

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-167301

(P2021-167301A)

(43) 公開日 令和3年10月21日(2021.10.21)

(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 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00 Z N A	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/527 (2006.01)	A 6 1 K 31/527	

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L 外国語出願 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-64507 (P2021-64507)
(22) 出願日 令和3年4月6日 (2021.4.6)
(31) 優先権主張番号 63/007329
(32) 優先日 令和2年4月8日 (2020.4.8)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31) 優先権主張番号 63/165049
(32) 優先日 令和3年3月23日 (2021.3.23)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71) 出願人 593141953
ファイザー・インク
アメリカ合衆国10017ニューヨーク州
ニューヨーク市イースト・フォーティーセ
カンド・ストリート235

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CDK2阻害剤に対する腫瘍適応を抑制するためのCDK4/6およびCDK2阻害剤による同時処置

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 CDK2阻害剤に対する腫瘍適応を抑制するためのCDK4/6およびCDK2阻害剤による同時処置を提供する。

【解決手段】 疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK2阻害剤および治療有効量のCDK4/6阻害剤を投与するステップを含み、CDK4/6阻害剤が、CDK2の阻害に応答した、CDK4および/またはCDK6によって媒介されるリバウンドリン酸化を防止する、方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の CDK 2 阻害剤および治療有効量の CDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、治療有効量が、一緒になって、がんの処置において有効である、方法。

【請求項 2】

がんが、腫瘍細胞増殖に対する CDK 2 依存によって特徴付けられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

治療有効量の CDK 4 / 6 阻害剤が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / または CDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を防止する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

CDK 4 / 6 阻害剤が、アベマシクリブ、リボシクリブ、バルボシクリブ、レロシクリブ、トリラシクリブ、SHR - 6390 および BPI - 16350、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

CDK 2 阻害剤が、6 - (ジフルオロメチル) - 8 - [(1R, 2R) - 2 - ヒドロキシ - 2 - メチルシクロペンチル] - 2 - {[1 - (メチルスルホニル)ピペリジン - 4 - イル]アミノ}ピリド[2, 3 - d]ピリミジン - 7 (8H) - オン (PF - 06873600)、ミルシクリブ、インジチニブおよび FN - 1501、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

CDK 2 阻害剤および CDK 4 / 6 阻害剤が、逐次に、同時発生的にまたは同時に投与される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

CDK 2 阻害剤が、PF - 06873600 またはその薬学的に許容できる塩である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

CDK 4 / 6 阻害剤が、バルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩である、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

細胞における CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / または CDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を阻害するための方法であって、細胞に、ある量の CDK 2 阻害剤およびある量の CDK 4 / 6 阻害剤を導入するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤の量が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / または CDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化の阻害において有効である、方法。

【請求項 10】

細胞が、がん細胞である、請求項 9 に記載の方法。

40

【請求項 11】

がん細胞が、腫瘍細胞増殖に対する CDK 2 依存によって特徴付けられる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

CDK 4 / 6 阻害剤が、アベマシクリブ、リボシクリブ、バルボシクリブ、レロシクリブ、トリラシクリブ、SHR - 6390 および BPI - 16350、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される、請求項 9 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

CDK 2 阻害剤が、PF - 06873600、ミルシクリブ、インジチニブおよび FN

50

- 1501、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される、請求項9から12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤が、それを必要とする対象へと逐次に、同時発生的にまたは同時に投与される、請求項9から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

CDK2阻害剤が、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩である、請求項9から14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項16】

CDK4/6阻害剤が、パルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩である、請求項9から15のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

配列表の参照

本願は、EFS-Web経由で電子的に出願されており、.txt形式で電子的に提出された配列表を含む。この.txtファイルは、2021年3月26日に作成され、17KBのサイズを有する、「PC07258002SEQLISTING__ST25.txt」という表題の配列表を含有する。この.txtファイルに含有される配列表は、本明細書の一部であり、その全体を参照により本明細書に組み込む。

【0002】

発明の分野

本発明は、サイクリン依存性キナーゼ2(CDK2)ならびにサイクリン依存性キナーゼ4および6(CDK4/6)の同時阻害により、がん等の異常細胞増殖性障害を処置または改善するための組合せおよび方法に関する。一部の実施形態では、本組合せおよび方法は、CDK2およびCDK4/6の相乗的同時阻害を提供する。

【背景技術】

【0003】

細胞周期の進行は、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)によって媒介される逐次リン酸化事象によって実行される。細胞周期を通したCDK活性のタイミングおよび特異性は、ヘテロ二量体複合体の形成を介してCDKを活性化し、様々なサイクリンの上昇および下降によってもたらされる。休止または静止状態の細胞は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ経路を活性化し、マイトジェンによって、細胞周期に進入するように刺激され、D型サイクリン(サイクリンD1、D2およびD3)の上方調節をもたらすことができる(Aktasら、1997; Sherr、1993、1994)。次に、サイクリンDは、CDK4およびCDK6に結合し、網膜芽細胞腫タンパク質、Rbのリン酸化を惹起する。RbのCDK4/6媒介性リン酸化の性質および効果については、活発な議論中であるが(Chungら、2019; Narasimhaら、2014; Sanidasら、2019)、現在のモデルは、Rbリン酸化が、その不活性化および結果的にE2F転写因子遊離をもたらす、E2F転写因子が、サイクリンEおよびサイクリンAを含むS期進入に必要とされる遺伝子の発現を駆動することを記述する(Chellappanら、1991; Ohtaniら、1995)。CDK4およびCDK6は、構造的および機能的な相同性を示し、両者共に、Rbをリン酸化することができる(Katoら、1993; MeyersonおよびHarlow、1994)。しかし、両者の特有の系列特異的発現プロファイルは、これらが完全に冗長であるとは限らないことを示唆する(Huら、2009; Malumbresら、2004; Raneら、1999)。

【0004】

マイトジェンの添加によって細胞周期に再進入するように刺激された静止細胞において、CDK4/6活性は、サイクリンEがCDK2を活性化するまで要求され、CDK2は、Rbをさらにリン酸化し、E2Fの完全遊離および制限点(細胞が以後マイトジェン非

10

20

30

40

50

依存性になる時点として定義)の通過を確実にする正のフィードバックループを惹起する (Baldinら、1993; LundbergおよびWeinberg、1998; Matsushimeら、1994; Mittnachtら、1994)。非同期的に周期を進める細胞において、CDK4/6は、G1期の最初の3~6時間においてのみ要求され、これは、パルボシクリブ (IBRANCE (登録商標)、参照により本明細書に組み込む米国特許第6,936,612号およびRE47,739も参照)等のCDK4/6阻害剤の添加がCDK2活性の上昇および細胞周期進行を以後妨害しなくなる時点によって決定される (Yangら、2017b)。S期進入後に、サイクリンEレベルは減退し、CDK2-サイクリンAが取って代わり、これは、いくつものプロセスの中でもとりわけ、DNA複製 (例えば、Cdc6)、DNA修復 (例えば、Nbs1)、ヒストン合成 (例えば、NPAT)、中心体重複 (例えば、ヌクレオフォスミン、Mps1)に必須なタンパク質のリン酸化を促進する (FiskおよびWiney、2001; Okudaら、2000; Petersenら、1999; Wohlboldら、2012; Zhaoら、2000)。最後に、CDK1-サイクリンAおよびCDK1-サイクリンB複合体が、S期後期およびG2期において活性化されて、それぞれ有糸分裂への移行およびその完了を駆動する (Katsunoriら、2009) (Lindqvistら、2009; Lohkaraら、1988)。CDK-サイクリン複合体の生物学的重要性を考慮すると、これらの複合体およびこれらを調節するタンパク質が、がんにおいて突然変異されることが多いことは驚くには当たらない (Deshpandeら、2005)。一般的な変更は、Rb機能の損失、またはサイクリンD、サイクリンE、CDK4およびCDK6の上方調節/増幅を含む (BurkhardtおよびSage、2008; Keyomarsiら、2002; Khatibら、1993; Massague、2004; Musgroveら、2011; Parkら、2014)。

【0005】

CDKの決定的な機能にもかかわらず、CDK1を例外として、その多くは*in vivo*で必須ではなく、CDK間の機能的代償を示唆する。例えば、マウスにおけるCDK4の欠失は、腭ベータ細胞および下垂体乳腺刺激ホルモン分泌細胞の増殖に選択的に影響を与え、CDK6の欠失は、造血細胞のサブセットのみに影響を与え、CDK2損失は、生殖系列細胞における増殖に選択的に影響を与える (Malumbresら、2004; Moonら、2002; Raneら、1999)。CDK4/CDK6ダブルノックアウトは、造血欠乏が原因でマウスにおいて胚性致死であるが、他の組織は、正常な増殖を示した (Malumbresら、2004)。これと一致して、様々な細胞培養モデルにおけるCDK2のノックアウトまたはノックダウンは、CDK2が、細胞増殖に必須ではないことを示した (TetsuおよびMcCormick、2003)。

【0006】

これらの研究は、CDK2活性が、生存率および増殖に必須ではないという考えを支持するが、CDK2が、細胞周期進行に必須ではないのか、または代償性キナーゼが、CDK2ヌル設定において活性であるか否かは不明であった (Berthetら、2003)。CDK2/CDK4ダブルノックアウトマウスも生存可能であったため、CDK2またはCDK4の非存在下での増殖は、CDK1による代償性リン酸化に起因した (Malumbresら、2004)。実際に、CDK2、CDK3、CDK4およびCDK6を欠くマウス胚は、妊娠中期に至るまで発生することができる (Santamariaら、2007)。これらのマウスノックアウト研究から得た結論は、CDK1が、哺乳類細胞における唯一の必須CDKであり、あらゆる必須CDK2、CDK4およびCDK6基質の代償性リン酸化を駆動することができることであった。

【0007】

上述の研究によって実証されるCDK2の非必須性にもかかわらず、依然として、サイクリンEを過剰発現し、これに依存するがんを処置するための、CDK2を標的とする低分子阻害剤の開発には大きな関心がある。このようながんは、臨床CDK4/6阻害剤に対し内在的な抵抗性を有し、生存のためにCDK2に「耽溺」していると考えられる (C

10

20

30

40

50

aldonら、2012)。その上、前臨床モデルにおいて、CDK4/6阻害剤（例えば、パルボシクリブ、アベマシクリブ、リボシクリブ）による延長された処置は、Rbの損失、CDK2/サイクリンE活性の上方調節をもたらすCCNE1の増幅、または非標準CDK2/サイクリンD1複合体の形成を介して、獲得抵抗性をもたらす（Francorら、2014；Herrera-Abreuら、2016；Yangら、2017a）。この臨床仮説に取り組むために、新たなATP競合性CDK阻害剤PF-06873600（本明細書において、PF3600と称される場合もあり、これは、米国特許第10,233,188号にさらに開示されており、各化学構造およびその使用を特に参照により本明細書に組み込む）が、Pfizer Inc.により近年開発された。PF3600は、抗標的CDK1を上回る有意な効力ウィンドウを維持しつつ、CDK2、4および6複合体の細胞シグナリング活性を捕捉するように設計された。このことから分かるように、特に、がん等の異常細胞増殖性障害の処置において、CDK2、4および6の組み合わせた阻害の潜在的な治療効果をより良く理解することが、長年にわたって切実に必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

- 【特許文献1】米国特許第6,936,612号
- 【特許文献2】RE47,739
- 【特許文献3】米国特許第10,233,188号
- 【特許文献4】米国特許第8,822,683号
- 【特許文献5】米国特許第8,598,197号
- 【特許文献6】米国特許第8,598,186号
- 【特許文献7】米国特許第8,691,830号
- 【特許文献8】米国特許第8,829,102号
- 【特許文献9】米国特許第8,822,683号
- 【特許文献10】米国特許第9,102,682号
- 【特許文献11】米国特許第9,499,564号
- 【特許文献12】米国特許第9,481,591号
- 【特許文献13】米国特許第9,260,442号
- 【特許文献14】米国特許第6,106,864号
- 【特許文献15】WO 00/35298
- 【特許文献16】WO 91/11172
- 【特許文献17】WO 94/02518
- 【特許文献18】WO 98/55148

【非特許文献】

【0009】

- 【非特許文献1】Aktasら、1997
- 【非特許文献2】Sherr、1993、1994
- 【非特許文献3】Chungら、2019
- 【非特許文献4】Narasimharaら、2014
- 【非特許文献5】Sanidasら、2019
- 【非特許文献6】Chellappanら、1991
- 【非特許文献7】Ohtaniら、1995
- 【非特許文献8】Katoら、1993
- 【非特許文献9】MeyersonおよびHarlow、1994
- 【非特許文献10】Huら、2009
- 【非特許文献11】Malumbresら、2004
- 【非特許文献12】Raneら、1999
- 【非特許文献13】Baldinら、1993

10

20

30

40

50

- 【非特許文献14】LundbergおよびWeinberg、1998
- 【非特許文献15】Matsushimeら、1994
- 【非特許文献16】Mittnachtら、1994
- 【非特許文献17】Yangら、2017b
- 【非特許文献18】FiskおよびWiney、2001
- 【非特許文献19】Okudaら、2000
- 【非特許文献20】Petersenら、1999
- 【非特許文献21】Wohlboldら、2012
- 【非特許文献22】Zhaoら、2000
- 【非特許文献23】Katsunoら、2009 10
- 【非特許文献24】Lindqvistら、2009
- 【非特許文献25】Lohkaら、1988
- 【非特許文献26】Deshpandera、2005
- 【非特許文献27】BurkhardtおよびSage、2008
- 【非特許文献28】Keyomarsiら、2002
- 【非特許文献29】Khatibら、1993
- 【非特許文献30】Massague、2004
- 【非特許文献31】Musgroveら、2011
- 【非特許文献32】Parkら、2014
- 【非特許文献33】Malumbresら、2004 20
- 【非特許文献34】Moonsら、2002
- 【非特許文献35】Raneら、1999
- 【非特許文献36】Malumbresら、2004
- 【非特許文献37】TetsuおよびMcCormick、2003
- 【非特許文献38】Berthetら、2003
- 【非特許文献39】Malumbresら、2004
- 【非特許文献40】Santamariaら、2007
- 【非特許文献41】Caldonら、2012
- 【非特許文献42】Francoら、2014
- 【非特許文献43】Herrera-Abreuら、2016 30
- 【非特許文献44】Yangら、2017a
- 【非特許文献45】「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第19版(Mack Publishing Company、1995)
- 【非特許文献46】Expert Opinion in Therapeutic Patents、11(6)、981~986、LiangおよびChen著(2001)
- 【非特許文献47】「Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets、1巻」、H.LiebermanおよびL.Lachman著、Marcel Dekker、N.Y.、N.Y.、1980(ISBN 0-8247-6918-X) 40
- 【非特許文献48】Vermaら、Pharmaceutical Technology On-line、25(2)、1~14(2001)
- 【非特許文献49】J Pharm Sci、88(10)、955~958、FinninおよびMorgan著(1999年10月)
- 【非特許文献50】「Pro-drugs as Novel Delivery Systems」、14巻、ACS Symposium Series(T HiguchiおよびW Stella)
- 【非特許文献51】「Bioreversible Carriers in Drug Design」、Pergamon Press、1987(E B Roche編、American Pharmaceutical Association) 50

- 【非特許文献52】「Design of Prodrugs」H Bundgaard 著 (Elsevier、1985)
- 【非特許文献53】Hataら、2016
- 【非特許文献54】Ramirezら、2016
- 【非特許文献55】Shafferら、2017
- 【非特許文献56】Sharmaら、2010
- 【非特許文献57】Ortegaら、2003
- 【非特許文献58】GrimおよびClurman、2003
- 【非特許文献59】Matsushimeら、1992
- 【非特許文献60】Brookesら、2015 10
- 【非特許文献61】Gabriellira、1999
- 【非特許文献62】Gookinら、2017
- 【非特許文献63】Yangら、2006
- 【非特許文献64】Zerjatkeら、2017
- 【非特許文献65】Schwarzら、2018
- 【非特許文献66】Spencerら、2013
- 【非特許文献67】Barriereら、2007
- 【非特許文献68】SherrおよびRoberts、2004
- 【非特許文献69】Sahaら、1998
- 【非特許文献70】Merrickら、2011 20
- 【非特許文献71】Sarcevicら、1997
- 【非特許文献72】Akiyamaら、1992
- 【非特許文献73】Aleemら、2005
- 【非特許文献74】Vassilevら、2006
- 【非特許文献75】Evronら、2001
- 【非特許文献76】Cappellaら、2016
- 【非特許文献77】Aroraら、2017
- 【非特許文献78】https://github.com/scappell/Cell_tracking
- 【非特許文献79】Lapekら、2017b 30
- 【非特許文献80】EdwardsおよびHaas、2016
- 【非特許文献81】Xuら、2015
- 【非特許文献82】Huttlinら、2010
- 【非特許文献83】Lapekら、2017a
- 【非特許文献84】Guerraら、2003
- 【非特許文献85】Jonkersら、2001
- 【非特許文献86】Leeら、2012
- 【発明の概要】
- 【発明が解決しようとする課題】
- 【0010】 40
- 【課題を解決するための手段】
- 【0011】
- そこで、本発明者らは、単細胞タイムラプスイメージングを他の伝統的技法と共に使用して、基質リン酸化および細胞周期進行におけるCDK2阻害の動的効果の特徴付けた。DNAヘリカーゼB(DHB)のC末端に由来するCDK2活性に関する生細胞センサーを使用して、CDK2阻害後にCDK2基質再リン酸化および細胞周期進行を駆動する急速代償性機構が実証された。CDK2の阻害は、予想される通り、多種多様な異なるCDK2基質にわたるリン酸化の即時損失をもたらす。しかし、細胞適応の顕著な表出において、代償性基質リン酸化が、急速に、1~2時間以内に始まる。驚いたことに、CDK2およびCDK1の同時阻害は、代償性リン酸化を遮断しない一方で、CDK2およびCD

K 4 / 6 の同時阻害は、リバウンドリン酸化を排除し、細胞を C D K ¹ ^o ^w 非増殖性状態にさせる。これらの結果は、細胞が、C D K 4 / 6 の代償性活性化により、C D K 2 活性の損失に急速に適応し得ること、また、C D K 2 阻害剤が、承認された C D K 4 / 6 阻害剤を含む C D K 4 / 6 を標的とする治療薬と組み合わせる相乗的に作用する準備ができていることを指し示す。

【 0 0 1 2 】

本発明は、一部には、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、C D K 2 および C D K 4 および C D K 6 の活性を阻害する、治療有効量の 2 種以上の C D K 阻害剤、またはそれらの組合せを投与するステップを含む方法を提供する。

10

【 0 0 1 3 】

本発明は、一部には、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、C D K 2 の阻害に応答した、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を阻害する、治療有効量の 2 種以上の C D K 阻害剤を投与するステップを含む方法をさらに提供する。

【 0 0 1 4 】

一態様では、本発明は、異常細胞増殖性疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の C D K 2 阻害剤および治療有効量の C D K 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、C D K 4 / 6 阻害剤が、C D K 2 の阻害に応答した、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を阻害する、方法を提供する。

20

【 0 0 1 5 】

別の態様では、本発明は、細胞における C D K 2 の阻害に応答した、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を阻害するための方法であって、細胞に、ある量の C D K 2 阻害剤およびある量の C D K 4 / 6 阻害剤を導入するステップを含み、C D K 4 / 6 阻害剤の量が、C D K 2 の阻害に応答した、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化の阻害において有効である、方法を提供する。一部の実施形態では、C D K 2 阻害剤が導入され、続いて C D K 4 / 6 阻害剤が導入される。

【 0 0 1 6 】

別の態様では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量の C D K 2 阻害剤および治療有効量の C D K 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、治療有効量が、一緒になって、疾患または障害の処置において有効である、方法を提供する。

30

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、C D K 2 の阻害に応答した、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化が、対象において観察される場合、それを必要とする対象に、治療有効量の C D K 2 阻害剤および治療有効量の C D K 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

40

【 0 0 1 8 】

本発明は、また、疾患または障害、好ましくは、がんを処置する治療上の方法および使用であって、それを必要とする対象に、治療有効量の C D K 2 阻害剤および治療有効量の C D K 4 / 6 阻害剤を、治療有効量の 1 種または複数の追加的な抗がん剤または緩和剤とさらに組み合わせるステップを含み、治療有効量が、一緒になって、疾患または障害、例えば、がんの処置において有効である、方法および使用を提供する。

【 0 0 1 9 】

別の態様では、本発明は、対象における C D K 2、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介される疾患または障害、好ましくは、対象における C D K 2 の阻害に応答した、C D K 4 および / または C D K 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化によって特徴

50

付けられる疾患または障害の処置のための方法を提供する。

【0020】

本明細書に提供される方法の一部の実施形態では、疾患または障害は、サイクリンE1 (CCNE1) および/またはサイクリンE2 (CCNE2) の増幅または過剰発現によって特徴付けられるがんである。本明細書に提供される方法の一部の実施形態では、がんは、例えば、増加したサイクリンE発現が原因の、1種または複数のCDK4/6阻害剤に対する抵抗性によって特徴付けられる。本明細書に提供される方法の他の頻出する実施形態では、がんは、腫瘍細胞増殖に対するCDK2依存によって特徴付けられる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1A~図1G: CDK2活性は、PF3600によって急性的に阻害されるが、リン酸化は急速にリバウンドする。(A) CDK2活性センサーの模式図。DHB(DNAヘリカーゼB断片)は、非リン酸化の場合は核に局在化する; 漸進的リン酸化は、細胞質へのセンサーの移行をもたらす。NLS、核局在化シグナル; NES、核外輸送シグナル; S、セリンにおけるCDKコンセンサスリン酸化部位。(B) MCF10AにおけるDHBセンサーリン酸化。活発に増殖中の細胞(CDK2^{in c}、方法を参照)は、ハッシュ化(hashed)陰影でマークされた時間ウィンドウにおいて薬物を受けた場合、プロットに選択される。細胞は、薬物添加のt時間前に分裂後期を完了した場合、プロットに選択され、この場合、tは、有糸分裂間時間の25%~75%の間の細胞周期の試料採取に選択された。単細胞トレースの数: DMSO(121、92、99、71)、25nM PF3600(133、92、104、76)、100nM PF3600(80、95、107、80)、500nM(19、51、159、119)。(C) CDC6-YFP C/N比による読み取り値としてのMCF10A細胞におけるCDC6リン酸化。細胞は、図1Bと同様にイメージング、処置およびプロットした。単細胞トレースの数: DMSO(83)、100nM PF3600(86)、500nM PF3600(95)。(D)、(F)および(G)図1Bと同様のDHBセンサーリン酸化。次の細胞についての単細胞トレースの数: (D) RPE-hTERT: DMSO(69、74、100、97)、25nM PF3600(66、97、92、106)、100nM PF3600(43、111、121、87)、500nM PF3600(25、151、231、182); (F) MCF7: DMSO(148、126、124、107)、25nM PF3600(196、179、167、145)、100nM PF3600(172、198、188、161)、500nM PF3600(246、230、191、190); (G) OVCAR3: DMSO(100、100、100、86)、25nM PF3600(100、100、100、95)、100nM PF3600(62、100、100、100)、500nM PF3600(22、100、88、94)。(E) 指し示されている時間におけるDMSOまたは10μM 3MB-PP1で処置されたCDK2アナログ感受性RPE-hTERTにおけるDHBセンサーリン酸化。単細胞トレースの数: DMSO(133)、10μM 3MB-PP1(104)。

【図2】図2A~図2C: CDK4/6およびCDK2の同時阻害は、増殖およびCDK2基質の代償性リン酸化を遮断する。(A) 図1Bと同様に、指し示されている時間におけるDMSO、10μM 3MB-PP1、1μMパルボシクリブまたは10μM 3MB-PP1+1μMパルボシクリブで処置したCDK2アナログ感受性RPE-hTERT細胞におけるDHBセンサーリン酸化。3MB-PP1は、CDK2アナログ感受性細胞におけるCDK2活性の阻害に使用される。単細胞トレースの数: DMSO(133)、10μM 3MB-PP1(104)、1μMパルボシクリブ(146)、10μM 3MB-PP1+1μMパルボシクリブ(160)。図1Eから再現されたDMSOおよび10μM 3MB-PP1メジアントレース。(B) 図1Bと同様にDMSO、100nM PF3600、5μMリボシクリブ、100nM PF3600+5μMリボシクリブで処置したMCF10A細胞におけるDHBセンサーリン酸化; (C) 図1Bと同様にDMSO、100nM PF3600、1μMアベマシクリブまたは100nM PF

10

20

30

40

50

3600 + 1 μ M アベマシクリブで処置した MCF10A 細胞における DHB センサーリン酸化。(B) 単細胞トレースの数、左: DMSO (55)、100 nM PF3600 (53)、5 μ M リボシクリブ (23)、100 nM PF3600 + 5 μ M リボシクリブ (26)。(C) 単細胞トレースの数、右: DMSO (197)、100 nM PF3600 (242)、1 μ M アベマシクリブ (390)、100 nM PF3600 + 1 μ M アベマシクリブ (270)。

【図3】図3。指し示されている濃度において1 μ M パルボシクリブまたは9 μ M RO3306で処置したMCF10A細胞におけるDHBセンサーリン酸化。単細胞トレースの数: DMSO (39)、パルボシクリブ (72) およびRO3306 (43)。細胞は、分裂後期の5~6時間後に薬物を受けた。

【図4】図4A~図4D: CDK2阻害後のCDK2基質リン酸化における一過性損失およびリバウンド。(A)および(B)MCF10A細胞は、指し示されている時間にわたり100 nM PF3600で処置し、固定し、(A)ホスホ-Rbまたは(B)ホスホ-ヌクレオリンに関して染色した。ヘキストを使用して、個々の細胞におけるDNA含量を定量化した。平均核シグナルを、3~4N DNA含量を有する細胞に関して定量化し、右に確率密度ヒストグラムとしてプロットした。(C)指し示されている時間にわたるPF3600による処置後のMCF10A細胞における選択CDK2基質のリン酸化レベルを示すウエスタンプロット。-チューブリンおよびGAPDHをローディング対照とした。バンド強度を定量化し、棒グラフとしてプロットした。データは、2回の生物学的反復の代表である。(D)PF3600による処置後のリン酸化ペプチドの不偏網羅的解析。MCF7細胞を25 nM PF3600で処置し、その結果生じるリン酸化ペプチドモジュレーションをプロテオミクスにより評価した。1時間処置後の最小CDKコンセンサスモチーフ(SPまたはTP)を含有する有意にモジュレートされたリン酸化ペプチド($p < 0.05$)、および24時間目の同じペプチドの運命が示されている。データは、DMSO対照と比べてプロットされている。

【図5】図5A~図5D: パルボシクリブは、CDK2基質の代償性リン酸化を消失させる。(A)および(B)DMSO、PF3600、PF3600 + 9 μ M RO3306またはPF3600 + 1 μ M パルボシクリブで処置したMCF10A、RPE-hTERTおよびMCF7細胞におけるDHBセンサーリン酸化。MCF10AおよびRPE-hTERTについて、100 nM PF3600を使用した; MCF7について、25 nM PF3600を使用した。図1Bと同様に細胞をイメージングし、プロットした。垂直ハッシュ化バーは、薬物添加時点を表す。(C)指し示されている時間にわたる100 nM PF3600および1 μ M パルボシクリブによる同時処置後のMCF10A細胞における選択CDK2基質のリン酸化レベルを示すウエスタンプロット。-チューブリンおよびGAPDHをローディング対照とした。白色のバーは、図4Cから再現されている。データは、2回の生物学的反復の代表である。(D)MCF10A細胞は、指し示されている時間にわたり100 nM PF3600 + 1 μ M パルボシクリブで処置し、固定し、ホスホ-Rbまたはホスホ-ヌクレオリンに関して染色した。平均核シグナルを、3~4N DNA含量を有する細胞に関して定量化し、確率密度ヒストグラムとしてプロットした。陰影付きのヒストグラムは、図4Aおよび図4Bから再現された、対応する時点におけるPF3600単独処置後のホスホ-Rbまたはホスホ-NCL分布を表す。

【図6】図6A~図6F: CDK4/6/サイクリンDのノックダウンは、CDK2基質の代償性リン酸化を低下させる。(A)次のsiRNAによるトランスフェクションの20時間後にDMSOまたはPF3600で処置したMCF10AおよびMCF7におけるDHBセンサーリン酸化: 非標的化、CDK4、CDK6、またはCDK4およびCDK6。垂直の黒い線は、PF3600添加の時間をマークする(MCF10Aは100 nM PF3600; MCF7は25 nM PF3600)。(B)(A)においてプロットされた個々のMCF10A(上)およびMCF7(下)細胞に関するDHB C/N単細胞トレース。薬物処置後の任意のさらなる有糸分裂は、C/N比の急激な下落によって認められる。DHB C/N比の漸進的な下落は、有糸分裂によらないDHBの脱リン酸化

10

20

30

40

50

を表示する。(C) 次の siRNA によるトランスフェクションの6時間後に DMSO または PF3600 で処置した MCF10A および MCF7 における DHB センサーリン酸化：非標的化、CCND1、CCND2、CCND3、または CCND1、CCND2 および CCND3 (MCF10A) もしくは CCND1 および CCND3 (MCF7) の組み合わせたノックダウン。MCF7 細胞は、サイクリン D2 を発現しないため、MCF7 実験から CCND2 ノックダウンを省略した。(D) 指し示されている時間における、PF3600 処置 (MCF10A は 100 nM、MCF7 は 25 nM) に応答した指し示されている CDK および D 型サイクリンのウエスタンブロット解析。ホールセル抽出物を SDS-PAGE により解析した。対照試料は、0 時間と標識されている。ローディング対照としてヒストン H3 が使用されている。(E) 指し示されている時間における、PF3600 処置に応答した MCF10A または MCF7 細胞における CCND1、CCND2、CCND3、CDK4 および CDK6 mRNA の発現を示す代表的 mRNA FISH 画像。核は、ヘキスト色素で染色されており、シアンで示されている；mRNA はマゼンタで示されている。(F) (E) における mRNA FISH データの定量化。エラーバーは、複数の画像の標準偏差を指し示す。

【図7】図7A~図7C：Cdk2 アブレーションは、Kras^{G12V}/Trp53^{-/-} 駆動肺腫瘍においてパルボシクリブに対する感受性を増加させる。(A) Kras^{+/+}/LSLG12V；Trp53^{L/L} マウス由来の平均腫瘍体積倍率変化 (CT スキャンにより測定) の定量化。測定は、パルボシクリブ (70 mg/kg) による処置後 28 日目に実行した。各コホートにおいて解析した腫瘍の数は、「n」として指定されている。平均腫瘍体積倍率変化は、初期腫瘍体積で割った最終腫瘍体積として計算した。エラーバーは、SEM を指し示す。(B) 図7A に描写されているパルボシクリブで処置した Kras^{+/+}/LSLG12V；Trp53^{L/L} マウス由来の腫瘍のウエスタンブロットは、指し示されているバイオマーカーに関して調べ、定量化した。p 値は、2 標本 t 検定から得た。(C) Kras^{+/+}/LSLG12V；Trp53^{L/L} マウスの各コホート由来の指し示されている数の腫瘍 (n) 由来の平均腫瘍体積倍率変化の定量化。Cdk2 状態は、野生型 (Cdk2^{+/+}) またはヌル (Cdk2^{-/-}) として指し示されている。腫瘍体積は、CT スキャンにより測定される。平均腫瘍体積倍率変化は、A と同様に計算された。エラーバーは、SEM を指し示す。

【図8】図8A~図8C：(A) MCF10A および MCF7 細胞を、増加する用量の PF3600 で1時間処置し、ELISA によってホスホ-Rb (S807/811) を測定した。データは、薬物濃度当たり重複した測定から得られる平均および標準偏差を表す。(B) DMSO または 1 μM パルボシクリブで1時間処置した個々の MCF10A または MCF7 細胞における、総 Rb に対して正規化された平均核ホスホ-Rb S807/S811 シグナル強度の密度散布図。DNA 含量は、ヘキスト色素の総核強度を使用して定量化した。(C) 個々の MCF10A、RPE-hTERT、MCF7 および OVCAR3 細胞に関する DHBC/N 単細胞トレース。細胞は、薬物添加の t 時間前に分裂後期を完了した場合、プロットに選択され、この場合、t は、薬物添加時点における細胞周期中途 (有糸分裂間時間に基づく) の細胞の捕捉に選択された。単細胞トレースの数：MCF10A：DMSO (53)、25 nM PF3600 (72)、100 nM PF3600 (66)。MCF7：DMSO (100)、25 nM PF3600 (100)、100 nM PF3600 (100)。RPE-hTERT：DMSO (71)、25 nM PF3600 (68)、100 nM PF3600 (62)。OVCAR3：DMSO (19)、25 nM PF3600 (29)、100 nM PF3600 (23)。薬物処置後の任意の追加的な有糸分裂が標識されている。

【図9】図9A~図9F：(A) および (B) 野生型 RPE-hTERT (B) または両方の Cdk2 アレルにおいて CDK2 のゲートキーパー残基 (RPE-hTERT CDK2^{F80G/F80G}) にゲノム突然変異を有する RPE-hTERT 細胞 (A) における DHB センサーリン酸化。細胞は、分裂後期の後の指し示されている時間ウィンドウにおいて DMSO または 10 μM の ATP アナログ 3MB-PP1 で処置し、図1B と同

10

20

30

40

50

様にイメージングおよびプロットした。(C) RPE-hTERT CDK2^{F80G}/^{F80G}は、10 μM 3MB-PP1で1時間処置し、固定し、ホスホ-NBS1抗体で染色した。核ホスホ-NBS1シグナルのヒストグラムを示す。2回の技術的複製からデータをプールする。(D)野生型RPE-hTERT細胞におけるDHBセンサーリン酸化。細胞は、分裂後期の後の指し示されている時間ウィンドウにおいて100 nM PF3600で処置し、図1Bと同様にイメージングおよびプロットした。(E)野生型RPE-hTERT vs. RPE-hTERT CDK2^{F80G}/^{F80G}細胞におけるDHBセンサーリン酸化。細胞は、分裂後期の後の指し示されている時間ウィンドウにおいて9 μM RO3306で処置し、図1Bと同様にイメージングおよびプロットした。(F)DMSO対照と比べた、25 nM PF3600で1時間または24時間処置したMCF7細胞におけるタンパク質で正規化されたホスホ-プロテオミクス変化。各ホスホペプチドは、同様の条件下で決定されたその総細胞レベルに対して正規化された。黒色の球は、1時間時点で有意に減少したホスホペプチドを強調し、これは一般に、24時間時点でベースラインレベルに戻る。

【図10】図10A~図10C:(A)MCF10A細胞は、100 nM PF3600 + 9 μM RO3306で指し示されている時間処置し、固定し、ホスホ-Rbまたはホスホ-ヌクレオリンに関して染色した。平均核シグナルは、3~4N DNA含量を有する細胞に関して定量化し、確率密度ヒストグラムとしてプロットした。陰影付きのヒストグラムは、図4Aおよび図4Bから再現された、対応する時点におけるPF3600単独処置後のホスホ-Rbまたはホスホ-NCL分布を表す。(B)PF3600、プラス、パルボシクリブで処置した個々のMCF10A、RPE-hTERTおよびMCF7細胞に関する図5Bから得たDHB C/N単細胞トレース。(C)指し示される通りに処置したMCF10A、RPE-hTERTおよびMCF7に関する図5Bに対応する増殖データ。細胞計数は、イメージングの最初のフレームにおける細胞の数に対して正規化した。3回の技術的複製からデータをプールした。垂直な黒い線は、薬物添加時点をマークする。細胞計数における湾曲(jog)は、培地交換による有糸分裂細胞の損失が原因で、媒体または薬物添加により起こり得ることに留意されたい。

【図11】図11A~図11F:(A)指し示されているsiRNA処置後のMCF10AおよびMCF7におけるCDK4およびCDK6の損失を検証するウエスタンプロット。ライセートは、siRNAのトランスフェクションの24時間後に収集した。ローディング対照として-チューブリンまたはヒストンH3を使用する。(B)次のsiRNAによる処置後のMCF10AまたはMCF7細胞におけるDHBセンサーリン酸化:非標的化、CDK4、CDK6、またはCDK4およびCDK6。細胞を、siRNAトランスフェクションの直後に開始して50時間連続的にイメージングした。(C)指し示されているsiRNA処置後のMCF10AおよびMCF7におけるサイクリンD1、D2、D3の損失を検証するウエスタンプロット。ライセートは、トランスフェクションの24時間後に収集した。ローディング対照として-チューブリン、GAPDHまたはヒストンH3を使用する。(D)次のsiRNAによる処置後のMCF10AまたはMCF7細胞におけるDHBセンサーリン酸化:非標的化、CCND1、CCND2、CCND3、同時CCND1、D2およびD3(MCF10A)、または同時CCND1およびD3(MCF7)ノックダウン。(E)図6Cにおいてプロットされた個々のMCF10A(上)およびMCF7(下)細胞に関するDHB C/Nトレース。薬物処置後の任意のさらなる有糸分裂は、C/N比の急激な下落によって認められる。DHB C/N比の漸進的な下落は、有糸分裂によらないDHBの脱リン酸化を表示する。(F)100 nM PF3600による24時間処置後のMCF10A細胞における増加したサイクリンD3-CDK4およびサイクリンD3-CDK6タンパク質相互作用。CDK-サイクリン複合体は、CDK4またはCDK6のいずれかに対する抗体を使用して免疫沈降した。偽免疫沈降のためにウサギIgGを使用した(IgG)。免疫沈降物およびインプット(Inp)におけるサイクリンD3およびCDKレベルは、ウエスタンプロットによって決定した。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【0022】

本発明は、本発明の好まれる実施形態の次の詳細な説明および本明細書に含まれる実施例を参照することにより、より容易に理解することができる。本明細書で使用されている用語法は、単に特異的な実施形態の記載を目的としており、限定を意図しないことを理解されたい。本明細書に特に定義されていない限り、本明細書で使用されている用語法が、関連する技術分野で知られたその伝統的な意義を与えられるべきであることをさらに理解されたい。

【0023】

本明細書において、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、文脈がそれ以外を明らかに指示しない限り、複数形指示対象を含む。よって、例えば、「1つの細胞(a cell)」の参照は、1つまたは複数の細胞および当業者に知られたその均等物、等々を含む。同様に、単語「または(or)」は、文脈がそれ以外を明らかに指し示さない限り、「および(and)」を含むことを意図する。したがって、「AまたはBを含む」は、A、またはB、またはAおよびBを含むことを意味する。さらに、用語「含んでいる(including)」、ならびに「含む(includes)」および「含まれる(included)」等の他の関連形態の使用は、限定的ではない。

10

【0024】

用語「約」は、本明細書において、「およそ」または「ほぼ」と同様の意義を有する柔軟な単語である。用語「約」は、厳密さが要求されないが、むしろ企図された変動があることを指し示す。よって、本明細書において、用語「約」は、特に列挙されている値から1もしくは2標準偏差以内、または特に列挙されている値と比較して±で最大20%、最大15%、最大10%、最大5%または最大4%、3%、2%もしくは1%の範囲を意味する。

20

【0025】

本明細書に記載されている本発明は、適宜、本明細書で特に開示されていないいずれかの要素(複数可)の非存在下で実施することができる。よって、例えば、本明細書における各例において、用語「を含む(comprising)」、「から本質的になる(consisting essentially of)」および「からなる(consisting of)」のいずれかは、残る2つの用語のどちらかに置き換えることができる。

30

【0026】

本明細書において、「阻害する」、「阻害」は、正常野生型レベルと比べた、標的タンパク質産物の活性の減少を指す。阻害は、標的酵素、好ましくは、CDKの活性の減少、より好ましくは、CDK2の阻害に応答した、CDK4および/またはCDK6によって媒介されるリバウンドリン酸化の減少をもたらすことができる。一部の実施形態では、CDK4および/またはCDK6によって媒介されるリバウンドリン酸化は、10%未満、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%または100%減少する。

【0027】

CDKおよび関連セリン/スレオニンキナーゼは、細胞分裂および増殖の調節における必須機能を果たす重要な細胞酵素である。「CDK阻害剤」は、1種または複数のCDKタンパク質またはCDK/サイクリンキナーゼ複合体の活性を阻害するいずれかの化合物または薬剤を意味する。化合物または薬剤は、CDKタンパク質との直接的もしくは間接的相互作用により、リン酸化等のCDK活性を阻害することができる、または1種もしくは複数のCDK遺伝子の発現を防止するように作用することができる。好まれる実施形態では、CDK阻害剤は、低分子CDK阻害剤またはその薬学的に許容できる塩である。

40

【0028】

CDK阻害剤は、幅広いCDKを標的とする汎CDK阻害剤、または特異的なCDK(複数可)を標的とする選択的CDK阻害剤を含む。CDK阻害剤は、オーロラA、オーロラB、Chk1、Chk2、ERK1、ERK2、GST-ERK1、GSK-3、G

50

S K - 3、PDGFR、TrkAおよびVEGFR等、CDKに加えた標的に対する活性を有することができる。

【0029】

CDK阻害剤は、アベマシクリブ(CAS番号1231929-97-7)、アルボシジブ(alvocidib)(すなわち、フラボピリドール;CAS番号146426-40-6)、ディナシクリブ(CAS番号779353-01-4)、インジチニブ(inditinib)(AGM-130;CAS番号1459216-10-4)、ミルシクリブ(milciclib)(PHA-848125;CAS番号802539-81-7)、バルボシクリブ(CAS番号571190-30-2)、リボシクリブ(CAS番号1211441-98-3)、ロスコピチン(セリシクリブ(seliciclib);CAS番号186692-46-6)、AT7519(CAS番号844442-38-2)、AZD5438(CAS番号602306-29-6)、BMS-265246(CAS番号582315-72-8)、BMS-387032(SNS-032;CAS番号345627-80-7)、BS-181(CAS番号1397219-81-6)、FN-1501(CAS番号1429515-59-2)、JNJ-7706621(CAS番号443797-96-4)、K03861(CAS番号853299-07-7)、MK-8776(CAS番号891494-63-6)、P276-00(CAS番号920113-03-7)、PF-06873600(CAS番号2185857-97-8)、PHA-793887(CAS番号718630-59-2)、R547(CAS番号741713-40-6)、RO3306(CAS番号872573-93-8)およびSU 9516(CAS番号377090-84-1)を含むがこれらに限定されない。

10

20

【0030】

汎CDK阻害剤の例は、アルボシジブ、ディナシクリブ、ロスコピチン、AT7519、AZD5438、BMS-387032、P276-00、PHA-793887、R547およびSU 9516を含むがこれらに限定されない。選択的CDK1阻害剤の非限定的な例は、RO3306である。CDK1/2阻害剤の例は、BMS-265246およびJNJ-7706621を含むがこれらに限定されない。

【0031】

CDK2阻害剤は、CDK2の選択的または非選択的阻害剤であり得る。CDK2阻害剤の例は、K03861、PF-06873600、インジチニブ、ミルシクリブおよびFN-1501を含むがこれらに限定されない。PF-06873600等の一部の化合物が、CDK2阻害剤として同定され得るが、この命名は、他のCDKに対する化合物の活性を限定するものではない。したがって、PF-06873600は、CDK2を、例えば用量依存性様式で、有効に阻害することができ、CDK4およびCDK6を、一部の例ではこの場合も同様に用量依存性様式で、阻害することもできる(すなわち、CDK2/4/6阻害剤として作用することができる)。本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、CDK2阻害剤は、6-(ジフルオロメチル)-8-[(1R, 2R)-2-ヒドロキシ-2-メチルシクロペンチル]-2-{ [1-(メチルスルホニル)ピペリジン-4-イル]アミノ}ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF-06873600)、ミルシクリブ、インジチニブおよびFN-1501、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される。本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、CDK2阻害剤は、6-(ジフルオロメチル)-8-[(1R, 2R)-2-ヒドロキシ-2-メチルシクロペンチル]-2-{ [1-(メチルスルホニル)ピペリジン-4-イル]アミノ}ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オン(PF-06873600)、インジチニブおよびFN-1501、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される。本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、CDK2阻害剤は、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩である。

30

40

【0032】

選択的CDK4/6阻害剤の例は、アベマシクリブ、リボシクリブ、バルボシクリブ、

50

レロシクリブ (lerociclib) (CAS 番号 1628256-23-4)、トリラシクリブ (trilaciclib) (CAS 番号 1374743-00-6)、SHR-6390 (CAS 番号 2278692-39-8) および BPI-16350 (CAS 番号 2412559-19-2)、またはそれらの薬学的に許容できる塩を含むがこれらに限定されない。本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、CDK4/6 阻害剤は、アベマシクリブ、リボシクリブ、パルボシクリブ、レロシクリブ、トリラシクリブ、SHR-6390 および BPI-16350、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される。本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、CDK4/6 阻害剤は、アベマシクリブ、リボシクリブおよびパルボシクリブ、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される。

10

【0033】

本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、CDK4/6 阻害剤は、パルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩である。

【0034】

CDK4/6 阻害剤の好まれる例およびそれらの構造を下に提示する：

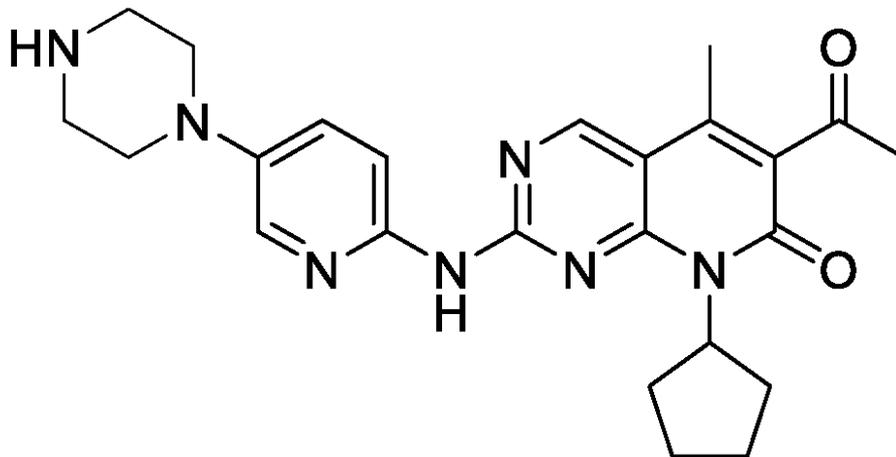
【0035】

パルボシクリブ (PD-0332991; IBRANCE (登録商標)) は、内分泌療法と組み合わせたホルモン受容体陽性、HER2 陰性転移性乳がんの処置のための、Pfizer によって販売される選択的 CDK4/6 阻害剤である。パルボシクリブの構造を次に示す：

20

【0036】

【化1】



30

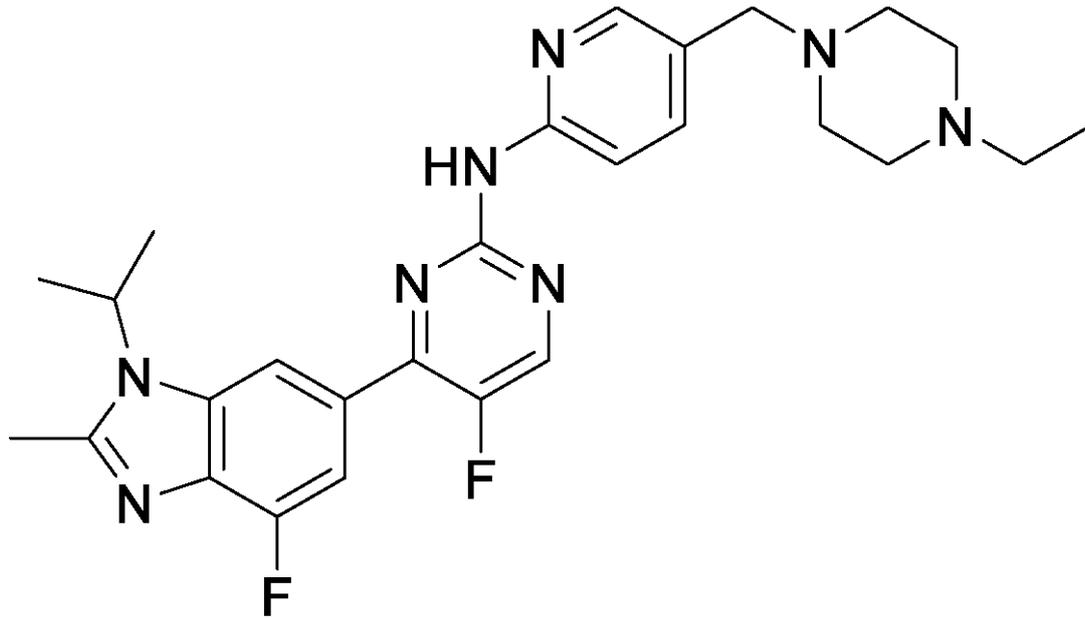
【0037】

アベマシクリブ (LY2835219; VERZENIO (登録商標)) は、内分泌療法と組み合わせたホルモン受容体陽性、HER2 陰性転移性乳がんの処置のための、Eli Lilly によって販売される選択的 CDK4/6 阻害剤である。アベマシクリブの構造を次に示す：

40

【0038】

【化2】



10

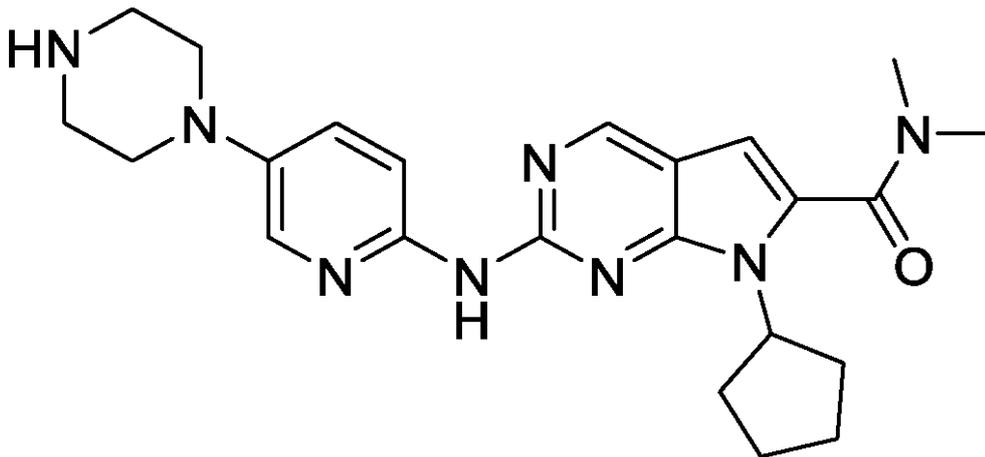
【0039】

リボシクリブ (Lee011; KISQALI (登録商標)) は、内分泌療法と組み合わせたホルモン受容体陽性、HER2陰性転移性乳がんの処置のための、Novartisによって販売される選択的CDK4/6阻害剤である。リボシクリブの構造を次に示す：

20

【0040】

【化3】



30

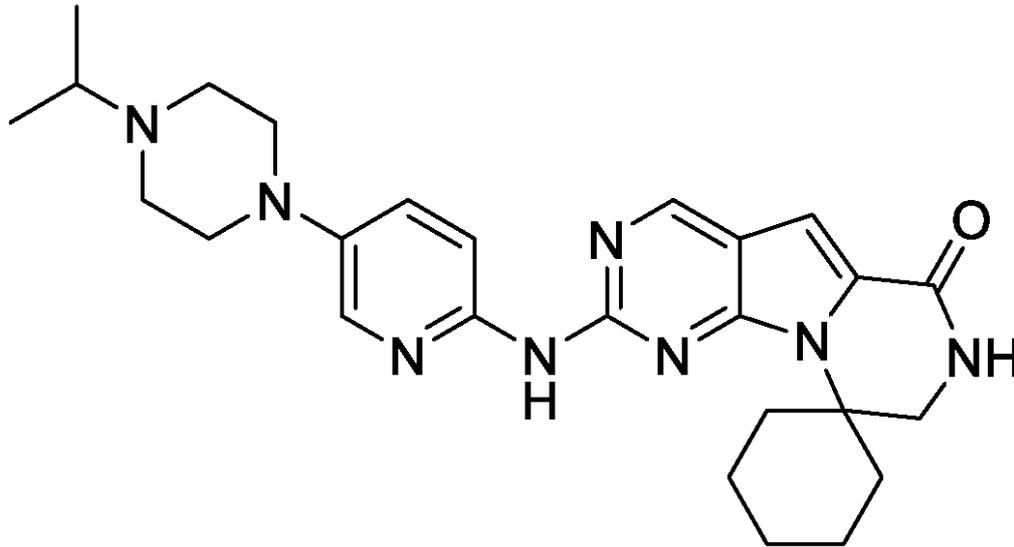
【0041】

レロシクリブは、複数の腫瘍学徴候における他の標的化療法と組み合わせた使用のための、G1 Therapeuticsによって臨床開発中の経口の選択的CDK4/6阻害剤である。レロシクリブは、次の構造を有する：

40

【0042】

【化4】



10

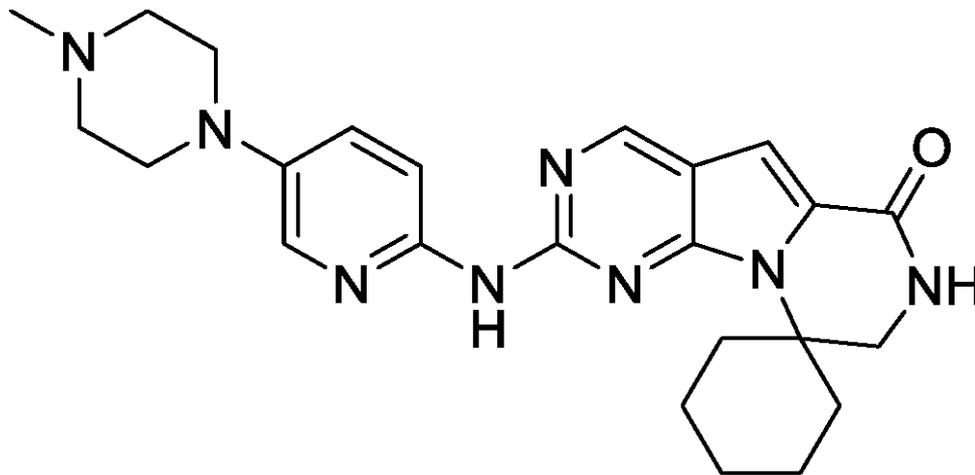
【0043】

トリラシクリブは、化学療法を受ける患者のための骨髄保存 (myelopreservation) 療法における使用のための、G1 Therapeutics によって臨床開発中の選択的 CDK4/6 阻害剤である。トリラシクリブは、化学療法に先立ち投与される短時間作用型静脈内 CDK4/6 阻害剤であり、現在、臨床的に評価されている。トリラシクリブは、次の構造を有する：

20

【0044】

【化5】



30

【0045】

SHR-6390は、Jiangsu HengRui Medicine Co., Ltd. によって開発されている選択的 CDK4/6 阻害剤である。SHR-6390は現在、HR陽性およびHER2陰性進行型乳がんを有する患者において、レトロゾールまたはアナストロゾールまたはフルベストラントと組み合わせて調査されている。様々な他のピリミジンに基づく薬剤が、過剰増殖性疾患の処置のために開発された。Tavares および Strum によって出願され、G1 Therapeutics に譲渡された、米国特許第 8,822,683 号；同第 8,598,197 号；同第 8,598,186 号；同第 8,691,830 号；同第 8,829,102 号；同第 8,822,683 号；同第 9,102,682 号；同第 9,499,564 号；同第 9,481,591 号；および同第 9,260,442 号は、次式 (文献中で定義された変数による) のものを含

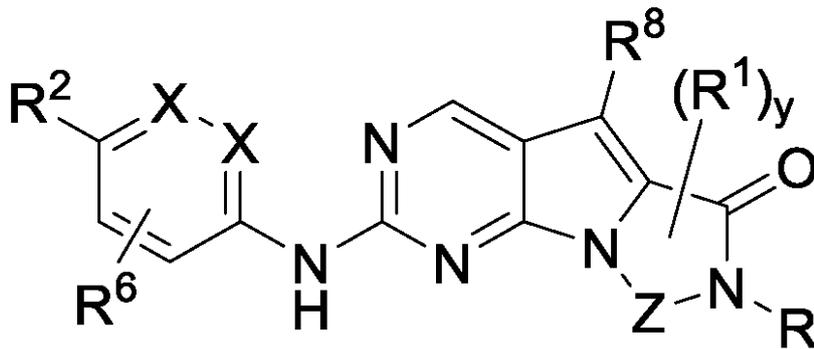
40

50

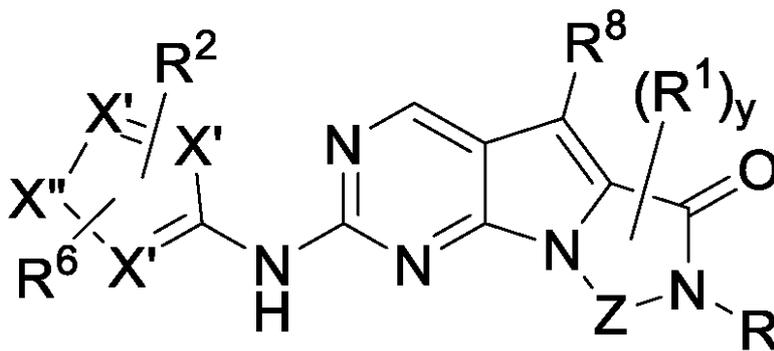
む N - (ヘテロアリール) - ピロロ[3, 2-d]ピリミジン - 2 - アミンサイクリン依存性キナーゼ阻害剤のクラスについて記載する：

【0046】

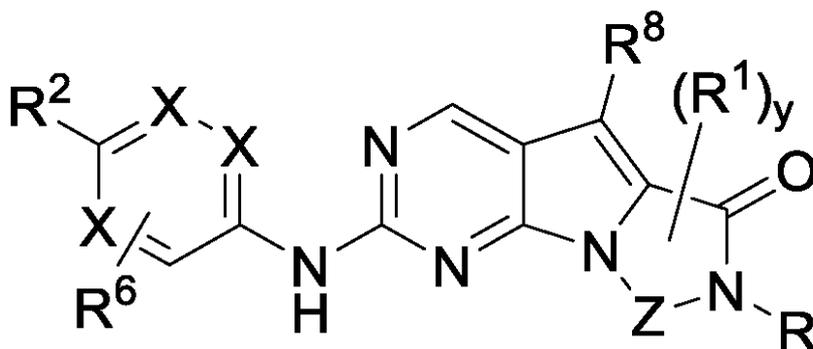
【化6】



10



20



30

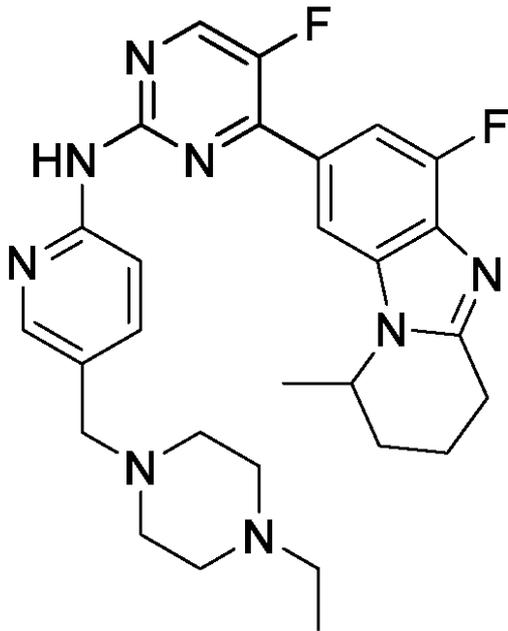
40

【0047】

BPI-16350は、Betta Pharmaceuticalsによって開発されている選択的CDK4/6阻害剤である。BPI-16350は現在、局所的進行型または転移性固形腫瘍のための第I相用量漸増研究において調査されている。BPI-16350は、次の構造を有する：

【0048】

【化7】



10

【0049】

20

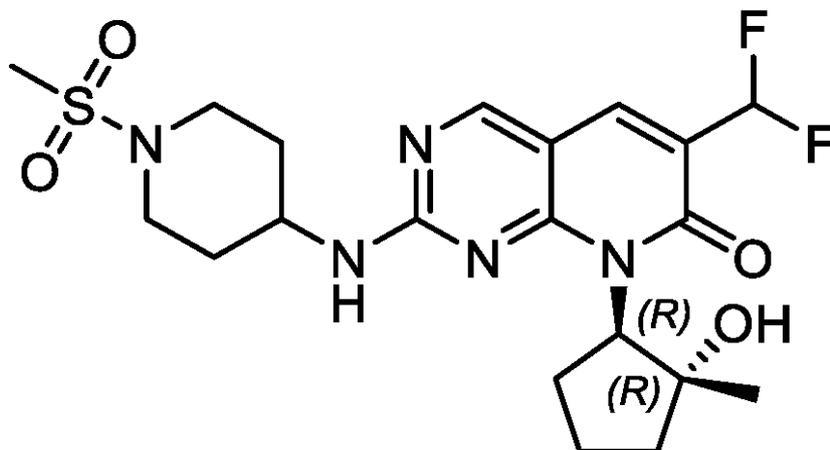
CDK2阻害剤の好まれる例およびそれらの構造を下に提示する：

本明細書においてPF-06873600またはPF3600とも称される、化合物6-(ジフルオロメチル)-8-[(1R,2R)-2-ヒドロキシ-2-メチルシクロペンチル]-2-{[1-(メチルスルホニル)-ピペリジン-4-イル]アミノ}ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オンは、Pfizerによって開発中のCDK2阻害剤であり、これは、CDK4およびCDK6も阻害する。PF3600の化学構造は、下に同定されており、参照により本明細書に組み込む米国特許第10,233,188号においてより十分に記載されている：

【0050】

【化8】

30



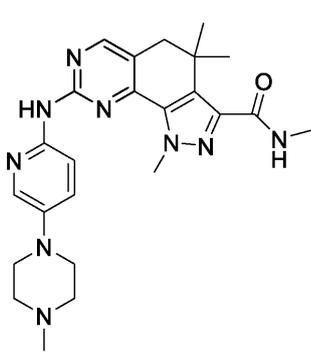
40

【0051】

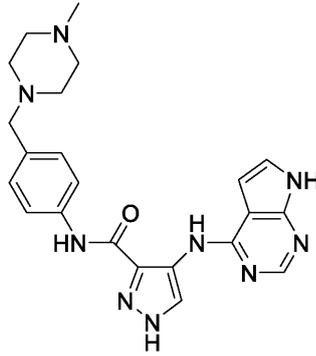
他のCDK、例えば、CDK4およびCDK6をさらに阻害することができる追加的なCDK2阻害剤は、ミルシクリブ、FN-1501およびインジチニブ(AGM-130)を含むがこれらに限定されない。化学構造を下に提示する：

【0052】

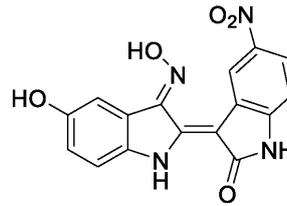
【化 9】



PHA-848125
(ミルシクリブ)
CDK2
第2相



FN-1501
CDK2/4/6
第1相



AGM-130
(インジチニブ)
CDK1/2/4/5/6
第1相

10

【0053】

他に指示がなければ、低分子CDK阻害剤、特に、低分子CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤についての本明細書におけるあらゆる参照は、その薬学的に許容できる塩、溶媒和化合物、水和物および複合体、ならびにその薬学的に許容できる塩の溶媒和化合物、水和物および複合体の参照を含み、そのアモルファスおよび多形性形態、立体異性体ならびに同位体標識バージョンを含む。

20

【0054】

本明細書に記載されている方法は、それを必要とする対象に、選択的または非選択的CDK2阻害剤であり得るCDK2阻害剤と、典型的に選択的CDK4/6阻害剤であるCDK4/6阻害剤とを投与するステップを含む併用療法に関する。明確にするために、本明細書に記載されている方法および組合せにおいて、CDK2阻害剤（すなわち、第1のCDK阻害剤）およびCDK4/6阻害剤（すなわち、第2のCDK阻害剤）が、CDK2、CDK4およびCDK6を阻害する、2個の別々のおよび別個の化合物であって、単一の化合物ではないことが理解されるであろう。

【0055】

一実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK2阻害剤および治療有効量のCDK4/6阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。

30

【0056】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK2阻害剤および治療有効量のCDK4/6阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、CDK2阻害剤が投与され、続いて、CDK4/6阻害剤が投与される。

【0057】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK2/4/6阻害剤および治療有効量のCDK4/6阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、CDK2/4/6阻害剤が投与され、続いて、CDK4/6阻害剤が投与される。

40

【0058】

本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、治療有効量のCDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、一緒になって、がん等の疾患または障害の処置において有効である。

【0059】

本明細書における方法および組合せのそれぞれの一部の実施形態では、他に指示がなければ、CDK2阻害剤は、CDK4/6をさらに阻害することができる（すなわち、CD

50

K 2 / 4 / 6 阻害剤)。

【0060】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 阻害剤および治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / またはCDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を防止する、方法を提供する。

【0061】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 阻害剤および治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤の量が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / またはCDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化の防止、改善または低下に有効である、方法を提供する。

10

【0062】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 阻害剤および治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / またはCDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を防止する、方法を提供する。一部の実施形態では、CDK 2 阻害剤が投与され、続いて、CDK 4 / 6 阻害剤が投与される。

20

【0063】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 阻害剤および治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤の量が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / またはCDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化の改善または低下に有効である、方法を提供する。一部の実施形態では、CDK 2 阻害剤が投与され、続いて、CDK 4 / 6 阻害剤が投与される。

【0064】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 / 4 / 6 阻害剤および治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤が、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / またはCDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化を防止する、方法を提供する。一部の実施形態では、CDK 2 / 4 / 6 阻害剤が投与され、続いて、CDK 4 / 6 阻害剤が投与される。

30

【0065】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 / 4 / 6 阻害剤および治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含み、CDK 4 / 6 阻害剤の量が、CDK 2 / 4 / 6 阻害剤による、CDK 2 の阻害に応答した、CDK 4 および / またはCDK 6 によって媒介されるリバウンドリン酸化の改善または低下に有効である、方法を提供する。一部の実施形態では、CDK 2 / 4 / 6 阻害剤が投与され、続いて、CDK 4 / 6 阻害剤が投与される。

40

【0066】

一実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK 2 阻害剤、ならびにバルボシクリブ、リボシクリブおよびアベマシクリブ、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される治療有効量のCDK 4 / 6 阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。好まれる実施形態では、CDK 4 / 6 阻害剤は、バルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩である。

【0067】

50

一実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK2阻害剤であって、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩であるCDK2阻害剤と、パルボシクリブ、リボシクリブおよびアベマシクリブ、またはそれらの薬学的に許容できる塩からなる群から選択される治療有効量のCDK4/6阻害剤とを投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩が投与され、続いて、CDK4/6阻害剤が投与される。

【0068】

別の実施形態では、本発明は、疾患または障害、好ましくは、がんを処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療有効量のCDK2阻害剤であって、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩であるCDK2阻害剤と、治療有効量のCDK4/6阻害剤であって、パルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩であるCDK4/6阻害剤とを投与するステップを含む方法を提供する。

10

【0069】

本発明は、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤、またはそれらの薬学的に許容できる塩を、単独で、または1種もしくは複数の他の治療剤もしくは緩和剤と組み合わせて投与するステップを含む、治療上の方法および使用をさらに提供する。

【0070】

本明細書に提供される方法の一部の実施形態では、疾患または障害は、異常な細胞成長、特に、がんである。一態様では、本発明は、対象における異常な細胞成長の処置のための方法であって、対象に、治療有効量のCDK2阻害剤および治療有効量のCDK4/6阻害剤を投与するステップを含む方法を提供する。頻出する実施形態では、異常な細胞成長は、がんである。別の態様では、本発明は、対象におけるがんの処置のための方法であって、対象に、ある量のCDK2阻害剤およびある量のCDK4/6阻害剤を、ある量の追加的な抗がん剤とさらに組み合わせて投与するステップを含み、これらの量が、一緒になって、前記がんの処置において有効である、方法を提供する。

20

【0071】

さらに別の態様では、本発明は、対象におけるがん細胞増殖を阻害するための方法であって、対象に、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤を、がん細胞増殖の阻害に有効な量で投与するステップを含む方法を提供する。

30

【0072】

別の態様では、本発明は、対象におけるがん細胞侵襲性を阻害するための方法であって、対象に、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤を、がん細胞侵襲性の阻害に有効な量で投与するステップを含む方法を提供する。

【0073】

別の態様では、本発明は、対象におけるがん細胞においてアポトーシスを誘導するための方法であって、対象に、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤を、アポトーシスの誘導に有効な量で投与するステップを含む方法を提供する。

【0074】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんの処置における使用のための、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤を含む組合せを提供する。一部の斯かる実施形態では、CDK2阻害剤は、CDK4/6をさらに阻害する（すなわち、CDK2/4/6阻害剤）。

40

【0075】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんの処置における、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤を含む組合せの使用を提供する。

【0076】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象におけるがんの処置のための医薬の製造における、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤を含む組合せの使用を提供する。

【0077】

50

本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれの好まれる実施形態では、CDK2阻害剤は、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩である。本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれの好まれる実施形態では、CDK4/6阻害剤は、パルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩である。本明細書に提供される方法、組合せおよび使用の特に好まれる組合せにおいて、CDK2阻害剤は、PF-06873600またはその薬学的に許容できる塩であり、CDK4/6阻害剤は、パルボシクリブまたはその薬学的に許容できる塩である。

【0078】

本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれの一部の実施形態では、がんは、例えば、増加したサイクリンE発現が原因の、CDK4/6阻害剤に対する抵抗性によって特徴付けられる。本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれの他の実施形態では、がんは、腫瘍細胞増殖に対するCDK2依存によって特徴付けられる。

10

【0079】

本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれの頻出する実施形態では、がんは、乳がん、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、前立腺がん、肺がん（NSCLC、SCLC、扁平上皮癌または腺癌を含む）、食道がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、腎臓がん（RCCを含む）、肝臓がん（HCCを含む）、膵がん、胃（stomach）（すなわち、胃（gastric））がんおよび甲状腺がんからなる群から選択される。

【0080】

本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれのさらなる実施形態では、がんは、乳がん、卵巣がん、膀胱がん、子宮がん、前立腺がん、肺がん、食道がん、肝臓がん、膵がんおよび胃（stomach）がんからなる群から選択される。一部の斯かる実施形態では、がんは、腫瘍細胞増殖に対するCDK2依存によって特徴付けられる。本明細書に提供される方法の他の実施形態では、異常な細胞成長は、サイクリンE1（CCNE1）および/または（CCNE2）の増幅または過剰発現によって特徴付けられるがんである。本明細書に提供される方法、組合せおよび使用のそれぞれの一部の実施形態では、対象は、CCNE1および/またはCCNE2の増幅または過剰発現によって特徴付けられるがんを有すると同定される。

20

【0081】

一部の実施形態では、がんは、乳がんおよび卵巣がんからなる群から選択される。一部の斯かる実施形態では、がんは、CCNE1および/またはCCNE2の増幅または過剰発現によって特徴付けられる乳がんまたは卵巣がんである。一部の斯かる実施形態では、がんは、（a）乳がんもしくは卵巣がんである；（b）CCNE1もしくはCCNE2の増幅もしくは過剰発現によって特徴付けられる；または（c）（a）および（b）の両方である。

30

【0082】

一部の実施形態では、がんは、卵巣がんである。一部の斯かる実施形態では、卵巣がんは、CCNE1および/またはCCNE2の増幅または過剰発現によって特徴付けられる。

【0083】

一部の実施形態では、がんは、乳がんである。一部の斯かる実施形態では、乳がんは、エストロゲン受容体陽性（ER+）および/またはプロゲステロン受容体陽性（PR+）であり得るホルモン受容体陽性（HR+）である。一部の実施形態では、乳がんは、ホルモン受容体陰性（HR-）である。一部の実施形態では、乳がんは、ヒト上皮成長因子受容体2陽性（HER2+）である。一部の実施形態では、乳がんは、ヒト上皮成長因子受容体2陰性（HER2-）である。他の斯かる実施形態では、乳がんは、HR陽性、HER2陰性乳がん；HR陽性、HER2陽性乳がん；HR陰性、HER2陽性乳がん；三種陰性乳がん（TNBC）；または炎症性乳がんである。一部の実施形態では、乳がんは、内分泌抵抗性乳がん、トラスツズマブ抵抗性乳がん、またはCDK4/6阻害に対する一次（primary）もしくは獲得抵抗性を実証する乳がんである。一部の実施形態では、乳が

40

50

んは、進行型または転移性乳がんである。前述のそれぞれの一部の実施形態では、乳がんは、CCNE1および/またはCCNE2の増幅または過剰発現によって特徴付けられる。

【0084】

一部の実施形態では、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、第一選択療法として投与することができる。他の実施形態では、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、第二（またはそれ以降の）選択療法として投与される。一部の実施形態では、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、内分泌療法剤による処置後に、第二（またはそれ以降の）選択療法として投与される。一部の実施形態では、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、内分泌療法剤による処置後に、第二（またはそれ以降の）選択療法として投与される。一部の実施形態では、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、逐次に投与され、それによると、CDK2阻害剤は、0の時点で投与され、続いて、1の時点でCDK4/6阻害剤が投与される。一部の実施形態では、CDK阻害剤は、例えば、タキサンまたは白金剤を含む1種または複数の化学療法レジメンによる処置後に、第二（またはそれ以降の）選択療法として投与される。一部の実施形態では、CDK阻害剤は、例えばHER2標的化剤、例えば、トラスツズマブによる処置後に、第二（またはそれ以降の）選択療法として投与される。

10

【0085】

用語「治療有効量」は、本明細書において、処置されている障害の症状のうち1種または複数がある程度軽減するであろう、投与されている化合物の当該量を指す。がんの処置の参照において、治療有効量は、(1)腫瘍のサイズを低下させる、(2)腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度遅くする、好ましくは、停止する）、(3)腫瘍成長もしくは腫瘍侵襲性がある程度阻害する（すなわち、ある程度遅くする、好ましくは、停止する）、および/または(4)がんに関連する1種もしくは複数の徴候もしくは症状がある程度軽減する（または好ましくは、排除する）効果を有する当該量を指す。

20

【0086】

本明細書において、「対象」は、ヒトまたは動物対象を指す。ある特定の好まれる実施形態では、対象は、ヒトである。

【0087】

用語「処置すること」は、本明細書において、他に指示がなければ、斯かる用語が適用される障害もしくは状態または斯かる障害もしくは状態の1種もしくは複数の症状を反転すること、それを緩和すること、その進行を阻害することまたはそれを防止することを意味する。用語「処置」は、本明細書において、他に指示がなければ、直ぐ上で「処置すること」が定義されている通りの、処置する行為を指す。用語「処置すること」は、対象のアジュバントおよびネオアジュバント処置も含む。

30

【0088】

用語「異常な細胞成長」および「過剰増殖性障害」は、本願で互換的に使用されている。

【0089】

「異常な細胞成長」は、本明細書において、他に指示がなければ、正常な調節機構に依存しない細胞成長を指す（例えば、接触阻害の損失）。異常な細胞成長は、良性（非がん性）または悪性（がん性）であり得る。

40

【0090】

用語「追加的な抗がん剤」は、本明細書において、次のクラスに由来する薬剤等、がんの処置において使用されるまたは使用され得る、本発明のCDK2およびCDK4/6阻害剤の組合せ以外のいずれか1種または複数の治療剤を意味する：有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼIおよびII阻害剤、植物アルカロイド、ホルモン剤およびアントゴニスト、成長因子阻害剤、放射線照射、タンパク質チロシンキナーゼおよび/またはセリン/スレオニンキナーゼの阻害剤、細胞周期阻害剤、生物学的応答修飾因子、酵素阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはオリゴ

50

ヌクレオチド誘導体、細胞傷害性薬剤、ならびに免疫腫瘍学的 (immuno-oncology) 薬剤。

【 0 0 9 1 】

本明細書において、「がん」は、いずれかの悪性および/もしくは侵襲性成長、または異常な細胞成長に起因する腫瘍を指す。がんは、自身を形成する細胞の型にちなんで命名された固形腫瘍、血液、骨髄またはリンパ系のがんを含む。固形腫瘍の例は、肉腫および癌腫を含む。血液のがんは、白血病、リンパ腫および骨髄腫を含むがこれらに限定されない。がんは、身体の特異的な部位に起源をもつ原発性がん、それが開始した場所から身体の他の部分へと拡散した転移性がん、寛解後の本来の原発性がんからの再発、および後のがんとは異なる型の以前のがんの病歴を有する人物における新たな原発性がんである第2の原発性がんも含む。

10

【 0 0 9 2 】

C D K 阻害剤の投与、好ましくは、C D K 2 阻害剤およびC D K 4 / 6 阻害剤の投与は、作用部位への阻害剤の送達を可能にするいずれかの方法によって投与することができる。これらの方法は、経口経路、十二指腸内経路、非経口的注射 (静脈内、皮下、筋肉内、血管内または注入を含む)、外用および直腸投与を含む。C D K 2 阻害剤およびC D K 4 / 6 阻害剤は、逐次に、同時発生的にまたは同時に投与することができる。用語「逐次」または「逐次に」は、単独または医薬中のいずれかでの、次々に為される、併用療法の各治療剤の投与を指し、各治療剤は、いずれかの順序で投与することができる。併用療法における治療剤が、異なる剤形である場合、例えば、ある1種の薬剤が錠剤であり、別の薬剤が滅菌された液体である場合、および/または薬剤が、異なる投薬スケジュールに従って投与される場合、例えば、ある1種の薬剤が毎日投与され、第2の薬剤が毎週等、より低い頻度で投与される場合、逐次投与は、特に有用となることができる。用語「同時発生的に」は、単独または別々の医薬中のいずれかでの、本発明の併用療法における各治療剤の投与を指し、第2の治療剤は、第1の治療剤の直後に投与されるが、治療剤は、いずれかの順序で投与することができる。用語「同時」は、同じ医薬における本発明の併用療法の各治療剤の投与を指す。

20

【 0 0 9 3 】

投薬量レジメンは、最適な所望の応答をもたらすように調整することができる。例えば、単一ポースを投与することができる、いくつかの分割用量を経時的に投与することができる、または治療状況の危急によって指し示される通りに、用量を比例的に低下もしくは増加させることができる。投与の容易さおよび投薬量の均一性のために、投薬量単位形態で非経口的組成物を製剤化することは特に有利である。投薬量単位形態は、本明細書において、処置されるべき哺乳類対象のための単位投薬量として適する物理的に別々の単位を指す；各単位は、要求される薬学的担体と共同して所望の治療効果を生じるように計算された所定の含量の活性化合物、例えば、C D K 2 阻害剤およびC D K 4 / 6 阻害剤を含有する。投薬量単位形態の詳細は、(a) 化学療法剤の特有の特徴および達成されるべき特定の治療または予防効果、ならびに (b) 個体における感受性の処置のための斯かる活性化合物の配合の技術分野における固有の限界によって決定され、これらに直接依存する。

30

40

【 0 0 9 4 】

よって、当業者であれば、本明細書に提供される開示に基づき、用量および投薬レジメンが、治療技術分野でよく知られた方法に従って調整されることを認めるであろう。すなわち、最大耐量を容易に確立することができ、患者に検出可能な治療利益をもたらすための各薬剤の投与に関する時間的要求と同様に、患者に検出可能な治療利益をもたらす有効量を決定することもできる。したがって、ある特定の用量および投与レジメンが本明細書で例証されているが、これらの例は、本発明の実施において対象にもたらされ得る用量および投与レジメンを決して限定しない。

【 0 0 9 5 】

投薬量の値が、緩和されるべき状態の種類および重症度に伴い変動することがあり、単

50

一または複数用量を含むことができることに留意されたい。いずれか特定の対象のために、特異的な投薬量レジメンが、個々の必要および組成物を投与するまたはその投与を監督する人物の専門家判断に従って経時的に調整されるべきであること、また、本明細書に示す投薬量範囲が、単なる例示であり、請求されている組成物の範囲または実施の限定を意図しないことをさらに理解されたい。例えば、用量は、毒性効果および/または研究室検査値等の臨床効果を含むことができる薬物動態または薬力学パラメータに基づき調整することができる。よって、本発明は、当業者によって決定される通りの患者内用量漸増を包含する。化学療法剤の投与に適切な投薬量およびレジメンの決定は、関連する技術分野でよく知られており、本明細書に開示されている教示が提供されれば、当業者によって包含されることが理解されるであろう。

10

【0096】

投与されるCDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤の量は、処置されている対象、障害または状態の重症度、投与率、化合物の体内動態(disposition)、および処方医の裁量に依存するであろう。しかし、有効投薬量は典型的に、単一または分割用量において、1日当たり体重1kg当たり約0.001~約100mg、好ましくは、約0.01~約35mg/kg/日の範囲内である。70kgのヒトに関して、これは、約0.07~約7000mg/日、好ましくは、約0.7~約2500mg/日に達するであろう。一部の例では、前述の範囲の下限を下回る投薬量レベルは、十分過ぎるものであり得るが、他の場合では、いかなる有害副作用を引き起こすこともなく、さらにより多い用量を使用することができる、斯かるより多い用量は典型的に、1日を通した投与のために、いくつかのより少ない用量へと分割される。好まれる一実施形態では、有効投薬量は、単一または分割用量において、1日当たり体重1kg当たり約0.001~約100mg、好ましくは、約1~約35mg/kg/日の範囲内である。70kgのヒトに関して、これは、約0.05~約7g/日、好ましくは、約0.1~約2.5g/日に達するであろう。一部の例では、前述の範囲の下限を下回る投薬量レベルは、十分過ぎるものであり得るが、他の場合では、いかなる有害副作用を引き起こすこともなく、さらにより多い用量を用いることができ、ただし、斯かるより多い用量は先ず、1日を通した投与のためにいくつかの少ない用量へと分割されるものとする。一部の例では、前述の投薬量の例は、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤の組合せのための投薬量範囲を記載することができる。代替実施形態では、前述の投薬量の例は、個々にCDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤のための投薬量範囲を記載することができる。

20

30

【0097】

好まれる一実施形態では、CDK4/6阻害剤の治療有効量または投薬量は、CDK2阻害剤によるCDK2の阻害に応答した、CDK4および/またはCDK6によって媒介されるリバウンドリン酸化の防止に十分な投薬量であり得る。

【0098】

本明細書において、「薬学的に許容できる担体」は、生物に有意な刺激作用を引き起こさず、投与されるCDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤の生物学的活性および特性を抑制しない担体または希釈剤を指す。

【0099】

薬学的に許容できる担体は、いずれかの従来薬学的担体または賦形剤を含むことができる。担体および/または賦形剤の選択は、大いに、投与機序、溶解性および安定性における担体または賦形剤の効果、ならびに剤形の性質等の因子に依存するであろう。

40

【0100】

適した薬学的担体は、不活性希釈剤またはフィラー、水および様々な有機溶媒(水和物および溶媒和化合物等)を含む。医薬組成物は、所望に応じて、調味料、結合剤、賦形剤等の追加的な成分を含有することができる。よって、経口投与のため、デンプン、アルギン酸およびある特定の複合ケイ酸塩等の様々な崩壊剤ならびにスクロース、ゼラチンおよびアカシア等の結合剤と共に、クエン酸等の様々な賦形剤を含有する錠剤を用いることができる。賦形剤の限定しない例は、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖およ

50

びデンプンの種類、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油ならびにポリエチレングリコールを含む。その上、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルク等の潤滑剤は多くの場合、打錠目的に有用である。同様の種類の固体組成物は、軟および硬充填ゼラチンカプセルにおいて用いることもできる。したがって、材料の非限定的な例は、ラクトースまたは乳糖および高分子量ポリエチレングリコールを含む。水性懸濁液またはエリキシル剤が、経口投与に所望される場合、その中にある活性化合物は、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリンまたはこれらの組合せ等の希釈剤と共に、様々な甘味料または調味剤、着色物質または色素および所望に応じて、乳化剤または懸濁剤と組み合わせることができる。

【0101】

医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセル、丸剤、粉末、徐放製剤、溶液、懸濁液として経口投与に、滅菌溶液、懸濁液もしくはエマルジョンとして非経口的注射に、軟膏もしくはクリームとして外用投与に、または坐剤として直腸投与に適した形態であり得る。医薬組成物は、正確な投薬量の単一投与に適した単位剤形であり得る。

【0102】

例示的な非経口的投与形態は、滅菌水性溶液、例えば、水性プロピレングリコールまたはデキストロース溶液における活性化合物の溶液または懸濁液を含む。斯かる剤形は、所望に応じて適宜緩衝することができる。

【0103】

本発明の化合物、すなわち、本明細書に記載されているCDK2およびCKD4/6阻害剤の送達に適した医薬組成物、ならびにそれらの調製のための方法は、当業者には容易に明らかとなるであろう。斯かる組成物およびそれらの調製のための方法は、例えば、その開示全体を参照により本明細書に組み込む、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、第19版(Mack Publishing Company、1995)に見出すことができる。

【0104】

CDK2およびCKD4/6阻害剤は、経口投与することができる。経口投与は、化合物が胃腸管に進入できるような嚥下が関与し得る、または化合物が口から直接的に血流に進入する頬側もしくは舌下投与を用いることができる。経口投与に適した製剤は、錠剤、微粒子、液体または粉末を含有するカプセル、薬用キャンディー(液体充填型を含む)、チューズ、多微粒子およびナノ微粒子、ゲル、固溶体、リボソーム、フィルム(粘膜附着性を含む)、オビュール(ovule)等の固体製剤、スプレー、ならびに液体製剤を含む。

【0105】

液体製剤は、懸濁液、溶液、シロップおよびエリキシル剤を含む。斯かる製剤は、軟または硬カプセル中のフィラーとして使用することができ、典型的に、担体、例えば、水、エタノール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、メチルセルロースまたは適した油、ならびに1種または複数の乳化剤および/または懸濁剤を含む。液体製剤は、例えば、小袋から得た固体の復元によって調製することもできる。

【0106】

CDK2およびCKD4/6阻害剤は、その開示全体を参照により本明細書に組み込む、Expert Opinion in Therapeutic Patents、11(6)、981~986、LiangおよびChen著(2001)に記載されている剤形等、急速溶解、急速崩壊剤形において使用することもできる。

【0107】

錠剤剤形に関して、用量に依存して、薬物は、剤形の1wt%~80wt%、より典型的には、剤形の5wt%~60wt%を構成することができる。薬物に加えて、錠剤は一般に、崩壊剤を含有する。崩壊剤の例は、デンプングリコール酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、クロスポビドン、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、微結晶性セルロース、低級アルキル置換ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、アルファ化デ

10

20

30

40

50

ンブンおよびアルギン酸ナトリウムを含む。一般に、崩壊剤は、剤形の1wt%~25wt%、好ましくは、5wt%~20wt%を占めるであろう。

【0108】

結合剤は一般に、錠剤製剤への粘着性品質の付与に使用される。適した結合剤は、微結晶性セルロース、ゼラチン、糖、ポリエチレングリコール、天然および合成ゴム、ポリビニルピロリドン、アルファ化デンプン、ヒドロキシプロピルセルロースならびにヒドロキシプロピルメチルセルロースを含む。錠剤は、ラクトース（一水和物、噴霧乾燥一水和物、無水物その他）、マンニトール、キシリトール、デキストロース、スクロース、ソルビトール、微結晶性セルロース、デンプンおよび二塩基性リン酸カルシウム二水和物等の希釈剤を含有することもできる。

10

【0109】

錠剤は、また、ラウリル硫酸ナトリウムおよびポリソルベート80等の表面活性剤、ならびに二酸化ケイ素およびタルク等の流動促進剤を含んでいてもよい。存在する場合、表面活性剤は典型的に、錠剤の0.2wt%~5wt%の量であり、流動促進剤は典型的に、錠剤の0.2wt%~1wt%である。錠剤は、また、一般に、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリルフマル酸ナトリウム(sodium stearyl fumarate)、およびステアリン酸マグネシウムとラウリル硫酸ナトリウムの混合物等の潤滑剤を含有する。潤滑剤は一般に、錠剤の0.25wt%~10wt%、好ましくは、0.5wt%~3wt%の量で存在する。他の従来成分は、抗酸化剤、着色剤、調味剤、保存料および味覚遮蔽(taste-masking)剤を含む。例示的な錠剤は、最大約80wt%の薬物、約10wt%~約90wt%の結合剤、約0wt%~約85wt%の希釈剤、約2wt%~約10wt%の崩壊剤および約0.25wt%~約10wt%の潤滑剤を含有する。

20

【0110】

錠剤ブレンドを、直接的にまたはローラーによって圧縮して、錠剤を形成することができる。錠剤ブレンドまたはブレンドの部分を、その代わりに、打錠前に湿式、乾式もしくは溶融造粒する、溶融凝結するまたは押し出すことができる。最終製剤は、1または複数の層を含むことができ、コーティングされていてもコーティングされていなくてもよい；またはカプセル封入されていてよい。錠剤の製剤は、その開示全体を参照により本明細書に組み込む、「Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets、1巻」、H. LiebermanおよびL. Lachman著、Marcel Dekker、N.Y.、N.Y.、1980(ISBN 0-8247-6918-X)に詳細に記述されている。経口投与のための固体製剤は、即時および/または修飾放出となるように製剤化することができる。修飾放出製剤は、遅延、持続、パルス(pulsed)、制御、標的化およびプログラムされた放出を含む。適した修飾放出製剤は、米国特許第6,106,864号に記載されている。高エネルギー分散および浸透圧およびコーティング粒子等、他の適した放出技術の詳細は、Vermaら、Pharmaceutical Technology On-line、25(2)、1~14(2001)に見出すことができる。制御された放出を達成するためのチューインガムの使用は、WO 00/35298に記載されている。これらの参考文献の開示全体を参照により本明細書に組み込む。

30

40

【0111】

本発明のCDK2およびCDK4/6阻害剤は、血流中、筋肉中または内臓中に直接的に投与することもできる。非経口的投与に適した手段は、静脈内、動脈内、腹腔内、くも膜下腔内、脳室内(intraventricular)、尿道内(intraurethral)、胸骨内(intrasternal)、頭蓋内、筋肉内および皮下を含む。非経口的投与に適したデバイスは、有針(マイクロニードルを含む)注射器、無針注射器および注入技法を含む。

【0112】

非経口的製剤は典型的に、塩、炭水化物および緩衝剤(好ましくは、3~9のpHにするための)等の賦形剤を含有することができる水性溶液であるが、一部の適用のため、滅

50

菌非水性溶液として、または滅菌パイロジェンフリーの水等の適した媒体と併せて使用されるべき乾燥形態として、より適切に製剤化することができる。

【0113】

滅菌条件下での、例えば、凍結乾燥による非経口的製剤の調製は、当業者によく知られた標準薬学的技法を使用して容易に達成することができる。非経口的溶液の調製において使用される本発明の化合物の溶解性は、溶解性増強剤の取り込み等、適切な製剤技法を使用して増加させることができる。非経口的投与のための製剤は、即時および/または修飾放出となるように製剤化することができる。修飾放出製剤は、遅延、持続、パルス、制御、標的化およびプログラムされた放出を含む。よって、本発明の化合物は、活性化化合物の修飾放出をもたらす植え込まれたデポーとしての投与のために固体、半固体またはチキソトロピー液体として製剤化することができる。斯かる製剤の例は、薬物コーティングされたステントおよびPGLAマイクロスフェアを含む。

10

【0114】

本発明のCDK阻害剤は、皮膚または粘膜へと外用に、すなわち、真皮的または経皮的に投与することもできる。この目的のための典型的な製剤は、ゲル、ハイドロゲル、ローション、溶液、クリーム、軟膏、散布剤(dusting powder)、ドレッシング材、泡、フィルム、皮膚パッチ、オブラート(wafer)、インプラント、スポンジ、繊維、包帯およびマイクロエマルジョンを含む。リポソームを使用することもできる。典型的な担体は、アルコール、水、鉱物油、流動ワセリン、白色ワセリン、グリセリン、ポリエチレングリコールおよびプロピレングリコールを含む。浸透増強薬が取り込まれてもよい；例えば、J Pharm Sci、88(10)、955~958、FinninおよびMorgan著(1999年10月)を参照されたい。外用投与の他の手段は、電気穿孔、イオン泳動、フォノフォレーシス、ソノフォレーシスおよびマイクロニードルまたは無針(例えば、Powderject(商標)、Bioject(商標)等)注射による送達を含む。これらの参考文献の開示全体を参照により本明細書に組み込む。外用投与のための製剤は、即時および/または修飾放出となるように製剤化することができる。修飾放出製剤は、遅延、持続、パルス、制御、標的化およびプログラムされた放出を含む。

20

【0115】

本発明のCDK阻害剤は、典型的には、乾燥粉末インヘラーからの乾燥粉末(単独で、または例えば、ラクトースとの乾燥ブレンドにおける混合物として、または混合構成成分粒子として、例えば、ホスファチジルコリン等のリン脂質と混合して)の形態で、または加圧された容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー(好ましくは、細かいミストを産生するための電気流体力学を使用したアトマイザー)もしくはネブライザーからのエアロゾルスプレーとして、当技術分野内で知られた適した推進剤を使用してまたは使用せず、鼻腔内にまたは吸入によって投与することもできる。鼻腔内使用のため、粉末は、生体接着剤、例えば、キトサンまたはシクロデキストリンを含むことができる。

30

【0116】

加圧された容器、ポンプ、スプレー、アトマイザーまたはネブライザーは、例えば、エタノール、水性エタノール、または活性の分散、可溶化もしくは放出延長に適した代替薬剤、溶媒としての推進剤(複数可)、およびソルビタントリオレート、オレイン酸またはオリゴ乳酸(oligolactic acid)等の場合による界面活性物質を含む、本発明の化合物(複数可)の溶液または懸濁液を含有する。乾燥粉末または懸濁液製剤における使用に先立ち、薬物製品は、吸入による送達に適したサイズ(典型的には、5ミクロン未満)へと微粒子化される。これは、スパイラルジェット(spiral jet)製粉、流動床ジェット製粉、ナノ粒子を形成するための超臨界流体加工、高圧ホモジナイゼーションまたは噴霧乾燥等、いずれか適切な粉碎方法によって達成することができる。

40

【0117】

インヘラーまたは吸入器における使用のためのカプセル(例えば、ゼラチンまたはHPMCから作られた)、プリスターおよびカートリッジは、CDK阻害剤、ラクトースまたはデンプン等の適した粉末基剤、およびI-ロイシン、マンニトールまたはステアリン酸

50

マグネシウム等の性能修飾因子の粉末ミックスを含有するように製剤化することができる。ラクトースは、無水、または一水和物の形態であり得、好ましくは後者である。他の適した賦形剤は、デキストラン、グルコース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、フルクトース、スクロースおよびトレハロースを含む。

【0118】

細かいミストを産生するために電気流体力学を使用したアトマイザーにおける使用に適した溶液製剤は、発動当たり $1 \mu\text{g} \sim 20 \text{mg}$ の本発明のCDK阻害剤を含有することができ、発動体積は、 $1 \mu\text{L}$ から $100 \mu\text{L}$ に変動し得る。典型的な製剤は、本発明の1種または複数のCDK阻害剤、プロピレングリコール、滅菌水、エタノールおよび塩化ナトリウムを含む。プロピレングリコールの代わりに使用することができる代替溶媒は、グリセロールおよびポリエチレングリコールを含む。メントールおよびレボメントール (levomenthol) 等の適した香料、またはサッカリンもしくはサッカリンナトリウム等の甘味料を、吸入/鼻腔内投与に意図される本発明のこのような製剤に添加することができる。

10

【0119】

吸入/鼻腔内投与のための製剤は、例えば、ポリ(DL-乳酸-co グリコール酸 (PLGA)) を使用して、即時および/または修飾放出となるように製剤化することができる。修飾放出製剤は、遅延、持続、パルス、制御、標的化およびプログラムされた放出を含む。

【0120】

乾燥粉末インヘラーおよびエアロゾルの場合、投薬量単位は、計量された量を送達するバルブを用いて決定される。本発明に従った単位は典型的に、好ましくは、所望の量の本発明のCDK2およびCDK4/6阻害剤を含有する、計量された用量または「パフ (puff)」を投与するように準備される。全体的な1日用量は、単一用量において、またはより通常では、1日を通した分割用量として投与することができる。

20

【0121】

本発明のCDK2およびCDK4/6阻害剤は、例えば、坐剤、ペッサリーまたは注腸の形態で、直腸または腔に投与することができる。カカオバターは、伝統的な坐剤の基剤であるが、必要に応じて様々な代替を使用することができる。直腸/腔投与のための製剤は、即時および/または修飾放出となるように製剤化することができる。修飾放出製剤は、遅延、持続、パルス、制御、標的化およびプログラムされた放出を含む。

30

【0122】

本発明のCDK2およびCDK4/6阻害剤は、典型的には、等張性のpH調整された滅菌生理食塩水における微粒子化された懸濁液または溶液の液滴の形態で、眼または耳に直接的に投与することもできる。眼性および耳性投与に適した他の製剤は、軟膏、生分解性 (例えば、吸収性ゲルスポンジ、コラーゲン) および非生分解性 (例えば、シリコーン) インプラント、オブラート、レンズおよび微粒子、またはニオソーム (niosome) もしくはリポソーム等の小胞系を含む。架橋 (crossed-linked) ポリアクリル酸、ポリビニルアルコール、ヒアルロン酸、セルロース性ポリマー、例えば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースもしくはメチルセルロース、またはヘテロ多糖ポリマー、例えば、ゲランガム (gelan gum) 等のポリマーを、塩化ベンザルコニウム等の保存料と共に取り込むことができる。斯かる製剤は、イオン泳動によって送達することもできる。眼性/耳性投与のための製剤は、即時および/または修飾放出となるように製剤化することができる。修飾放出製剤は、遅延、持続、パルス、制御、標的化またはプログラムされた放出を含む。

40

【0123】

投与機序のいずれかにおける使用のための、それらの溶解性、溶解速度、味覚遮蔽、バイオアベイラビリティおよび/または安定性を改善するための、本発明のCDK2およびCDK4/6阻害剤ならびにそれらの適した誘導體またはポリエチレングリコール含有ポリマー。薬物-シクロデキストリン複合体は、例えば、大部分の剤形および投与経路に一般に有用であることが見出される。封入および非封入複合体の両方を使用することができ

50

る。薬物との直接的な複合体形成の代替として、シクロデキストリンは、補助的添加物、すなわち、担体、希釈剤または可溶化剤として使用することができる。アルファ - 、ベータ - およびガンマ - シクロデキストリンが、これらの目的のために最も一般的に使用されており、これらの例は、それらの開示全体を参照により本明細書に組み込む、PCT公開番号WO 91/11172、WO 94/02518およびWO 98/55148に見出すことができる。

【0124】

例えば、がん等の特定の疾患または状態を処置する目的のため、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤の組合せを投与することが望ましい場合があるため、CDK2阻害剤を含有する第1の医薬組成物およびCDK4/6阻害剤を含有する第2の医薬組成物を、組成物の同時投与に適したキットの形態で簡便に組み合わせることができることは本発明の範囲内である。よって、本発明のキットは、2種以上の別々の医薬組成物を含み、そのうち1種はCDK2阻害剤を含有し、そのうち別の1種はCDK4/6阻害剤を含有し、容器、分割ボトルまたは分割ホイルパッケージ等、前記組成物を別々に保持するための手段を含む。斯かるキットの例は、錠剤、カプセルその他の包装に使用される馴染み深いブリスターパックである。本発明のキットは、異なる剤形、例えば、経口および非経口の投与に、異なる投薬量間隔での別々の組成物の投与に、または互いに対する別々の組成物の用量設定に特に適する。服薬遵守を支援するために、キットは典型的に、投与のための指示を含み、記憶補助装置と共に提供され得る。

10

【0125】

一部の態様では、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤は、併用療法の一部である。本明細書において、用語「併用療法」は、1種または複数の追加的な薬学的なまたは薬用の薬剤（例えば、抗がん剤）と一緒にあってもよい、CDK2阻害剤およびCDK4/6阻害剤の、逐次、同時発生的または同時のいずれかでの投与を指す。ある特定の腫瘍における本発明の組合せの治療有効性は、他の承認されたまたは実験的ながん治療法、例えば、放射線照射、外科手術、化学療法剤、標的化療法、腫瘍において調節不全される他のシグナリング経路を阻害する薬剤、およびPD-1アンタゴニスト等の他の免疫増強剤との組合せによって増強され得る。

20

【0126】

本明細書に提供される方法のそれぞれの一部の実施形態では、方法は、第1のCDK阻害剤および第2のCDK阻害剤を投与するステップを含み、第1のCDK阻害剤は、CDK2阻害剤（CDK2の選択的または非選択的阻害剤であり得る）であり、第2のCDK阻害剤は、好まれる実施形態では選択的CDK4/6阻害剤である、CDK4/6阻害剤である。選択的CDK阻害剤は典型的に、標準生化学的アッセイにおいて、目的の特異的CDK（複数可）を阻害し、IC₅₀は、他のCDKの少なくとも5倍の選択性、好ましくは、斯かる他のCDKの10倍以上の選択性を実証する。例えば、選択的CDK4/6阻害剤は典型的に、他のCDKの少なくとも5、好ましくは、10倍の選択性で、CDK4およびCDK6を阻害するであろう。

30

【0127】

追加的な抗がん剤を含む併用療法が使用される場合、1種または複数の追加的な抗がん剤は、CDK2阻害剤および/またはCDK4/6阻害剤と逐次に、同時発生的にまたは同時に投与することができる。一実施形態では、追加的な抗がん剤は、本発明のCDK2および/またはCDK4/6阻害剤の投与に先立ち、哺乳類（例えば、ヒト）に投与される。別の実施形態では、追加的な抗がん剤は、本発明のCDK2および/またはCDK4/6阻害剤の投与の後に、哺乳類に投与される。別の実施形態では、追加的な抗がん剤は、本発明のCDK2および/またはCDK4/6阻害剤の投与と同時に、哺乳類（例えば、ヒト）に投与される。

40

【0128】

本発明は、また、ヒトを含む哺乳類における異常な細胞成長の処置のための医薬組成物であって、1種または複数の（好ましくは1~3種の）追加的な抗がん剤と組み合わせた

50

、上に定義されている、ある量のCDK2阻害剤およびある量のCDK4/6阻害剤（前記化合物またはその薬学的に許容できる塩の水和物、溶媒和化合物および多形を含む）を含む医薬組成物に関する。

【0129】

特定の実施形態では、1種または複数の追加的な抗がん剤は、PL3キナーゼ、mTOR、PARP、IDO、TOO、ALK、ROS、MEK、VEGF、FLT3、AXL、ROR2、EGFR、FGFR、Src/Ab1、RTK/Ras、Myc、Raf、PDGF、AKT、c-Kit、erbB、CDK2、CDK2/4/6、CDK4/6、CDK5、CDK7、CDK9、SMO、CXCR4、HER2、GLS1、EZH2もしくはHsp90の阻害剤等の標的化された薬剤、またはPD-1もしくはPD-L1アンタゴニスト、OX40アゴニストまたは4-1BBアゴニスト等の免疫調節剤である。

10

【0130】

他の実施形態では、1種または複数の追加的な抗がん剤は、タモキシフェン、ドセタキセル、パクリタキセル、シスプラチン、カペシタビン、ゲムシタビン、ビノレルビン、エキセメスタン、レトロゾール、フルベストラント、アナストロゾールまたはトラスツズマブ等の標準治療剤である。

【0131】

別の実施形態では、本発明は、CDK2阻害剤またはその薬学的に許容できる塩および薬学的に許容できる担体または賦形剤を含む医薬組成物、ならびにCDK4/6阻害剤またはその薬学的に許容できる塩および薬学的に許容できる担体または賦形剤を含む医薬組成物を提供する。一部の実施形態では、医薬組成物は、2種以上の薬学的に許容できる担体および/または賦形剤を含む。他の実施形態では、医薬組成物は、少なくとも1種の追加的な抗がん剤をさらに含む。

20

【0132】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物は、少なくとも1種の追加的な抗がん剤または緩和剤をさらに含む。一部の斯かる実施形態では、少なくとも1種の追加的な薬剤は、後述する抗がん剤である。一部の斯かる実施形態では、組合せは、相加的な、相加的よりも大きい、または相乗的な抗がん効果をもたらす。

【0133】

一実施形態では、本発明は、それを必要とする対象における異常な細胞成長の処置のための方法であって、治療有効量の本発明の医薬組成物またはその薬学的に許容できる塩を対象に投与するステップを含む方法を提供する。

30

【0134】

別の態様では、本発明は、それを必要とする対象における異常な細胞成長の処置のための方法であって、ある量の本発明の医薬組成物またはその薬学的に許容できる塩を、ある量の追加的な治療剤（例えば、抗がん治療剤）と組み合わせて対象に投与するステップを含み、これらの量が一緒になって、前記異常な細胞成長の処置において有効である、方法を提供する。

【0135】

本明細書に提供される方法の頻出する実施形態では、異常な細胞成長は、がんである。本発明の医薬組成物は、単一の薬剤として、例えば、CDK2阻害剤の医薬組成物、CDK4/6阻害剤の医薬組成物もしくはCDK2/4/6阻害剤の医薬組成物としてまたは単一の医薬組成物として投与することができる、または他の抗がん剤、特に、特定のがんに適切な標準治療剤と組み合わせて投与することができる。一部の実施形態では、提供される方法は、次の効果のうち1種または複数をもたらす：（1）がん細胞増殖の阻害；（2）がん細胞侵襲性の阻害；（3）がん細胞のアポトーシスの誘導；（4）がん細胞転移の阻害；または（5）血管新生の阻害。

40

【0136】

別の態様では、本発明は、ある特定のがん等、対象におけるCDK2、CDK4および

50

／またはCDK6によって媒介される障害の処置のための方法であって、CDK2阻害剤またはその薬学的に許容できる塩および本発明のCDK4/6阻害剤またはその薬学的に許容できる塩を、前記障害の処置に有効な量で、対象に投与するステップを含む方法を提供する。

【0137】

他に指示がなければ、本明細書におけるCDK阻害剤の参照は全て、その塩、溶媒和化合物、水和物、アナログおよび複合体、ならびにその塩の溶媒和化合物、水和物および複合体の参照を含み、これは、その多形、立体異性体および同位体標識バージョンを含む。

【0138】

本発明のCDK阻害剤のうち1種または複数は、例えば、本明細書で同定されているCDK阻害剤のうち1種の化合物の酸付加塩および塩基付加塩等、薬学的に許容できる塩の形態で存在することができる。本明細書において、用語「薬学的に許容できる塩」は、親化合物の生物学的有効性および特性を保持する塩を指す。語句「薬学的に許容できる塩（複数可）」は、本明細書において、他に指示がなければ、本明細書で同定されているCDK阻害剤中に存在し得る酸性または塩基性の基の塩を含む。

10

【0139】

本発明は、また、本明細書に提供される式の化合物のプロドラッグに関する。よって、それ自体に薬理的活性が殆どないまたは全くなくてよい本発明の化合物のある特定の誘導体は、患者に投与されると、例えば加水分解性の切断によって、発明に係る化合物へと変換され得る。斯かる誘導体は、「プロドラッグ」と称される。プロドラッグの使用に関するさらなる情報は、それらの開示全体を参照により本明細書に組み込む、「Pro-drugs as Novel Delivery Systems」、14巻、ACS Symposium Series (T HiguchiおよびW Stella)および「Bioreversible Carriers in Drug Design」、Pergamon Press、1987 (E B Roche編、American Pharmaceutical Association)に見出すことができる。

20

【0140】

本発明に従ったプロドラッグは、例えば、その開示全体を参照により本明細書に組み込む、「Design of Prodrugs」H Bundgaard著 (Elsevier、1985)に記載されている通りに、例えば、発明に係る化合物中に存在する適切な官能性を、「プロモイエティ (pro-moiety)」として当業者に知られたある特定の部分に置き換えることにより産生することができる。

30

【0141】

本明細書に引用されているあらゆる刊行物および特許出願は、それらの全体を参照により本明細書に組み込む。当業者であれば、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなく、それに対してある一定の変化および修飾を為すことができることが明らかであろう。

【実施例】

【0142】

(実施例1)

CDK4/6媒介性リバウンドリン酸化による、CDK2阻害に対する急速適応の概要
本発明は、CDK2阻害が、基質リン酸化の急速かつ劇的な損失をもたらし、これはその後、数時間以内に回復されることを実証した。この代償性リン酸化現象は、複数の細胞株において、細胞周期の全ての期で観察された。本発明は、細胞株が、G1初期におけるそれらの典型的役割を越えて活性となるCDK4およびCDK6の活性化により、CDK2活性の損失に急速に適応することをさらに実証した。本発明は、CDK2/4/6阻害剤PF3600ならびにCDK2基質の固定細胞および生細胞イメージングを使用して、細胞型依存性様式で、CDK4/6-サイクリンD複合体が、例えば、PF3600等の低分子CDK2阻害剤に応答したCDK2の阻害後に、細胞周期を駆動することができる再配線 (rewiring) 事象を生じたことをさらに実証した。このCDK4/6依存性活性は

40

50

、CDK2阻害10時間後までに最大強度となることが示され、一部には、CDK4/6/サイクリンDの上方調節によって駆動され得る。これらの知見の著しい特色は、細胞が、CDK2活性低下に応答してバイパス機構を活性化したスピードであった。

【0143】

注目すべきことに、標的化されたがん治療法の出現以降、このような治療法に対する抵抗性を駆動する分子機構の理解に、顕著な研究努力が費やされてきた。一部のがん薬物抵抗性は、薬物に対する既存の（内在的な）遺伝的抵抗性によって駆動されるが、新たに得られつつある証拠は、バイパス経路のエピジェネティック変化および活性化を含む非遺伝的代償性機構が、細胞に標的化療法を相殺させることを実証した（Hataら、2016；Ramirezら、2016；Shafferら、2017；Sharmaら、2010）。このような適応応答は、細胞が真正な遺伝的薬物抵抗性突然変異を獲得することができるリザーバーとして機能する薬物耐性状態を、細胞が通過することを可能にする。バイパス機構の存在は、種々のがん型において実証されたが、薬物に対する適応の報告されたタイムスケールは、数週間から数カ月間に及ぶ（Hataら、2016；Ramirezら、2016；Sharmaら、2010）。本明細書で実証される分子事象の精細な時間分解能のため、数時間のタイムスケールでのCDK2阻害に対する適応が観察された。細胞の100%が、PF3600に初期に応答したという事実は、薬物に対する内在的な抵抗性と相反し、適応の急速なタイムスケールは、CDK2阻害剤に対する観察された耐性のためのドライバーとしての獲得された遺伝的突然変異と相反する。むしろ、実証される通り、本明細書に提供されるデータは、まとめると、例えばCDK2阻害薬による処

10

20

【0144】

CDK2/サイクリン複合体は、決定的な細胞プロセスに關与する多数の基質をリン酸化する。したがって、CDK2は、細胞周期の決定的な調節因子であると考えられる。しかし、この考えに対しては、CDK2が、発生および増殖に必須ではないことを示すマウスおよび細胞株ノックアウト研究によって、15年前に異議が唱えられた（Berthetら、2003；Ortegaら、2003；Santamariaら、2007；TetsuおよびMcCormick、2003）。これらの研究は、2種の可能な解釈を示唆した：CDK2基質リン酸化が、検査した環境において細胞周期進行に決定的でなかった、または冗長なキナーゼ活性が、CDK2の非存在下でCDK2基質をリン酸化することができた、のいずれかである（Berthetら、2003；GrimおよびClurman、2003）。本明細書に提示されるデータは、CDK2基質の少なくともサブセットが、細胞周期進行に必須であり、CDK2の非存在下で、CDK4/6が、ある特定の細胞環境においてこれらの決定的な機能を実現可能であるという考えを支持する。実際に、本明細書に提供されるデータは、代償性リン酸化を媒介するCDK4/6/サイクリンD複合体が、細胞型特異的であり得ることをさらに指し示す。様々なD型サイクリン、CDK4およびCDK6が、組織特異的発現および機能を有することが知られていることを考慮すると、このことは驚くには当たらない。しかし、PF3600に対する適応に關与するキナーゼ/サイクリンは、所与の細胞型において正常な細胞周期進行に要求されるものと必ずしも同じでなくてもよい。

30

40

【0145】

細胞周期の広く受け入れられているモデルにおいて、CDK4/6/サイクリンD複合体は、G1初期において機能し、その後、サイクリンDは分解され、CDK4/6は不活性にされる（Matsushimeら、1992）。しかし、数例の研究が、より後の細胞周期ステージにおけるCDK4/6活性の役割を報告した（Brookesら、2015；Gabrielら、1999）。その上、いくつかの研究が、サイクリンD1タンパク質が、MCF10A、RPE-hTERTおよびMRC5ヒト線維芽細胞において、細胞周期のG2期で上昇することを報告したが、いかなるキナーゼ活性が関連するかについては不明である（Gookinら、2017；Yangら、2006；Zerjat

50

keら、2017)。本明細書で、CDK4/6活性は、G1期の後に必須ではないようであるが、CDK4/6は、CDK2阻害後に全ての細胞周期の期で基質リン酸化を媒介することが実証される。一実施形態では、PF3600およびバルボシクリブの同時処置が、ベースラインへのDHBシグナルの即時下落を引き起こさないという事実において、CDK4/6再活性化における見かけ上の遅延を見ることができる。代わりに、DHBシグナルは先ず、およそ5時間上昇し(PF3600単独で処置された細胞のDHBシグナルと並行して)、その後、減退が始まり、これは、ベースラインへと下降するのにさらに5時間を要求する。CDK4/6再活性化における見かけ上の遅延は、代償性キナーゼ活性に關与するタンパク質を上方調節するのに要する時間に起因し得る。

【0146】

CDK2基質のCDK4/6媒介性代償性リン酸化は、直接的または間接的なプロセスにより為され得る。例えば、精製されたCDK/サイクリン複合体および精製されたDHBセンサーを利用した*in vitro*キナーゼアッセイは、CDK2/サイクリンE1、CDK2/サイクリンA2、CDK1/サイクリンA2およびCDK1/サイクリンE1によるDHBのリン酸化を示したが、CDK1/サイクリンB1、CDK4/サイクリンD1またはCDK6/サイクリンD1によるDHBのリン酸化を示さなかった(Schwarzら、2018; Spencerら、2013)。しかし、これらのアッセイは、正常なCDK2に能力がある(proficient)条件下で発現された、タグ付けおよび精製されたCDK/サイクリン複合体を使用した。したがって、CDK/サイクリン複合体は、CDK2阻害によって誘導され得、CDK4/6/サイクリンDの活性化に必要となり得る、翻訳後修飾または新たなタンパク質-タンパク質相互作用を含有しないであろう。CDK4/6が、他のキナーゼを活性化するもしくはホスファターゼを阻害することによる間接的な効果によりCDK2基質再リン酸化を可能にすること、またはCDK2それ自体が再活性化されるようになることも確実に可能である。

【0147】

CDK1は、細胞周期において非冗長機能を果たし、これにより、必須であると考慮される。これと一致して、CDK1ロックアウト胚は、発生することができず(Santamariaら、2007)、細胞培養物におけるCDK1の低分子阻害は、G2停止および有糸分裂遮断をもたらす。CDK1は、マウスが、妊娠中期に至るまでCDK2およびCDK4の非存在下で生存するのに十分であったが、その後、胚は重篤な造血欠損のために死亡した(Santamariaら、2007)。よって、CDK1が、大部分の組織型において、CDK2およびCDK4の非存在下で全ての代償性キナーゼ活性を実行することができることが暗示された。対照的に、本明細書において、本出願人らは、CDK1は依然として、有糸分裂への進入に必須であるが(図3、右)、CDK2機能的バックグラウンドにおける急性CDK2阻害後に、本明細書で検査される細胞の環境において、CDK2基質のリン酸化において小さな代償性役割しか果たさないことを示す。

【0148】

本明細書に示されている酵素阻害とは対照的に、代償性リン酸化をCDK1が駆動する直接的な証拠は、他の間期CDKが全て完全にアブレーションされた(CDK2/3/4/6四重ロックアウト)マウスにおいてのみ示された。興味深いことに、CDK4/CDK2ダブルロックアウトマウスにおいて、CDK6およびサイクリンD2の間の相互作用の増加が観察され、CDK6/サイクリンDが、CDK4およびCDK2の非存在下で代償性リン酸化を駆動することができることが推測された(Barriereraら、2007)。さらに、CDK2またはCDK2とCDK4を欠くMEFは、その野生型対応物と比較して、より低い効率で増殖した(Barriereraら、2007; Berthetら、2003; Ortegaら、2003)。これと一致して、本発明において、CDK2活性が、MCF10A、MCF7およびRPE-hTERT細胞においてPF3600を使用して急性的に阻害された場合、より長い有糸分裂間時間が観察された(図8C)。

【0149】

本明細書に提供されるデータは、増加したサイクリンE発現が原因で臨床CDK4/6

10

20

30

40

50

阻害剤に対して抵抗性になったがんにおいて、腫瘍細胞増殖のためにCDK2に依存するがんにおいて、または代償性キナーゼの上方調節によって代償することができないがんにおいて、選択的CDK2阻害が、標的化療法として有望な戦略となり得ることを示唆する。この考えに一致して、OVCA R3細胞は、サイクリンE増幅が原因で、パルボシクリブに対して抵抗性であるが、CDK2阻害に対して特に感受性であり、基質の代償性リン酸化を示すことも、またはPF3600に反応して任意のさらなる有糸分裂を起すこともない。さらに、遺伝的に操作された、パルボシクリブ抵抗性マウス肺腫瘍は、PF3600によるCDK2/4/6の阻害と同様に、CDK2損失およびCDK4/6阻害のコンビナトリアル活性を実証した。CDK4/6によりCDK2阻害に適応したこのような腫瘍は、CDK2およびCDK4/6阻害剤による併用処置の候補となることができる。

10

【0150】

(実施例2)

CDK2活性の阻害は、基質リン酸化の急速損失を引き起こした

PF3600処置によるCDK2阻害のリアルタイム効果は先ず、DHBに基づくCDK2活性センサーを使用して試験した(Spencerら、2013)(図1A)。DHBセンサーは、リン酸化されていない場合、核に局在化する。リン酸化後に、核局在化シグナルが遮蔽され、核外輸送シグナルが遮蔽を外され、センサーは、増加するCDK2活性に反応して細胞質へと着実に移行する(図1A)。よって、キナーゼ活性は、DHBセンサーの細胞質蛍光強度の核蛍光強度に対する比(C/N比)によって定量化することができる。本発明において、細胞IC₅₀値(図8A)を使用して、PF3600の関連する用量として25nMおよび100nMを選択し、2種の非形質転換上皮細胞株(MCF10AおよびRPE-hTERT)、乳がん細胞株(MCF7)および卵巣がん系統(OVCA R3)においてDHBセンサーのタイムラプスイメージングを行った。非同期的に周期を進める細胞を先ず、薬物の非存在下でおよそ20時間イメージングを行って、各細胞の細胞周期の期を確立した；次に、動画を休止して、薬物を添加し、次いでイメージングをさらに1~2日間続けた。細胞は、非同期的に周期を進めていたため、1種の薬物処置による全ての細胞周期の期が試料採取された。これにより、本発明者らは、分裂後期の完了から任意の時点で薬物を受けた細胞のトレースを計算的に単離することができた。

20

【0151】

より高い濃度では、PF3600は、CDK2に加えてCDK4/6を阻害する。PF3600の効果は主にCDK4/6阻害からの干渉を伴わないCDK2の阻害によるものであったことを確実にするために、CDK4/6が不活性であると考えられる細胞周期ステージに解析を制限した。CDK4/6が主に細胞周期のG1期において作用する(Chungら、2019；SherrおよびRoberts、2004)という概念と一致して、分裂後期5時間後またはそれより後のパルボシクリブの添加は、DHBセンサーリン酸化、細胞周期進行または有糸分裂のタイミングに効果がなかった(図3、左)。本発明者らは、したがって、分裂後期5時間後に始まるPF3600に反応したDHBリン酸化のいかなる変化も、CDK2活性の阻害が原因であろうと判断した。同様に、1時間のパルボシクリブ処置は、2N DNA含量を有する細胞におけるRbの脱リン酸化をもたらしたが、3~4N DNA含量を有する細胞においてはRbリン酸化に効果がなく(図8B)、この場合もやはり、Chungら、2019と一致した。したがって、PF3600による処置後のCDK2基質リン酸化を評価する全ての実験に関して、解析を、3~4N DNA含量を有する細胞または分裂後期5時間後に処置した細胞に制限した。

30

40

【0152】

予想通り、細胞周期半ば(mid-cell cycle)のPF3600の添加は、検査した全4種の細胞株においてDHBセンサーのC/N比の急激かつ急速な下落をもたらした(図1B、図1D、図1Fおよび図1G)。CDK2リン酸化に反応して核から細胞質へと同様に移行する(Petersenら、1999；Sahaら、1998)複製前複合体の構成成分である、別のCDK2基質CDC6のリン酸化におけるPF3600のリアルタイム効果も試験した。PF3600の添加

50

は、CDK6リン酸化の下落をもたらし、核へと戻るその移行を引き起こした(図1C)。まとめると、DHBおよびCDK6の両方のC/N比の下落は、PF3600による処置後の急速な(1時間以内)CDK2活性の阻害を示唆する。

【0153】

DHBセンサーの特異性の評価において、有糸分裂5時間後またはそれより後の高用量の1 μ Mパルボシクリブによる処置は、DHBセンサーリン酸化、細胞周期進行または有糸分裂のタイミングに即時効果がなかった(図3、左)。しかし、次の回の有糸分裂の完了後に、このようなパルボシクリブ処置細胞は、CDK2^{low} G0停止に進入し、CDK4/6の阻害およびその後の細胞周期へのコミットメントの遮断におけるパルボシクリブの有効性を指し示す。9 μ M RO3306によるCDK1阻害もまた、DHBセンサーリン酸化における即時効果が最小であった(図3、右)。細胞周期の終わりに向かって、このようなRO3306処置細胞は、G2停止を示し、DHBリン酸化がプラトーに達し、CDK1の阻害および有糸分裂進入の遮断におけるRO3306の有効性を指し示す。これらの観察は、以前に公開された*in vitro*キナーゼデータ(Schwarzら、2018; Spencerら、2013)およびサイクリンE1^{low}/E2^{low}/A1^{low}/A2^{low}/MEFが、核DHBセンサーを維持するという事実(Chungら、2019)と共に、DHBセンサーが、正常な成長条件下において、主にCDK2によってリン酸化され、CDK4、CDK6またはCDK1によるリン酸化が最小であることを実証する。

10

【0154】

20

(実施例3)

CDK2阻害後のCDK2基質リン酸化における急速リバウンド

PF3600による処置後のDHBセンサーリン酸化の即時下落に加えて、1~2時間以内に始まるリン酸化の急速リバウンドが、MCF10A、MCF7およびRPE-hTERT細胞において認められた(それぞれ図1B、図1Fおよび図1D)。5時間目までに、DHBセンサーリン酸化は、処置前レベルに戻り、その後上昇し続けた。これと一致して、細胞周期進行は続き、細胞は、有糸分裂を最終的に完了した(図8C)。MCF7乳がん細胞は、MCF10AおよびRPE-hTERT細胞よりも、PF3600に対して感受性が高かった(図1F、図8Aおよび図8C)。25nM PF3600は、MCF7において下落-リバウンド挙動を示したが、100nM PF3600は、DHBリン酸化の短いリバウンドとそれに続く長続きした抑制および有糸分裂遮断を引き起こした(図1Fおよび図8C)。下落-リバウンドは、PF3600で処置したMCF10A細胞におけるCDK6リン酸化によっても観察された(図1C)。細胞におけるPF3600のほぼ30時間の半減期ならびに薬物動態および薬力学研究は、PF3600処置後のCDK2基質の観察された再リン酸化が、化合物の不安定性または阻害剤結合の損失が原因ではないことを指し示した。

30

【0155】

センサーリン酸化のリバウンドが観察された3種の細胞株(MCF10A、MCF7およびRPE-hTERT)は全て、細胞周期進入のためにCDK4/6/サイクリンDに依存し、予想通り、パルボシクリブ感受性であった。対照的に、OVCA R3細胞は、サイクリンEの増幅を有し、パルボシクリブに対して抵抗性である。本発明者らは、OVCA R3細胞が、その生存および増殖のためにCDK2活性にさらに依存する場合、この細胞は、DHBセンサーにより可視化される通り、PF3600によるCDK2阻害に対してさらに大きい感受性を示すであろうと仮定した。この考えと一致して、低い方の25nM用量のPF3600によるOVCA R3細胞の処置は、イメージング期間の残りにおいて、細胞増殖を阻害し、さらなる有糸分裂を全て防止した(図1Gおよび図8C)。興味深いことに、MCF10A、MCF7またはRPE-hTERT細胞とは異なり、DHBセンサーリン酸化は、PF3600処置後にOVCA R3細胞においてリバウンドしなかったが、その代わりに、下落し、次いで中間レベルにおいてプラトーに達した(図1G)

40

50

【0156】

直交性様式で下落 - リバウンド効果を検査するために、両方のCDK2アレルにF80G突然変異を含有するCDK2アナログ感受性RPE-hTERT細胞(CDK2^{F80G}/F80G; (Merrickら、2011))へとDHBセンサーを形質導入した。この突然変異は、巨大なATP競合性アナログ、3MB-PP1、1-(tert-ブチル)-3-(3-メチルベンジル)-1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-アミン(CAS番号956025-83-5)によって特異的に阻害される、修飾されたATP結合ポケットを生じる。PF3600処置と一致して、3MB-PP1によるCDK2活性の阻害は、迅速にリバウンドするDHBセンサーリン酸化の低下を引き起こした一方で、野生型RPE-hTERT細胞は、3MB-PP1による影響を受けなかった(図1E、図9Aおよび図9B)。3MB-PP1によるCDK2^{F80G}/F80G細胞におけるDHBリン酸化の下落は、PF3600による野生型RPE-hTERT細胞よりも顕著に劇的でなかったが、CDK2^{F80G}/F80Gは、Nbs1リン酸化の損失によって実証される通り、実際に阻害された(図9C)。ゲートキーパー残基の突然変異が、CDK2機能を低下させることが知られている(Merrickら、2011)ことを考慮すると、3MB-PP1によるDHBリン酸化における小さい効果は、CDK2^{F80G}/F80G細胞が、野生型RPE-hTERT細胞と比較して、よりCDK1活性に頼るという事実が原因の可能性がある。CDK1阻害剤RO3306の添加は、野生型RPE-hTERT細胞と比較して、RPE-hTERT CDK2^{F80G}/F80G細胞においてDHBリン酸化のはるかにより大幅な下落をもたらした(図9E)。よって、RPE-hTERT CDK2^{F80G}/F80G細胞において、CDK1は、細胞周期初期に異常に活性であり、CDK2基質のリン酸化に寄与し、これにより、3MB-PP1により達成可能なDHBリン酸化の阻害を弱める。

10

20

【0157】

次に、免疫蛍光およびウエスタンブロッティングを使用して、CDK2阻害が、内因性CDK2基質:Cdc6(Petersenら、1999;Saharaら、1998)、ヌクレオリン(Sarcevicら、1997)およびRb(Akiyamaら、1992)のリン酸化動態に同様の効果を有したかについて調査した。3~4N DNA含量を有する細胞におけるPF3600の効果を免疫蛍光によって定量化したところ、PF3600処置は、Rbおよびヌクレオリンのリン酸化の一過性低下と、それに続くリバウンドをもたらした(図4Aおよび図4B)。Cdc6、Rbおよびヌクレオリンに関して、ウエスタンブロッティングによって同様の結果が得られた(図4C)。

30

40

【0158】

CDK2基質動力学をホスホ-プロテオミクスにより網羅的に評価した。MCF7細胞を25nM PF3600で1時間または24時間処置し、CDK基質リン酸化における効果を質量分析による解析によって評価した(図9F)。最小CDKコンセンサスリン酸化部位(SPまたはTP)を有するペプチドのみを考慮して、1時間のPF3600処置後にそのリン酸化が有意に低下した(p<0.05)40種のペプチドを同定したところ、これらの大部分が、24時間目までに対照レベルにリバウンドした(図4D、図9Fおよび表1)。まとめると、生細胞イメージング、免疫蛍光、ウエスタンブロッティングおよびホスホ-プロテオミクスから得られた観察は、CDK2活性が急性的に阻害された場合、MCF10A、MCF7およびRPE-hTERT細胞等のがん細胞は、代償性キナーゼ(複数可)の活性化によって急速に適応したことを示唆し、その際に、代償性キナーゼはCDK2基質をリン酸化して、細胞周期の最終的完了を容易にする。

【0159】

(実施例4)

代償性キナーゼ活性の調査:CDK1の寄与は小さかった

CDK1は、非正準CDK1-サイクリン複合体の形成により、CDK2/4/6マウスノックアウトにおいて完全な細胞周期を駆動することが示された(Alleemら、2005;Santamariaら、2007)。CDK1が、急性CDK2阻害後にCDK

50

2 基質のリン酸化を駆動することができるかについて、CDK 1 阻害剤である RO3306 で同時処置することにより、MCF10A、RPE-hTERT および MCF7 細胞におけるタイムラプスイメージングによって調査した (Vassilevら、2006)。予想に反して、CDK 2 (100 nM または 25 nM PF3600) および CDK 1 (9 μM RO3306) の同時阻害は、それにもかかわらず、DHB センサーのリン酸化のリバウンドをもたらした (図 5 A) が、このような同時処置条件下で達成された DHB リン酸化のレベルは、若干低かった。同様に、CDK 2 (100 nM PF3600) および CDK 1 (9 μM RO3306) の同時阻害は、CDK 2 のみの阻害 (100 nM PF3600) と比較して、Rb またはヌクレオリンのリン酸化に追加的な効果がなかった (図 10 A)。まとめると、これらのデータは、CDK 2 の阻害後に、DHB および他の CDK 2 基質は、十分に機能的な CDK 2 を有する細胞において、CDK 1 によってごく弱くリン酸化されることを示唆する。CDK 2 および CDK 1 の同時阻害は、基質リン酸化のリバウンドを消失させなかったため、本発明者らは、CDK 2 活性の非存在下での CDK 2 基質リン酸化を可能にし得る代替キナーゼ (複数可) の存在を仮定した。

【0160】

(実施例 5)

代償性キナーゼ活性の調査：活性は CDK 4 / 6 阻害により消失した

HCT116 結腸がん細胞における以前の研究は、CDK 2 が、遺伝的アプローチにより (though) アブレーションされた場合、Rb はやはり、細胞においてリン酸化されたことを示した。増大された CDK 4 活性は、このリン酸化の原因であると推測された (Tetsu および McCormick、2003) が、このことは、Rb が CDK 4 / 6 基質でもあるという事実によって説明することができる。同様に、HCT116 細胞は一般に、パルボシクリブに対して非感受性であるが、CDK 2 の遺伝的アブレーションは、この細胞を CDK 4 / 6 阻害に対して脆弱性にする。これらの観察は、CDK 4 のせいで、このような細胞において CDK 2 活性が冗長になっている可能性を暗示するが、CDK 2 特異的基質のリン酸化は試験されなかった。DHB センサーは、正常では CDK 4 / 6 基質ではないため (図 3 および (Spencerら、2013))、本発明者らは、DHB センサーを使用して、CDK 4 / 6 / サイクリン D による代償を経た PF3600 に対する可能な適応を調査した。

【0161】

パルボシクリブ (1 μM) および PF3600 による、MCF10A (100 nM PF3600)、RPE-hTERT (100 nM PF3600) および MCF7 (25 nM PF3600) 細胞における CDK 4 / 6 および CDK 2 の同時阻害は、リン酸化の持続性よりはむしろ一過性のリバウンドを明らかにし、これはその後、イメージング期間の残りにおいてベースラインレベルに降下した (図 5 B)。これらの細胞は、任意のさらなる有糸分裂を起こさず、細胞周期完了に決定的な基質リン酸化が遮断されたことを示唆する (図 10 B および 図 10 C)。Rb、Cdc6 およびヌクレオリンのリン酸化は、CDK 4 / 6 および CDK 2 の同時阻害後に急速に失われ、処置 24 時間後になっても回復は観察されなかったため、この現象は、DHB センサーに制限されなかった (図 5 C および 図 5 D)。直交性システムにおいてこの効果を検査するために、RPE-hTERT CDK2^{F80G} / F80G 細胞において、10 μM 3MB-PP1、1 μM パルボシクリブまたは 10 μM 3MB-PP1 + 1 μM パルボシクリブにより、指し示されている時間で CDK 2 および CDK 4 / 6 を同時阻害した。3MB-PP1 単独により以前に見られた持続したリバウンドリン酸化 (図 9 A) は、3MB-PP1 およびパルボシクリブによる同時処置後に消失した (図 2 A)。単細胞トレースの数：DMSO (133)、10 μM 3MB-PP1 (104)、1 μM パルボシクリブ (146)、10 μM 3MB-PP1 + 1 μM パルボシクリブ (160)。DMSO および 10 μM 3MB-PP1 メジアントレースは、図 1 D から再現された。これらの結果は、複数の CDK 2 基質が、CDK 2 活性の急性阻害後に、CDK 4 / 6 依存性様式でリン酸化されるという概念を支持する。CDK 2 および CDK 4 / 6 は、MCF10A 細胞において、100 nM

10

20

30

40

50

PF3600、5 μMリボシクリブ、100 nM PF3600 + 5 μMリボシクリブにより同時阻害された(図2B)。単細胞トレースの数: DMSO(55)、100 nM PF3600(53)、5 μMリボシクリブ(23)、100 nM PF3600 + 5 μMリボシクリブ(26)(図2B)。CDK2およびCDK4/6は、MCF10A細胞において、100 nM PF3600、1 μMアベマシクリブまたは100 nM PF3600 + 1 μMアベマシクリブにより同時阻害された(図2C)。単細胞トレースの数、右: DMSO(197)、100 nM PF3600(242)、1 μMアベマシクリブ(390)、100 nM PF3600 + 1 μMアベマシクリブ(270)(図2C)。

【0162】

(実施例6)

CDK4/6 - サイクリンD複合体は、CDK2基質のリバウンドリン酸化において重大な役割を果たす

CDK4およびCDK6は、重複する細胞機能および特有の細胞機能の両方を有するため、CDK2の阻害後に見られる基質リン酸化のリバウンドに対するそれらの個々の寄与の決定に興味を持った。周期を進めるMCF10AおよびMCF7細胞におけるCDK4またはCDK6のsiRNA媒介性ノックダウン(図11A)は、MCF7細胞が、正常な細胞周期進行のためにCDK4に主に頼ることを明らかにした一方で、CDK4およびCDK6の同時ノックダウンが、MCF10Aにおける増殖の遮断に必要とされた(図11B)。

【0163】

PF3600処置MCF10A細胞において、CDK4ノックダウンは、DHBのリバウンドリン酸化の遮断において非常に有効であり(図6A、左)、単細胞トレースの大部分は、有糸分裂の阻害と共にDHBセンサーの核局在化を示した(図6B、上)。対照的に、MCF7細胞において、CDK4およびCDK6の両方の同時ノックダウンが、DHBのリバウンドリン酸化の有効な遮断に必要とされた(図6A、右および図6B、下)。よって、CDK4/6ノックダウンは、PF3600およびパルボシクリブ同時処置により為された観察を表現型コピーする(図5B)。

【0164】

CDK4およびCDK6は一般的には、D型サイクリンと対になるため、siRNA媒介性ノックダウン(図11C)を使用して、いずれのD型サイクリンが、代償性キナーゼ活性に寄与するか調査した。周期を進めるMCF10A細胞において、トリプルノックダウンのみが細胞周期進行に強い効果を有したため、全3種のサイクリンD1、D2およびD3が、細胞周期進入に寄与した(図11D、上)。MCF7細胞は、サイクリンD2を発現しないため(Evronら、2001)、本発明者らは、サイクリンD1およびD3に焦点を合わせた。MCF7細胞において、サイクリンD1のノックダウンは、細胞周期進行を有効に遮断したが、サイクリンD3は必須ではなかった(図11D、下)。

【0165】

PF3600で処置したMCF10A細胞において、DHBリン酸化のリバウンドは、サイクリンD1、D2またはD3単独をノックダウンすることにより部分的に遮断された一方で、D型サイクリンのトリプルノックダウンは、持続したリバウンドを抑制した(図6C、左および図11E、上)。PF3600で処置したMCF7細胞において、サイクリンD3のノックダウンは、最小の効果を有した一方で、サイクリンD1の標的化は、DHBリン酸化のリバウンドを大部分は遮断し、サイクリンD1およびD3の同時ノックダウンは、このリバウンドの防止においてさらにより有効であった(図6C、右および図11E、下)。よって、サイクリンD1、D2およびD3(MCF10A)またはサイクリンD1(MCF7)のノックダウンは、図5Bに示すPF3600およびパルボシクリブ同時処置により為される観察を表現型コピーする。要約すると、MCF10A細胞は、正常な細胞周期進入のためにCDK4、CDK6、サイクリンD1、サイクリンD2およびサイクリンD3を使用することができるが、急性CDK2阻害後のリバウンドリン酸化の

10

20

30

40

50

ためにCDK4 /サイクリンD2およびD3に僅かにより大きく頼る。対照的に、MCF7細胞は、正常な細胞周期進行のためにCDK4 /サイクリンD1を使用するが、急性CDK2阻害後のリバウンドリン酸化のためにサイクリンD1と共にCDK4およびCDK6の両方に頼る。

【0166】

(実施例7)

サイクリンD1およびD3レベルは、CDK2阻害後に上方調節された

CDK2阻害後にリバウンドキナーゼ活性を駆動する機構を調査した。MCF10A細胞において、PF3600 (100 nM) 処置24時間以内にサイクリンD1およびD3タンパク質レベルの増加が観察されたが、CDK2、CDK4およびCDK6タンパク質レベルは安定を維持した(図6D)。対照的に、MCF7細胞において、サイクリンD1、サイクリンD3、CDK2、CDK4およびCDK6タンパク質レベルは全て、PF3600 (25 nM) 処置24時間以内に様々な程度増加した。上方調節が転写レベルで起こったか決定するために、mRNA FISHを行って、CDK4、CDK6ならびにサイクリンD1、D2およびD3の発現を測定した。ウエスタンブロット結果に一致して、PF3600処置に応答して、サイクリンD1およびD3のmRNA発現の増加が、MCF10Aにおいて観察され、サイクリンD1の特に強い増加が、MCF7細胞において観察された(図6E~図6F)。これらの知見は、増加したタンパク質レベルを少なくとも部分的に説明する。

【0167】

上方調節されたサイクリンDタンパク質レベルが、MCF10A細胞における増加したCDK - サイクリンD3複合体に繋がったか決定するために、DMSOまたはPF3600のいずれかで24時間処置したMCF10A細胞においてCDK4およびCDK6の免疫沈降を行って、サイクリンD3について調べた。実際に、CDK4およびCDK6の両方に結合した、より多い量のサイクリンD3が、CDK2阻害後に観察された(図11F)。まとめると、これらのデータは、CDK2の急性阻害が、細胞型特異的CDK4 / 6 / サイクリンD複合体の上方調節を誘発し、この複合体のサブセットが、CDK2基質のリバウンドリン酸化を促進し得ることを実証する。

【0168】

(実施例8)

CDK4 / 6およびCDK2は、*in vivo*で互いを代償する

*in vivo*におけるCDK2およびCDK4 / 6の間の潜在的な代償性の関係性を検査するために、KRAS^{G12V}およびTRP53突然変異によって駆動される確立されたマウス肺腫瘍モデルを使用した。Creリコンビナーゼをコードするアデノウイルス粒子を鼻腔内感染させたKras⁺ / LSL^{G12V}、Trp53^{L / L}マウスは、5カ月間の潜伏期により肺腫瘍を発生した。CTスキャンによって腫瘍発生が検出されたら、媒体またはパルボシクリブ(70 mg / kg QD)のいずれかで動物を28日間処置し、その後、処置期間の終わりにCTスキャンによって腫瘍体積を測定した。媒体およびパルボシクリブ処置マウス間の腫瘍体積倍率変化の比較は、パルボシクリブ処置後に腫瘍負荷の有意な低下を示さなかった(図7A)。しかし、CDK2 T - ループリン酸化およびサイクリンE1の上方調節が、パルボシクリブ処置肺腫瘍において、ウエスタンブロットにより検出された。CDK阻害剤p21の有意な下方調節(図7B)と共に、これらのデータは、CDK2活性の上方調節が、パルボシクリブに対する非感受性を説明することができることを指し示す。

【0169】

CDK2が、パルボシクリブ抵抗性腫瘍における役割を果たすか検査するために、Kras⁺ / LSL^{G12V}; Trp53^{L / L}; Cdk2^{- / -}マウスを作製した。このようなマウスは、Kras⁺ / LSL^{G12V}; Trp53^{L / L}; Cdk2^{+/+}対照動物と同様のサイズの肺腫瘍を発生した(図7C)。注目すべきことに、Cdk2ヌル肺腺癌を有するマウスのパルボシクリブ処置は、有意に低下した腫瘍サイズをもたらした(p

10

20

30

40

50

= 0.037) (図7C)。よって、この腫瘍設定において、CDK4/6阻害は、CDK2の非存在下での腫瘍成長の抑制に十分であった。

【0170】

CDK2およびCDK4/6の両方が、腫瘍成長に寄与するという考えをさらに支持するために、50mg/kg BID (CDK2、CDK4およびCDK6を網羅する、現在までに発表された細胞研究において使用されるよりも高い用量)のPF3600で処置することにより、Kras⁺/LSLG^{12V}; Trp53^{L/L}肺腫瘍を有するマウスにおけるCDK2、CDK4およびCDK6活性を阻害した。Cdk2ヌル腫瘍のバルボシクリブ感受性と一致して、PF3600によるCDK2/4/6の阻害は、有意に低下した腫瘍体積をもたらした(図7C)。まとめると、*in vivo*データは、CDK2およびCDK4/6キナーゼが、重複する機能を果たし、互いを代償することができるという仮説を支持する。

10

【0171】

(実施例9)

材料と方法

実験モデル詳細:

Icahn School of MedicineのRobert Fisher研究室の厚意により得られたRPE-hTERT野生型およびCDK2アナログ感受性細胞を例外として、本研究で使用した細胞株は、ATCCから得た。MCF10A(ヒト乳房上皮)細胞は、5%ウマ血清(Invitrogen)、20ng/mL上皮成長因子(Sigma-Aldrich)、0.5mg/mLヒドロコルチゾン(Sigma-Aldrich)、100ng/mLコレラ毒素(Sigma-Aldrich)および10μg/mLインスリン(Invitrogen)を補充したDMEM/F12において培養した。RPE-hTERT細胞は、10%FBSを有するDMEMにおいて育成した。MCF7およびOVCAR3細胞は、10%FBSを補充したRPMI-1640を使用して育成した。siRNAトランスフェクション中を除いて、全ての完全成長培地に、ペニシリン/ストレプトマイシンを補充した。全ての細胞は、37°Cで5%CO₂により培養した。

20

【0172】

レンチウイルスベクターを使用した安定した細胞株作製:

30

CDK2センサー(DHB-mVenusまたはDHB-mCherry)、およびmTurquoiseをタグ付けしたH2Bを安定して発現する細胞を、レンチウイルス形質導入によって作製した。ウイルス作製のため、Fugene-HD試薬(Promega E2311)を使用して、HEK293T細胞に、CSII-EFプラスミド(CSII-EF DHB-mVenus、CSII-EF DHB-mCherry、CSII-EF CDC6-YFPまたはCSII-EF H2B-mTurquoise)を、ヘルパーパッケージングおよびエンベローププラスミド(pMDLg、pRSV-Rev、pCMV-VSV-G)と共にトランスフェクトした。トランスフェクション48時間後にレンチウイルスを収集し、0.45μmフィルター(Millipore)を通して濾過し、5μg/mLポリブレン(EMD Millipore #TR-1003)の存在下で標的細胞と共に6~10時間インキュベートした。安定した組込みを有する細胞をAria Fusionフローサイトメーターにおいて選別して、全ての細胞が所望のセンサーを発現する集団を確立した。

40

【0173】

siRNAトランスフェクション

Dharmafect1試薬(Dharmacon)により、製造業者のプロトコールを使用して、siRNAトランスフェクションを実行した。標的毎に、遺伝子の3種の異なる領域を標的とするsiRNAのプールを使用した。細胞を、抗生物質を欠く完全成長培地においてトランスフェクション複合体と共に6~7時間インキュベートした。本研究に使用したsiRNA配列は次の通りであった: CCND1 (Dharmacon #MU

50

- 003210 - 05 - 0002)、CCND2 (Dharmacon # MU - 003210 - 05 - 0002)、CCND3 (Dharmacon # J - 003212 - 10 - 0002、J - 003212 - 11 - 0002、J - 003212 - 12 - 0002)、CDK4 (IDT製品 # 198569326、198569329、198569332)、CDK6 (IDT製品 # 200925870、200925873、200925876)。

【0174】

タイムラプスイメージング：

イメージングの少なくとも24時間前に、播種前にコラーゲンでコーティングしたガラス底96ウェルプレート (Cellvis P96 - 1.5H - N) におけるフェノールレッドを含まない完全成長培地に、細胞を播種した。細胞が、イメージング期間の終わりまでサブコンフルエントを維持するように、播種密度を選んだ。細胞は先ず、薬物なしで完全成長培地において16~20時間イメージングした。次に、動画を短時間休止し、完全成長培地を、所望の濃度で薬物を含有する完全成長培地に置き換えた。次に、プレートを顕微鏡に再度挿入し、その以前の位置へと整列し、さらに24~48時間イメージングを続けた。5%CO₂で加湿した37℃チャンパーにおいて、10×0.45NA対物レンズを備えるNikon Eclipse TiまたはTi2顕微鏡において12分毎 (MCF10AまたはRPE - hTERTについて) または20分毎に (MCF7またはOVCA3について) 画像を獲得した。全チャンネルの全動画の露光時間は、1時点当たり500ミリ秒未満に維持して、光毒性を最小化した。公開されたMATLABスクリプト (Cappellettiら、2016) を使用して、以前に記載された通りに (Aroraら、2017)、細胞トラッキングを行った。 https://github.com/scappelletti/Cell_tracking におけるダウンロードからトラッキングコードを利用できる。動画の各フレームにおける分割された核の数を計数することにより、経時的な細胞計数を得た。

10

20

【0175】

免疫蛍光：

細胞は、新鮮に調製した4%パラホルムアルデヒドで15分間固定し、PBSで2回洗浄し、ブロッキングバッファー (PBS中3%BSA) と共に1時間室温でインキュベートした。0.2%Triton - X 100を使用して、15分間4℃で透過処理を実行した。一次抗体をブロッキングバッファーに希釈し、細胞と共に一晩4℃でインキュベートし、続いて1×PBSで3回洗浄した。Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546またはAlexa Fluor 647にコンジュゲートした二次抗体を細胞と共に1時間インキュベートし、続いて1×PBSで3回洗浄した。1:10000でヘキスト33342色素を使用してDNAを10分間染色した (ThermoFisher H3570)。10×0.45NA対物レンズを備えるNikon Eclipse TiまたはTi2顕微鏡において画像を獲得した。各細胞のヘキストシグナルの積分強度を得ることにより、DNA含量を決定した。DNA含量のヒストグラムをプロットし、閾値および2Nピークの終わりを導くことにより、細胞を3~4N DNA含量として描写した。

30

40

【0176】

抗体および試薬：

本研究で使用した抗体は、ホスホ - Rb (Ser807/811) (CST 8516)、ホスホ - ヌクレオリン (Thr84) (Abcam ab196338)、ホスホ - NBS1 (Ser432) (Abcam ab12297)、ホスホ - CDC6 (Ser54) (Abcam ab75809)、GAPDH (図4ではCST 5174、図5ではInvitrogen ZG003)、 α -チューブリン (CST 86298)、ヒストンH3 (CST)、CDK2 (Abcam ab32147)、CDK4 (Abcam ab108357)、CDK6 (Abcam ab151247およびab124821)、サイクリンD1 (サイクリンD1クローンSP4 (Thermo Scien

50

tific RM-9140-S0)、サイクリンD2 (CST 3741)、サイクリンD3 (CST 2936)、ホスホ-CDK2 T160 (Cell Signaling 2561)、CDK2 (Abcam 32147)、p21 (Santa Cruz 6246)、サイクリンE (Santa Cruz 481)、ピンキュリン (Sigma V9131)、Alexa 488ヤギ抗マウス (Thermo Fisher Scientific、A-11001)、Alexa Fluor 546ヤギ抗ウサギ (Thermo Fisher Scientific、A-11035) および Alexa Fluor 647ヤギ抗ウサギ (Thermo Fisher Scientific、A-21245) であった。

【0177】

パルボシクリブおよびPF3600は、無水DMSO (Sigma-Aldrichカタログ番号: 276855) に溶解した; パルボシクリブは、1 μ Mの最終濃度となるように添加し、PF3600は、指し示される通り、25 nM、100 nMまたは500 nMの最終濃度となるように添加した。アベマシクリブ (カタログ番号: HY-16297A) およびリボシクリブ (カタログ番号: HY-15777) は、MedChemExpressから購入し、無水DMSOに溶解した。アベマシクリブは、1 μ Mの最終濃度となるように添加し、リボシクリブは、5 μ Mの最終濃度となるように添加した。3MB-PP1 (Cayman Chemicalカタログ番号: 17860) は、無水DMSOに溶解し、10 μ Mの最終濃度となるように添加した。RO3306 (#SML0569) は、Sigma Aldrichから購入した。

【0178】

共免疫沈降:

DMSOまたは100 nM PF3600で24時間処置したMCF10A細胞は、フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、ホスファターゼ阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤 (Sigma-Aldrich P8340の1:1000希釈) を補充した1x細胞溶解バッファー (CST 9803) を使用して溶解した。ライセートにおける総タンパク質濃度は、Bradfordアッセイを使用して測定し、等しい含量のタンパク質を5 μ gの抗体と共に一晩4°Cでインキュベートした。プロテインG Dynabeads (ThermoFisher 10003D) とインキュベートすることにより、抗原-抗体複合体をプルダウンし、1x溶解バッファーで3回洗浄した。ビーズに結合したタンパク質は、1xLDS試料バッファー (ThermoFisher NP0007) を使用して溶出し、ウエスタンブロッティングによって解析した。

【0179】

ホスホ-セリン807/811 Rb ELISA:

MCF10AまたはMCF7細胞を、96ウェル細胞培養プレート内の成長培地に25,000細胞/ウェルで播種し、37°Cで5%CO₂により一晩接着させた。翌日、10 mMストックから11ポイント3倍希釈曲線のためにDMSO (Sigma) において化合物を系列希釈した。細胞における0.1% DMSOにおける最終濃度10 μ Mトッピングのための細胞における1:5希釈に先立ち、化合物を成長培地へ中間的に1:200希釈した。細胞を1時間37°Cで5%CO₂において処置した。プロテアーゼ阻害剤カクテル (Cell Signaling Technologies、5872)、SDSおよびPMSFを含有する溶解バッファー (Cell Signaling Technologies、9803) に細胞を氷上で溶解し、4°Cでの一晩インキュベーションのために、予めコーティングされブロッティングされた抗ホスホ-Ser807/811 Rb (Cell Signaling Technologies、8516) ELISAプレートに移した。プレートをリン酸緩衝溶液で洗浄して、残渣非結合細胞タンパク質を除去し、総Rb検出抗体 (Cell Signaling Technologies、9309) を90分間37°Cで添加した。非結合総Rb抗体を除去するための洗浄後に、HRPをタグ付けされた抗体 (Cell Signaling Technologies、7076) を30分間37°Cで結合させた。非結合HRP抗体を除去するための洗浄後

10

20

30

40

50

に、Glo基質試薬(R&D Systems、DY993)を添加し、光から保護しつつ5~10分間インキュベートした。Envisionプレートリーダー(Perkin Elmer)において発光モードでプレートを読み取り、GraphPad Prismバージョン8.0.2を使用してIC50値を計算した。

【0180】

ウエスタンブロッティング：

等しい数の細胞を使用した、1xLDS試料バッファー(ThermoFisher NP007)を使用して、ライセートを調製した。NuPAGEプレキャストポリアクリルアミドゲル(ThermoFisher NP0301)を使用して、タンパク質を分離した。総タンパク質は、Azure Red色素(Azure Biosystems AC2124)を使用して定量化し、目的の抗体のシグナルの正規化に使用した。使用した一次抗体は、「抗体」セクションにて指定されている。HRPコンジュゲートまたはIR700およびIR800標識蛍光二次抗体を可視化のために使用した(Cell Signaling Technology 7074および7076)。

10

【0181】

図7Bにおけるウエスタンブロットのため、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤のカクテル(complete Mini, Roche、11836153001;ホスファターゼ阻害剤カクテル2および3、Sigma、P5726およびP0044)を補充したタンパク質溶解バッファー(50mM Tris-HCl pH7.4、150mM NaCl、0.5%NP-40)においてタンパク質抽出を行った。Bradford(Bio-Rad)法を使用してタンパク質濃度を測定した。腫瘍組織から得た25gのタンパク質抽出物を、NuPAGE TM 4~12% Bis-Tris Midiゲル(Invitrogen)において分離し、ニトロセルロース膜(GE Healthcare)に転写し、一次抗体によりブロットした。マウスまたはウサギIgGに対するヤギ二次抗体(HRP、DakoおよびAlexa Fluor 680、Invitrogen)により一次抗体を検出し、ECLウエスタンブロット検出溶液(GE Healthcare)により可視化した。

20

【0182】

mRNA FISH：

ThermoFisherから標的特異的mRNAプローブを得て、ViewRNA ISHキット(QVC001)を製造業者のプロトコールと共に使用して、単細胞における標的mRNA発現を検出した。本研究で使用したプローブは、CCND1(VA6-16943-VC)、CCND2(VA4-3083615-VC)、CCND3(VA6-17696-VC)、CDK4(VA6-18880)およびCDK6(VA6-3169253)である。mRNA FISHシグナルの定量化のため、ヘキストを使用して核マスクを得て、これは、細胞当たりのメジアン細胞質シグナル強度を得るために1ピクセルにより拡張された。

30

【0183】

単細胞CDK2活性解析：

イメージング期間中に分裂して薬物処置を受けた、非同期的に周期を進める細胞は、薬物添加時点に対する相対的な細胞の分裂後期の時間に基づきカテゴリーへと最初に分割した。次に、このような細胞はその上、有糸分裂事象後のそのDHB細胞質/核(C/N)比に基づきサブカテゴリー化した。C/N比は、細胞質の核に対する平均DHB蛍光の比を定量化することにより計算し、細胞質構成成分は、核マスクの外側のピクセルのリングの上位50パーセントの平均として計算した。

40

【0184】

分裂後期3時間後にDHB C/N比が、0.5単位を上回る場合、細胞は、CDK2^{inc}として分類し、それ以外の場合は、CDK2^{low}として分類した。図の説明文は、CDK2^{inc}細胞のみがブロットされたか、または全ての細胞がブロットされたかを指し示す。次に、サブカテゴリーにおける単細胞トレースのメジアンを使用して、特定の

50

サブカテゴリーを代表する95%信頼区間によるメジアントレースを作成した。カスタムMATLABスクリプトを使用して、全ての細胞トレース解析を行った。要求に応じてコードを利用できる。

【0185】

ホスホ - プロテオミクス :

以前に記載された通りに(Lapekら、2017b)、ホスホ - ペプチド濃縮を行った。次に、以前に記載された通りに(EdwardsおよびHaas、2016)、凍結乾燥したホスホ - ペプチドをTMT標識し、逆相塩基性pH分画によって分画し、画分を組み合わせた。画分を凍結乾燥し、MS解析まで80で貯蔵した。LC-MS2/MS3解析のため、10 μ Lの5%ギ酸中5%アセトニトリルにおいて試料を復元し、各画分のうち8 μ Lを解析のためにOrbitrap Fusion Lumosに注射した。

10

【0186】

60に加熱したPepMap RSLC C18カラム(2 μ m、100、75 μ m \times 50cm)において、300nL/分で7~32%溶媒B(0.1%ギ酸中80%アセトニトリル)の165分間勾配においてペプチドを溶出した。5秒間サイクルによるトップスピードモードでスペクトルを獲得した。500~1500m/zの範囲にわたる60000分解能でOrbitrapにおいて、MS1データを収集した。2 \times 10⁵の自動利得制御(AGC)標的を、100ミリ秒の最大注射時間により使用した。急速スキャン速度、70ミリ秒の最大注射時間および2 \times 10⁴のAGC標的によるイオントラップにおいて、MS2データを獲得した。0.5m/zの単離ウィンドウにより、四重極を単離のために使用した。10ミリ秒の活性化時間および0.25の活性化Qにより、30%正規化衝突エネルギーにおけるCIDによりペプチドを断片化した。MS3スペクトルのため、最大10イオンが同期的前駆物質選択のために選択され、Orbitrapにおける60000分解能でデータを収集した。55%のエネルギーにおけるHCDによりイオンを断片化した。250ミリ秒の最大注射時間および110m/zの第1の質量により、MS3 AGCを1 \times 10⁵に設定した。全ステージにおけるデータは、質量中心(centroided)であった。

20

【0187】

その結果得られる未加工のファイルをIP2GPUサーバー(Integrated Proteomics Applications, Inc.)で処理した。現在の夾雑物(contaminant)データベースおよびリバース(reverse)データベースに連結されたUniProtヒトデータベース(2018年1月29日にダウンロード)に対して、ProLuCIDアルゴリズム(Xuら、2015)によりデータを検索した。システイン残基のカルバミドメチル化(Carbamidomethylation)(+57.02146)ならびにペプチドn末端およびリジン残基のTMT-11修飾(+229.162932)が、静的修飾として含まれた。メチオニンの酸化(+15.9949)ならびにセリン、スレオニンおよびチロシンのリン酸化(+79.966331)が、可変的修飾として含まれた。最大4個の可変的修飾および2個の見逃された切断が許される。ペプチドは、考慮されるために最小で6アミノ酸の長さを有する必要があった。50ppm MS1許容値(Huttlinら、2010)および800ppm MS2許容値によりデータを検索した。1%タンパク質レベル偽発見率へと最終データにフィルターをかけた。

30

40

【0188】

以前に記載された通りに(Lapekら、2017a)、多段階プロセスでデータを正規化した。手短に説明すると、最初のデータは、プールされたブリッジチャンネルに対して正規化して、ラン間の(run-to-run)機器性能差を補償し、次いで、メジアンを磨いて(scrub)、任意の混合エラーを補償した。全ホスホデータを処理し、ペプチドレベルで解析した。

【0189】

実験モデル詳細 :

Icahn School of MedicineのRobert Fisher研

50

研究室の厚意により得られたRPE-hTERT野生型およびCDK2アナログ感受性細胞を例外として、本研究で使用した細胞株は、ATCCから得た。MCF10A(ヒト乳房上皮)細胞は、5%ウマ血清(Invitrogen)、20ng/mL上皮成長因子(Sigma-Aldrich)、0.5mg/mLヒドロコルチゾン(Sigma-Aldrich)、100ng/mLコレラ毒素(Sigma-Aldrich)および10μg/mLインスリン(Invitrogen)を補充したDMEM/F12において培養した。RPE-hTERT細胞は、10%FBSを有するDMEMにおいて育成した。MCF7およびOVCAR3細胞は、10%FBSを補充したRPMI-1640を使用して育成した。siRNAトランスフェクション中を除いて、全ての完全成長培地に、ペニシリン/ストレプトマイシンを補充した。全ての細胞は、37°Cで5%CO₂により培養した。

10

【0190】

マウス研究：

マウス：Kras⁺/LSLG12VTrp53^{L/L}およびCdk2^{-/-}マウスは、以前に記載された(Guerraら、2003; Jonkersら、2001; Ortegaら、2003)。次の導入遺伝子：Kras⁺/LSLG12V(Guerraら、2003); Trp53^{L/L}(Leeら、2012)およびCdk2^{-/-}(Ortegaら、2003)を使用した複合マウスを本研究のために作製した。全動物実験は、Ethical Committees of the Spanish National Cancer Research Centre(CNIO)、Carlos III Health InstituteおよびAutonomous Community of Madrid(PROEX 270/14)によって承認され、Council for International Organizations of Medical Sciences(CIOMS)によって開発されたInternational Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animalsに記されたガイドラインに従って実施された。マウスは、CNIOのAnimal Facility(AAALAC、JRS:dpR 001659)において特定病原体を含まない条件下で収容した。雌および雄マウスを実験に使用した。全マウスは、CNIOのGenomic Unitにおいて遺伝子型決定した。

20

30

【0191】

肺腫瘍誘導：麻酔した(ケタミン75mg/kg、キシラジン12mg/kg)8週齢マウスにおいて、Creリコンビナーゼをコードするアデノウイルス(Ad-Cre)の10⁶pfu/マウスの単一用量の鼻腔内滴下注入によって、肺腺癌の誘導を実行した。全アデノウイルス調製物は、University of Iowa(Iowa City, USA)から購入した。

【0192】

マイクロCTイメージング：画像研究は、CNIOのMolecular Imaging Core Unitによって行われた。1%~3%イソフルラン/酸素混合物の連続流(0.5L/分)によりマウスを麻酔し、CompaCTスキャナー(SEDECAL Madrid SpainGE)により行われる三次元マイクロコンピュータ処理断層撮影によって胸部区域をイメージングした。360度スキャンによる720投射、3フレームによる100ミリ秒の積分時間、50KeVの光子エネルギーおよび100uAの電流により、データを獲得した。GE MicroViewソフトウェアv2.2により腫瘍測定値を得た。次の通りに腫瘍体積を計算した：(短軸×短軸×長軸/2)。

40

【0193】

マウスにおける薬理的処置：Kras⁺/LSLG12V; Trp53^{L/L}; Cdk2^{-/-}およびKras⁺/LSLG12V; Trp53^{L/L}; Cdk2^{+/+}マウスを、10⁶pfuのAd-Creに感染させた。CTによって腫瘍が検出されたら、3mm³よりも大きい少なくとも1個の腫瘍を有するマウスを異なる処置群に登録した。パ

50

ルボシクリブは、70 mg / kg QDで4週間投薬し、PF3600は、50 mg / kg BIDで4週間投薬した。薬物有効性は、CT測定によってモニターした。

【0194】

【表1-1】

表 1: 処置(25nM PF3600)後 1 時間目および 24 時間目の標的タンパク質リン酸化レベル

タンパク質	記載	遺伝子	配列	3600_1時間_log2	3600_24時間_log2
E7EVA0	微小管関連タンパク質 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=MAP4 PE=1 SV=1	MAP4	DVPPLSETEApTPVPIK (配列番号 1)	-2.05	1.30
P12270	ヌクレオプロテイン TPR OS=ヒト (Homo sapiens) GN=TPR PE=1 SV=3	TPR	GIASTSDPPTANIKPTP VVSPTPSK (配列番号 2)	-2.33	0.16
Q13330	転移関連タンパク質 MTA1 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=MTA1 PE=1 SV=2	MTA1	SVSSVLSSLpTPAK (配列番号 3)	-2.82	-0.89
Q9UBF8	ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼベータ OS=ヒト (Homo sapiens) GN=PI4KB PE=1 SV=1	PI4KB	ELPSLSPAPDTGLpSP SK (配列番号 4)	-2.50	0.71
Q13330	転移関連タンパク質 MTA1 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=MTA1 PE=1 SV=2	MTA1	AGVVNGTGAPGQpSP GAGR (配列番号 5)	-0.98	-0.63

10

20

30

40

【0195】

【表 1 - 2】

P31689	DnaJ ホモログ サブファミリー A メンバー1 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=DNAJA1 PE=1 SV=2	DNAJA1	VNFPENGFLpSPDK (配列番号 6)	-1.15	0.01	10
P28749	網膜芽細胞腫様 タンパク質 1 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=RBL1 PE=1 SV=3	RBL1	RVIAIDSDAEpSPAK (配列番号 7)	-1.39	-0.40	10
Q8WYP5- 3	タンパク質 ELYS のアイソ フォーム 3 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=AHCTF1	AHCTF1	GLSQNQQIPQNSVpTP R (配列番号 8)	-2.29	0.54	20
Q09666	神経芽細胞分化 関連タンパク質 AHNAK OS=ヒ ト(Homo sapiens) GN=AHNAK PE=1 SV=2	AHNAK	ISMQDVDLSLGpSPK (配列番号 9)	-1.85	0.14	30
Q09666	神経芽細胞分化 関連タンパク質 AHNAK OS=ヒ ト(Homo sapiens) GN=AHNAK PE=1 SV=2	AHNAK	GGVTGSPEASISGpSK (配列番号 10)	-2.39	-0.92	30
Q14004	サイクリン依存 性キナーゼ 13 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=CDK13 PE=1 SV=2	CDK13	TNpTPQGVLPSQLK (配列番号 11)	-1.72	0.00	40

【表 1 - 3】

Q53GA4	プレクストリン 相同様ドメイン ファミリーA メンバー2 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=PHLDA2 PE=1 SV=2	PHLDA2	TAPAAPAEDAVAAAAA APSEPSEPSRPpSPQP K (配列番号 12)	-1.42	0.21	10
Q96HC4	PDZ および LIM ドメイン タンパク質 5 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=PDLIM5 PE=1 SV=5	PDLIM5	EVVKPVPipTSPAVSK (配列番号 13)	-1.67	-0.29	20
O15446	DNA 指向性 RNA ポリメ ラーゼ I サブ ユニット RPA34 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=CD3EAP PE=1 SV=1	CD3EAP	QEQINTEPLEDTVLPSP TKK (配列番号 14)	-0.97	0.19	30
Q9NQS7	インナーセント ロメアタンパク 質 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=INCENP PE=1 SV=3	INCENP	HSPIAPSpSPSPQVLA QK (配列番号 15)	-1.40	0.03	40
P42858	ハンチンチン OS=ヒト (Homo sapiens) GN=HTT PE=1 SV=2	HTT	EKEPGEQASVPLpSPK (配列番号 16)	-1.28	-0.25	

【表 1 - 4】

Q6IQ22	Ras 関連タンパク質 Rab-12 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=RAB12 PE=1 SV=3	RAB12	AGGGGGLGAGpSPAL SGGQGR (配列番号 17)	-1.42	-0.72	
Q9UGU0	転写因子 20 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=TCF20 PE=1 SV=3	TCF20	NCPAVTLTpSPAK (配列番号 18)	-0.96	-0.47	10
Q9NQS7	インナーセントロメアタンパク質 OS=ヒト(Homo sapiens) GN=INCENP PE=1 SV=3	INCENP	HpSPIAPSpSPSPQVLA QK (配列番号 19)	-1.23	-0.46	20
E7EVA0	微小管関連タンパク質 OS=ヒト(Homo sapiens) GN=MAP4 PE=1 SV=1	MAP4	DGVLTLANNVpTPAK (配列番号 20)	-1.11	0.85	
Q8NEF9	血清応答因子結合タンパク質 1 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=SRFBP1 PE=1 SV=1	SRFBP1	DSVVSLESQKpTPADPK (配列番号 21)	-1.92	0.31	30
Q12830	ヌクレオソームリモデリング因子サブユニット BPTF OS=ヒト (Homo sapiens) GN=BPTF PE=1 SV=3	BPTF	PQVAAQSQPQSNVQG QpSPVR (配列番号 22)	-1.10	-0.85	40

【表 1 - 5】

P49454	セントロメアタンパク質 F OS=ヒト (Homo sapiens) GN=CENPF PE=1 SV=2	CENPF	SQQAAQSADVSLNPC NpTPQK (配列番号 23)	-1.41	0.36	
P85037	フォークヘッドボックスタンパク質 K1 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=FOXK1 PE=1 SV=1	FOXK1	YSQSAPGpSPVSAQP VIM(15.995)AVPPRPS SLVAK (配列番号 24)	-1.24	-1.53	10
J3QS41	ジンクフィンガードメインを有する推定ヘリカーゼ OS=ヒト (Homo sapiens) GN=HELZ PE=1 SV=1	HELZ	GpSPIPYGLGHHPPVTI GQPQNQHQEK (配列番号 25)	-1.17	0.36	20
B5MBX0	ソロリン (Sororin) OS=ヒト (Homo sapiens) GN=CDCA5 PE=1 SV=1	CDCA5	RIVAHAVEVPAVQpSP R (配列番号 26)	-1.07	0.59	30
Q9H7N4	スプライシング因子、アルギニン/セリンリッチ 19 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=SCAF1 PE=1 SV=3	SCAF1	pSPSPAPAPAAAAAG PPTR (配列番号 27)	-0.91	-0.16	40

【表 1 - 6】

Q5JSZ5	タンパク質 PRRC2B OS=ヒト (Homo sapiens) GN=PRRC2B PE=1 SV=2	PRRC2B	ApSPQENGPVHK (配列番号 28)	-2.32	-0.64	
Q8N8A6	ATP 依存性 RNA ヘリカー ゼ DDX51 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=DDX51 PE=1 SV=3	DDX51	VNDAEPGpSPEAPQG K (配列番号 29)	-0.97	0.96	10
Q5VT52-3	核プレ mRNA ドメイン含有タ ンパク質 2 の 調節のアイソフ ォーム 3 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=RPRD2	RPRD2	NTGVSPASRPSPGpTP TSPSNLTSGLK (配列番号 30)	-1.32	-0.09	20
Q9Y6D5	ブレフェルジン A 阻害グアニン ヌクレオチド交 換タンパク質 2 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=ARFGEF2 PE=1 SV=3	ARFGEF 2	PQSPVIQAAAVpSPK (配列番号 31)	-1.08	-0.69	30
Q9Y446	プラコフィリン -3 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=PKP3 PE=1 SV=1	PKP3	AGGLDWPEATEVpSP SR (配列番号 32)	-0.94	0.83	40

【 0 2 0 0 】

【表 1 - 7】

Q9H7N4	スプライシング 因子、アルギニ ン/セリンリッ チ 19 OS=ヒト(Homo sapiens) GN=SCAF1 PE=1 SV=3	SCAF1	pSPSPAPAPAAAAAG PPTRK (配列番号 33)	-0.99	-0.53	10
Q6KC79	Nipped-B 様タ ンパク質 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=NIPBL PE=1 SV=2	NIPBL	DVPPDILLDpSPERK (配列番号 34)	-0.86	-0.06	20
Q12955-5	アンキリン-3 のアイソフォー ム 3 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=ANK3	ANK3	RYSYLTEPGM(15.995) SPQpSPCER (配列番号 35)	-2.38	0.35	30
Q9UHG0	ダブルコルチン ドメイン含有タ ンパク質 2 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=DCDC2 PE=1 SV=2	DCDC2	STVGSSDNSpSPQPLK (配列番号 36)	-1.69	-0.37	40
Q9UHB7	AF4/FMR2 フ ァミリーメンバ ー4 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=AFF4 PE=1 SV=1	AFF4	DLLPpSPAGPVPSK (配列番号 37)	-1.00	-0.36	50
Q96T58	Msx2 相互作用 タンパク質 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=SPEN PE=1 SV=1	SPEN	DSELKpTPPSVGPPSV TVVTLESAPSALEK (配列番号 38)	-0.93	-0.05	

【 0 2 0 1 】

【 表 1 - 8 】

Q86UU0-4	B 細胞 CLL/リンパ腫 9 様タンパク質のアイソフォーム 4 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=BCL9L	BCL9L	TAM(15.995)PpSPGVS QNK (配列番号 39)	-0.88	0.53
Q8WUF5	RelA 関連阻害剤 OS=ヒト (Homo sapiens) GN=PPP1R13 L PE=1 SV=4	PPP1R13 L	AGpSPRGpSPLAEGPQ AFFPER (配列番号 40)	-1.12	0.63

10

【 0 2 0 2 】

20

参考文献

次の参考文献は、それらの全体を参照により本明細書に組み込む：

[1] Akiyama, T.,

Ohuchi, T., Sumida, S., Matsumoto, K. および Toyoshima, K. (1992) 「 c d k 2 による網膜芽細胞腫タンパク質のリン酸化 (Phosphorylation of the retinoblastoma protein by cdk2) 」 Proc Natl Acad Sci U S A 89, 7900-7904.

[2] Aktas, H., Cai,

H. および Cooper, G.M. (1997) 「 R a s は、サイクリン D 1 および C d k 阻害剤 p 2 7 K I P 1 の調節により、成長因子シグナリングを細胞周期機構に関連付ける (Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1) 」 Mol Cell Biol 17, 3850-3857.

30

[3] Aleem, E.,

Kiyokawa, H. および Kaldis, P.

(2005) 「 C d c 2 - サイクリン E 複合体は、G 1 / S 期移行を調節する (Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition) 」 Nat Cell Biol 7, 831-836.

[4] Arora, M.,

Moser, J., Phadke, H., Basha, A.A. および Spencer, S.L. (2017) 「母細胞における内因性複製ストレスは、娘細胞の静止状態をもたらす (Endogenous Replication Stress in Mother Cells Leads to Quiescence of Daughter Cells) 」 Cell reports 19, 1351-1364.

40

[5] Baldin, V.,

Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. および Draetta, G. (1993) 「サイクリン D 1 は、G 1 期の細胞周期進行に要求される核タンパク質である (Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1) 」 Genes Dev 7, 812-821.

[6] Barriere, C.,

Santamaria, D., Cerqueira, A., Galan, J., Martin, A., Ortega, S., Malumbres, M., Dubus, P. および Barbacid, M.

50

- (2007) 「マウスは、Cdk4 および Cdk2 なしで発育する (Mice thrive without Cdk4 and Cdk2)」 *Mol Oncol* 1, 72-83.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L. および Kaldis, P.
- (2003) 「Cdk2 ノックアウトマウスは生存可能である (Cdk2 knockout mice are viable)」 *Curr Biol* 13, 1775-1785.
- [7] Brookes, S., Gargic, S., Sanij, E., Rowe, J., Gregory, F.J., Hara, E. および Peters, G. (2015) 「細胞老化のコンディショナルモデルにおける CDK4 依存性チェックポイントの証拠 (Evidence for a CDK4-dependent checkpoint in a conditional model of cellular senescence)」 *Cell Cycle* 14, 1164-1173. 10
- [8] Burkhardt, D.L. および Sage, J. (2008) 「網膜芽細胞腫遺伝子による腫瘍抑制の細胞機構 (Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene)」 *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- [9] Caldon, C.E., Sergio, C.M., Kang, J., Muthukaruppan, A., Boersma, M.N., Stone, A., Barraclough, J., Lee, C.S., Black, M.A., Miller, L.D. ら、(2012) 「サイクリン E2 過剰発現は、内分泌抵抗性に関連するが、ヒト乳がん細胞における CDK2 阻害に対する非感受性には関連しない (Cyclin E2 overexpression is associated with endocrine resistance but not insensitivity to CDK2 inhibition in human breast cancer cells)」 *Mol Cancer Ther* 11, 1488-1499. 20
- [10] Cappell, S.D., Chung, M., Jaimovich, A., Spencer, S.L. および Meyer, T. (2016) 「不可逆的 APC (Cdh1) 不活性化は、細胞周期進入のポイントオブノーリターンの根底にある (Irreversible APC(Cdh1) Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry)」 *Cell* 166, 167-180. 30
- [11] Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryj, M., Horowitz, J.M. および Nevins, J.R. (1991) 「E2F 転写因子は、RB タンパク質の細胞標的である (The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein)」 *Cell* 65, 1053-1061.
- [12] Chung, M., Liu, C., Yang, H.W., Koberlin, M.S., Cappell, S.D. および Meyer, T. (2019) 「CDK4/6 活性における一過性ヒステリシスは、G1 期における制限点の通過の根底にある (Transient Hysteresis in CDK4/6 Activity Underlies Passage of the Restriction Point in G1)」 *Mol Cell*. 40
- [13] Deshpande, A., Sicinski, P. および Hinds, P.W. (2005) 「発生およびがんにおけるサイクリンおよび cdk : 展望 (Cyclins and cdk in development and cancer: a perspective)」 *Oncogene* 24, 2909-2915.
- [14] Edwards, A. および Haas, W. (2016) 「ヒト細胞株のハイスループット包括的プロテオーム比較のためのマルチプレックス化定量的プロテオミクス (Multiplexed Quantitative Proteomics for High-Throughput Comprehensive Proteome Comparisons of Human Cell Lines)」 *Methods in molecular biology* 1394, 1-13. 50

[1 5] Evron, E., Umbricht, C.B., Korz, D., Raman, V., Loeb, D.M., Niranjan, B., Buluwela, L., Weitzman, S.A., Marks, J. および Sukumar, S. (2001) 「乳がんの大部分におけるサイクリン D 2 発現の損失は、プロモーター過剰メチル化に関連する (Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation)」 *Cancer Res* 61, 2782-2787.

[1 6] Fisk, H.A. および Winey, M. (2001) 「マウス Mps1p 様キナーゼは、中心体重複を調節する (The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication)」 *Cell* 106, 95-104.

[1 7] Franco, J., Witkiewicz, A.K. および Knudsen, E.S. (2014) 「CDK4 / 6 阻害剤は、膵がんのモデルにおいて経路選択的治療剤と組み合わせて強力な活性を有する (CDK4/6 inhibitors have potent activity in combination with pathway selective therapeutic agents in models of pancreatic cancer)」 *Oncotarget* 5, 6512-6525.

[1 8] Gabrielli, B.G., Sarcevic, B., Sinnamon, J., Walker, G., Castellano, M., Wang, X.Q. および Eilam, K.A. (1999) 「G2 期細胞周期進行に要求されるサイクリン D - Cdk4 活性は、紫外線照射に誘導された G2 期遅延において阻害される (A cyclin D-Cdk4 activity required for G2 phase cell cycle progression is inhibited in ultraviolet radiation-induced G2 phase delay)」 *J Biol Chem* 274, 13961-13969.

[1 9] Gookin, S., Min, M.W., Phadke, H., Chung, M.Y., Moser, J., Miller, I., Carter, D. および Spencer, S.L. (2017) 「細胞周期進行および細胞周期脱出におけるタンパク質動力学のマップ (A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit)」 *Plos Biology* 15.

[2 0] Grim, J.E. および Clurman, B.E. (2003) 「CDK2 なしで周期を進める? (Cycling without CDK2?)」 *Trends Cell Biol* 13, 396-399.

[2 1] Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V. および Barbacid, M. (2003) 「内因性 K - r a s 癌遺伝子による腫瘍誘導は、細胞の状況に高度に依存する (Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context)」 *Cancer Cell* 4, 111-120.

[2 2] Hata, A.N., Niederst, M.J., Archibald, H.L., Gomez-Caraballo, M., Siddiqui, F.M., Mulvey, H.E., Maruvka, Y.E., Ji, F., Bhang, H.E., Krishnamurthy Radhakrishna, V. ら、(2016) 「腫瘍細胞は、別個の進化経路に従って、上皮成長因子受容体阻害に対して抵抗性になることができる (Tumor cells can follow distinct evolutionary paths to become resistant to epidermal growth factor receptor inhibition)」 *Nature medicine* 22, 262-269.

[2 3] Herrera-Abreu, M.T., Palafox, M., Asghar, U., Rivas, M.A., Cutts, R.J., Garcia-Murillas, I., Pearson, A., Guzman, M., Rodriguez, O., Grueso, J. ら、(2016) 「エストロゲン受容体陽性乳がんにおける CDK4 / 6 阻害に対する初期適応および獲得抵抗性 (Early Adaptation to CDK4/6 Inhibition in ER-Positive Breast Cancer)」 *Cancer Research* 76, 111-120.

10

20

30

40

50

tion and Acquired Resistance to CDK4/6 Inhibition in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer) 」 *Cancer Res* 76, 2301-2313.

[2 4] Hu, M.G. ,

Deshpande, A., Enos, M., Mao, D., Hinds, E.A., Hu, G.F., Chang, R., Guo, Z., Dose, M., Mao, C.ら、(2009) 「胸腺細胞発生および腫瘍発生におけるサイクリン依存性キナーゼ6の要求(A

requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis) 」 *Cancer Res* 69, 810-818.

[2 5] Huttlin, E.L. ,

Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M.E.およびGygi, S.P. (2010) 「マウスタンパク質リン酸化および発現の組織特異的アトラス(A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression) 」 *Cell* 143, 1174-1189.

[2 6] Jonkers, J. ,

Meuwissen, R., van der Gulden, H., Peterse, H., van der Valk, M.およびBerns, A. (2001) 「乳がんのコンディショナルマウスモデルにおけるBRCA2およびp53の相乗的腫瘍抑制活性(Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer) 」 *Nat Genet* 29, 418-425.

[2 7] Kato, J. ,

Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E.およびSherr, C.J. (1993) 「網膜芽細胞腫遺伝子産物(pRb)へのサイクリンDの直接的結合およびサイクリンD依存性キナーゼCDK4によるpRbリン酸化(Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4) 」 *Genes Dev* 7, 331-342.

[2 8] Katsuno, Y. ,

Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D.H., Shimada, M., Niida, H., Mizuno, T., Hanaoka, F.およびNakanishi, M. (2009) 「サイクリンA-Cdk1は、哺乳類細胞における複製起点点火(origin firing)プログラムを調節する(Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells) 」 *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3184-3189.

[2 9] Keyomarsi, K. ,

Tucker, S.L., Buchholz, T.A., Callister, M., Ding, Y., Hortobagyi, G.N., Bedrosian, I., Knickerbocker, C., Toyofuku, W., Lowe, M.ら、(2002) 「乳がん患者におけるサイクリンEおよび生存(Cyclin E and survival in patients with breast cancer) 」 *N Engl J Med* 347, 1566-1575.

[3 0] Khatib, Z.A. ,

Matsushime, H., Valentine, M., Shapiro, D.N., Sherr, C.J.およびLook, A.T. (1993) 「ヒト肉腫におけるMDM2およびG1IとCDK4遺伝子との共増幅(Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and G1I in human sarcomas) 」 *Cancer Res* 53, 5535-5541.

[3 1] Lapek, J.D. ,

Jr., Greninger, P., Morris, R., Amzallag, A., Pruteanu-Malinici, I., Benes, C.H.およびHaas, W. (2017a) 「ハイスループットプロテオミクスによるタンパク質関連ネットワークの調節不全の検出は、がん脆弱性を予測する(Detection of dysregulated protein-association networks by

10

20

30

40

50

high-throughput proteomics predicts cancer vulnerabilities)」Nature biotechnology 35, 983-989.

[3 2] Lapek, J.D., Jr., Lewinski, M.K., Wozniak, J.M., Guatelli, J. および Gonzalez, D.J. (2017b) 「誘導性 HIV - 1 モデルの定量的時間的ピロミクス (Viromics) は、タンパク質 Vpr に関連する網羅的宿主標的およびホスホ動力学に関する洞察をもたらす (Quantitative Temporal Viromics of an Inducible HIV-1 Model Yields Insight to Global Host Targets and Phospho-Dynamics Associated with Protein Vpr)」Molecular & cellular proteomics : MCP 16, 1447-1461. 10

[3 3] Lee, C.L., Moding, E.J., Huang, X., Li, Y., Woodlief, L.Z., Rodrigues, R.C., Ma, Y. および Kirsch, D.G. (2012) 「FRT フランキング p53 マウスにおける Flp リコンビナーゼによる原発性腫瘍の作製 (Generation of primary tumors with Flp recombinase in FRT-flanked p53 mice)」Dis Model Mech 5, 397-402.

[3 4] Lindqvist, A., Rodriguez-Bravo, V. および Medema, R.H. (2009) 「有糸分裂に進む決断：有糸分裂進入ネットワークにおけるフィードバックおよび冗長性 (The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network)」Journal of Cell Biology 185, 193-202. 20

[3 5] Lohka, M.J., Hayes, M.K. および Maller, J.L. (1988) 「初期有糸分裂事象の細胞内調節因子である卵成熟促進因子の精製 (Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events)」Proc Natl Acad Sci U S A 85, 3009-3013.

[3 6] Lundberg, A.S. および Weinberg, R.A. (1998) 「網膜芽細胞腫タンパク質の機能的不活性化は、少なくとも 2 種の別個のサイクリン - cdk 複合体による逐次修飾を要求する (Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes)」Molecular and cellular biology 18, 753-761. 30

[3 7] Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaria, D., Galan, J., Cerezo, A., Ortega, S., Dubus, P. および Barbacid, M. (2004) 「哺乳類細胞は、D 型サイクリン依存性キナーゼ Cdk4 および Cdk6 なしで周期を進める (Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6)」Cell 118, 493-504. 40

[3 8] Massague, J. (2004) 「G1 細胞周期制御およびがん (G1 cell-cycle control and cancer)」Nature 432, 298-306.

[3 9] Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F. および Sherr, C.J. (1992) 「哺乳類 D 型 G1 サイクリンの非定型触媒サブユニット (p34PSK - J3 / cdk4) の同定および特性 (Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins)」Cell 71, 323-334. 50

- [4 0] Matsushime, H., Quelle, D.E., Shurtleff, S.A., Shibuya, M., Sherr, C.J.およびKato, J.Y. (1994) 「哺乳類細胞におけるD型サイクリン依存性キナーゼ活性 (D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells)」 *Mol Cell Biol* 14, 2066-2076.
- [4 1] Merrick, K.A., Wohlbold, L., Zhang, C., Allen, J.J., Horiuchi, D., Huskey, N.E., Goga, A., Shokat, K.M.およびFisher, R.P. (2011) 「ヒト細胞増殖における要件を明らかにするために、低分子によりCdk2のスイッチをオンまたはオフにする (Switching Cdk2 On or Off with Small Molecules to Reveal Requirements in Human Cell Proliferation)」 *Molecular Cell* 42, 624-636. 10
- [4 2] Meyerson, M.およびHarlow, E. (1994) 「新規サイクリンDパートナーであるcdk6のG1キナーゼ活性の同定 (Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner)」 *Mol Cell Biol* 14, 2077-2086.
- [4 3] Mitnacht, S., Lees, J.A., Desai, D., Harlow, E., Morgan, D.O.およびWeinberg, R.A. (1994) 「網膜芽細胞腫タンパク質の別個の亜集団は、リン酸化の別個のパターンを示す (Distinct sub-populations of the retinoblastoma protein show a distinct pattern of phosphorylation)」 *EMBO J* 13, 118-127. 20
- [4 4] Moons, D.S., Jirawatnotai, S., Parlow, A.F., Gibori, G., Kineman, R.D.およびKiyokawa, H. (2002) 「サイクリン依存性キナーゼ4を欠乏するマウスにおける下垂体形成不全および乳腺刺激ホルモン分泌細胞機能不全 (Pituitary hypoplasia and lactotroph dysfunction in mice deficient for cyclin-dependent kinase-4)」 *Endocrinology* 143, 3001-3008.
- [4 5] Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A.およびSutherland, R.L. (2011) 「がんにおける治療標的としてのサイクリンD (Cyclin D as a therapeutic target in cancer)」 *Nat Rev Cancer* 11, 558-572. 30
- [4 6] Narasimha, A.M., Kaulich, M., Shapiro, G.S., Choi, Y.J., Sicinski, P.およびDowdy, S.F. (2014) 「サイクリンDは、モノリン酸化によりRb腫瘍抑制剤を活性化する (Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation)」 *Elife* 3. Ohtani, K., DeGregori, J.およびNevins, J.R. (1995) 「転写因子E2F1によるサイクリンE遺伝子の調節 (Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1)」 *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 12146-12150. 40
- [4 7] Okuda, M., Horn, H.F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A.G., Chan, P.K., Knudsen, E.S., Hofmann, I.A., Snyder, J.D., Bove, K.E.ら、(2000) 「ヌクレオフォスミン/B23は、中心体重複におけるCDK2/サイクリンEの標的である (Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication)」 *Cell* 103, 127-140.
- [4 8] Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M.およびBarbacid, M. (2003) 「サイクリン依存性キナーゼ2は、マウスにおいて減数分裂に必須であるが、有糸 50

分裂の細胞分裂に必須ではない (Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice) 」Nat Genet 35, 25-31.

[4 9] Park, S., Lee,

J., Do, I.G., Jang, J., Rho, K., Ahn, S., Maruja, L., Kim, S.J., Kim, K.M., Mao, M.ら、(2014) 「ゲノムプロファイリングによって同定された難治性横紋筋肉腫における異常 C D K 4 増幅 (Aberrant CDK4 amplification in refractory rhabdomyosarcoma as identified by genomic profiling) 」Sci Rep 4, 3623.

10

[5 0] Petersen, B.O.,

Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J.およびHelin, K. (1999) 「サイクリン A / C D K 2 による哺乳類 C D C 6 のリン酸化は、その細胞下局在を調節する (Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization) 」EMBO J 18, 396-410.

[5 1] Ramirez, M.,

Rajaram, S., Steininger, R.J., Osipchuk, D., Roth, M.A., Morinishi, L.S., Evans, L., Ji, W., Hsu, C.H., Thurley, K.ら、(2016) 「多様な薬物抵抗性機構が、薬物耐性がん存続 (persister) 細胞から出現し得る (Diverse drug-resistance mechanisms can emerge from drug-tolerant cancer persister cells) 」Nature communications 7, 10690.

20

[5 2] Rane, S.G.,

Dubus, P., Mettus, R.V., Galbreath, E.J., Boden, G., Reddy, E.P.およびBarbacid, M. (1999) 「C d k 4 発現の損失は、インスリン欠乏性糖尿病を引き起こし、C d k 4 活性化は、ベータ島細胞肥厚をもたらす (Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia) 」Nat Genet 22, 44-52.

[5 3] Saha, P., Chen,

J., Thome, K.C., Lawlis, S.J., Hou, Z.H., Hendricks, M., Parvin, J.D.およびDutta, A. (1998) 「ヒト C D C 6 / C d c 1 8 は、O r c 1 およびサイクリン - c d k に会合し、S 期開始時に核から選択的に排除される (Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase) 」Mol Cell Biol 18, 2758-2767.

30

[5 4] Sanidas, I.,

Morris, R., Fella, K.A., Rumde, P.H., Boukhali, M., Tai, E.C., Ting, D.T., Lawrence, M.S., Haas, W.およびDyson, N.J. (2019) 「モノリン酸化のコードは、R B の機能をモジュレートする (A Code of Mono-phosphorylation Modulates the Function of RB) 」Mol Cell 73, 985-1000 e1006.

40

[5 5] Santamaria, D.,

Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J.F., Dubus, P., Malumbres, M.およびBarbacid, M. (2007) 「C d k 1 は、哺乳類細胞周期の駆動に十分である (Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle) 」Nature 448, 811-815.

[5 6] Sarcevic, B.,

Lilischkis, R.およびSutherland, R.L. (1997) 「D 1 型、D 3 型、E 型および A 型サイクリン - C D K 複合体による T - 4 7 D ヒト乳がん細胞基質の差次的リン酸化 (Differential phosphorylation of T-47D human breast cancer cell

50

substrates by D1-, D3-, E-, and A-type cyclin-CDK complexes) 」 J Biol Chem 272, 33327-33337.

[5 7] Schwarz, C.,

Johnson, A., Koivomagi, M., Zatulovskiy, E., Kravitz, C.J., Doncic, A.およびSkotheim, J.M. (2018) 「正確な C d k 活性閾値は、制限点の通過を決定する (A Precise Cdk Activity Threshold Determines Passage through the Restriction Point) 」 Mol Cell 69, 253-264 e255.

[5 8] Shaffer, S.M.,

Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M.ら、(2017) 「がん薬物抵抗性の機序としての希少細胞可変性および薬物誘導性リプログラミング (Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance) 」 Nature 546, 431-435. 10

[5 9] Sharma, S.V.,

Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A.ら、(2010) 「がん細胞亜集団におけるクロマチン媒介性可逆的薬物耐性状態 (A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations) 」 Cell 141, 69-80. 20

[6 0] Sherr, C.J.

(1993) 「哺乳類 G 1 サイクリン (Mammalian G1 cyclins) 」 Cell 73, 1059-1065.

[6 1] Sherr, C.J.

(1994) 「G 1 期進行: タイミング良く周期を進める (G1 phase progression: cycling on cue) 」 Cell 79, 551-555.

[6 2] Sherr, C.J.およびRoberts, J.M. (2004) 「サイクリンおよびサイクリン依存性キナーゼありまたはなしで生きる (Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases) 」 Genes Dev 18, 2699-2711. 30

[6 3] Spencer, S.L.,

Cappell, S.D., Tsai, F.C., Overton, K.W., Wang, C.L.およびMeyer, T. (2013) 「増殖 - 静止状態の決断は、有糸分裂脱出における C D K 2 活性の分岐によって制御される (The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit) 」 Cell 155, 369-383.

[6 4] Tetsu, O.およびMcCormick, F. (2003) 「C D K 2 阻害にもかかわらず起こるがん細胞の増殖 (Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition) 」 Cancer Cell 3, 233-245.

[6 5] Wohlbold, L.,

Merrick, K.A., De, S., Amat, R., Kim, J.H., Larochele, S., Allen, J.J., Zhang, C., Shokat, K.M., Petrini, J.H.ら、(2012) 「化学遺伝学は、DNA 損傷応答における C d k 2 活性のための特異的な要件を明らかにし、ヒト細胞における C d k 2 基質として N b s 1 を同定する (Chemical genetics reveals a specific requirement for Cdk2 activity in the DNA damage response and identifies Nbs1 as a Cdk2 substrate in human cells) 」 PLoS Genet 8, e1002935. 40

[6 6] Xu, T., Park,

S.K., Venable, J.D., Wohlschlegel, J.A., Diedrich, J.K., Cociorva, D., Lu, B., Liao, L., Hewel, J., Han, X.ら、(2015) 「P r o L u C I D : 増強された感度および特異度を有する改善された S E Q U E S T 様アルゴリズム (ProLuCID: An improved SEQUES 50

T-like algorithm with enhanced sensitivity and specificity) 」 Journal of proteomics 129, 16-24.

[6 7] Yang, C., Li,

Z., Bhatt, T., Dickler, M., Giri, D., Scaltriti, M., Baselga, J., Rosen, N.およびChandarlapaty, S. (2017a) 「獲得されたCDK6増幅は、CDK4/6阻害剤に対する乳がん抵抗性ならびにERシグナリングおよび依存性の損失を促進する (Acquired CDK6 amplification promotes breast cancer resistance to CDK4/6 inhibitors and loss of ER signaling and dependence) 」 Oncogene 36, 2255-2264.

10

[6 8] Yang, H.W.,

Chung, M., Kudo, T.およびMeyer, T.

(2017b) 「マイトジェンおよびp53シグナリングの競合記憶は、細胞周期進入を制御する (Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry) 」 Nature 549, 404-408.

[6 9] Yang, K.,

Hitomi, M.およびStacey, D.W.

(2006) 「細胞周期を通じたサイクリンD1レベルの変動は、細胞の増殖性運命を決定する (Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell) 」 Cell

20

Div 1.

[7 0] Zerjatke, T.,

Gak, I.A., Kirova, D., Fuhrmann, M., Daniel, K., Gonciarz, M., Muller, D., Glauche, I.およびMansfeld, J.

(2017) 「細胞トラッキングおよび分類のための内因性オールインワンレポーターに基づく定量的細胞周期解析 (Quantitative Cell Cycle Analysis Based on an Endogenous All-in-One

Reporter for Cell Tracking and Classification) 」 Cell Reports 19, 1953-1966.

[7 1] Zhao, J.,

Kennedy, B.K., Lawrence, B.D., Barbie, D.A., Matera, A.G., Fletcher, J.A.およびHarlow, E. (2000) 「NPATは、サイクリンE-Cdk2を複製依存性ヒストン遺伝子転写の調節に関連付ける (NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent

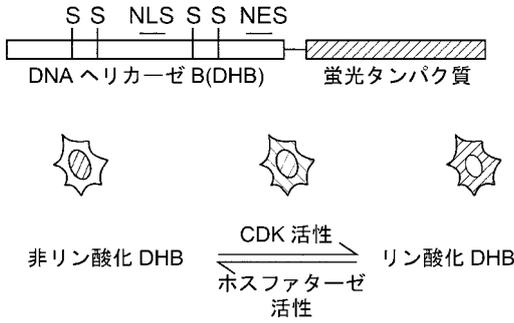
30

histone gene transcription) 」 Genes

Dev 14, 2283-2297.

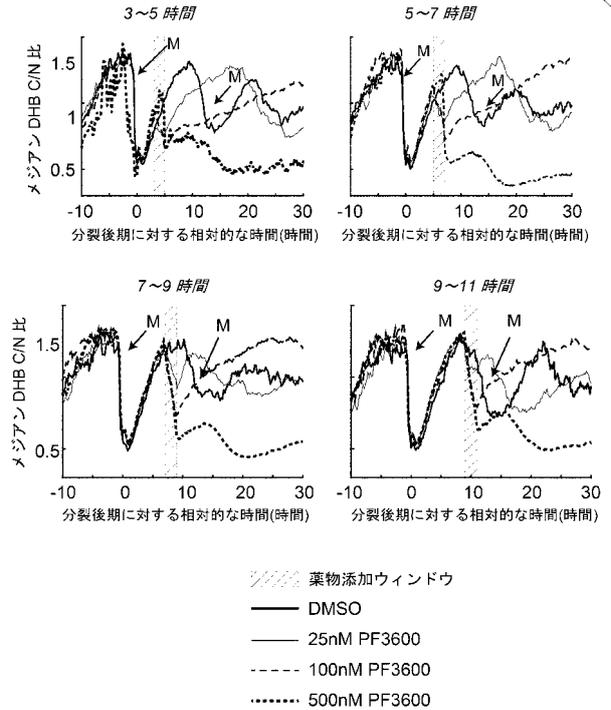
【 図 1 - 1 】

図 1A



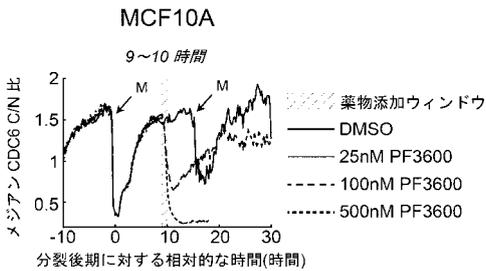
【 図 1 - 2 】

図 1B



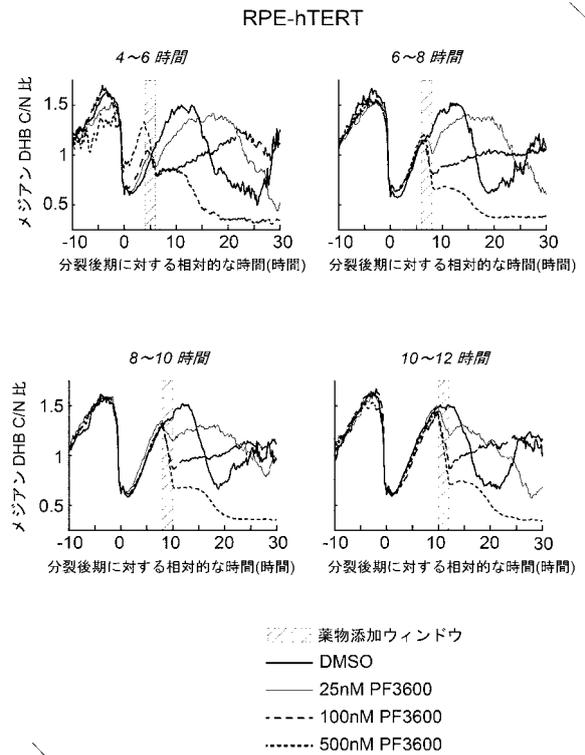
【 図 1 - 3 】

図 1C



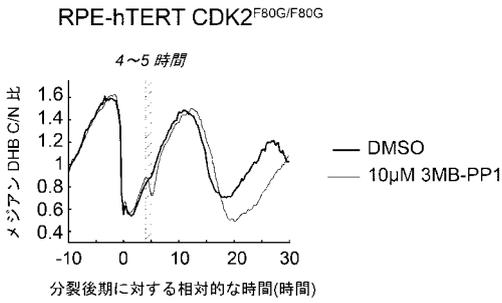
【 図 1 - 4 】

図 1D



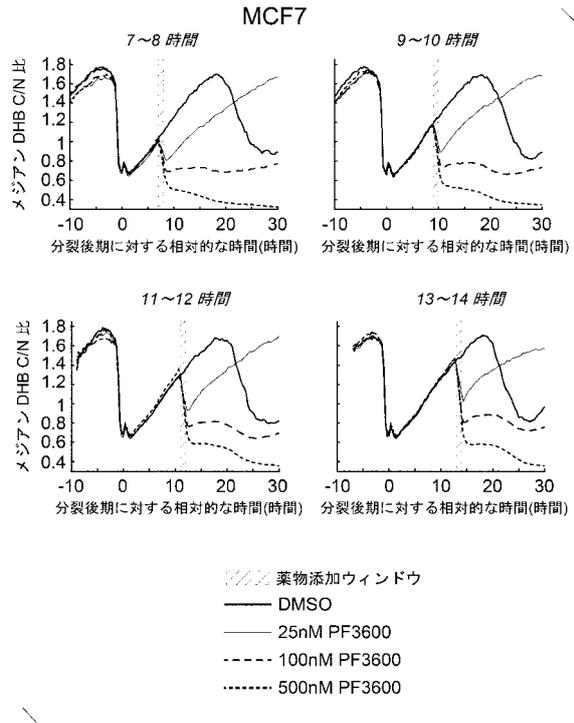
【 図 1 - 5 】

図 1E



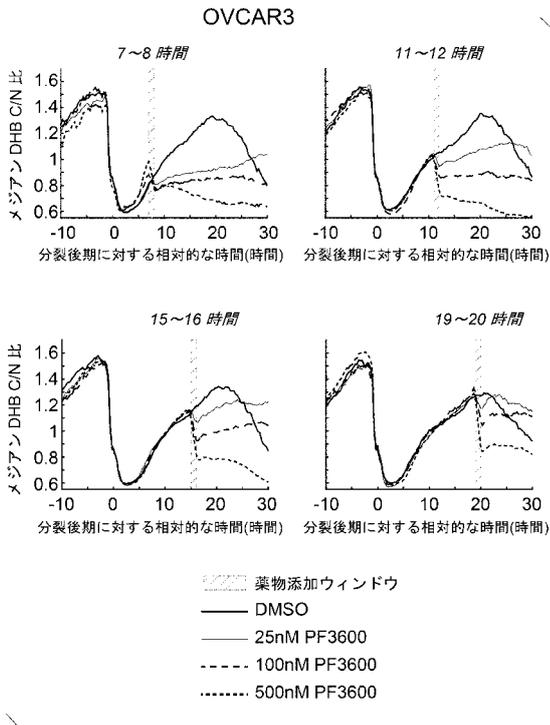
【 図 1 - 6 】

図 1F



【 図 1 - 7 】

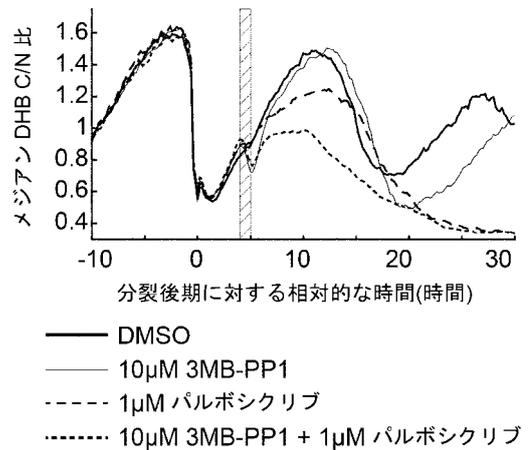
図 1G



【 図 2 - 1 】

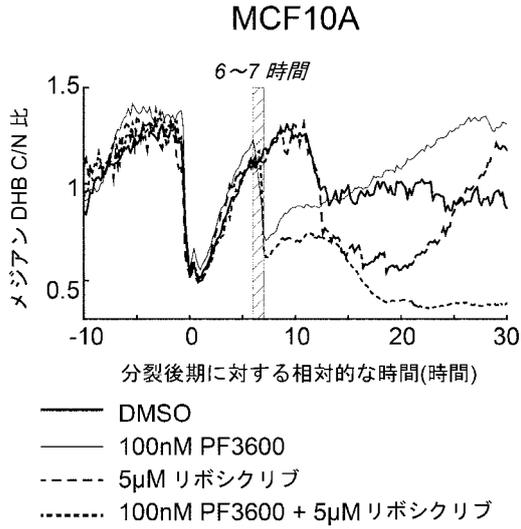
図 2A

RPE-hTERT CDK2^{F80G/F80G}



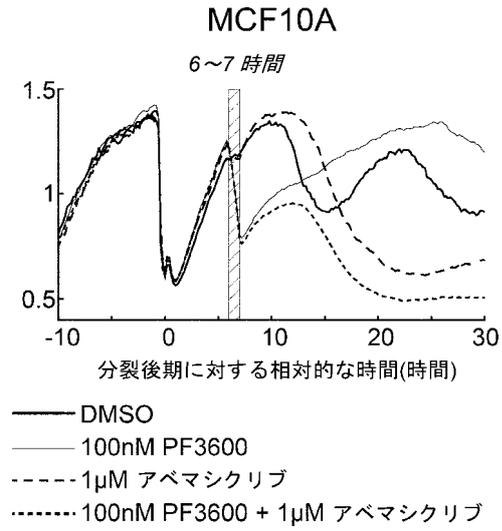
【 図 2 - 2 】

図 2B



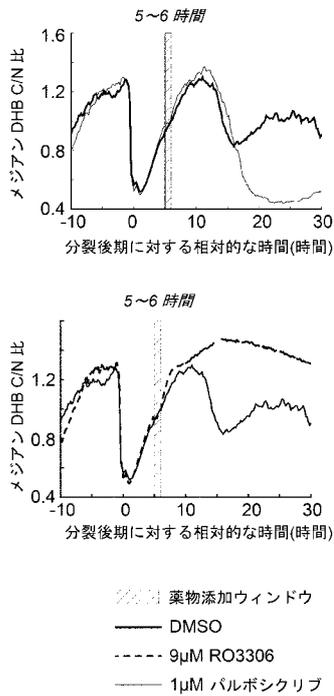
【 図 2 - 3 】

図 2C



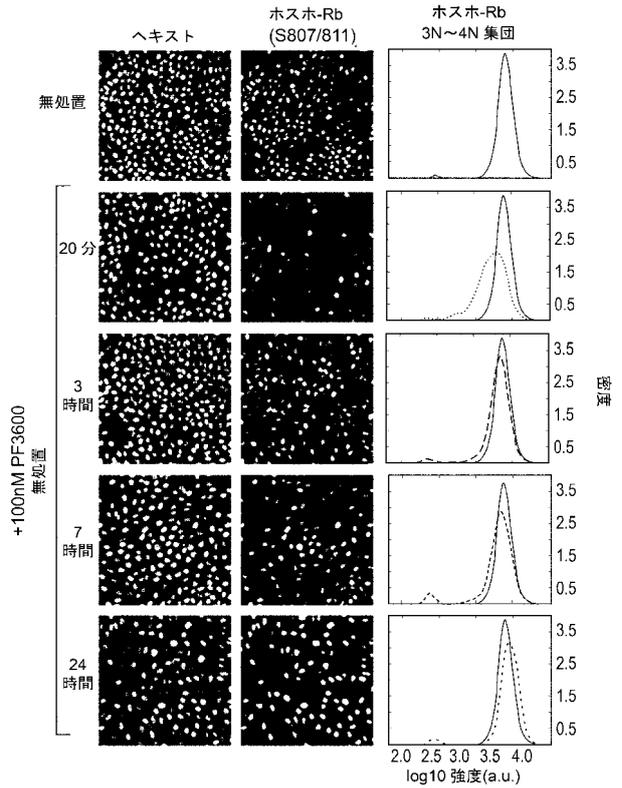
【 図 3 】

図 3

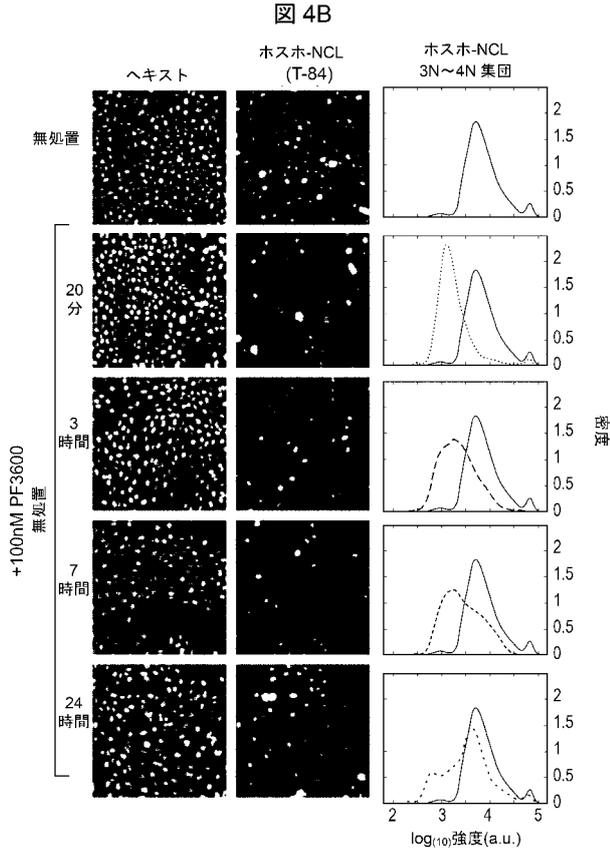


【 図 4 - 1 】

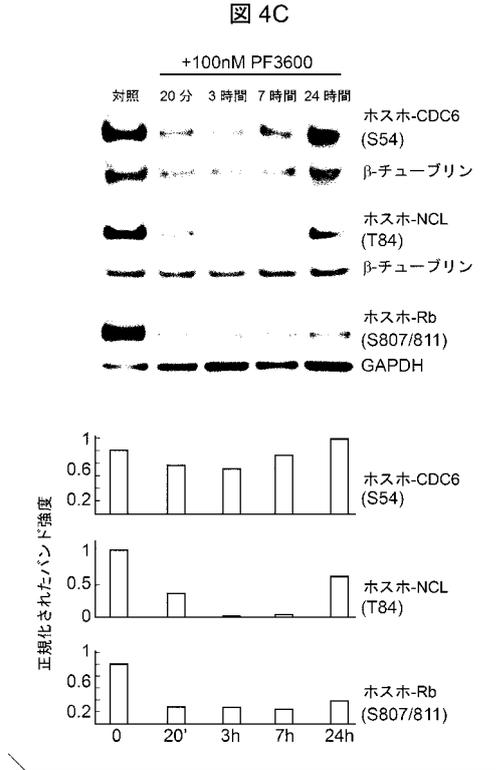
図 4A



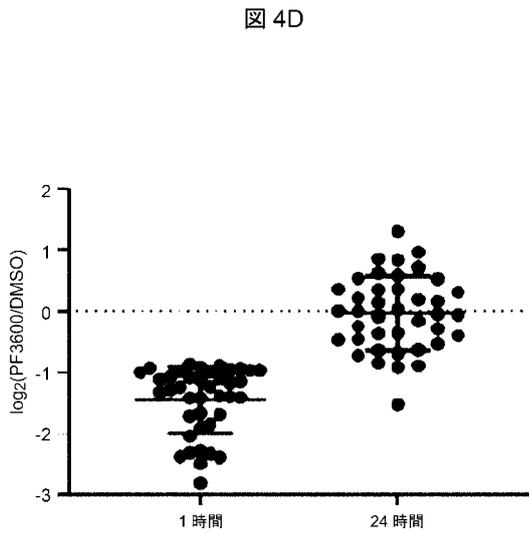
【 図 4 - 2 】



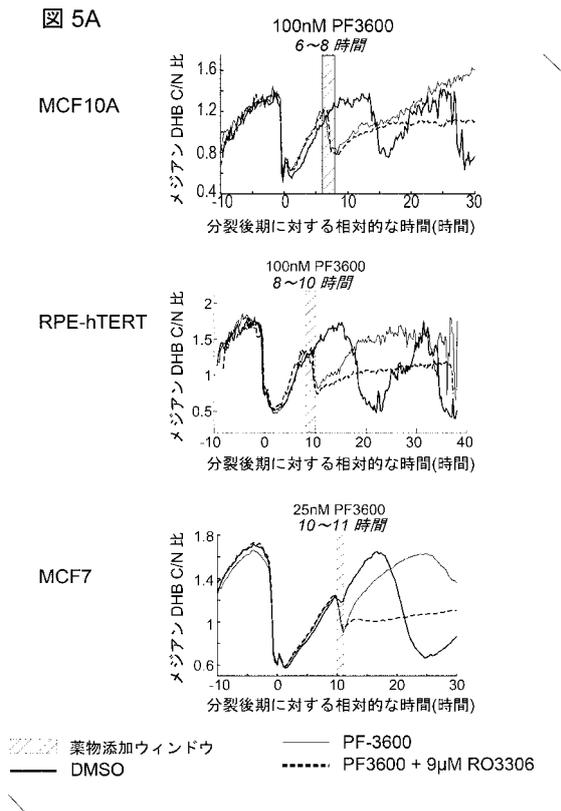
【 図 4 - 3 】



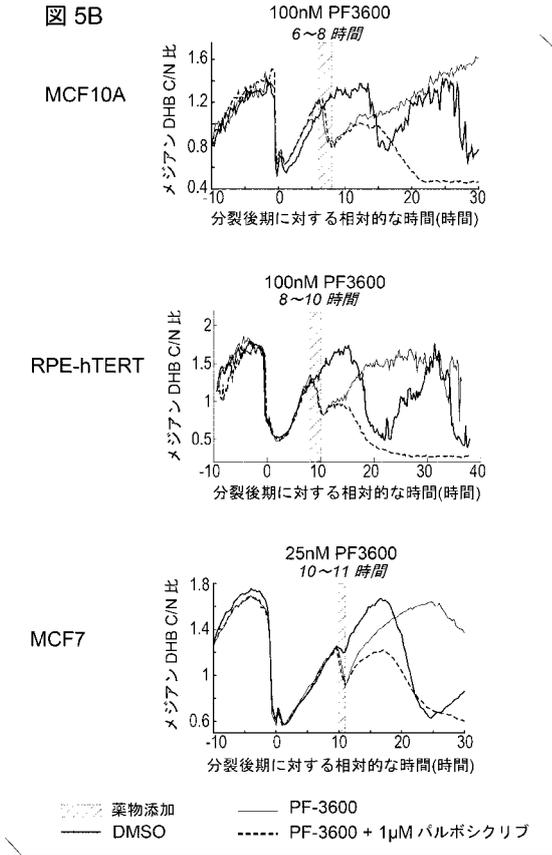
【 図 4 - 4 】



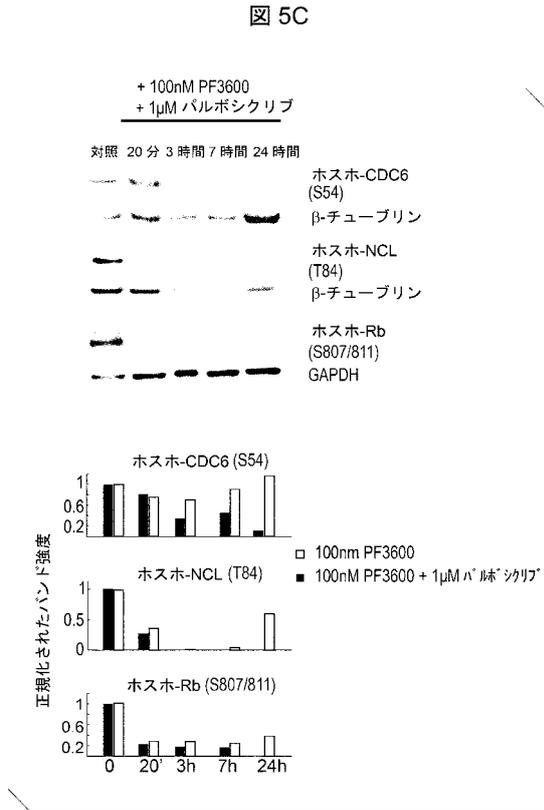
【 図 5 - 1 】



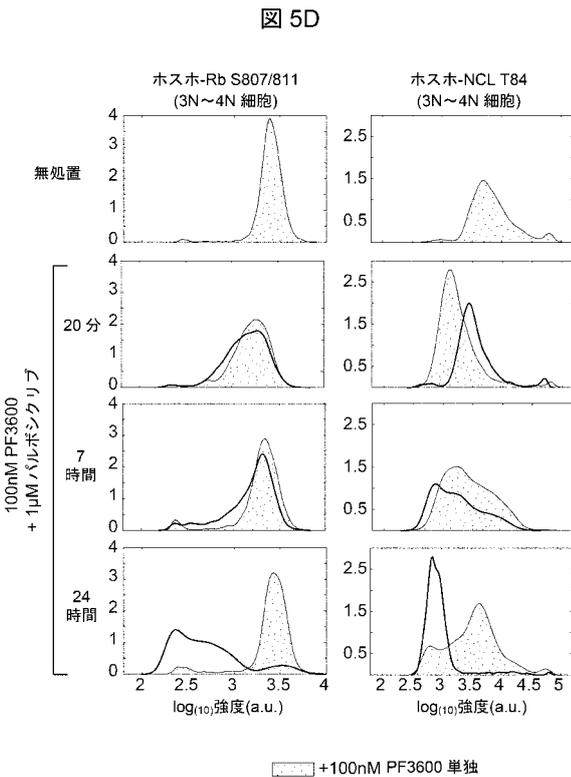
【 図 5 - 2 】



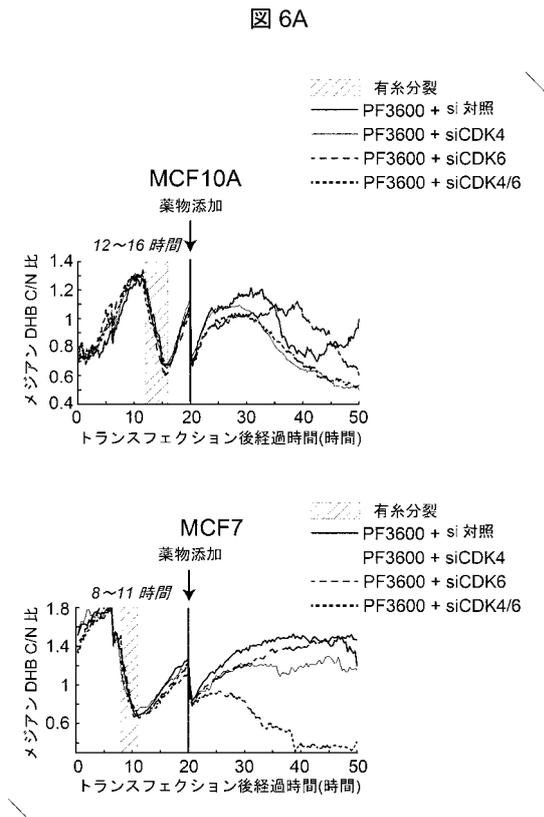
【 図 5 - 3 】



【 図 5 - 4 】

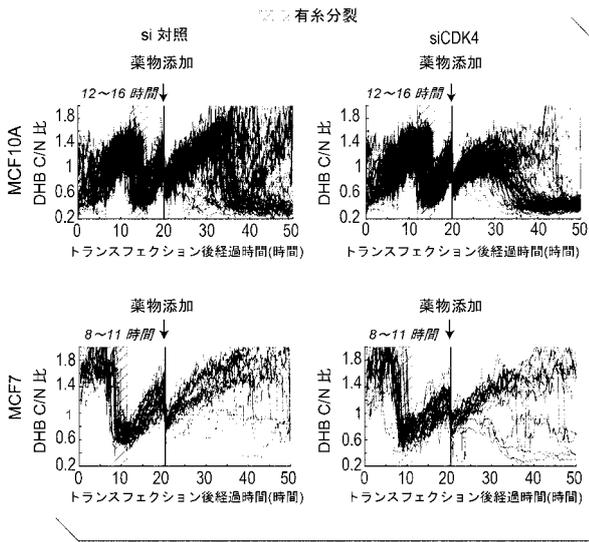


【 図 6 - 1 】



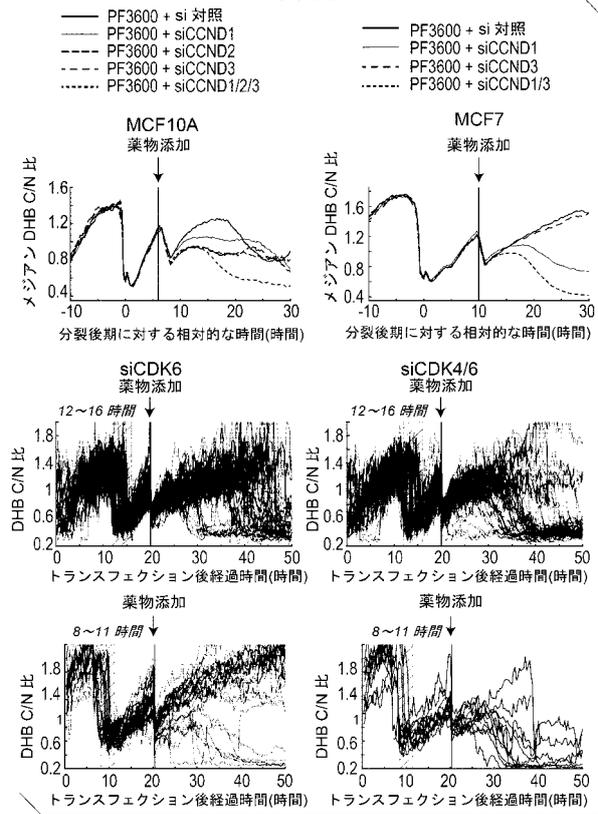
【 図 6 - 2 】

図 6B



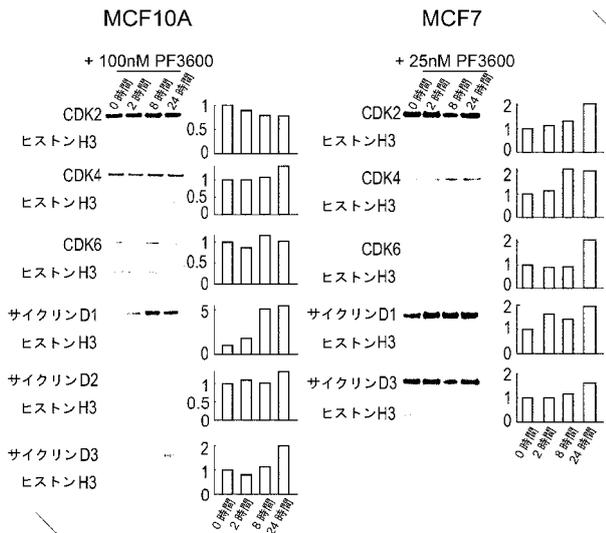
【 図 6 - 3 】

図 6C



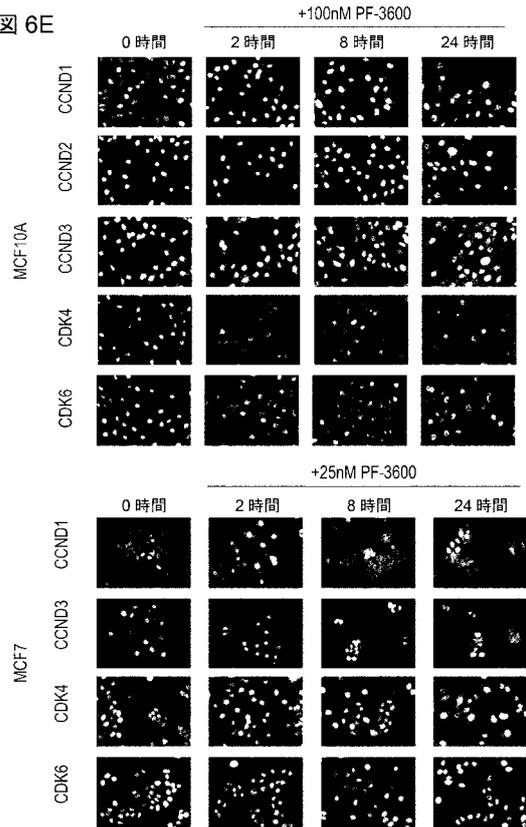
【 図 6 - 4 】

図 6D



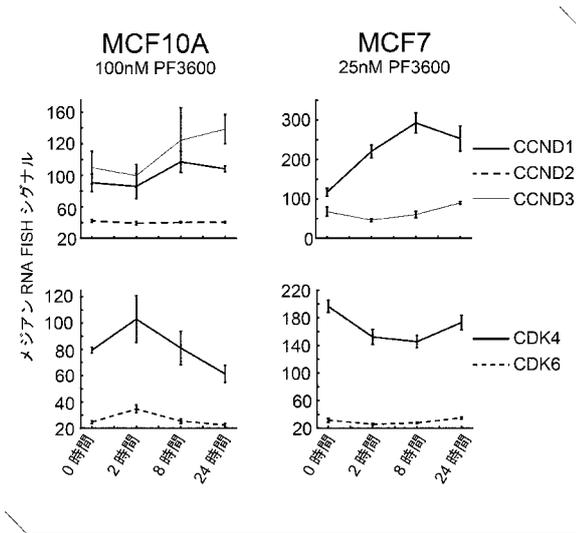
【 図 6 - 5 】

図 6E



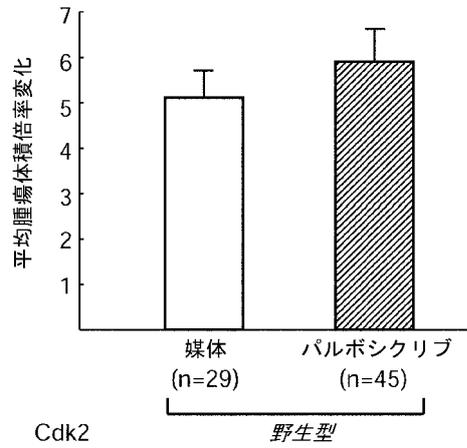
【 図 6 - 6 】

図 6F



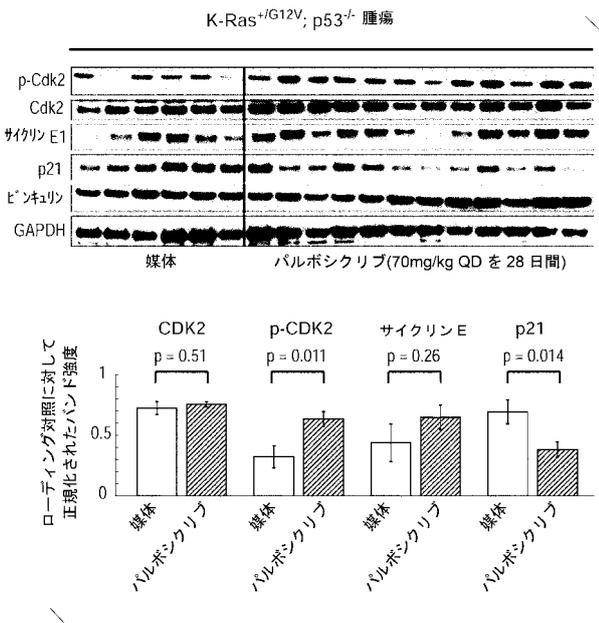
【 図 7 - 1 】

図 7A



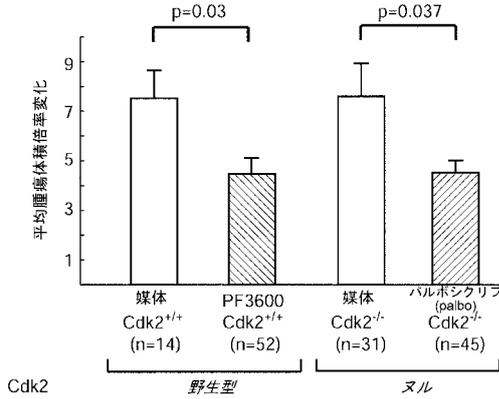
【 図 7 - 2 】

図 7B



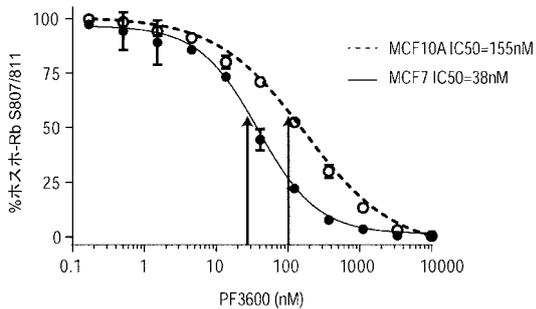
【 図 7 - 3 】

図 7C



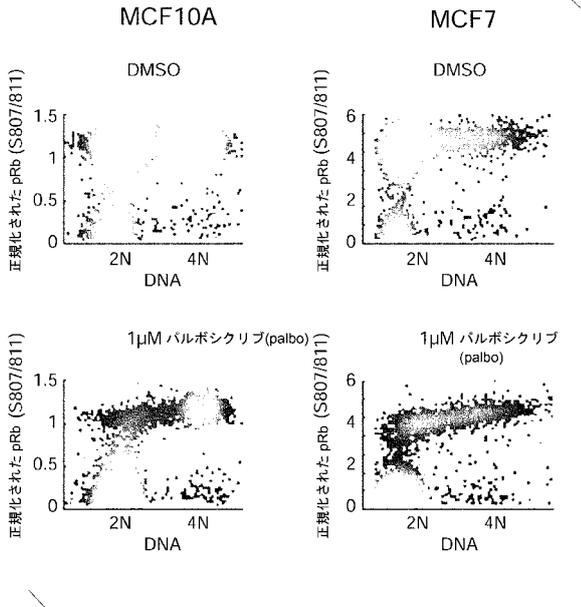
【 図 8 - 1 】

図 8A



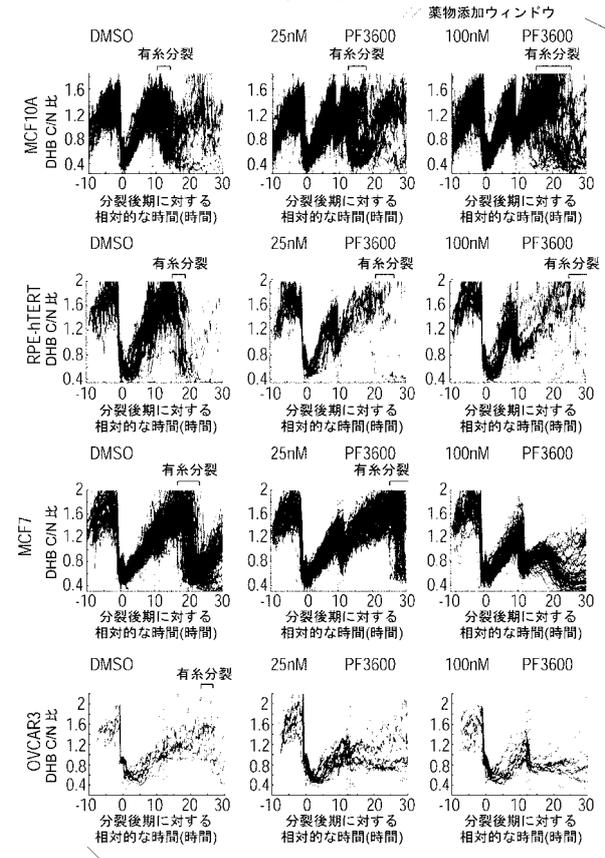
【 図 8 - 2 】

図 8B



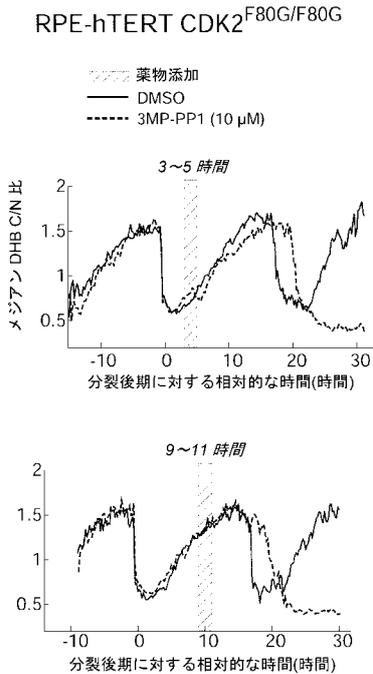
【 図 8 - 3 】

図 8C



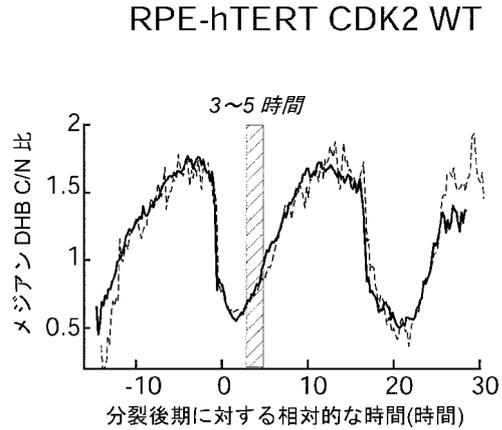
【 図 9 - 1 】

図 9A



【 図 9 - 2 】

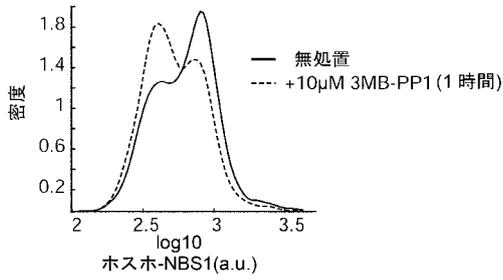
図 9B



【 図 9 - 3 】

図 9C

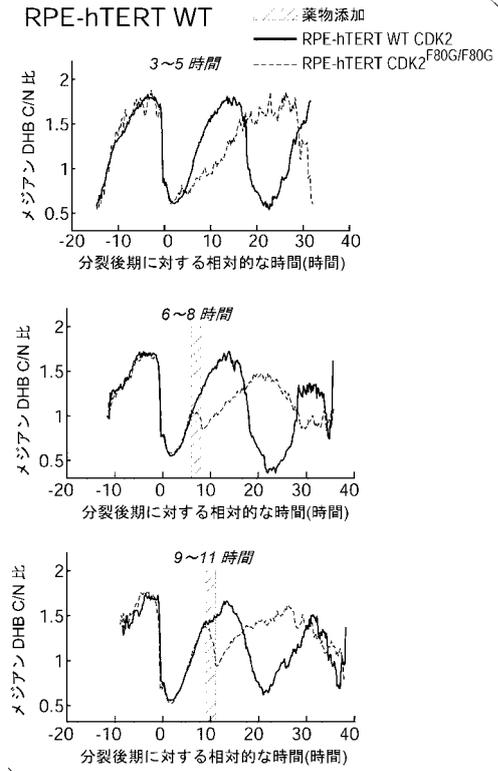
RPE-hTERT CDK2^{F80G/F80G}



【 図 9 - 4 】

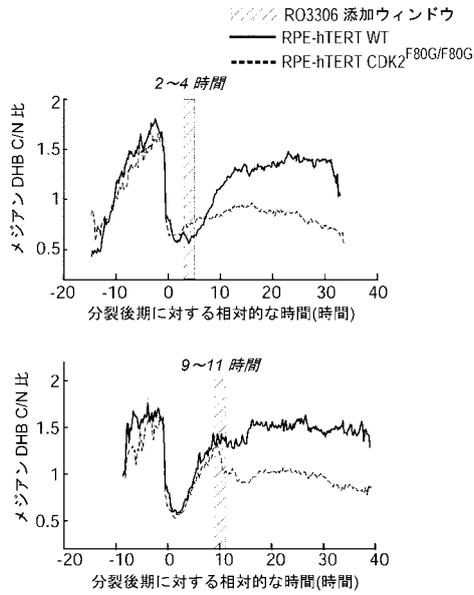
図 9D

RPE-hTERT WT



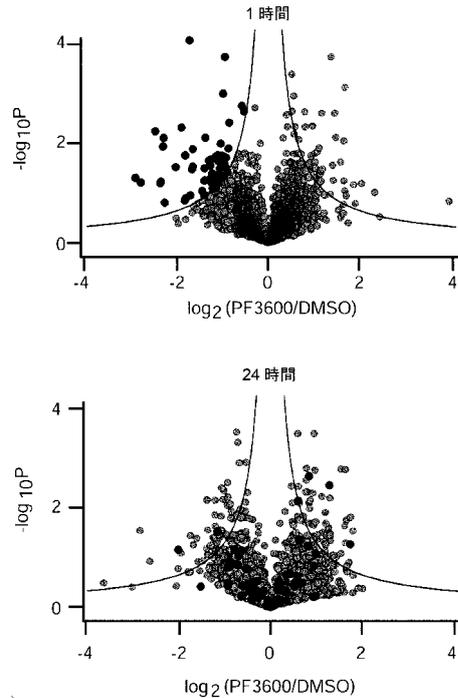
【 図 9 - 5 】

図 9E



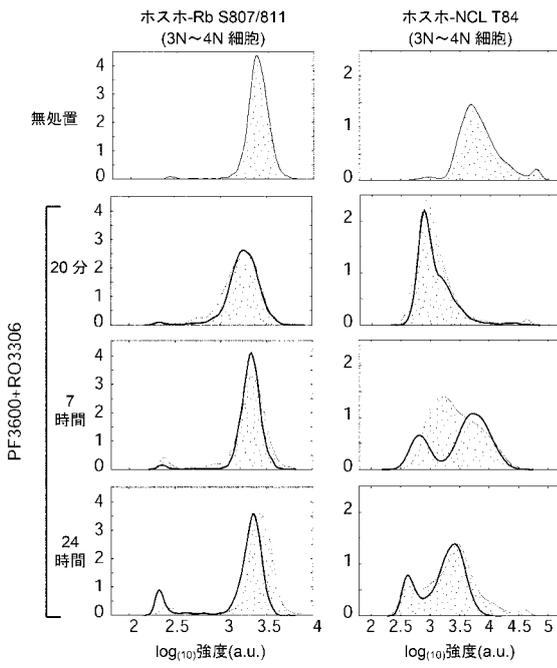
【 図 9 - 6 】

図 9F



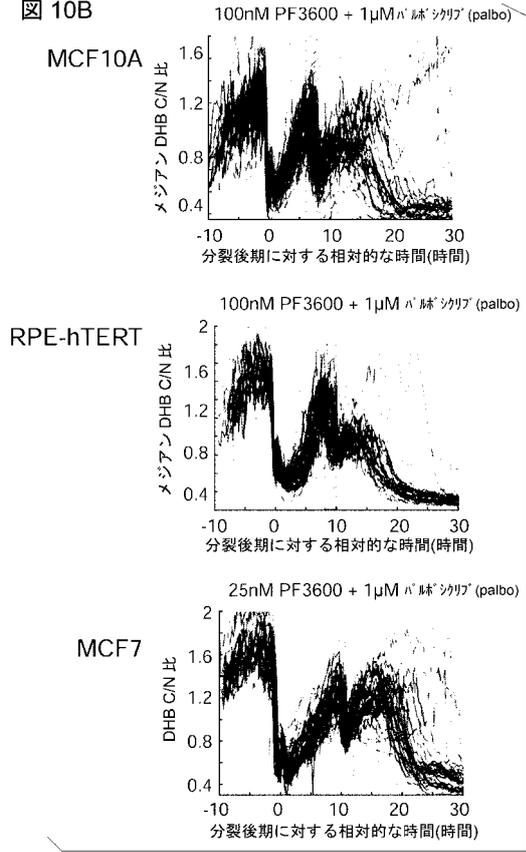
【 図 1 0 - 1 】

図 10A

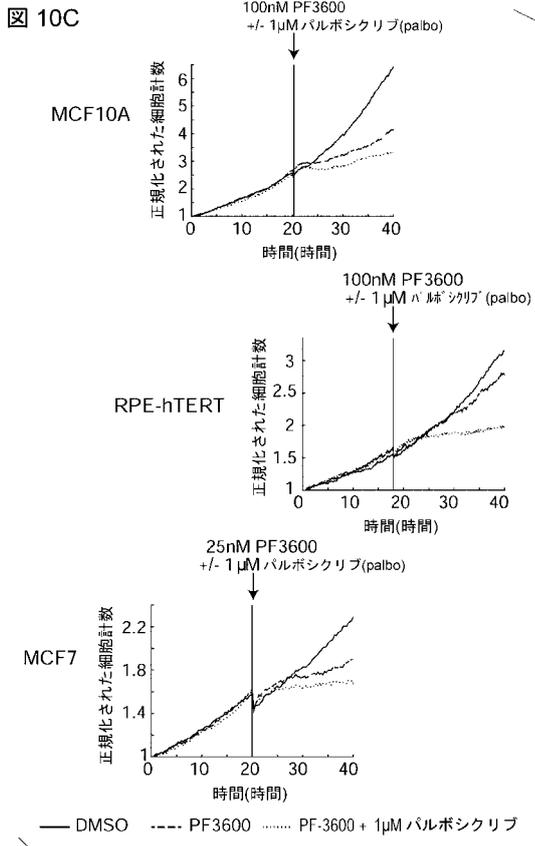


【 図 1 0 - 2 】

図 10B

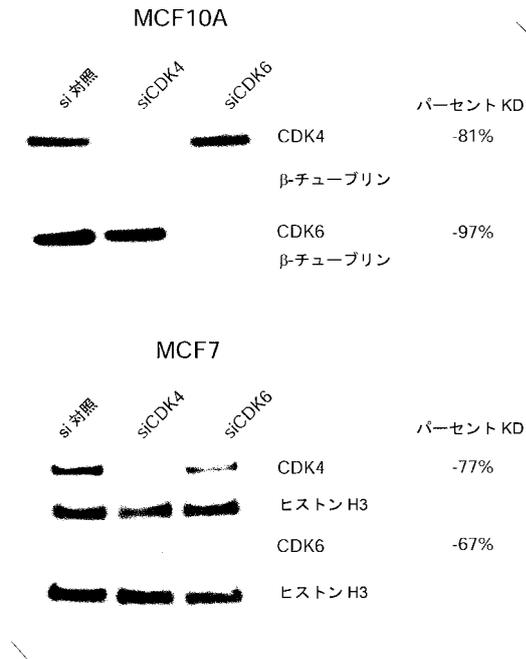


【 図 1 0 - 3 】



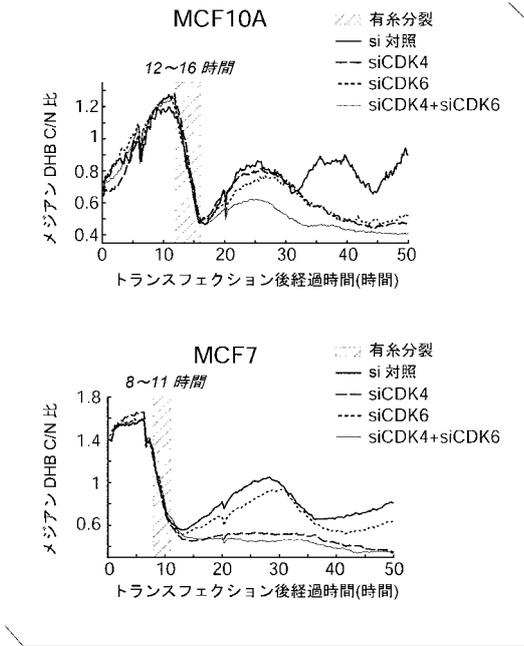
【 図 1 1 - 1 】

図 11A



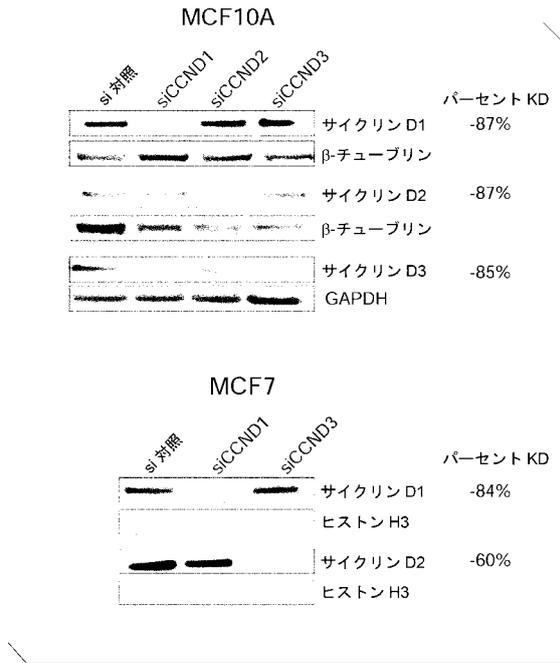
【 図 1 1 - 2 】

図 11B



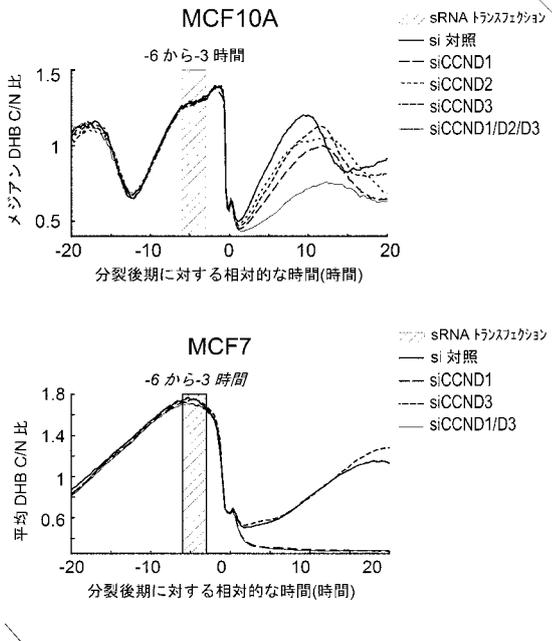
【 図 1 1 - 3 】

図 11C



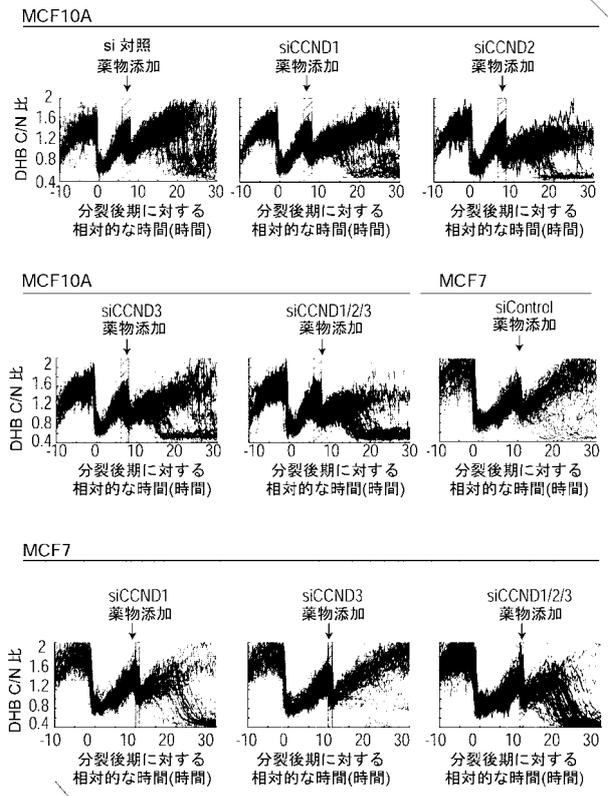
【 図 1 1 - 4 】

図 11D



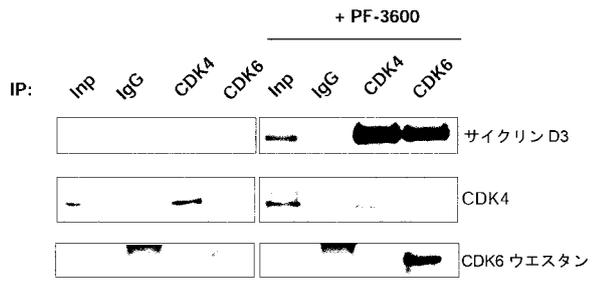
【 図 1 1 - 5 】

図 11E



【 図 1 1 - 6 】

図 11F



【 配列表 】

2021167301000001.app

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 K 31/4045 (2006.01) A 6 1 K 31/4045

(71)出願人 308032460
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ コロラド, ア ボディー コーポレート
 THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF COLORADO, a
 body corporate
 アメリカ合衆国 コロラド 80203, デンバー, グラント ストリート 1800, 8
 ティーエイチ フロアー

(74)代理人 100133927
 弁理士 四本 能尚

(74)代理人 100147186
 弁理士 佐藤 真紀

(74)代理人 100174447
 弁理士 龍田 美幸

(74)代理人 100185960
 弁理士 池田 理愛

(72)発明者 マンシ アローラ
 アメリカ合衆国 01701 マサチューセッツ州 フレーミングハム市 ラウンドトップ・ロー
 ド 100

(72)発明者 ステファン ジョージ ダン
 アメリカ合衆国 92064 カリフォルニア州 パウウェイ市 セント・アンドリュース・ドラ
 イブ 17124

(72)発明者 ニコル リー グッドマン ミラー
 アメリカ合衆国 92064 カリフォルニア州 パウウェイ市 ロス・ナイトス・アヴェニュー
 14129

(72)発明者 サブリナ スペンサー
 アメリカ合衆国 80302 コロラド州 ボールダー市 トゥエンティ・セカンド・ストリート
 1836

(72)発明者 トッド リー ヴァナデル
 アメリカ合衆国 92121 カリフォルニア州 サン・ディエゴ市 サイエンス・ドライブ 1
 0777 ファイザー・インク内

F ターム(参考) 4C084 AA20 NA05 ZB261 ZB262 ZC201 ZC202
 4C086 AA01 AA02 BC13 BC50 CB05 CB09 GA07 GA08 GA12 MA02
 MA04 NA05 ZB26

【外国語明細書】
2021167301000001.pdf