリヌクレオチドを含む。

#### 【0026】

本明細書において、発現ベクターとしては、限定されないが、プラスミドベクター、ファージベクター、ファージミドベクター、コスミドベクター、ウイルスベクター等の公知の任意のベクターを利用することができる。ベクターは、担持する核酸の発現を増強するプロモーターを少なくとも含んでいることが好ましく、この場合、該核酸は、かかるプロモーターと作動可能に連結されていることが好ましい。核酸がプロモーターに作動可能に連結されているとは、プロモーターの作用により、該核酸のコードするタンパク質が適切に産生されるように、該核酸とプロモーターとが配置されていることを意味する。ベクターは、宿主細胞内で複製可能であってよい。ベクターからの遺伝子の転写は、宿主細胞の核外で行われても、核内で(例えば、核酸が宿主細胞のゲノムに組み込まれて)行われてもよい。

#### 【0027】

GSTP1の活性を抑制する薬物としては、限定されないが、例えば、GSTP1に結合する物質が挙げられ、例えば、グルタチオン、グルタチオンアナログ(例えば、国際公開第95/08563号、同第96/40205号、同第99/54346号、又はNakajima et al., J Pharmacol Exp Ther. 2003;306(3):861-9等に記載のもの)、ケトプロフェン(Takahashi and Niitsu, Gan To Kagaku Ryoho. 1994;21(7):945-51)、インドメタシン(Hall et al., Cancer Res. 1989;49(50):1015-21)等が挙げられる。

22):6265-8)、エタクリン酸、ピリプロスト(Tew et al., Cancer Res. 1988;48(13):3622-5)、抗GSTP1抗体、GSTP1のドミナントネガティブ変異体等が挙げられる。これらの薬物は市販されているか、公知の技術に基づいて適宜製造することができる。

#### 【 0 0 2 8 】

GSTP1の抑制は、GSTP1を抑制する薬物を作用させなかった場合に比べ、細胞においてGSTP1の発現(発現量)及び/又は活性が抑制されていることにより決定することができる。

#### 【 0 0 2 9 】

GSTP1の発現は、公知の任意の手法、例えば限定されないが、抗GSTP1抗体を利用した手法、例えば、免疫沈降法、EIA(enzyme immunoassay)(例えば、ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)など)、RIA(radioimmunoassay)(例えば、IRMA(immunoradiometric assay)、RAST(radioallergosorbent test)、RIST(radioimmunosorbent test)など)、ウェスタンプロッティング法、免疫組織化学法、免疫細胞化学法又はフローサイトメトリー法、あるいはGSTP1遺伝子の転写産物(例えば、mRNA)若しくはスプライシング産物又はそれらの断片に特異的にハイブリダイズする核酸を利用した手法、例えば、種々のハイブリダイゼーション法、例えばノーザンプロット法若しくはサザンプロット法、又は種々のPCR法(例えば、リアルタイムRT-PCR法)などにより評価することができる。

10

#### 【 0 0 3 0 】

また、GSTP1の活性は、GSTP1の公知の活性、限定されないが、例えば、CRAF(特にリン酸化CRAF)又はEGFR(特にリン酸化EGFR)などのタンパク質との結合性などを、公知の任意の方法、例えば、免疫沈降法、ウェスタンプロッティング法、質量分析法、プルダウン法、表面プラズモン共鳴(SPR)法などにより解析することによって評価することができる。

20

#### 【 0 0 3 1 】

本明細書において、「シグナルカスケード」は、複数のシグナル伝達分子が順々にシグナルを伝えていくシグナル伝達を意味する。「RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケード」は、RAS、RAF、MEK及びERKをシグナル伝達分子として含む、細胞の増殖及び分化などに関係するシグナルカスケードである。Gタンパク質共役型受容体やチロシンキナーゼ型受容体に、例えば成長因子などのリガンドが結合すると、低分子Gタンパク質であるRASが活性化され、活性化されたRASはRAF(MAPKKKの一種)をリン酸化して活性化する。活性化されたRAFはMEK(MAPK/ERK kinase、MAP2Kの一種)を活性化し、活性化されたMEKはERK(Extracellular signal-regulated kinase、MAPKの一種)を活性化する。活性化されたERKは核内へと移行し、様々なmRNAの転写を促進することで細胞増殖の引き金となる。

30

#### 【 0 0 3 2 】

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分としては、RAS、RAF、MEK及びERKが挙げられる。

#### 【 0 0 3 3 】

本明細書において、「RAS」(RASタンパク質)は、RAS遺伝子によりコードされる、低分子GTP結合タンパク質を指す。RASはヒトを含む種々の動物に存在し、その配列情報も公知である。RASの配列情報は、例えば、NCBIデータベースなどの公のデータベースから入手できる。RASには、KRAS、NRAS及びHRASが含まれる。

40

#### 【 0 0 3 4 】

例えば、KRASの具体例として、配列番号3で示される189残基のアミノ酸配列(NCBIアクセスション番号NP\_203524.1)からなるヒト由来のKRAS(ヒトKRAS)タンパク質が挙げられる。また、KRASには、配列番号3で示されるKRASと機能的に同等の活性を有するKRASバリアント及び他生物種のKRASオルソログも含まれる。KRASは、GTP加水分解活性を有し、当該活性の測定方法は当業者には知られている。具体的には、KRASには、配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、あるいは配列番号3で示されるアミノ酸配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するKRASタンパク質が含まれる。

#### 【 0 0 3 5 】

「KRAS遺伝子」は、前記KRASをコードする遺伝子である。KRAS遺伝子の具体例として、

50

配列番号3で示されるアミノ酸配列からなるヒトKRASをコードするヒトKRAS遺伝子が挙げられる。より具体的には、KRAS遺伝子は、配列番号4で示される塩基配列(NCBIアクセシション番号NM\_033360.3)からなる遺伝子であってよい。また、KRAS遺伝子には、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなるヒトKRASと機能的に同等の活性を有するKRASバリエント又は他生物種のKRASオルソログをコードするKRAS遺伝子も包含される。具体的には、配列番号4で示される塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列、あるいは配列番号4で示される塩基配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するKRAS遺伝子が包含される。

#### 【 0 0 3 6 】

本明細書において、「RAF」(RAFタンパク質)は、RAF遺伝子によりコードされる、キナーゼ活性を有する酵素を指す。RAFはヒトを含む種々の動物に存在し、その配列情報も公知である。RAFの配列情報は、例えば、NCBIデータベースなどの公のデータベースから入手できる。RAFには、ARAF、BRAF及びCRAF(Raf-1ともいう)が含まれる。

10

#### 【 0 0 3 7 】

例えば、CRAFの具体例として、配列番号5で示される648残基のアミノ酸配列(NCBIアクセシション番号NP\_001341619.1)又は配列番号7で示される567残基のアミノ酸配列(NCBIアクセシション番号NP\_001341620.1)からなるヒト由来のCRAF(ヒトCRAF)タンパク質が挙げられる。また、CRAFには、配列番号5又は7で示されるCRAFと機能的に同等の活性を有するCRAFバリエント及び他生物種のCRAFオルソログも包含される。具体的には、CRAFには、配列番号5又は7で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列、あるいは配列番号5又は7で示されるアミノ酸配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するCRAFタンパク質が包含される。

20

#### 【 0 0 3 8 】

「CRAF遺伝子」は、前記CRAFをコードする遺伝子である。CRAF遺伝子の具体例として、配列番号5又は7で示されるアミノ酸配列からなるヒトCRAFをコードするヒトCRAF遺伝子が挙げられる。より具体的には、CRAF遺伝子は、配列番号6で示される塩基配列(NCBIアクセシション番号NM\_001354690.1)又は配列番号8で示される塩基配列(NCBIアクセシション番号NM\_001354691.1)からなる遺伝子であってよい。また、CRAF遺伝子には、配列番号5又は7で示されるアミノ酸配列からなるヒトCRAFと機能的に同等の活性を有するCRAFバリエント又は他生物種のCRAFオルソログをコードするCRAF遺伝子も包含される。具体的には、配列番号6又は8で示される塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列、あるいは配列番号6又は8で示される塩基配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するCRAF遺伝子が含まれる。

30

#### 【 0 0 3 9 】

本明細書において、「MEK」(MEKタンパク質)は、MEK遺伝子によりコードされる、キナーゼ活性を有する酵素を指す。MEKはヒトを含む種々の動物に存在し、その配列情報も公知である。MEKの配列情報は、例えば、NCBIデータベースなどの公のデータベースから入手できる。MEKには、MEK1及びMEK2が含まれる。

40

#### 【 0 0 4 0 】

本明細書において、「ERK」(ERKタンパク質)は、ERK遺伝子によりコードされる、キナーゼ活性を有する酵素を指す。ERKはヒトを含む種々の動物に存在し、その配列情報も公知である。ERKの配列情報は、例えば、NCBIデータベースなどの公のデータベースから入手できる。ERKには、ERK1及びERK2が含まれる。

#### 【 0 0 4 1 】

本明細書において、「RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物」には、限定されないが、例えば、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の産生及び/又は活性を抑制する薬物、並びにRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の分解及び/又は不活性化を促進する薬物などが含まれる。

#### 【 0 0 4 2 】

50

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の産生を抑制する薬物としては、限定されないが、例えばRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分をコードする遺伝子に対する阻害性核酸、例えばRNAi分子、リボザイム、アンチセンス核酸、DNA/RNAキメラポリヌクレオチド等、及びこれを発現するベクター等が挙げられる。このような阻害性核酸及びこれを発現するベクターは、特異性が高く、副作用の可能性が低いために好ましい。

#### 【0043】

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の活性を抑制する薬物としては、限定されないが、例えば、MEK阻害剤であるセルメチニブ及びトラメチニブ；BRAF阻害剤であるベムラフェニブ及びPLX4720；ERK阻害剤；RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分に結合する物質(例えば、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分に結合する抗体など)、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分のドミナントネガティブ変異体等が挙げられる。これらの薬物は市販されているか、公知の技術に基づいて適宜製造することができる。

10

#### 【0044】

一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物は、RASを抑制する薬物であってもよい。RASを抑制する薬物は、KRASを抑制する薬物であってもよい。KRASを抑制する薬物は、KRAS遺伝子に対する阻害性核酸、例えばRNAi分子等であってもよい。

#### 【0045】

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物は、1種を用いてもよいし、2種以上(例えば、異なるRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分を抑制する2種以上の薬物)を用いてもよい。

20

#### 【0046】

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの抑制は、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物を作用させなかった場合に比べ、細胞においてRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが抑制されていることにより決定することができる。本明細書において、「シグナルカスケードを抑制する」とは、シグナルカスケードの不活性化を誘導することのみならず、シグナルカスケードの活性化を抑制することも意味する。RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの抑制は、限定されないが、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の発現(発現量)又はリン酸化されたRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の量を公知の任意の手法(例えば、抗体を利用した手法、例えば、免疫沈降法若しくはウェスタンブロッティング法、又は核酸を利用した手法、例えば、種々のハイブリダイゼーション法、例えばノーザンプロット法若しくはサザンプロット法、又は種々のPCR法)で決定することによって評価できる。

30

#### 【0047】

本発明に係る細胞増殖抑制剤は、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対して使用することができる。本明細書において、「シグナルカスケードが活性化される」とは、シグナルカスケードの活性化が誘導されることのみならず、シグナルカスケードの不活性化が抑制されることも意味する。

#### 【0048】

本明細書において、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分に活性化変異を有するがん、あるいはRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の発現(発現量)の増大を伴うがん、リン酸化されたRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分の量の増大を伴うがん、及びRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分以外の関連因子(例えば、受容体型チロシンキナーゼの活性化など)によるシグナルカスケードの活性化を伴うがんを含み得る。本明細書において、「活性化変異」とは、タンパク質の機能を恒常に活性化させる変異をいう。本明細書において、「変異を有するがん」を、「変異陽性がん」と称することもある。

40

#### 【0049】

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分における変異の検出は、公知の任意の手法、限定されないが、例えば、公知の変異配列に特異的な核酸プローブによる選択的ハイブ

50

リダイゼーション、酵素ミスマッチ切断法、配列決定法、PCR-RFLP(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)法等が挙げられる。

【0050】

一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、RAS(例えば、KRAS)に活性化変異を有するがんであってもよい。本明細書において、RASに活性化変異を有するがんとしては、RASにおいて内因性GTPaseを阻害する変異、又はグアニンヌクレオチド交換速度を増大させる変異などを有するがんが挙げられる。かかる変異の具体例としては、限定されないが、例えば、ヒトKRASにおける第12、13及び/又は61アミノ酸における変異(内因性GTPaseを阻害)、又はヒトKRASにおける第116及び/又は119アミノ酸における変異(グアニンヌクレオチド交換速度を増大)等が挙げられる(Bos, Cancer Res. 1989;49(17):4682-9, Levi et al., Cancer Res. 1991;51(13):3497-502)。したがつて、一実施形態では、活性化変異を有するKRASとしては、ヒトKRASにおける第12、13、61、116、及び119アミノ酸の少なくとも1つに変異を有するKRASが挙げられる。一実施形態では、活性化変異を有するKRASは、ヒトKRASにおける第13アミノ酸に変異(例えば、第13アミノ酸のグリシンからアスパラギン酸への変異)を有する。

【0051】

一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、GSTP1を過剰発現するがんであってもよい。本明細書において、GSTP1発現の検出は、上述のものを含む公知の任意の手法を用いて行うことができる。被験細胞(例えば、がん細胞)においてGSTP1が過剰発現しているか否かは、例えば、被験細胞におけるGSTP1の発現の程度と、正常な同種の細胞におけるGSTP1の発現の程度とを比較することなどにより評価することができる。この場合、被験細胞におけるGSTP1の発現の程度が正常な同種の細胞におけるGSTP1の発現の程度を上回っていれば、GSTP1が過剰発現しているということができる。

【0052】

本明細書において、がんとしては、限定されないが、例えば、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、脂肪肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、血管肉腫、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、滑膜肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫などの肉腫、脳腫瘍、頭頸部がん、乳がん、肺がん、食道がん、胃がん、十二指腸がん、虫垂がん、大腸がん、直腸がん、肝がん、脾がん、胆嚢がん、胆管がん、肛門がん、腎がん、尿管がん、膀胱がん、前立腺がん、陰茎がん、精巣がん、子宮がん、卵巣がん、外陰がん、膣がん、皮膚がんなどのがん腫、さらには白血病や悪性リンパ腫などが挙げられる。なお、本明細書では、「がん」は、上皮性悪性腫瘍及び非上皮性悪性腫瘍を含む。がんは、身体の任意の部位、例えば、脳、頭頸部、胸部、四肢、肺、心臓、胸腺、食道、胃、小腸(十二指腸、空腸、回腸)、大腸(結腸、盲腸、虫垂、直腸)、肝臓、脾臓、胆嚢、肛門、腎、尿管、膀胱、前立腺、陰茎、精巣、子宮、卵巣、外陰、膣、皮膚、横紋筋、平滑筋、滑膜、軟骨、骨、甲状腺、副腎、腹膜、腸間膜、骨髄、血液、血管系、リンパ節等のリンパ系、リンパ液などに存在し得る。

【0053】

一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、KRASに活性化変異を有する大腸がんであってもよい。

【0054】

本発明に係る細胞増殖抑制剤は、後述するように医薬としてがんの治療若しくは予防に使用してもよいし、又は研究用試薬として使用してもよい。本発明に係る細胞増殖抑制剤は、インピボ又はインピトロで使用することができる。本明細書において、「インピボ」とは、個体に対して使用することを指し、「インピトロ」とは、個体から単離された組織又は細胞などに対して使用することを指す。

【0055】

また本発明は、本発明に係る細胞増殖抑制剤を用いて、GSTP1オートクライインループとRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの両方を阻害することを含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんを治療又は予防する方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【0056】

がんの治療又は予防における、本発明に係る細胞増殖抑制剤の使用について、後述の「3. 組成物及び治療/予防方法」に説明されている。

## 【0057】

本発明はまた、上述の本発明に係る細胞増殖抑制剤を用いて、細胞増殖を抑制する方法に関する。本方法は、対象に細胞増殖抑制剤を投与することを含む、がん細胞の増殖をインピボで抑制する方法であってもよいし、又は単離された細胞若しくは組織に細胞増殖抑制剤を投与することを含む、がん細胞の増殖をインピトロで抑制する方法であってもよい。

## 【0058】

本明細書において、細胞増殖の抑制は、種々の公知の手法、例えば、経時的な生細胞数の計数、腫瘍のサイズ、体積若しくは重量の測定、DNA合成量の測定、WST-1法、BrdU(ブロモデオキシウリジン)法、<sup>3</sup>Hチミジン取込み法などにより評価することができる。

## 【0059】

本明細書において、インピトロでの細胞増殖抑制法の適用対象となる細胞は、限定されないが、例えば、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがん細胞、好ましくは、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの成分に活性化変異を有するがん細胞、より好ましくは、RAS(例えば、KRAS)に活性化変異を有するがん細胞、例えば、M7609細胞、DLD-1細胞又はHCT116細胞であってもよい。

## 【0060】

インピトロでの投与量は、当業者であれば適宜決定できるが、例えば、培地中で0.00001nM～100000 μM、0.01nM～100 μM又は1nM～1 μMの濃度になるように投与してもよい。

## 【0061】

本発明はまた、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物と組み合わせて投与するための、GSTP1を抑制する薬物を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤を提供する。

## 【0062】

本発明はまた、GSTP1を抑制する薬物と組み合わせて投与するための、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物を含む、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対する細胞増殖抑制剤を提供する。

## 【0063】

GSTP1を抑制する薬物と、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物とは、同時に投与されてもよいし、時間間隔をあけて投与されてもよい。時間間隔をあけて投与される場合、GSTP1を抑制する薬物を含む製剤を、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物を含む製剤の前に投与してもよいし、後に投与してもよい。

## 【0064】

## 2. GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物による細胞増殖抑制

本発明はまた、GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物を含む、細胞増殖抑制剤に関する。本発明は、後述の実施例に示されるように、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードとGSTP1のオートクライブループとの接合点である、GSTP1とCRAFの相互作用を阻害することにより、がん細胞の増殖が抑制されるという本発明者の知見に基づく。

## 【0065】

「GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物」としては、例えば、結合ドメイン(CRAF上のGSTP1との結合ドメイン又はGSTP1上のCRAFとの結合ドメイン)を含むが活性を持たない、デコイペプチド、及びこれを発現するベクターが挙げられる。本発明において、デコイペプチドは、内在性のGSTP1とCRAFの相互作用を競合的に阻害し得る。本明細書において、CRAF上のGSTP1との結合ドメインを含むがCRAF活性を持たないデコイペプチドを、CRAFデコイペプチドと称する。本明細書において、GSTP1上のCRAFとの結合ドメインを含むがGSTP1活性を持たないデコイペプチドを、GSTP1デコイペプチドと称する。

## 【0066】

10

20

30

40

50

GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物は、CRAFデコイペプチド又はこれを発現するベクターであってもよい。

【0067】

CRAFデコイペプチドは、

- (a)配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (b)配列番号9に示されるアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなるポリペプチド、
- (c)配列番号9に示されるアミノ酸配列に対して90%以上、95%以上、97%以上、98%以上又は99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド、及び
- (d)(a)～(c)のいずれかに記載されるポリペプチドのN末端又はC末端に1～50個(例えば1～30個、1～20個、1～10個又は1～5個)のアミノ酸が付加されたポリペプチドからなる群から選択されてもよい。

【0068】

配列番号9に示されるアミノ酸配列は、配列番号5に示されるヒトCRAFの56～184位のアミノ酸配列である。

【0069】

GSTP1とCRAFの相互作用の阻害は、GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物を作用させた場合と、該薬物を作用させなかった場合において、GSTP1とCRAFの相互作用を公知の技術、例えば免疫沈降法などによって検出することにより評価できる。

【0070】

本発明に係る細胞増殖抑制剤は、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんに対して使用することができる。RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんについては、上述されている。一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、RAS(例えば、KRAS)に活性化変異を有するがんであってもよい。一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、GSTP1を過剰発現するがんであってもよい。一実施形態では、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんは、KRASに活性化変異を有する大腸がんであってもよい。

【0071】

本発明に係る細胞増殖抑制剤は、後述するように医薬としてがんの治療若しくは予防に使用してもよいし、又は研究用試薬として使用してもよい。本発明に係る細胞増殖抑制剤は、インピボ又はインピトロで使用することができる。

【0072】

がんの治療又は予防における、本発明に係る細胞増殖抑制剤の使用について、後述の「3. 組成物及び治療/予防方法」に説明されている。

【0073】

本発明はまた、上述の本発明に係る細胞増殖抑制剤を用いて、細胞増殖を抑制する方法に関する。本方法は、対象に細胞増殖抑制剤を投与することを含む、がん細胞の増殖をインピボで抑制する方法であってもよいし、又は単離された細胞若しくは組織に細胞増殖抑制剤を投与することを含む、がん細胞の増殖をインピトロで抑制する方法であってもよい。

【0074】

インピトロでの投与量は、当業者であれば適宜決定できるが、例えば、培地中で0.00001nM～100000 μM、0.01nM～100 μM又は1nM～1 μMの濃度になるように投与してもよい。

【0075】

GSTP1とCRAFの相互作用を阻害する薬物は、上に記載されるRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制する薬物及びGSTP1を抑制する薬物の少なくとも一方と併用してもよい。

【0076】

3. 組成物及び治療/予防方法

本発明は、上述の本発明に係る細胞増殖抑制剤を含む、組成物にも関する。組成物は、

10

20

30

40

50

医薬組成物であってもよい。

【0077】

組成物は、活性成分の効果を妨げない限り、活性成分に加えて、他の任意成分を含んでもよい。そのような任意成分としては、例えば、化学治療剤、薬学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等が挙げられる。また、投与経路又は薬物放出様式などに応じて、医薬組成物を、適切な材料、例えば、腸溶性のコーティング又は時限崩壊性の材料で被覆してもよく、また、適切な薬物放出システムに組み込んでもよい。

【0078】

本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物は、経口及び非経口の両方を包含する種々の経路、例えば、限定されないが、経口、静脈内、筋肉内、皮下、局所、腫瘍内、直腸、動脈内、門脈内、心室内、経粘膜、経皮、鼻内、腹腔内、肺内及び子宮内等の経路で投与してもよく、各投与経路に適した剤形に製剤化してもよい。かかる剤形及び製剤方法は任意の公知のものを適宜採用することができる。

10

【0079】

例えば、経口投与に適した剤形としては、限定されないが、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、乳剤、ゲル剤、シロップ剤などが挙げられる。非経口投与に適した剤形としては、限定されないが、溶液性注射剤、懸濁性注射剤、乳濁性注射剤、用時調製型注射剤などの注射剤が挙げられる。非経口投与用製剤は、水性又は非水性の等張性無菌溶液又は懸濁液の形態であることができる。

【0080】

20

本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物における活性成分の配合量は、当該細胞増殖抑制剤又は組成物が投与された場合に、所望の効果(例えば、がん細胞の増殖抑制など)を達成する量であってもよい。また、投与による利益を超える悪影響が生じない量が好ましい。かかる量は公知であるか、培養細胞などを用いたインビトロ試験や、マウス、ラット、イヌ又はブタなどのモデル動物における試験により適宜決定することができ、このような試験法は当業者によく知られている。活性成分の配合量は、細胞増殖抑制剤又は組成物の投薬態様によって変化し得る。配合量の調整は当業者が適宜行うことができる。

【0081】

また、活性成分は、種々の非ウイルス性脂質又はタンパク質担体に担持させることもできる。かかる担体としては、限定されずに、例えば、コレステロール、リポソーム、抗体プロトマー、シクロデキストリンナノ粒子、融合ペプチド、アプタマー、生分解性ポリ乳酸コポリマー、ポリマーなどが挙げられ、細胞内への取込み効率を高めることができる(例えば、Pirollo and Chang, Cancer Res. 2008;68(5):1247-50などを参照)。特に、カチオン性リポソーム又はポリマー(例えば、ポリエチレンイミンなど)が有用である。かかる担体として有用なポリマーのさらなる例としては、例えば、米国特許出願公開第2008/0207553号明細書、同第2008/0312174号明細書等に記載のものなどが挙げられる。

30

【0082】

本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物は、特定の組織又は細胞に標的化されていてもよい。標的化は、公知の任意の手法により達成することができる。がんへの送達を企図する場合は、限定されないが、例えば、製剤をEPR(enhanced permeability and retention)効果の発現に好適な直径50~200 μm、特に75~150 μmなどのサイズにすることによるパッセンジターゲティング; CD19、HER2、トランスフェリン受容体、葉酸受容体、VIP受容体、EGFR(Torchilin, AAPS J. 2007;9(2):E128-47)、RAAG10(特表2005-532050号公報)、PIPA(特表2006-506071号公報)、又はKID3(特表2007-529197号公報)などのリガンド; RGDモチーフ又はNGRモチーフを有するペプチド; F3又はLyP-1(Ruosahti et al., J Cell Biol. 2010;188(6):759-68)などを標的化剤として利用するアクティビターゲティングなどの手法を用いることができる。また、レチノイドががん細胞への標的化剤として有用であることも知られているため(国際公開第2008/120815号)、レチノイドを標的化剤として含む担体を利用することもできる。かかる担体は、上記文献のほか、国際公開第2009/036368号及び同第2010/014117号などに記載されている。

40

50

**【 0 0 8 3 】**

本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物は、いずれの形態で供給されてもよいが、保存安定性の観点から、用時調製可能な形態、例えば、医療の現場又はその近傍において、医師及び/又は薬剤師、看護士、又はその他のパラメディカルなどによって調製され得る形態で提供してもよい。かかる形態は、本発明の細胞増殖抑制剤又は組成物が、脂質、タンパク質又は核酸などの安定した保存が難しい成分を含むときに特に有用である。この場合、本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物は、これらに必須の構成要素の少なくとも1つを含む1個又は2個以上の容器において提供され、使用の前、例えば、24時間前以内、好ましくは3時間前以内、より好ましくは使用の直前に調製される。調製に際しては、調製する場所において通常入手可能な試薬、溶媒、調剤器具などを適宜使用することができる。

10

**【 0 0 8 4 】**

本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物の具体的な用量は、処置を要する対象に関する種々の条件、例えば、症状の重篤度、対象の一般健康状態、年齢、体重、対象の性別、食事、投与の時期及び頻度、併用している医薬、治療への反応性、剤形、及び治療に対するコンプライアンスなどを考慮して決定され得る。例えば、活性成分が0.0000001mg/体重kg/日～1000mg/体重kg/日又は0.0001mg/体重kg/日～1mg/体重kg/日となる量で投与してもよい。

**【 0 0 8 5 】**

投与頻度は、用いる細胞増殖抑制剤若しくは組成物の性状、及び上記のものを含む対象の条件によって異なるが、例えば、1日多数回(すなわち1日2、3、4回又は5回以上)、1日1回、数日毎(すなわち2、3、4、5、6、7日毎など)、1週間毎、数週間毎(すなわち2、3、4週間毎など)であってもよい。

20

**【 0 0 8 6 】**

本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物は、他の抗がん剤と併用してもよい。併用する場合は、同時に投与するための配合剤として、あるいは独立して投与するための別個の製剤としてもよい。併用は、同時投与及び連続投与を含む。

**【 0 0 8 7 】**

本発明はまた、上述の本発明に係る細胞増殖抑制剤又は組成物を対象に投与することを含む、がんの治療又は予防方法にも関する。

**【 0 0 8 8 】**

30

本明細書において、「治療」は、がん細胞が死滅すること若しくはその細胞数が減少すること、及びがんの増殖が抑制されることを含む。本明細書において、「予防」は、がん転移防止、がん再発防止及び発がん防止を含む。

**【 0 0 8 9 】**

本明細書において、「対象」は、任意の生物個体を意味し、好ましくは動物、さらに好ましくは哺乳動物、さらに好ましくはヒトの個体である。典型的には、対象は、本発明に係る細胞増殖抑制剤の投与を必要とする対象、例えば、がんに罹患している対象、がんの転移若しくは再発のリスクがある対象、又は発がんのリスクのある対象などであり得る。

**【 0 0 9 0 】**

40

**4. キット**

本発明はまた、本発明に係る細胞増殖抑制剤若しくは組成物、又はそれに含まれる活性成分を、単独で若しくは組み合わせて含む1個又は2個以上の容器を含む、組成物の調製用、細胞増殖抑制用、又はがんの治療若しくは予防用キットにも関する。

**【 0 0 9 1 】**

本発明のキットは、上記のほか、細胞増殖抑制剤又は組成物の調製方法や投与方法などが記載された指示、例えば説明書、又はCD、DVD等の電子記録媒体等を含んでいてもよい。

**【 実施例 】****【 0 0 9 2 】**

以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明の技術的範囲は

50

これら実施例に限定されるものではない。

【0093】

[実施例1]

(GSTP1と結合するCRAFのドメインの解析)

(1)細胞培養

KRAS変異陽性大腸がん細胞株M7609をRPMI培地(10%FBSを含む)中で37℃にて培養した。M7609細胞は、札幌医科大学第四内科から提供を受けた。M7609細胞はKRASに活性化変異を有するため、M7609細胞のRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードは活性化されている。

【0094】

(2)プラスミドの調製

10

図1に、実施例1で後述のように用いたプラスミドが発現するタンパク質の構造が示される。(a)はFLAG-CRAF(1-648)を示し、CRAFに含まれるドメインのアミノ酸残基位置(61～192位: CR1ドメイン、251～266位: CR2ドメイン、333～625位: CR3ドメイン)を示す。(b)はFLAG-CRAF N(193-648)を示す。(c)はFLAG-BRAF(1-766)を示し、BRAFに含まれるドメインのアミノ酸残基位置(2～117位: BRSRドメイン、155～280位: CR1ドメイン、360～375位: CR2ドメイン、457～717位: CR3ドメイン)を示す。(d)はFLAG-BRAF N(149-766)を示す。

【0095】

図1(a)に示されるFLAG-CRAF(1-648)は、配列番号5に示される全長CRAFタンパク質のC末端にFLAGタグが結合したタンパク質である。FLAG-CRAF(1-648)は、札幌医科大学第四内科から提供を受けたプラスミドpCMV3.1-FLAG-CRAFから発現する。

20

【0096】

図1(b)に示されるFLAG-CRAF N(193-648)は、配列番号5の193～648位のアミノ酸配列からなる欠失型CRAFタンパク質のC末端にFLAGタグが結合したタンパク質である。この欠失型CRAFタンパク質は、全長CRAFのN末端部分(配列番号5のアミノ酸残基1～192位)が欠失している。FLAG-CRAF N(193-648)は、pCMV6-Entryベクター(Origen社)のAsiSI部位とMluI部位の間にCRAFのアミノ酸193～648位に対応するcDNAをクローニングすることによって作製したプラスミドpCMV6-Myc-DDK-CRAF Nから発現する。

【0097】

図1(c)に示されるFLAG-BRAF(1-766)は、配列番号10に示される全長BRAFタンパク質のC末端にFLAGタグ(DDKタグ)が結合したタンパク質である。FLAG-BRAF(1-766)は、プラスミドpCMV6-Myc-DDK-BRAF(Origen社)から発現する。

30

【0098】

図1(d)に示されるFLAG-BRAF N(149-766)は、配列番号10の149～766位のアミノ酸配列からなる欠失型BRAFタンパク質のC末端にFLAGタグが結合したタンパク質である。この欠失型BRAFタンパク質は、全長BRAFのN末端部分(配列番号10のアミノ酸残基1～148位)が欠失している。FLAG-BRAF N(149-766)は、pCMV6-Entryベクター(Origen社)のAsiSI部位とMluI部位の間にBRAFのアミノ酸149～766位に対応するcDNAをクローニングすることによって作製したプラスミドpCMV6-Myc-DDK-BRAF Nから発現する。

【0099】

(3)プラスミドのトランスフェクション

40

4種のプラスミドをそれぞれ、M7609細胞にリポフェクタミン法によってトランスフェクトした。また、対照として、トランスフェクションしていない細胞(NT)を用意した。

【0100】

(4)共免疫沈降

トランスフェクション後の細胞を用いて、共免疫沈降を行った。細胞を、0.5%NP-40溶解バッファー(0.5%NP-40、20mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EGTA、10%グリセロール、Complete, Mini(Roche Diagnostics社)及びPhosSTOP(Roche Diagnostics社))中で氷上で30分間インキュベートして溶解した。遠心分離し、上清を細胞溶解物として得た。各サンプルから得られた、等量のタンパク質を含む細胞溶解物を、抗FLAG M2磁気ビーズ(SIGMA社)と4℃にて2時間～一晩インキュベートし、ビーズにFLAGタグ付タンパ

50

ク質を結合させた。ビーズを0.5%NP-40溶解バッファーで4回洗浄した。

#### 【0101】

##### (5) ウエスタンプロット解析

共免疫沈降で得られたビーズから、ウェスタンプロット用のサンプルを調製し、SDS-PAGEに供して、タンパク質を分離した。分離したタンパク質をPVDFメンブレンに転写した。メンブレンを一次抗体溶液とインキュベートし、洗浄した。用いた一次抗体は、抗GSTP1抗体(MBL社)、抗FLAG抗体(F3165、SIGMA社)又は抗GAPDH抗体(Abcam社)とした。次いで、メンブレンを二次抗体(ウサギ又はマウスIgGに対するヤギ二次抗体)溶液とインキュベートし、洗浄した。ECL又はECL primeウェスタンプロッティング検出系(GE healthcare社)を用いてメンブレンにおいてシグナルを可視化した。

10

また、同様の方法で、細胞溶解物についてもウェスタンプロット解析を行った。

#### 【0102】

##### (6) 結果

結果を図2に示す。GSTP1は、全長CRAFタンパク質と共に沈降した(図2のレーン2)が、N末端部分が欠失したCRAFタンパク質とは共沈降しなかった(図2のレーン4)。この結果は、CRAFタンパク質のN末端部分(アミノ酸残基61～192位のCR1ドメインを含むアミノ酸残基1～192位)がGSTP1との結合に関与していることを示す。

#### 【0103】

さらに、GSTP1は、全長BRAFタンパク質とは共沈降しなかった(図2のレーン3)が、N末端部分が欠失したBRAFタンパク質と共に沈降した(図2のレーン5)。全長BRAFタンパク質は、全長CRAFタンパク質に対して高いアミノ酸保存性を有するが、N末端側に伸長部分を有する(図1c)。本実施例の結果は、この伸長部分があるBRAFはGSTP1に結合せず、伸長部分がないBRAFはGSTP1に結合することを示す。このことから、BRAFのN末端伸長部分(CRAFにはない)の存在が、GSTP1のBRAFへの結合を立体構造的に干渉又はブロックする可能性が示される。

20

#### 【0104】

##### [実施例2]

###### (GSTP1によるCRAF活性への影響)

###### (1) 細胞培養及びEGF処理

KRAS野生型HeLa細胞をDMEM培地の中で5%CO<sub>2</sub>環境下で37℃にて培養した。HeLa細胞は、札幌医科大学第四内科から提供を受けた。HeLa細胞をまず血清飢餓条件下で16時間インキュベートし、次いで50ng/ml EGF(上皮成長因子、BD Biosciences社)溶液で10分間処理した。EGF処理によりRASが活性化される。RAS活性化はCRAFのリン酸化に必要である。

30

#### 【0105】

###### (2) インビトロキナーゼアッセイ

pcDNA3.1-FLAG-CRAF(札幌医科大学第四内科から提供)をHeLa細胞(EGF処理あり又はなし)に、FuGENE6 HD(Promega社)を用いてトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、HeLa細胞を0.5%NP-40溶解バッファー(0.5%NP-40、20mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、1mM EGTA、10%グリセロール、Complete, Mini(Roche Diagnostics社)及びPhosSTOP(Roche Diagnostics社))中で氷上で30分間インキュベートして溶解した。13000×gで10分間、4℃にて遠心分離し、上清を細胞溶解物として得た。細胞溶解物を抗FLAG M2アフィニティゲル(SIGMA社)と4℃で2時間インキュベートし、抗FLAG M2アフィニティゲルにFLAG-CRAFを結合させた。インキュベート後の抗FLAG M2アフィニティゲルを0.5%NP-40溶解バッファーで4回洗浄した。FLAG-CRAFを結合させた抗FLAG M2アフィニティゲルをAssay Dilution Buffer I (Merck-Millipore社)で洗浄し、このゲルを、Assay Dilution Buffer I (Merck-Millipore社)中で、1μgのヒト胎盤GSTP1(SIGMA社)の存在下又は非存在下で、1μgの不活性MEK1(Merck-Millipore社)及びマグネシウム/ATPカクテル(Merck-Millipore社)と30℃で1時間インキュベートし、FLAG-CRAFによるMEK1のリン酸化反応を行った。また、FLAG-CRAFを結合させた抗FLAG M2アフィニティゲルの代わりに活性CRAF(Origene社)を、Assay Dilution Buffer I中で不活性MEK1及びマグネシウム/ATPカクテルとイン

40

50

キュベートした対照サンプルを調製した。

【0106】

(3) ウェスタンプロット解析

インビトロキナーゼアッセイの反応後のサンプルについて、一次抗体として抗p-MEK1/2 (Ser217/221) 抗体 (Cell signaling technology社) 又は抗MEK1/2抗体 (Cell signaling technology社) を用いたことを除き、実施例1の(5)に記載したように、ウェスタンプロット解析を行った。

【0107】

(4) 結果

結果を図3に示す。GSTP1によって、FLAG-CRAFによるMEK1のリン酸化が増強されたことが示された(図3のレーン3及び5を比較)。特に、GSTP1によるMEK1のリン酸化の増強は、EGF処理細胞から単離されたFLAG-CRAFを用いた場合により明らかだった(図3のレーン4及び6を比較)。これらの結果は、GSTP1がCRAFの活性を増強することを示す。

【0108】

RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードが活性化されているがんでは、当該シグナルカスケードの活性化によって下流のGSTP1の発現が増加し得ることが知られている(図4の黒矢印)。例えば、KRAS変異陽性がん細胞では、恒常的に活性化した変異型KRAS(mKRAS)により、CRAFなどのRAF、MEK、及びERKへのシグナル伝達が駆動され、異常な細胞増殖をもたらすこと、及び駆動されたシグナルカスケードがc-FOS及びc-JUNなどの転写因子によるphorbol 12-O-tetradecanoate-13-acetate(TPA)-responsive element(TRE；塩基配列TGACTCAG)への結合を介して、GSTP1の転写を誘導する(図4の黒矢印)。実施例1及び2の結果から、GSTP1がRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードの活性化によりいったん誘導されると(図4の黒矢印の経路)、当該シグナルカスケードの成分であるCRAFの活性を増強し、変異型KRASによる恒常的な上流からの刺激とは無関係にこのカスケードを駆動し(GSTP1のオートクライブループ：図4の白矢印の経路)、その結果、両経路によって当該シグナルカスケードが異常に活性化され、細胞増殖が永続的に促進されることが示された。両経路を阻害することにより、効果的に細胞増殖抑制効果が得られると考えられた。

【0109】

[実施例3]

(CRAFタンパク質断片による細胞増殖への影響)

CRAFタンパク質断片発現プラスミドpcDNA-hRAF384(5807bp)を、ベクターpcDNA3.1(+)(Thermo Fisher Scientific社)のCMV(サイトメガロウイルス)プロモーター下にヒトCRAF遺伝子(配列番号6)の332～718位の領域をクローニングして作製した。このプラスミドは、ヒトCRAFタンパク質(配列番号5)の56～184位のCRAFタンパク質断片(配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチド)の発現をもたらす。

【0110】

HCT116細胞(KRAS変異陽性ヒト大腸がん細胞)はATCCから入手した。HCT116細胞は第13アミノ酸のグリシン(G)がアスパラギン酸(D)へ活性化変異したKRASを有するため、HCT116細胞のRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードは活性化されている。

【0111】

DLD-1細胞(KRAS変異陽性ヒト大腸がん細胞)は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所のJCRB細胞バンクから入手した。DLD-1細胞は、第13アミノ酸のグリシン(G)がアスパラギン酸(D)へ活性化変異したKRASを有するため、DLD-1細胞のRAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードは活性化されている。

【0112】

HCT116細胞又はDLD-1細胞を96ウェルプレートの1ウェルあたり $1.0 \times 10^4$ 個又は $2.0 \times 10^4$ 個となるように播種し、McCoy's 5A培地で5%CO<sub>2</sub>環境下で37℃にて24時間培養した。培養後の細胞に、Lipofectamine 3000(Thermo Fisher Scientific社)を用いてCRAFタンパク質断片発現プラスミドpcDNA-hRAF384をトランスフェクトした。対照として、空ベクターpcDNA3.1(+)(Thermo Fisher Scientific社)をトランスフェクトした。トランスフェクショ

10

20

30

40

50

ンは、1ウェルあたり $0.2\mu\text{l}$ のLipofectamine 3000及び100ngのプラスミドを用いて、製造業者のプロトコールに従って行った。

【0113】

培養直後(0時間)並びに培養の24、48、72及び96時間後に細胞を回収し、WSTアッセイにより生細胞数を測定した。WSTアッセイは、Cell Counting Kit-8(CCK-8、同仁化学研究所)を用い、CCK-8溶液の添加後1時間インキュベートすることによって行った。

【0114】

$1.0 \times 10^4$ 個の細胞を播種した場合の結果を図5A(HCT116細胞)及び図5B(DLD-1細胞)に示す。CRAFタンパク質断片を発現させた細胞は、対照と比較して、増殖の低下を示した。 $2.0 \times 10^4$ 個の細胞を播種した場合も、同様の傾向が見られた。このCRAFタンパク質断片は、内在性のGSTP1とCRAFの結合を競合的に阻害し(すなわち、デコイペプチドとして機能し)、その結果、図4に示すGSTP1のオートクライループが遮断され、RAS/RAF/MEK/ERKカスケードによる細胞増殖シグナルが抑制され、細胞増殖が抑制されたことが示された。

【0115】

[実施例4]

(GSTP1とKARSの二重抑制による細胞増殖への影響)

KRAS変異陽性大腸がん細胞株M7609にsiRNAのトランスフェクションを2回行った。各トランスフェクションはLipofectamine RNAiMAX (Thermo fisher scientific社)を用いて製造業者のプロトコールに従って行った。M7609細胞をRPMI-1640培地(抗生物質なし)中で37

で培養し、20~30%コンフルエントに達したとき、細胞を、Opti-MEM I(Thermo fisher scientific社)中のsiRNAと5時間インキュベートして、1回目のトランスフェクションを行った。トランスフェクション後、細胞をRPMI-1640培地(抗生物質なし)中で37で培養した。2日間培養した後、1回目と同様の方法で2回目のトランスフェクションを行った。トランスフェクション後、細胞をRPMI-1640培地(抗生物質なし)中で37で培養した。3日間培養した後、細胞の総数をカウントした。また、対照としてトランスフェクションしていない細胞(NT)について同様に細胞数をカウントした。実験は3回独立して行い、平均値及び標準偏差を算出した。

【0116】

1回目と2回目のトランスフェクションは以下のsiRNAを用いて行った。

【0117】

【表1】

	1回目	2回目
siControl	対照siRNA	対照siRNA
siKRAS	対照siRNA	KRAS siRNA
siGSTP1	GSTP1 siRNA	対照siRNA
siGSTP1+siKRAS	GSTP1 siRNA	KRAS siRNA

【0118】

GSTP1 siRNAはThermo fisher scientific社からsiRNA ID: 2385で入手した。GSTP1 siRNAのトランスフェクション濃度は50nMとした。KRAS siRNAはThermo fisher scientific社からsiRNA ID: s7939で入手した。KRAS siRNAのトランスフェクション濃度は10nMとした。対照siRNAとしてAllStars Negative Control siRNA(Qiagen社)を使用した。

【0119】

結果を図6に示す。KRAS変異陽性がん細胞において、GSTP1 siRNAとKRAS siRNAはそれぞれ単独で細胞増殖を抑制したが、GSTP1 siRNAとKRAS siRNAの併用によって細胞増殖抑制が大幅に増強されることが示された。

【0120】

KRAS単独を抑制した場合には、図4に示される変異型KRASからのシグナル伝達は抑制されるが、GSTP1のオートクライループによるシグナル伝達は抑制されない。また、GSTP1

10

20

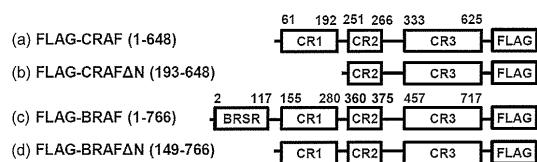
30

40

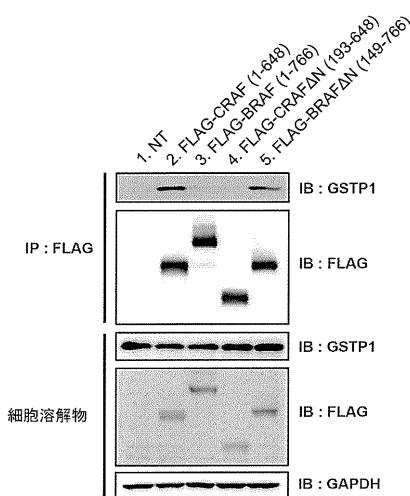
50

単独を抑制した場合には、図4に示されるGSTP1のオートクライループによるシグナル伝達は抑制されるが、変異型KRASからのシグナル伝達は抑制されない。一方、KRASとGSTP1の両方を抑制すると、より効果的に、RAS/RAF/MEK/ERKシグナルカスケードを抑制でき、細胞増殖を抑制できることが示された。

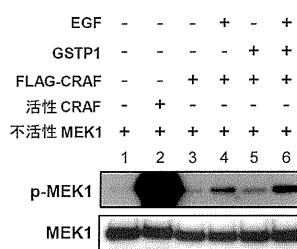
【図1】



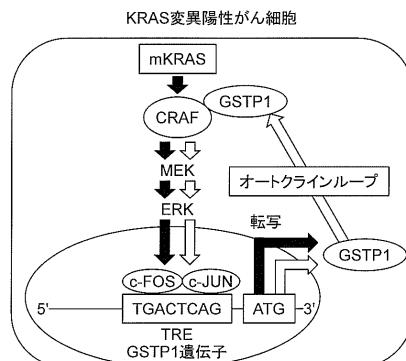
【図2】



【図3】

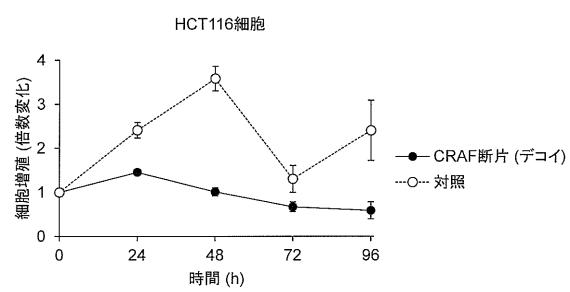


【図4】

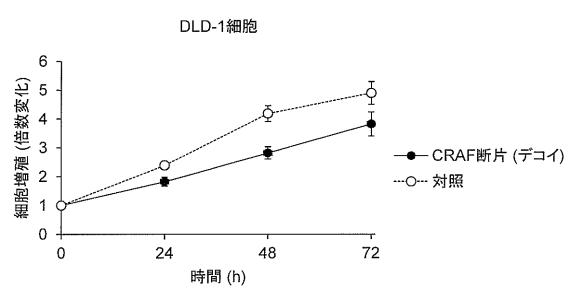


【図5】

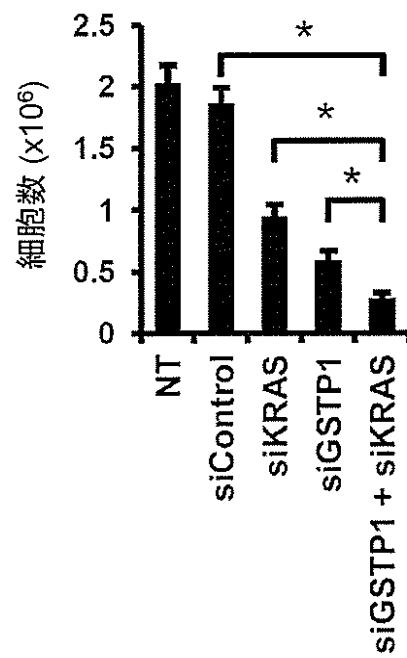
A



B



【図6】



【配列表】

0006952594000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 K	31/713	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	45/06	(2006.01)	A 6 1 K	31/713	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	A 6 1 K	45/06	
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	Z N A
			C 1 2 N	15/00	

(56)参考文献 国際公開第2012/176282 (WO, A1)

Cell Reports, 2014年09月11日, 8, p.1475-1483

PLoS ONE, 2017年10月05日, 12(10), e0185862, p.1-22

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0

A 6 1 K 4 8 / 0 0

A 6 1 K 3 1 / 0 0

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 / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

U n i P r o t / G e n e S e q