

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-175773

(P2023-175773A)

(43)公開日 令和5年12月12日(2023.12.12)

| | | | | |
|-----------------------------------|---------------|-------|-------|--|
| (51)国際特許分類 | F I | | | |
| A 6 1 K 38/18 (2006.01) | A 6 1 K 38/18 | | | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | | Z N A | |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | | | |
| A 6 1 P 35/04 (2006.01) | A 6 1 P 35/04 | | | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 2 1 | | |
| 審査請求 有 請求項の数 21 O L (全93頁) 最終頁に続く | | | | |

| | | | |
|-------------------|-----------------------------|---------|----------------------|
| (21)出願番号 | 特願2023-147297(P2023-147297) | (71)出願人 | 513321467 |
| (22)出願日 | 令和5年9月12日(2023.9.12) | | アイカーン スクール オブ メディシン |
| (62)分割の表示 | 特願2020-551836(P2020-551836) | | アット マウント サイナイ |
| |)の分割 | | アメリカ合衆国 ニューヨーク州 ニュー |
| 原出願日 | 平成31年3月26日(2019.3.26) | | ヨーク ワン グスタフ エル . レビー |
| (31)優先権主張番号 | 62/648,166 | | プレイス |
| (32)優先日 | 平成30年3月26日(2018.3.26) | (74)代理人 | 100102978 |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | 弁理士 清水 初志 |
| | | (74)代理人 | 100205707 |
| | | | 弁理士 小寺 秀紀 |
| (特許庁注：以下のものは登録商標) | | (74)代理人 | 100160923 |
| 1 . B R I J | | | 弁理士 山口 裕孝 |
| | | (74)代理人 | 100119507 |
| | | | 弁理士 刑部 俊 |
| | | (74)代理人 | 100142929 |
| | | | 最終頁に続く |

(54)【発明の名称】 微小残存がんを治療する方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】対象内の微小残存がんを治療する方法を提供する。

【解決手段】方法は、対象内の播種性がん細胞(DCC)を骨形成タンパク質7(BMP7)誘導体タンパク質と接触させる段階であって、該対象の接触させた該DCCの休眠を誘導または維持して該対象内の微小残存がんを治療する、該段階を含む。対象内のDCCを、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質と接触させる段階であって、該対象のDCCを根絶して該対象内の微小残存がんを治療する、該段階を含む、方法も開示する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象内の播種性がん細胞（DCC）を骨形成タンパク質7（「BMP7」）誘導体タンパク質と接触させる段階であって、該対象の接触させた該DCCの休眠を誘導または維持して該対象内の微小残存がんを治療する、該段階を含む、対象内の微小残存がんを治療する方法。

【請求項 2】

前記対象が、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マントル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、または結腸直腸がん
10

【請求項 3】

前記がんが、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん（DCIS）、非浸潤性小葉がん（LCIS）、および炎症性乳がんから選択される乳がんである、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記乳がんがHER2⁺乳がんである、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象が、播種性腫瘍細胞および/または非転移性がんとして診断されている、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記BMP7誘導体がBMP7-F9である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
20

【請求項 7】

前記対象に化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））およびラパチニブ（タイケルブ（登録商標））から選択される抗HER2化学療法剤である、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択される、請求項7に記載の方法。
30

【請求項 10】

前記対象に免疫療法剤が投与され、かつ該免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択される、請求項7に記載の方法。

【請求項 11】

前記対象にエピジェネティック作用物質が投与され、かつ該エピジェネティック作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコーム抑制複合体2サブユニット（EZH2）阻害物質、プロモドメイン（BRD）阻害物質、およびそれらの誘導体から選択される、請求項7に記載の方法。
40

【請求項 12】

前記接触させる段階が、前記BMP7誘導体タンパク質を前記対象に投与することにより実行される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記接触させる段階の前に、前記対象内のDCCの存在を検出する段階をさらに含む、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記DCCがNR2F1⁺である、請求項13に記載の方法。
50

【請求項 15】

前記DCCが骨形成タンパク質受容体陽性（「BMPR+」）である、請求項13または請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記DCCがホスホ-PERK活性である、請求項13～15のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記対象内のDCCを、プロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ（PERK）阻害物質、MEK阻害物質、CDK4/6阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる段階をさらに含む、請求項1～16のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記接触させる段階が、PERK阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、請求項17に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記接触させる段階が、LY2、LY3、LY4、およびそれらの組み合わせから選択されるPERK阻害物質を用いて実行される、請求項17または請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記接触させる段階が、EIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しないPERK阻害物質を用いて実行される、請求項17～19のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

前記接触させる段階が、MEK阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、請求項17に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記MEK阻害物質が、PD184352、PD318088、PD98059、PD334581、RDEA119/BAY 869766から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記接触させる段階が、CDK4/6阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、請求項17に記載の方法。

【請求項 24】

前記CDK4/6阻害物質が、アベマシクリブ（LY2835219）、パルボシクリブ（PD0332991）、およびリボシクリブ（LEE011）から選択される、請求項23に記載の方法

30

【請求項 25】

前記対象がヒトである、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記接触させる段階の前に、がん寛解状態の対象を選択する段階をさらに含む、請求項1～25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

対象内の播種性がん細胞（DCC）を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ（PERK）阻害物質と接触させる段階であって、該対象内のDCCを根絶して該対象内の微小残存がんを治療する、該段階を含む、対象内の微小残存がんを治療する方法。

40

【請求項 28】

前記対象が、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マンデル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、または結腸直腸がんと診断されている、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

前記がんが、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん（DCIS）、非浸潤性小葉がん（LCIS）、および炎症性乳がんから選択される乳がんである、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

50

前記乳がんがHER2⁺乳がんである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記対象が、播種性腫瘍細胞および/または非転移性がんと診断されている、請求項27に記載の方法。

【請求項32】

前記対象に化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含む、請求項27～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））およびラパチニブ（タイケルブ（登録商標））から選択される抗HER2化学療法剤である、請求項32に記載の方法。 10

【請求項34】

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項35】

前記対象に免疫療法剤が投与され、かつ該免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択される、請求項32に記載の方法。

【請求項36】

前記対象にエピジェネティック作用物質が投与され、かつ該エピジェネティック作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコム抑制複合体2サブユニット（EZH2）阻害物質、プロモドメイン（「BRD」）阻害物質、およびそれらの誘導体から選択される、請求項32に記載の方法。 20

【請求項37】

前記接触させる段階が、前記PERK阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、請求項27～36のいずれか一項に記載の方法。

【請求項38】

前記接触させる段階の前に、前記対象内のDCCの存在を検出する段階をさらに含む、請求項27～37のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項39】

前記DCCがNR2F1⁺である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記DCCがホスホ-PERK活性である、請求項38または請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記DCCが骨形成タンパク質受容体陽性（「BMPR⁺」）である、請求項38～40のいずれか一項に記載の方法。

【請求項42】

前記対象内のDCCを骨形成タンパク質7（BMP7）誘導体タンパク質と接触させる段階をさらに含む、請求項41に記載の方法。 40

【請求項43】

前記対象内のDCCをBMP7誘導体タンパク質と接触させる段階が、該BMP7誘導体タンパク質を該対象に投与することにより実行される、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

前記BMP7誘導体タンパク質がBMP7-F9である、請求項42または請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記PERK阻害物質が、EIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しない、請求項27～44のいずれか一項に記載の方法。 50

【請求項 46】

前記対象がヒトである、請求項27～45のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

前記接触させる段階の前に、がん寛解状態の対象を選択する段階をさらに含む、請求項27～46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】

本願は、2018年3月26日に出願された米国特許仮出願第62/648,166号の優先権の恩典を主張するものであり、同仮出願は、参照により全文が本明細書に組み入れられる。

10

【0002】

本発明は、米国国立保健研究所/国立がん研究所からR01 CA109182号、U54 CA16131号、およびP30 CA196521号として、ならびに米国国防総省のCongressionally Directed Medical Research ProgramsからBC 132674号として授与された政府支援を得てなされた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0003】

分野

本開示は、対象内の微小残存がんを治療する方法に関する。

【背景技術】

【0004】

20

背景

小胞体（「ER」）管腔におけるタンパク質の折り畳み不全は、3つの主要経路、PERK、IRE1、およびATF6を活性化し、それは小胞体ストレス応答（「UPR」）としても知られ、細胞がこのストレスを補正して生存することを可能にする（Walter et al., "The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation," *Science* 334:1081-1086 (2011)およびRon et al., "Signal Integration In the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:519-529 (2007)）。最近のエビデンスによれば、さまざまなタイプのがんにおいて、各種シグナルのなかでもUPRはとくに、腫瘍細胞ががん遺伝子および低酸素を原因とする増大した転写負荷により課されるERへの要求および酸化条件に

応答するのを可能にする機構である（Blais et al., "Activating Transcription Factor 4 is Translationally Regulated by Hypoxic Stress," *Mol. Cell. Biol.* 24:7469-7482 (2004); Chevet et al., "Endoplasmic Reticulum Stress-Activated Cell Reprogramming in Oncogenesis," *Cancer Discov.* 5:586-597 (2015); Tameire et al., "Cell Intrinsic and Extrinsic Activators of the Unfolded Protein Response in Cancer: Mechanisms and Targets for Therapy," *Semin. Cancer Biol.* 33:3-15 (2015); Hart et al., "ER Stress-Mediated Autophagy Promotes Myc-Dependent Transformation and Tumor Growth," *J. Clin. Invest.* 122:4621-4634 (2012); Martin-Perez et al., "Activated ERBB2/HER2 Licenses Sensitivity to Apoptosis Upon Endoplasmic Reticulum Stress Through a PERK-Dependent Pathway," *Cancer Res.* 74:1766-1777 (2014); Rajasekhar et al., "Postgenomic Global Analysis of Translational Control Induced by Oncogenic Signaling," *Oncogene* 23:3248-3264 (2004); Rajasekhar et al., "Oncogenic Ras and Akt Signaling Contribute to Glioblastoma Formation by Differential Recruitment of Existing mRNAs to Polysomes," *Mol. Cell* 12:889-901 (2003); Rojo et al., "4E-Binding Protein 1, A Cell Signaling Hallmark in Breast Cancer that Correlates With Pathologic Grade and Prognosis," *Clin. Cancer Res.* 13:81-89 (2007);およびSequeira et al., "Inhibition of eIF2alpha Dephosphorylation Inhibits ErbB2-Induced Deregulation of Mammary Acinar Morphogenesis," *BM*

30

40

50

C Cell Biol. 10:64 (2009))。がん遺伝子により活性化した経路は、mTORシグナリングの活性化および翻訳開始によって、ERクライアントタンパク質負荷を増加させる (Hart et al., "ER Stress-Mediated Autophagy Promotes Myc-Dependent Transformation and Tumor Growth," J. Clin. Invest. 122:4621-4634 (2012); Ozcan et al., "Loss of the Tuberous Sclerosis Complex Tumor Suppressors Triggers the Unfolded Protein Response to Regulate Insulin Signaling and Apoptosis," Mol. Cell 29:541-551 (2008); および Tameire et al., "Cell Intrinsic and Extrinsic Activators of the Unfolded Protein Response in Cancer: Mechanisms and Targets for Therapy," Semin. Cancer Biol. 33:3-15 (2015))。PERK および IRE1 -XBP-1 経路は、低酸素および微小環境ストレスへの適応に寄与することがさらにわかっており (Bi et al., "ER Stress-Regulated Translation Increases Tolerance to Extreme Hypoxia and Promotes Tumor Growth," EMBO J. 24:3470-3481 (2005); Blais et al., "Activating Transcription Factor 4 is Translationally Regulated by Hypoxic Stress," Mol. Cell. Biol. 24:7469-7482 (2004); Chen et al., "XBP1 Promotes Triple-Negative Breast Cancer by Controlling the HIF1alpha Pathway," Nature 508:103-107 (2014); Romero-Ramirez et al., "X box-Binding Protein 1 Regulates Angiogenesis in Human Pancreatic Adenocarcinomas," Transl. Oncol. 2:31-38 (2009); Rouschop et al., "The Unfolded Protein Response Protects Human Tumor Cells During Hypoxia Through Regulation of the Autophagy Genes MAP1LC3B and ATG5," J. Clin. Invest. 120:127-141 (2010); Schewe et al., "ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells In Vivo," Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A. 105:10519-10524 (2008); および Ye et al., "The GCN2-ATF4 Pathway is Critical for Tumour Cell Survival and Proliferation in Response to Nutrient Deprivation," EMBO J. 29:2082-2096 (2010))、UPRが変化する環境への適応を可能にし得ることが示唆される。

【 0 0 0 5 】

PERK 活性化により抗酸化およびオートファジー応答が調整されて、基底膜への接着が失われていても乳腺上皮細胞が保護される (Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment," Mol. Cell. Biol. 31:3616-3629 (2011))。この生存応答には、ATF4 および CHOP 転写プログラムが関与し (Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment," Mol. Cell. Biol. 31:3616-3629 (2011))、それは mTOR を阻害する LKB1-AMPK-TSC2 経路の高速活性化と連結している (Avivar-Valderas et al., "Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK," Oncogene 32(41):4932-40 (2013))。ヒト DCIS 病変が PERK リン酸化およびオートファジーの増強を示しており (Avivar-Valderas et al., "PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment," Mol. Cell. Biol. 31:3616-3629 (2011) および Espina et al., "Malignant Precursor Cells Pre-Exist in Human Breast DCIS and Require Autophagy for Survival," PloS One 5:e10240 (2010))、乳腺上皮の PERK の条件的アブレーションが、HER2 がん遺伝子に促進される乳腺がんの発症を遅らせた (Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK Promotes Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Limiting Oxidative DNA Damage," Oncogene 29:3881-3895 (2004) および Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK-Dependent Regulation of Lipogenesis During Mouse Mammary Gland Development and Adipocyte Differentiation," Proc. Nat'l. Acad. Sc 50

i. U.S.A. 105:16314-16319 (2008))。さらに、HER2は、腫瘍細胞におけるタンパク質毒性レベルを増加させて、JNKおよびIREシグナリングを活性化させ、HER2⁺がん細胞がこのストレスに対応するのを可能にする (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive," *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015))。したがって、cBioデータベース (Cerami et al., "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data," *Cancer Discov.* 2:401-404 (2012)) は、HER2増幅ヒト乳房腫瘍のおよそ14%がPERK mRNAの上向き調節を示すことを示し、HER2⁺腫瘍はPERKおよび/または他のUPR経路に生存を依存し得るという概念をさらに裏付けた。

10

【0006】

休眠(無活動)腫瘍細胞も、PERKおよびATF6シグナリングに生存を依存していることがわかっている (Ranganathan et al., "Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival," *Cancer Res.* 68:3260-3268 (2008); Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells," *Cancer Res.* 66:1702-1711 (2006); および Scheewe et al., "ATF6 α -Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells In Vivo," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 105:10519-10524 (2008))。肝内の無活動膵臓の播種性がん細胞(「DCC」)も、休眠中の免疫回避に有利な、E-カドヘリン発現の喪失およびMHC-Iの下向き調節と関連付けられたPERK依存性UPRを示した (Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases," *Science* 360(6394):eaao4908 (2018)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。MMTV-HER2モデルでは、骨髄および肺内の無活動DCCもE-カドヘリン陰性であることが見出されたが (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016))、UPRとの関連は試験されなかった。これらのデータをまとめると、UPRは、DCCのストレスおよび免疫微小環境適応性の生存機構として働き得ることが示唆される。

30

【0007】

本開示は、当技術分野における欠点を克服することに関する。

【発明の概要】

【0008】

概要

本開示の一面は、対象内の微小残存がんを治療する方法に関する。この方法は、対象内の播種性がん細胞(DCC)を骨形成タンパク質7(「BMP7」)誘導体タンパク質と接触させる段階であって、対象の接触させたDCCの休眠を誘導または維持して対象内の微小残存がんを治療する、段階を含む。この局面の方法は、微小残存がんを対象内で侵襲性増殖へと進行させないために用いられ得る。

40

【0009】

別の局面は、対象内の微小残存がんを治療する方法に関し、該方法は、対象内の播種性がん細胞(DCC)を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(「PERK」)阻害物質と接触させる段階であって、対象内のDCCを根絶して対象内の微小残存がんを治療する、段階を含む。

【0010】

さらに別の局面は、対象内の後期がんを治療する方法に関する。この方法は、対象内の播種性がん細胞(DCC)を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質と接触させる段階であって、対象内のDCCを根絶して対象内の後期がんを治療する、段階を含む。

50

【 0 0 1 1 】

以下の記載では、特に、選択的かつ強力なPERK阻害物質であるLY4が、休眠DCCの根絶を特異的にもたらず能力の結果としてHER2誘発性転移を妨害できることを実証する。本開示では、PERK阻害物質は、微小残存病変のステージにある単独休眠細胞を標的とする、単剤でも抗増殖性療法との併用でも致命的な転移の予防に役立つ、新たなストラテジーとなる。以下の記載ではまた、骨形成誘導体タンパク質が播種性腫瘍細胞の休眠を誘導できることを実証する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 2 】

【 図 1 A 】 図 1 A ~ 1 C は、無活動播種性HER2⁺細胞が、高レベルのERストレス経路の活性化を示すことを示す。図 1 A は、HER2、Ki67（増殖）、およびGADD34（ERストレス）を染色したMMTV-HER2動物の肺切片の画像を示す。図 1 A のグラフは、両マーカー陽性の細胞 / 転移の、全細胞に対するパーセンテージとしての定量化を示す。図 1 B は、サイトケラチン、Ki67（増殖）、およびGADD34（ERストレス）を染色した、異なる場所（リンパ節、肝臓、肺）のヒト乳がん転移の画像を示す。図 1 B のグラフは、両マーカー陽性の細胞 / 転移の、全細胞に対するパーセンテージとしての定量化を示す。図 1 C は、単一細胞（肺播種性腫瘍細胞（「DTC」））（横）のハイスループット標的遺伝子発現（縦）プロファイルの階層的クラスタリングを示す。

【 図 1 B 】 図 1 A の説明を参照のこと。

【 図 1 C 】 図 1 A の説明を参照のこと。

【 図 2 A 】 図 2 A ~ 2 G は、HER2⁺がん細胞患者でPERK阻害が上向き調節されることを実証する。図 2 A は、FluidigmのC1およびBiomark HDを用いる単一細胞遺伝子発現分析で行われる工程の流れ図である。全部で255個のDCCおよび90個の原発腫瘍（「PT」）細胞を分析した。図 2 B は、ハイスループットqPCRにより分析した遺伝子のリストを示す。図 2 C は、24時間懸濁させることでストレスを与えたMCF10A-HER2細胞におけるLYシリーズの阻害物質（LY2、LY3、およびLY4）およびGSK2656157（2 μM）によるPERKリン酸化の阻害を示す免疫プロットである。*は、非特異的バンドを示す。図 2 D は、MCF10A-HER2細胞の、ストレス（低用量タプシガルジン、Tg 2 nM）不存在（-）のまたは存在下の48時間後のLY4用量反応細胞生存率曲線（Cell Titer Blue、CTB）を示す。点線は、IC₅₀（9 nM）を示す。図 2 E は、酵素生化学的アッセイにより評価した、PERK阻害物質LY4、LY2、LY3、およびGSK2656157のキナーゼ選択性を示す。図 2 F は、2週間処置したMMTV-HER2雌の全骨髄細胞（後肢2本中）に対するLY4の効果を示す。図 2 G は、2週間処置したMMTV-HER2雌の全白血球に対するLY4の効果を示す。

【 図 2 B 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 C 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 D 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 E - 1 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 E - 2 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 E - 3 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 E - 4 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 F 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 2 G 】 図 2 A の説明を参照のこと。

【 図 3 A 】 図 3 A ~ 3 G は、LY4によるPERK阻害が、肺および骨髄における転移性疾患を単一播種性腫瘍細胞レベルで減少させることを示す。図 3 A は、一晚血清不足にしてからEGF（100 ng/ml）で15分処理したMCF10A-HER2細胞における、PERK阻害物質LY4（2 μM）によるPERKリン酸化（T980）の阻害を示す免疫プロットである。図 3 B では、MMTV-HER2⁺雌（24週齢）に2週間毎日ビヒクルまたはLY4（50 mpk）を注射した。P-PERKおよびP-EIF2 に対する抗体を用いた、脾臓切片および乳腺切片の免疫組織化学検査（「IHC」）を示す。挿入図は高倍率を示す。スケールバーは100 μm。

図3Cは、H&E染色により検出し、5つの肺切片/動物で定量化した($n=16$)、マクロ転移(100個超の細胞)の画像および定量化(右グラフ)を示す。スケールバーは100 μm 。pはマン・ホイットニー検定による。図3Dは、抗HER2抗体を用いてIHC染色して検出し、各肺切片/動物で定量化した($\pm\text{s.d.}$)($n=6$)、ミクロ転移(2~100個の細胞)の画像および定量化(右グラフ)を示す。スケールバーは25 μm 。pはマン・ホイットニー検定による。図3Eは、HER2のIHC染色により検出し、P-Rb⁺またはP-Rb⁻として分類し、各肺切片で定量化した($\pm\text{s.d.}$)($n=6$)、単独播種性腫瘍細胞(DTC)の画像および定量化(右グラフ)を示す。スケールバーは25 μm 。pはマン・ホイットニー検定による。画像の矢印および丸は、単独DTCを示す。図3Fは、成熟造血細胞枯渇骨髓組織($n=8$)由来の、サイトスピンでCK8/18およびHER2をIF染色して検出した、骨髓中の播種性腫瘍細胞の画像および定量化(右グラフ)を示す。スケールバーは25 μm 。pはマン・ホイットニー検定による。矢印は、Her2⁺細胞を示す。図3Gは、Dendraタグで標識されたH2Bタンパク質を発現するように改変され、低密度(単一細胞)でマトリゲルに播種されたZR75.1 HER2⁺細胞の代表的な画像を示す。0日目、Dendraタグ(緑色蛍光)は単回UV光パルスにより赤色蛍光へと光変換され、無活動の目安として用いられた。ウェルを2日目から8日目までビヒクル(DMSO)またはLY4(2 μM)で処理した。グラフは、8日目に測定した生細胞のパーセンテージ($\pm\text{s.d.}$)を示す($n=4$)。pはスチューデントのt検定による。

10

【図3B】図3Aの説明を参照のこと。

【図3C】図3Aの説明を参照のこと。

20

【図3D】図3Aの説明を参照のこと。

【図3E】図3Aの説明を参照のこと。

【図3F】図3Aの説明を参照のこと。

【図3G】図3Aの説明を参照のこと。

【図4A】図4A~4Fは、LY4処置が転移および循環腫瘍細胞(「CTC」)に及ぼす効果を示す。図4Aは、ビヒクルおよびLY4処置動物($n=21$ および15)における単一マクロ転移の相対化面積を示す。pはマン・ホイットニー検定による。図4Bは、サイトスピンのHER2染色による循環腫瘍細胞/血液1 mlの定量化を示すグラフである。図4Cは、各肺切片/動物($n=4$ および6)のP-Rb⁺ミクロ転移のパーセンテージを示す画像およびグラフを示す。図4Dは、3Dマトリゲルに播種した後、0日目に緑色蛍光から赤色蛍光へと100%光変換されたZR75.1-H2B-Dendraを示す画像である。図4Eでは、ZR75.1-H2B-Dendra光変換細胞を低(単一細胞)密度または高密度で播種した。グラフは、単一細胞として、または高密度で播種した細胞の赤色標識保持のパーセンテージ($\pm\text{s.d.}$)を示す($n=4$)。pはスチューデントのt検定による。図4Fは図4Dと同様であるが、高密度で播種した細胞を2日目から8日目までビヒクル(DMSO)またはLY4(2 μM)で処理した。グラフは、8日目に測定した生コロニーのパーセンテージ($\pm\text{s.d.}$)を示す($n=4$)。pはスチューデントのt検定による。

30

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図4C】図4Aの説明を参照のこと。

【図4D】図4Aの説明を参照のこと。

40

【図4E】図4Aの説明を参照のこと。

【図4F】図4Aの説明を参照のこと。

【図5A】図5A~5Cは、PERK阻害がHer2⁺細胞で上向き調節されることを実証する。図5Aは、PERK(EIF2AK3)がHER2⁺乳がん患者の下位集団で上向き調節されることを示す。cBioPortalを用いてのTCGA乳がんデータHER2⁺事例(58個の腫瘍)の分析。図5Bは、ビヒクルおよびLY4処置MMTV-neu乳腺ホルマウントと比較した、ホルマウントFVB正常乳腺のカルミン染色の代表的な画像を示す。図5Cは、H&E染色乳腺切片に存在する組織学的構造の定量化を示す(上段の画像は正常な空の管からDCIS様乳腺上皮内腫瘍まで、下段は高倍率)。

【図5B】図5Aの説明を参照のこと。

50

【図5C】図5Aの説明を参照のこと。

【図6A】図6A～6Cは、PERK阻害物質LY4がMMTV-HER2+乳がんモデルで乳腺「正常化」をもたらすことを示す。図6Aは、ビヒクルおよびLY4処置動物に由来するホルマウント乳腺のカルミン染色およびH&E染色の乳腺切片の代表的な画像を示す。スケールバーは100 μm。図6Bは、ビヒクルおよびLY4処置動物に見られる、H&E染色乳腺切片 (n=50 / 動物、動物n=13) に存在する組織学的構造 (空の管e.d.、閉塞管o.d.、閉塞過形成o.h.、およびDCIS様乳腺上皮内腫瘍M.I.N) の定量化 (±s.e.m.) を示す。統計学的有意性 (p) はマン・ホイットニー検定により計算した。図6Cは、乳腺切片中の上皮管腔マーカー、サイトケラチン8/18 (CK8/18)、および筋上皮マーカー、平滑筋アクチン (「SMA」) のIHCを示す。グラフは、各動物のCK8/18+およびSMA+構造のスコアを示す (n=12)。pはマン・ホイットニー検定による。スケールバーは75 μm。

10

【図6B】図6Aの説明を参照のこと。

【図6C】図6Aの説明を参照のこと。

【図7A】図7A～7Fは、LY4処置がP-PERKレベル、P-ヒストンH3レベル、および腫瘍サイズに及ぼす効果を示す。図7Aは、ビヒクルおよびLY4処置動物に由来するMMTV-neu腫瘍ライセート中のP-PERKレベルについてのウェスタンブロットである。図7Bは、ビヒクル処置雌 (上) およびLY4処置雌 (下) の腫瘍体積 (mm³) を示す。各線は腫瘍を表す。図7Cは、腫瘍縮小を示したLY4処置雌の腫瘍サイズ減少パーセンテージを示す。各線は腫瘍および動物を表す。図7Dは、乳腺腫瘍切片中のP-ヒストンH3のIHCの代表的な画像および定量化 (右グラフ) を示す。pはマン・ホイットニー検定による。図7Eでは、HER2を過剰発現するZR75.1細胞をマトリゲルに播種し、腺房の成立後 (10日目)、ウェルをビヒクル (対照) またはLY4 (2 μM) で10日間処理した。グラフは各腺房の切断型カスパーゼ-3陽性細胞のパーセンテージ (±s.d.) を示す (n=20)。pはスチューデントのt検定による。図7Fでは、MCF10A-HER2細胞をマトリゲルに播種し、腺房の成立後 (4日目)、ウェルをビヒクル (対照) またはLY4 (2 μM) で10日間処理した。グラフは各腺房のP-ヒストンH3陽性細胞のパーセンテージ (±s.d.) を示す (n=20)。pはスチューデントのt検定による。

20

【図7B】図7Aの説明を参照のこと。

【図7C】図7Aの説明を参照のこと。

【図7D】図7Aの説明を参照のこと。

【図7E】図7Aの説明を参照のこと。

【図7F】図7Aの説明を参照のこと。

30

【図8A】図8A～8Dは、PERK阻害がMMTV-HER2+雌において腫瘍増殖を妨げることを示す。図8Aでは、顕性腫瘍を呈するMMTV-neu雌 (24～32週齢) に、2週間毎日ビヒクルまたはLY4 (50 mpk) を注射した。グラフは、ビヒクルおよびLY4処置動物の腫瘍サイズの変化のパーセンテージ (±s.d.) を示す (n=16)。pはマン・ホイットニー検定による。図8Bは、最終腫瘍体積 (mm³) を示すグラフである。ひげは、データ (n=16) の最小および最大を表す。pはマン・ホイットニー検定による。図8Cは、腫瘍切片内のアポトーシスレベルを測定するTUNEL染色の代表的なIHCを示す。スケールバーは10 μmおよび50 μm。グラフは、ビヒクルおよびLY4処置腫瘍切片中のTUNEL陽性細胞のパーセンテージ (n=5)。pはマン・ホイットニー検定による。図8Dでは、HER2+ MCF10A-HER2またはSKBR3細胞をマトリゲルに播種し、腺房の成立後 (4日目)、ウェルをビヒクル (対照) またはLY4 (2 μM) で10日間処理した。グラフは、各腺房の切断型カスパーゼ-3陽性細胞のパーセンテージ (±s.d.) を示す (n=20)。pはスチューデントのt検定による。切断型カスパーゼ-3を染色したMCF10A-HER2腺房の代表的な共焦点画像。

40

【図8B】図8Aの説明を参照のこと。

【図8C】図8Aの説明を参照のこと。

【図8D】図8Aの説明を参照のこと。

50

【図9A】図9A～9Fは、LY4処置により、ホスホ-HER2および下流シグナリング経路のレベルが減少することを示す。図9Aは、MMTV-HER2乳腺腫瘍切片中のP-HER2、P-PERK、およびP-EIF2のIHCの代表的な画像を示す。P-HER2陽性の縁が、P-PERKおよびP-EIF2染色と重なることに注目されたい。スケールバーは100 μm。図9Bは、MMTV-HER2雌由来の単一細胞（原発乳腺腫瘍）（横）のハイスループット標的遺伝子発現（縦）プロファイルの階層的クラスタリングを示す。図9Cは、ビヒクルおよびLY4処置乳腺腫瘍における代表的なP-HER2および全HER2のIHC染色を示す。グラフは、ビヒクルおよびLY4処置腫瘍のP-HER2のスコアを示す。腫瘍切片中P-HER2レベルの定量化は、IHCの強度および面積のスコア付けによる（n=11）（図10Aを参照）。スケールバーは50 μm。pはマン・ホイットニー検定による。図9Dでは、MCF10A-HER2細胞を一晩飢餓状態にし、+/-LY4（2 μM）処理し、その後+/-EGF（100 ng/ml）を15分添加してから、収集した。P-HER2、P-EGFR、P-AKT、P-S6、およびP-ERK、ならびに全HER2およびEGFRのレベルをウェスタンブロットで査定した。GAPDHおよびβ-TUBをローディングコントロールとして用いた。3つの代表的なプロットを示す。P-HER2の密度測定分析（n=3）（±s.d.）。pはスチューデントのt検定による。図9Eでは、MCF10A-HER2細胞を図9Dと同様に処理し、表面受容体ビオチン化アッセイを実施した。全HER2およびP-HER2の表面レベルを査定した。P-HER2の密度測定を示す。図9Fでは、MCF10A-HER2細胞を図9Dと同様に処理し、可逆的表面受容体ビオチン化アッセイを実施した。全HER2およびP-HER2のエンドサイトーシスレベルを査定した。2つの実験の1つを示す。

10

20

【図9B】図9Aの説明を参照のこと。

【図9C】図9Aの説明を参照のこと。

【図9D】図9Aの説明を参照のこと。

【図9E】図9Aの説明を参照のこと。

【図9F】図9Aの説明を参照のこと。

【図10A】図10A～10Cは、MCF10A-HER2細胞におけるP-HER2レベルの定量化を示す。図10Aは、乳腺腫瘍切片におけるP-HER2レベルの定量化に用いられるスコア付けシステムを示す。IHCのP-HER2陽性面積に、これらの代表的な画像に示される確定スコアにしたがい、その強度スコアを掛けた。スケールバーは100 μm。図10Bでは、MCF10A-HER2細胞を一晩飢餓状態にし、+/-LY4（2 μM）処理し、その後+/-EGF（100 ng/ml）を20分添加してから、収集した。P-HER2/Y1112およびP-HER2/Y877のレベルをウェスタンブロットで査定した。GAPDHおよびHSP90をローディングコントロールとして用いた。図10Cは、表面ビオチン化アッセイに用いられる抽出物のインブロットを示す。

30

【図10B】図10Aの説明を参照のこと。

【図10C】図10Aの説明を参照のこと。

【図11A】図11A～11Eは、連続的なCDK4/6阻害に続くPERK阻害により、LY4の抗転移効果が増強することを示す。図11Aは、MMTV-neu/HER2⁺マウスモデルでアベマシクリブとLY4の連続的処置を評価するために設計されたインビボ実験の概略図である。MMTV-neu/HER2⁺雌マウス（24週齢）を4週間毎日CDK4/6阻害物質アベマシクリブ（50 mpk）で処置し、続いて+/-LY4（50 mpk）で処置した。図11Bは、腫瘍切片のHER2、Ki67（増殖）、およびGADD34（ERストレス）の一連の蛍光IHCである。スケールバーは100 μm。矢印は高蛍光を示す。図11Cは、H&E染色により検出し、5つの肺切片/動物（n=8）で定量化したマクロ転移（100個超の細胞）の数を示すグラフである。pはマン・ホイットニー検定による。図11Dは、抗HER2抗体を用いてIHC染色により検出し、各肺切片/動物で定量化した（±s.d.）（n=8）、ミクロ転移（2～100個の細胞）の数を示すグラフである。pはマン・ホイットニー検定による。図11Eは、HER2のIHC染色により検出し、Ki67⁺またはKi67⁻として分類し、各肺切片で定量化した（±s.d.）（n=8）、単独播種性腫瘍細胞の数を示すグラフである。pはマン・ホイットニー検定による。

40

50

【図 1 1 B】図 11A の説明を参照のこと。

【図 1 1 C】図 11A の説明を参照のこと。

【図 1 1 D】図 11A の説明を参照のこと。

【図 1 1 E】図 11A の説明を参照のこと。

【図 1 2 A】図 12A ~ 12G は、LY4 の使用を含む単剤または併用療法の提案、ならびに、CDK4/6 阻害物質アベマシクリブを LY4 と併用するメラノーマ細胞の処理が、2D および 3D 培養のインビトロの細胞生存率に異なる影響を及ぼすことを示す実験を示す。図 12A は、アベマシクリブと LY4 の併用の基本原理の概略図である。図 12B は、Braf 変異メラノーマ細胞 (WM35) を 0 nM、10 nM、または 50 nM のアベマシクリブで 1 週間インビトロ処理し、続いて 2 μ M の LY4 で 48 時間処理した結果を示す棒グラフである。図 12C には、アベマシクリブで 1 週間前処理し、続いて 2 μ M の LY4 で処理した後、DAPI 染色した細胞の画像が含まれる。5000 個の細胞をマトリゲルに播種した。図 12D ~ 12E では、WM35 メラノーマ細胞をアベマシクリブで 5 週間前処理し、続いて完全培地およびアベマシクリブ中、LY4 で処理した。細胞をトリパンブルーで染色して、生存細胞を特定した。図 12D は、アベマシクリブ感受性細胞を示すグラフである。図 12E は、アベマシクリブ耐性細胞を示すグラフである。図 12F は、アベマシクリブで 5 週間前処理してから、2 μ M の LY4 およびアベマシクリブで同時処理し、DAPI 染色した細胞の画像を示す。1000 個の細胞をマトリゲルに播種した。図 12G は、アベマシクリブで増殖停止を誘導すると、細胞は PERK 標的 (GADD34) を上向き調節することを示唆しており、このことは細胞が LY4 感受性である理由の説明になり得る。アベマシクリブ無感作または耐性 (R) WM35 メラノーマ細胞を、培養中ビヒクル (-) または 150 nM および 300 nM のアベマシクリブで 24 時間処理した。次いで細胞を溶解させ、GADD34 発現をウェスタンブロットにより調査した。チューブリン発現をローディングコントロールとして用いた。アベマシクリブ無感作細胞では GADD34 が上向き調節され、PERK 活性化が示唆されることに注目されたい。耐性細胞は、追加のアベマシクリブ処理の後も変化または減少しない、より高い GADD34 レベルを示すようである。

10

20

【図 1 2 B】図 12A の説明を参照のこと。

【図 1 2 C】図 12A の説明を参照のこと。

【図 1 2 D】図 12A の説明を参照のこと。

【図 1 2 E】図 12A の説明を参照のこと。

30

【図 1 2 F - 1】図 12A の説明を参照のこと。

【図 1 2 F - 2】図 12A の説明を参照のこと。

【図 1 2 G】図 12A の説明を参照のこと。

【図 1 3 A】図 13A ~ 13C は、BMP7-F9 が ERK/p38 活性比および休眠シグネチャー遺伝子に関連するさまざまな mRNA に及ぼす効果を実証する。図 13A は、2 ng/ml、5 ng/ml、および 10 ng/ml の BMP7-F9 処理 (それぞれ 2 つめ、3 つめ、および 4 つめのグレーのバー: 対照は 1 つめの黒いバー) により ERK/p38 活性比が対照よりも低下したことを示し、これは HEp3 HNSCC 細胞のウェスタンブロットで決定した。ERK/p38 活性比に対する効果は、2 ~ 6 および 24 時間後に観測される (縦の 2 つめから 4 つめの群)。最初の 30 分で、ERK 活性を BMP7 により刺激する (縦 1 つめのセット)。図 13B は、BMP7-F9 処理 (10 ng/ml BMP7-F9、24 時間) により、休眠シグネチャー遺伝子をコードする DEC2、p53、および p27 mRNA が誘導されることを示す。図 13C は、同じ細胞の BMP7-F9 処理により、強力な休眠誘導性転写因子 NR2F1 の核集積が誘導されることを示し、これは免疫蛍光により決定した (10 ng/ml、24 時間)。矢印は NR2F1 蛍光 (fluorescence) を示す。図 13A および 図 13B では差は $p < 0.05$ であり、スチューデントの t 検定により計算した。これらのデータは、BMP7-F9 が、自発的休眠 DCC で上向き調節されている、または骨髄内のリプログラミングもしくは TGF β 2 シグナリングにより誘導される休眠遺伝子の強力な誘導体であるという仮説を支持している。

40

【図 1 3 B】図 13A の説明を参照のこと。

【図 1 3 C】図 13A の説明を参照のこと。

50

【図14A】図14A～14Eは、インビトロおよびインビボでBMP7-F9がいかにしてT-HEp3細胞の増殖停止を誘導するかを示す。図14Aは、T-HEp3細胞のBMP7-F9処理により、増殖がインビトロで48時間阻害されることを示し、これはcell titer blueアッセイで決定した（RFU、相対蛍光単位）。図14Bは、図14C～14Dで用いられるインビボの実験手順の概略図である。T-HEp3細胞をインビトロで24時間BMP7-F9で前処理してから、トリ胚絨毛尿膜（「CAM」）に接種し（図14C）、インビボで毎日ビヒクルまたはBMP7-F9（50 ng/ml）で処理した後、腫瘍を収集し、HEp3 HNSCC細胞の数を定量化し（図14D）、P-H3のレベルを定量化した（図14E）。図14Eの矢印は、重なっているP-H3およびDAPIの蛍光を示す。これらのデータは、図13Bで特定した休眠マーカーが、CAM系の短期間の実験でインビトロおよびインビボで増殖抑制と関連するという仮説を支持している。 10

【図14B】図14Aの説明を参照のこと。

【図14C】図14Aの説明を参照のこと。

【図14D】図14Aの説明を参照のこと。

【図14E】図14Aの説明を参照のこと。

【図15A】図15A～15Cは、疾患のマウスモデルにおけるBMP7-F9処置の評価を示す。図15Aは、BMP7-F9が転移開始に及ぼす効果の評価に用いられるインビボの実験手順の概略図である。HEp3-GFP HNSCC腫瘍をおよそ300 mm³になるまで成長させてから、50 μg/kgのBMP7-F9のネオアジュバント設定で、腫瘍がおよそ600 mm³になるまで処置した。次に腫瘍を手術により除去した。手術の1～2日後、BMP7-F9を用いてのアジュバント処置をさらに3、4、または6週間継続した。次に動物を安楽死させ、蛍光顕微鏡を用いて肺のDCC負荷をスコア付けした。図15Bは、BMP7が、腫瘍手術後の局所および遠隔の再発の発生を制限することを示す。図15AのプロトコールにしたがいNSGマウスを3週間および6週間処置した。これらの時点で、局所再発およびDCC出現のパーセンテージをスコア付けした。図15Cではマウスを図15Aに示すように処置しているが、アジュバント処置は4週間であった。処置後、切除した肺のGFP陽性細胞の数をスコア付けした。これは肺のDCC負荷の大きさであり、BMP7-F9処置により有意に減少している。DCC負荷の中央値が1ログ小さいこと、およびBMP-7が7匹中3匹の動物をDCCから明らかに治癒していることに注目されたい。 20

【図15B】図15Aの説明を参照のこと。 30

【図15C】図15Aの説明を参照のこと。

【発明を実施するための形態】

【0013】

詳細な説明

本明細書において、対象内の微小残存がんを治療する方法を開示する。本開示の一局面は、対象内の微小残存がんを治療する方法に関する。この方法は、対象内の播種性がん細胞（DCC）を骨形成タンパク質7（BMP7）誘導体タンパク質と接触させる段階を含む。対象内の播種性がん細胞（DCC）を骨形成タンパク質7（BMP7）誘導体タンパク質と接触させる段階により、対象の接触させたDCCの休眠を誘導または維持して、対象内の微小残存がんを治療する。 40

【0014】

本明細書で使用する場合、「微小残存がん」という語句は、標準的なX線および組織学的水準によれば対象内にがんのエビデンスはないが、対象は実は、残存がん細胞（すなわちDCC）を（CTCとして）血中に、または（DTCとして）骨髄もしくはリンパ節中に有している状況または状態を含む。微小残存がんは、化学療法、手術、および/または放射線療法によるがん治療の後に生じ得る。標準的なX線および組織学的検出法には、たとえば、画像検査（X線、超音波、MRI）；PSAなどの既知の腫瘍マーカーまたは循環腫瘍マーカーに関する血液または免疫化学的検査；既知の腫瘍マーカーに関する生検または細胞検体検査をして、たとえば存在する腫瘍細胞の数またはそのような細胞の相対希少性を査定することが含まれ得る。 50

【 0 0 1 5 】

腫瘍細胞が原発腫瘍からCTCおよびDTCとして初期に播種し得ることは、当技術分野では周知である。実際、DTCは、腫瘍手術後に疾患のエビデンスがない対象内で特定されている。がんの病歴から移植提供が除外されない稀なケースでは、ドナーが30年も無疾患であっても、レシピエントはドナー由来の転移を生じている (MacKie et al., "Fatal Melanoma Transferred in a Donated Kidney 16 Years after Melanoma Surgery," *N. Engl. J. Med.* 348:567-568 (2003)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【 0 0 1 6 】

個別の患者体内の腫瘍系統発生および転移の全ゲノムシーケンシングは、原発腫瘍から転移、および転移から転移という伝播を示唆しており、連続的/線形増殖モデルで個別の患者の晩発性(10年超)の再発を説明できない根拠となっている (Gundem et al., "The Evolutionary History of Lethal Metastatic Prostate Cancer," *Nature* 520:353-357 (2015)およびNaxerova et al., "Using Tumour Phylogenetics to Identify the Roots of Metastasis in Humans," *Nature Reviews Clinical Oncology* 12:258-272 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【 0 0 1 7 】

単一細胞CTC分析もまた、CTCと原発腫瘍との遺伝子系統的つながりを示している (Ni et al., "Reproducible Copy Number Variation Patterns Among Single Circulating Tumor Cells of Lung Cancer Patients," *PNAS* 110(52):21083-88; Heitzer et al., "Complex Tumor Genomes Inferred from Single Circulating Tumor Cells by Array-CGH and Next-Generation Sequencing," *Cancer Res.* 73:2965-75 (2013);およびLohr et al., "Whole-Exome Sequencing of Circulating Tumor Cells Provides a Window into Metastatic Prostate Cancer," *Nature Biotech.* 32:479-484 (2014)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【 0 0 1 8 】

さらに、ヒトでは、CTC/DTCは原発がんのステージまたはサイズと相関していない (Krishnamurthy et al., "Detection of Minimal Residual Disease in Blood and Bone Marrow in Early Stage Breast Cancer," *Cancer* 116(14):3330-3337 (2010)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。代わりに、CTCおよびDTCは、転移性/再発性疾患を形成する能力を保持すると考えられている。具体的には、CTCおよびDTCの検出は、乳がんおよび前立腺がんの転移および再発を予測することが示されている (Braun et al., "A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer," *NEJM* 353:793-802 (2005); Hayes et al., "Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point During Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival," *Clin. Cancer Res.* 12(14):4218-4224 (2006);およびde Bono et al., "Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer," *Clin. Cancer Res.* 14:6302-6309 (2008)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【 0 0 1 9 】

転移は、増殖性であるが休眠性でもある、再活性化しているDCCから起きると考えられている。患者が腫瘍摘出から何年も経って転移を生じるとすれば、休眠DCCががんの晩発性再発の主たる原因となり得ると考えられる。本明細書で使用する場合、「休眠」という用語は、一時的な有糸分裂および増殖の停止を指し、細胞の休眠と定義され、内的および/または外的機構が単独または小群のDCCを無活動状態に入るよう駆動する(可逆的増殖停止)。休眠病変の2つめのカテゴリーは、血管新生の休眠により定義され、分裂する細胞と乏しい血管新生のせいで死ぬ細胞とのバランスにより、腫瘍塊が一定に維持される。3つめのカテゴリーは免疫介在性休眠であり、免疫系が、増殖するがん細胞集団を

10

20

30

40

50

持続的に減じる持続的細胞傷害活性によって、増殖性腫瘍塊を一定に維持する（たとえば Sosa et al., “Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field,” *Nat. Rev. Cancer* 14(9):611-622 (2014)を参照。参照により全文が本明細書に組み入れられる）。休眠細胞は、既成の原発腫瘍、二次腫瘍、および/または前浸潤性病変から生じ得る。

【0020】

本明細書に開示される方法の一態様では、接触させるDCCは休眠がん細胞であり、つまり、がん細胞は一時的に有糸分裂/増殖停止中であるか、老化様のふるまいをしている。

【0021】

DCCは、骨髄穿刺液で、陰性選択により造血系細胞を排除した後、EpCAMまたはCK8/18を陽性染色することにより、検出することができる。併せて、細胞の休眠マーカーを染色して、これらが増殖状態にあるか休眠状態にあるかを決定してもよい。後者は固定後に実施することができる。全ゲノムまたは全トランスクリプトーム分析を実施するために、骨髄由来EpCAM陽性DCCを生きのまま単離し、全ゲノムまたは全トランスクリプトーム分析用に処理する（Guzvic et al., “Combined Genome and Transcriptome Analysis of Single Disseminated Cancer Cells from Bone Marrow of Prostate Cancer Patients Reveals Unexpected Transcriptomes,” *Cancer Res.* 74(24):7383-94 (2014)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。

【0022】

本明細書に記載される方法は、前記接触させる段階の前に、対象内のDCCの存在を検出する段階をさらに含み得る。以下の表1に示すように、休眠DCCは表現型が他の細胞種とは異なるため、識別可能である（Sosa et al., “Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field,” *Nat. Rev. Cancer* 14(9):611-622 (2014)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。

【0023】

（表1）DCCマーカー

10

20

30

40

50

| がん | 休眠DCC 表現型 | 活性DCC 表現型 | |
|---------------------------|---|---|----|
| 乳がん | TGFβR3 ↑ BMPR2 ↑ P-ERK ↓ P-p38 ↑ GRP78 ↑ POSTN ↓ TSP 受容体 ↑ NR2F1 ↑ | P-FAK ↑ EDG2 ↑ P-Src ↑ P-ERK ↑ P-p38 ↓ NR2F1 ↓ | 10 |
| 頭頸部扁平上皮がん(HNSCC) | TGFβR3 ↑ BMPR2 ↑ P-ERK ↓ P-p38 ↑ GRP78 ↑ NR2F1 ↑ | P-FAK ↑ P-Src ↑ P-ERK ↑ P-p38 ↓ NR2F1 ↓ | 20 |
| 前立腺がん | TGFβR3 ↑ BMPR2 ↑ P-ERK ↓ P-p38 ↑ GRP78 ↑ NR2F1 ↑ | P-FAK ↑ P-Src ↑ P-ERK ↑ P-p38 ↓ NR2F1 ↓ | 30 |
| グリオブラストーマ、骨肉腫、 および脂肪肉腫 | POSTN ↓ TSP 受容体 ↑ | 未決定 | |
| 卵巣がん | ARHI ↑ ATG 遺伝子 ↑ | 未決定 | |
| 膵臓がん | IFNR ↑ TNFR ↑ | 未決定 | 40 |

【 0 0 2 4 】

DTCは、手術前の前立腺がん患者の13～72%の骨髄で、および手術後5年超の疾患エビデンスのない患者の20～57%の骨髄で、特定されている(Morgan et al., "Disseminated Tumor Cells in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy and without Evidence of Disease Predicts Biochemical Recurrence," Clin. Cancer Res. 15:677-683 (2009)およびWeckermann et al., "Perioperative Activation of Disseminated Tumor Cells in Bone Marrow of Patients with Prostate Cancer," J. Clin. Oncol. 27(10):1549-56 (2009)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。DTCの検出は、臨床的休眠患者の再発の予

後因子である。

【0025】

本明細書で使用する場合、「臨床的休眠」という語句は、原発腫瘍除去から疾患再発までの長期の臨床的無疾患の時間（たとえば5年超）を指す。臨床的休眠は、前立腺がん、乳がん、食道がん、腎臓がん、甲状腺がん、B細胞リンパ腫、およびメラノーマに多く（Lam et al., “The Role of the Microenvironment - Dormant Prostate Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow,” Drug Discov. Today Technol. 11:41-47 (2014); Gelao et al., “Tumour Dormancy and Clinical Implications in Breast Cancer,” Ecancermedicalscience 7:320 (2013); Ellis et al., “Detection and Isolation of Prostate Cancer Cells from Peripheral Blood and Bone Marrow,” Urology 61:277-281 (2003); Morgan et al., “Disseminated Tumor Cells in Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy and without Evidence of Disease Predicts Biochemical Recurrence,” Clin. Cancer Res. 15:677-683 (2009); および Pfitzenmaier et al., “Telomerase Activity in Disseminated Prostate Cancer Cells,” BJU Int. 97:1309-1313 (2006)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）、一部の患者では臨床的転移を生じることができるまで、長期間（たとえば10年超）にわたり休眠したままでいられる骨、リンパ節、肝臓、および肺といった遠隔の器官内に留まる。

【0026】

本明細書に記載される方法を実行するいくつかの態様では、対象はCTCと診断されている。

【0027】

本明細書に記載される方法を実行するいくつかの態様では、対象はDTCおよび/または非転移性がんとして診断されている。

【0028】

本明細書で使用する場合、「対象」は、たとえばがん患者などの患者であり、あらゆる動物を包含するが、好ましくは哺乳類である。一態様では、対象はヒト対象である。好適なヒト対象としては、限定ではないが、播種性がん細胞および/または非転移性がんとして診断されている子ども、成人、および老人の対象が挙げられる。

【0029】

他の態様では、対象は、ウシ、ヒツジ、ブタ、ネコ、ウマ、マウス、イヌ、ウサギなどであり得る。

【0030】

本明細書に記載される方法を実行する場合、対象内のDCCに接触して、DCCの休眠を誘導または維持する。このことは、DCCの持続性の非増殖性状態の確立、またはDCCの非増殖性状態の継続を意味する。

【0031】

一態様では、微小残存がんは、がんとして診断されている対象内で治療される。たとえば、限定ではないが、対象は、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺癌、脳がん、子宮頸がん、マントル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、ブドウ膜および皮膚メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、ならびに結腸直腸がんの1つまたは複数と診断されている。

【0032】

他のがんも、本明細書に記載される方法での治療に適し得る。

【0033】

一態様では、乳がんに関するまたは乳がん関連の微小残存がんが対象において治療される。乳がんは、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん（DCIS）、非浸潤性小葉がん（LCIS）、および炎症性乳がんの1つまたは複数から選択され得る。

【0034】

ホルモン受容体およびヒト上皮増殖因子受容体2（HER2）の状態を含むさまざまな分

子的要因によって、乳がんを分子的に分類することができる。HER2および基底様の群は、ホルモン受容体陰性乳がんにて特定される主要な分子サブタイプである (Schnitt, "Classification and Prognosis of Invasive Breast Cancer: From Morphology to Molecular Taxonomy," *Modern Pathology* 23:S60-S64 (2010)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。一態様では、乳がんはHER2⁺乳がんである。

【0035】

本明細書に記載される方法のいくつかの態様では、対象は摘出手術を受けて腫瘍を除去されている。たとえば、対象は、乳房切除術、前立腺切除術、皮膚病変除去術、小腸摘出術、胃切除術、開胸術、副腎摘出術、虫垂切除術、結腸切除術、卵巣摘出術、甲状腺切除術、子宮摘出術、舌切除術、結腸ポリープ切除術、および結腸直腸摘出術の1つまたは複数を受けている場合がある。

10

【0036】

本明細書に記載される方法では、対象内の播種性がん細胞 (DCC) に、骨形成タンパク質7 (BMP7) 誘導体タンパク質を接触させる。BMP7は、TGFスーパーファミリーのメンバーであり、骨髄間質骨芽細胞から分泌され、DCC/DTC微小環境に影響を及ぼす場合がある。BMP7は、間葉細胞から骨および軟骨への形質転換で主要な役割を果たし、また、前立腺がん幹様細胞の老化を可逆的に誘導することがわかっている (Kobayashi et al., "Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-Like Cells in Bone," *J. Exp. Med.* 208(13):2641-55 (2011)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。Pro-BMP7は、前タンパク質のタンパク分解性プロセッシングにより生じるpre-BMP7と成熟BMP7の間の中間体であり、成熟ホモ二量体のサブユニットを作る。

20

【0037】

ヒトBMP7タンパク質は、TGF-ベータスーパーファミリーの分泌型シグナリング分子であり、当初は骨形成を誘導する能力により同定されたが、後に多くの異なる細胞種の増殖および分化を媒介する多機能性サイトカインとして認識されるようになった。ヒトBMP7タンパク質は、細胞内で292アミノ酸の前駆タンパク質として発現し、成熟した生物学的に活性のBMP7は、シグナルペプチドおよびプロペプチドのタンパク分解性除去により生成する。シグナルペプチド (最初の29アミノ酸)、プロドメイン、および成熟ペプチド (太字) を含有する野生型ヒトBMP7タンパク質のアミノ酸配列を以下にSEQ ID NO:1として示す:

30

```
MHVRSLRAAA PHSFVALWAP LFLLRSLALAD FSLDNEVHSS FIHRRLRSQE RREMQREILS
ILGLPHRPRP HLQGGKHNAP MFMLDLNAM AVEEGGGPGG QGFSYPYKAV ESTQGPPPLAS
LQDSHELTDA DMVMSFVNLV EHDKEFFHPR YHHRFRFDL SKIPEGEAVT AAEFRIYKDY
IRERFDNETF RISVYQVLQE HLGRESLFL LDSRTLWASE EGWLVDITA TSNHWVNP
HNLGLQLSVE TLDGQSINPK LAGLGRHGP QNKQPFMVAF FKATEVHFRS IRSTGSKQRS
QNRSKTPKNQ EALRMANVAE NSSSDQRQAC KKHELYVSFR DLGWQDWIIA PEGYAAYYCE
GECAFPLNSY MNATNHAIVQ TLVHFINPET VPKPCCAPTQ LNAISVLYFD DSSNVILKKY
RNMVVRACGC H
```

40

。当業者であれば、シグナルペプチドがタンパク分解性切断により除去されて、pro-BMP7と呼ばれるインタクトなプロドメイン/成熟ペプチドができることを理解されよう。

【0038】

野生型ヒト成熟BMP7は、約35 kDaの2つの139アミノ酸のグリコシル化ジスルフィド結合ホモ二量体形成タンパク質の二量体である。各ホモ二量体形成タンパク質は、SEQ ID NO:2:

50

STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE
 GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLN AISVLYFDDS
 SNVILKKYRN MVVRACGCH
 に示すアミノ酸配列を有する。

【0039】

ヒトBMP7タンパク質のバリエーションとしては、SEQ ID NO:2のヒト成熟BMP7のバリエーションが挙げられ、これはSEQ ID NO:3:

STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSXQRQXCKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPX
 GYAAXYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAXXQXL XHXXNPETVP KPCCAPTQLX AISXLYFDDX
 SNVILKKXRN MXVXACGCH

10

に示すコンセンサス配列に示される特定のアミノ酸の変更を有する。本開示のヒト成熟BMP7タンパク質の特定のバリエーションは、野生型成熟ヒトBMP7タンパク質と比べて、比活性の増加、可溶性特徴の改善、生物利用性の改善、内在性循環阻害物質との結合の減少、および/またはEBF活性の低下を有する。

【0040】

ヒトBMP7タンパク質の好適なバリエーションは、F93V/N110G; Y65G/I86L/T89A/N110G; Y65G/I86L/N110G/Y128F; Y65G/I86L/N110G/Y128W; Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W (BMP7-F9); Y65G/T89A/N110G/Y128F; Y65G/I86L/N110G; およびY65G/V114Mからなる群より選択される(下の表2参照)。

20

【0041】

(表2) ヒトBMP7の例示的バリエーション

| BMP7 バリエーション | アミノ酸配列 | SEQ ID NO: |
|---------------------------|---|---------------|
| F93V/N110G | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHVINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH | 4 |
| Y65G/I86L/ T89A/N110G | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQAL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH | 5 |
| Y65G/I86L/ N110G/Y128F | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLG AISVLYFDDS SNVILKKFRN MVVRACGCH | 6 |
| Y65G/I86L/ | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN | 7 |

30

40

50

| BMP7 バリエーション | アミノ酸配列 | SEQ ID NO: |
|---|---|---------------|
| N110G/Y128W | ATNHALVQTL VHF I NPETVP KPCCAP T QLG AISVLYFDDS SNVILKKWRN MVVRACGCH | |
| Y65G/I86L/ F93V/N110G/ Y128W (BMP7-F9) | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHV I NPETVP KPCCAP T QLG AISVLYFDDS SNVILKKWRN MVVRACGCH | 8 |
| Y65G/I89A/ N110G/Y128F | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAI V QAL VHF I NPETVP KPCCAP T QLG AISVLYFDDS SNVILKK F RN MVVRACGCH | 9 |
| Y65G/I86L/ N110G | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHALVQTL VHF I NPETVP KPCCAP T QLG AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH | 10 |
| Y65G/V114M | STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAGYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAI V QTL VHF I NPETVP KPCCAP T QLN AIS M LYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH | 11 |

10

20

30

40

50

【0042】

一態様では、BMP7のバリエーションは、Y65G/I86L/N110G/Y128WおよびY65G/I86L/F93V/N110G/Y128Wからなる群より選択される。

【0043】

一態様では、BMP7誘導体は、pro-BMP7の改変BMP7バリエーションである。pro-BMP7の改変バリエーションは、BMP7成熟タンパク質ドメインに対応するアミノ酸位置のアミノ酸置換を含み得る。pro-BMP7の改変バリエーションを加工して成熟BMP7誘導体タンパク質としてもよい。ヒト成熟BMP7タンパク質バリエーションのN末端に融合したプロドメインを含有する好適なpro-BMP7のバリエーションが、表3に示すSEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、およびSEQ ID NO:16からなる群より選択される。

【0044】

(表3) ヒトPro-BMP7の例示的バリエーション

| Pro-BMP7 バリエーション | アミノ酸配列 | | | | | |
|---------------------|------------|-------------|------------|-------------|--------------|----|
| SEQ ID NO:12 | DFSLDNEVHS | SFIHRRRLRSQ | ERREMQREIL | SILGLPHRPR | PHLQ GKHN SA | |
| | PMFMLDLYNA | MAVEEGGGPG | GQGFSPYKA | VFSTQGPPLA | SLQDSHFLTD | |
| | ADMVMSFVNL | VEHDKEFFHP | RYHHREFRFD | LSKIPEGEAV | TAAEFRIYKD | |
| | YIRERFDNET | FRISVYQVLQ | EHLGRESDF | LLDSRTLWAS | EEGWLVDIT | |
| | ATSNHWVVNP | RHNLGLQLSV | ETLDGQSINP | KLGLIGRHG | PQNKQPFMVA | |
| | FFKATEVHFR | SIRSTGSKQR | SQNRSKTPKN | QEALRMANVA | ENSSSDQRQA | 10 |
| | CKKHELYVSF | RDLGWQDWII | APEGYAAYYC | EGECAFP LNS | YMNATNHAIV | |
| | QTLVHVINPE | TVPKPCCAPT | QLGAISVLYF | DDSSNVILKK | YRNMVVRACG | |
| | CH | | | | | |
| SEQ ID NO:13 | DFSLDNEVHS | SFIHRRRLRSQ | ERREMQREIL | SILGLPHRPR | PHLQ GKHN SA | |
| | PMFMLDLYNA | MAVEEGGGPG | GQGFSPYKA | VFSTQGPPLA | SLQDSHFLTD | |
| | ADMVMSFVNL | VEHDKEFFHP | RYHHREFRFD | LSKIPEGEAV | TAAEFRIYKD | |
| | YIRERFDNET | FRISVYQVLQ | EHLGRESDF | LLDSRTLWAS | EEGWLVDIT | |
| | ATSNHWVVNP | RHNLGLQLSV | ETLDGQSINP | KLGLIGRHG | PQNKQPFMVA | |
| | FFKATEVHFR | SIRSTGSKQR | SQNRSKTPKN | QEALRMANVA | ENSSSDQRQA | 20 |
| | CKKHELYVSF | RDLGWQDWII | APEGYAAGYC | EGECAFP LNS | YMNATNHALV | |
| | QALVHFINPE | TVPKPCCAPT | QLGAISVLYF | DDSSNVILKK | YRNMVVRACG | |
| | CH | | | | | |
| SEQ ID NO:14 | DFSLDNEVHS | SFIHRRRLRSQ | ERREMQREIL | SILGLPHRPR | PHLQ GKHN SA | |
| | PMFMLDLYNA | MAVEEGGGPG | GQGFSPYKA | VFSTQGPPLA | SLQDSHFLTD | |
| | ADMVMSFVNL | VEHDKEFFHP | RYHHREFRFD | LSKIPEGEAV | TAAEFRIYKD | |
| | YIRERFDNET | FRISVYQVLQ | EHLGRESDF | LLDSRTLWAS | EEGWLVDIT | |
| | ATSNHWVVNP | RHNLGLQLSV | ETLDGQSINP | KLGLIGRHG | PQNKQPFMVA | |
| | FFKATEVHFR | SIRSTGSKQR | SQNRSKTPKN | QEALRMANVA | ENSSSDQRQA | 30 |
| | CKKHELYVSF | RDLGWQDWII | APEGYAAGYC | EGECAFP LNS | YMNATNHALV | |
| | QTLVHFINPE | TVPKPCCAPT | QLGAISVLYF | DDSSNVILKK | FRNMVVRACG | |
| | CH | | | | | |
| SEQ ID NO:15 | DFSLDNEVHS | SFIHRRRLRSQ | ERREMQREIL | SILGLPHRPR | PHLQ GKHN SA | |
| | PMFMLDLYNA | MAVEEGGGPG | GQGFSPYKA | VFSTQGPPLA | SLQDSHFLTD | |
| | ADMVMSFVNL | VEHDKEFFHP | RYHHREFRFD | LSKIPEGEAV | TAAEFRIYKD | |
| | YIRERFDNET | FRISVYQVLQ | EHLGRESDF | LLDSRTLWAS | EEGWLVDIT | |
| | ATSNHWVVNP | RHNLGLQLSV | ETLDGQSINP | KLGLIGRHG | PQNKQPFMVA | 40 |

| Pro-BMP7 バリエント | アミノ酸配列 |
|-------------------|--|
| | FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHFEINPE TVPKPCCAPT QLGAI SVLYF DDSSNVILKK WRNMMVVRACG CH |
| SEQ ID NO:16 | DFSLDNEVHS SFIHRRLRSQ ERREMQRREIL SILGLPHRPR PHLQGKHNSA PMFMLDLVNA MAVEEGGGPG GQGFSYPYKA VFSTQGPPLA SLQDSHFLTD ADMVMSFVNL VEHDKEFFHP RYHHREFRFD LSKIPEGEAV TAAEFRIYKD YIRERFDNET FRISVYQVLQ EHLGRESDFL LLDLRTLWAS EEGWLVFDIT ATSNHWVNP RHNLGLQLSV ETLDGQSINP KLAGLIGRHG PQNKQPFMVA FFKATEVHFR SIRSTGSKQR SQNRSKTPKN QEALRMANVA ENSSSDQRQA CKKHELYVSF RDLGWQDWII APEGYAAGYC EGECAPPLNS YMNATNHALV QTLVHVINPE TVPKPCCAPT QLGAI SVLYF DDSSNVILKK WRNMMVVRACG CH |

10

20

【0045】

本明細書に記載される方法で使用される好適なBMP7誘導体タンパク質としては、ヒト pre-BMP7 (すなわち SEQ ID NO:1) のバリエントが挙げられる。

【0046】

一態様では、BMP7誘導体タンパク質は、成熟野生型BMP7タンパク質と比べて増大した生物活性 (たとえば最大で50倍またはそれ以上の生物活性) および生物物理的特性 (たとえば増大した可溶性および安定性) を有する成熟BMP7タンパク質である。

【0047】

別の態様では、BMP7誘導体はBMP7-F9 (SEQ ID NO:8) である。

30

【0048】

本明細書において、SEQ ID NOの参照を含む野生型BMP7タンパク質またはそのバリエントへの言及は、各単量体サブユニットが指定の配列を有するホモ二量体を指す。たとえば、BMP7-F9 (SEQ ID NO:8) への言及は、各単量体サブユニットがSEQ ID NO:8に示す配列を有し、サブユニット同士がジスルフィド結合で連結している、ホモ二量体を指す。

【0049】

本明細書に記載される機能アッセイでは、特定のpro-BMP7タンパク質またはそのバリエントでの治療またはその投与は、特定の成熟BMP7のホモ二量体、すなわちその野生型またはバリエントの、一般には野生型ヒトプロドメインとの非共有結合複合体での治療またはその投与を指す。

40

【0050】

本明細書に記載される方法にしたがって、接触させる段階は、BMP7誘導体タンパク質を対象に投与することにより、実行され得る。

【0051】

BMP7が対象に及ぼす効果は、BMP受容体2 (BMPR2) に左右され得、該受容体の発現は前立腺がん患者において再発および骨転移と逆相関関係があることがわかっている (Kobayashi et al., "Bone Morphogenetic Protein 7 in Dormancy and Metastasis of Prostate Cancer Stem-Like Cells in Bone," J. Exp. Med. 208(13

50

) : 2641-55 (2011)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。したがって、一態様では、対象内の接触させるDCCは、骨形成タンパク質受容体陽性(BMPR⁺)である。

【0052】

本明細書に記載される方法は、対象に、化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含み得る。

【0053】

本明細書で使用する場合、「化学療法剤」という用語は、酵素ではない、かつがん細胞を殺すかがん細胞の増殖を阻害するが非がん性細胞にはさほど効果のない、合成の、生物学的な、または半合成の化合物を指す。任意の好適な化学療法剤を用いることができる。

10

【0054】

好適な化学療法剤としては、限定ではないが、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物が挙げられる。例示的なアントラサイクリンとしては、限定ではないが、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、エピルピシン、ミトキサントロン、およびイダルピシンが挙げられる。例示的なタキサンとしては、限定ではないが、ドセタキセルおよびパクリタキセルが挙げられる。例示的なキナーゼ阻害物質としては、限定ではないが、ラパチニブ、イマチニブメシル酸塩、およびゲフィチニブ(genefitinib)が挙げられる。例示的な抗体としては、限定ではないが、アレムツズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、リツキシマブ、トラスツズマブ、およびイブリツモマブチウキセタンが挙げられる。例示的なフルオロピリミジンとしては、限定ではないが、5-フルオロウラシル(5-fluorouracil)、カペシタピン、テガフル、テガフル-ウラシル、フロクスウリジン、5-フルオロデオキシウリジン、およびS-1が挙げられる。例示的な白金薬物としては、限定ではないが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、およびネダプラチンが挙げられる。

20

【0055】

さらなる好適な化学療法剤としては、限定ではないが、アルキル化剤(たとえばメクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、チオテパ、ヘキサメチルメラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジン(decarbazine)、エストラムスチン、ストレプトゾシン、およびテモゾロミド)、ピンカアルカロイド(たとえばピンブラスチン、ピンクリスチン、およびビノレルピン)、ポドフィロトキシン(たとえばエトポシドおよびテニポシド)、抗生物質(たとえばブレオマイシン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、およびバルルピシン(valrubicrin))、およびカンプトテシン類似体(たとえばイリノテカンまたはトポテカン)が挙げられる。

30

【0056】

いくつかの態様では、化学療法剤は、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))およびラパチニブ(タイケルブ(登録商標))から選択される抗HER2化学療法剤である。トラスツズマブは、がん細胞上のHER2/neu受容体を標的とするモノクローナル抗体である。ラパチニブは、上皮成長因子受容体(EGFR)およびHER2を標的とするチロシンキナーゼ阻害物質である。

40

【0057】

本明細書で使用する場合、「免疫療法剤」という用語は、対象内で免疫応答を誘導または増強することができる剤を指す。がんの文脈では、免疫療法剤は、がん性細胞をより有効に標的化しよう免疫系を刺激する。好適な免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、および腫瘍ワクチンから選択され得る。

【0058】

免疫チェックポイント阻害物質は、免疫チェックポイントの結合を阻害する化合物である。例示的な免疫チェックポイント調節剤としては、PD-1阻害物質(たとえばペムプロリズマブおよびニボルマブ)、PD-L1阻害物質(たとえばアテゾリズマブ、アベルマブ、およびデュルバルマブ)、およびCTLA-4阻害物質(たとえばイピリムマブ)が挙げら

50

れる。

【0059】

インターフェロン（「IFN」）は、標的細胞への直接の影響により、かつ免疫応答を活性化することにより、疾患に対し防御する、サイトカインのファミリーである。IFNは、腫瘍細胞および免疫細胞の両方によって産生されることができ、かつ両方に作用することができる。I型IFNは、IFN タンパク質、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、およびIFN ω を含む。I型IFNは、数種類の悪性病変に対する抗悪性腫瘍効果を媒介することが知られている（Moschos et al., Interferons in the Treatment of Solid Tumors, " Cancer Treat. Res. 126:207-241 (2005)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。

【0060】

本明細書で使用する場合、「腫瘍ワクチン」という用語は、対象内で腫瘍またはがん性細胞に対する免疫応答を刺激する組成物を指す。腫瘍ワクチンは、典型的には、対象にとって自己（自分由来）または同種異系（他者由来）であり得るがん関連物質または細胞（抗原）ソースと、抗原に対する免疫応答をさらに刺激しブーストするための他の成分（たとえばアジュバント）とで構成される。腫瘍ワクチンは、対象の免疫系を刺激して、1種類もしくは数種類の特定抗原に対する抗体を作らせることができ、かつ/またはそれらの抗原を有するがん細胞を攻撃するキラーT細胞を作らせることができる。

【0061】

本明細書で使用する場合、「エピジェネティック作用物質」という用語は、そのような剤との接触またはその投与の直後または後に、細胞のDNAのエピジェネティック状態（たとえばメチル化状態）を変える作用物質を指す。

【0062】

好適なエピジェネティック作用物質は、たとえばヒストンデアセチラーゼ（「HDAC」）阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコム抑制複合体2サブユニット（「EZH2」）阻害物質、プロモドメイン（「BRD」）阻害物質、およびそれらの誘導体から選択され得る。

【0063】

例示的なHDAC阻害物質としては、限定ではないが、トリコスタチンA、トラポキシンB、ベンズアミド、フェニルブチラート、バルプロ酸、ポリノスタット、ベリノスタット、LAQ824、パノピノスタット、エンチノスタット、CI994、およびモセチノスタットが挙げられる。

【0064】

例示的なEZH2阻害物質としては、限定ではないが、3-デアザネプラノシンA（DZNe p）、EPZ005687、GSK126、EI1、UNC1999、およびEPZ-6438が挙げられる（Kim et al., " Targeting EZH2 in Cancer, " Nat. Med. 22(2):128-134 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。

【0065】

例示的なプロモドメイン阻害物質としては、限定ではないが、JQ1、I-BET151/762、PF-1、およびRVX-208が挙げられる（Wadhwa et al., " Bromodomain Inhibitor or Review: Bromodomain and Extra-terminal Family Protein Inhibitors as a Potential New Therapy in Central Nervous System Tumors, " Cureus 8(5):e620 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。

【0066】

さらなる例示的なエピジェネティック作用物質としては、限定ではないがアザシチジンおよびデシタピンなどのDNAメチルトランスフェラーゼ（DNMT）阻害物質が挙げられる。

【0067】

DCC/DTC微小環境は、睡眠の増強に重要な役割を果たす。核内受容体サブファミリー2グループFメンバー1（NR2F1）は、核内ホルモン受容体かつ転写制御因子であり、腫瘍細胞睡眠シグネチャーを構成する転写因子ネットワークの主要なノードである。エスト

10

20

30

40

50

ロゲン受容体陽性 (ER⁺) 乳がん患者の遺伝子発現プロファイルに当てはめると、このシグネチャーはより長い無転移期間を予測することがわかっている (Kim et al., "Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer," *PloS One* 7:e35569 (2012)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。この休眠シグネチャーは、7~18年にわたり無症状だった前立腺がん患者の休眠DTCでも見つかり (Sosa et al., "NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes," *Nat. Commun.* 6:6170 (2015)およびChery et al., "Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways," *Oncotarget* 5:9939-51 (2014)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、ヒト疾患との関連性が明示される。

10

【0068】

NR2F1は、頭頸部扁平上皮がん (HNSCC) 患者由来の異種移植片 (PDX) モデルの腫瘍手術後、上向き調節され、局所および遠隔残存腫瘍細胞の休眠を誘導することがわかっている (Sosa, "Dormancy Programs as Emerging Antimetastasis Therapeutic Alternatives," *Mol. Cell. Oncol.* 3(1):e1029062 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。NR2F1発現の可塑性は、残存腫瘍細胞のエピゲノムの変化が外的および内的シグナルによって制御され得、DCCの運命を定め得ることを示唆している。NR2F1は、おそらくクロマチンのリプログラミングを調節することにより、誘導多能性幹細胞 (iPS) のリプログラミングを制限することがわかっている (Onder et al., "Chromatin Modifying Enzymes as Modulators of Reprogramming," *Nature* 483(7391):598-602 (2012)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。NR2F1はまた、休眠腫瘍細胞において全抑制的クロマチンを維持しながら、同時に自体のプロモーターも含め特定の休眠遺伝子のプロモーターにおける活性クロマチン状態を許容する鍵であり (Sosa et al., "NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes," *Nat. Commun.* 6:6170 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、このことは、腫瘍細胞の休眠をもたらす、NR2F1および微小環境キューにより調節される協調的エピジェネティックプログラムの存在を強調している。一態様では、DTCはNR2F1⁺である。

20

30

【0069】

DCCは、ISRのメディエーターである、高レベルのPERK経路活性化を示すことがわかっている (Bragado et al., "Microenvironments Dictating Tumor Cell Dormancy," *Recent Results Cancer Res.* 195:25-39 (2012); Sosa et al., "Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy," *Adv. Exp. Med. Biol.* 734:73-89 (2013); Goswami et al., "The Phosphoinositide 3-Kinase/Akt1/Par-4 Axis: A Cancer-Selective Therapeutic Target," *Cancer Res.* 66(6):2889-92 (2006);およびSchewe et al., "ATF6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells in vivo," *PNAS* 105(30):10519-24 (2008)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。PERKによるISRシグナリングおよびEIF2 リン酸化の結果、翻訳量が全体的に減少し、かつ遺伝子特異的翻訳、酸化ストレス、およびROS産生の増加、タンパク質分解、RNA分解、オートファジー、および脂質生合成がもたらされ、これらが腫瘍細胞の生存を助ける場合がある。

40

【0070】

別の局面は、対象内の微小残存がんを治療する方法に関し、該方法は、対象内の播種性がん細胞 (DCC) を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ (PERK) 阻害物質と接触させる段階であって、対象内のDCCを根絶して対象内の微小残存がんを治療する、段階を含む。

【0071】

50

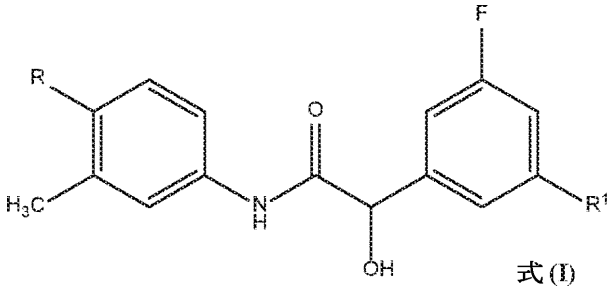
一態様では、DCCはホスホ-PERK活性である。したがって、方法は、対象内のDCCを、PERK阻害物質、MEK阻害物質、CDK4/6阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる段階をさらに含み得る。

【0072】

本明細書に記載される方法の一態様では、接触させる段階は、PERK阻害物質を対象に投与することにより、実行され得る。

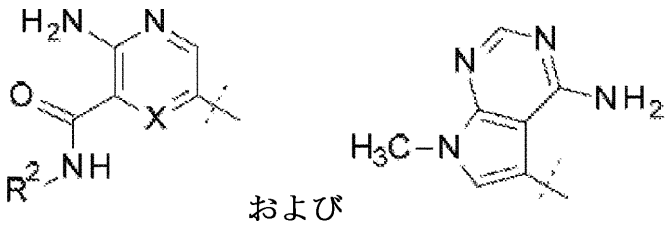
【0073】

一態様では、PERK阻害物質は、式(1)



10

の化合物、またはその薬学的に許容される塩であり、
式中、Rは、



20

からなる群より選択され；

XはCHまたはNであり；

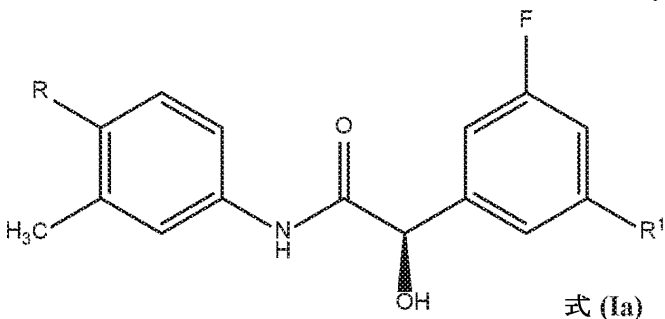
R¹は水素またはハロゲン（たとえばフルオロ）であり；

R²はC₁～C₃アルキルである。

30

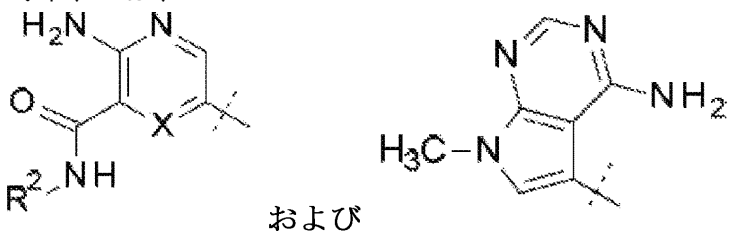
【0074】

さらなる態様では、PERK阻害物質は、式(1a)



40

の化合物、またはその薬学的に許容される塩であり、
式中、Rは、



50

からなる群より選択され；

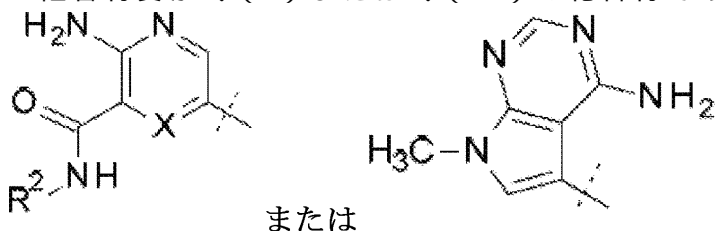
XはCHまたはNであり；

R¹は水素またはハロゲン（たとえばフルオロ）であり；

R²はC₁～C₃アルキルである。

【0075】

阻害物質が式(1)または式(1a)の化合物である場合、Rは、



10

であってもよい。

【0076】

本明細書で使用する場合、「アルキル」という用語は、鎖の中に約1～約6個の炭素原子または1～約3個の炭素原子（あるいは炭素数は「C_n～C_n」により指定され、ここでnは炭素原子の数の範囲）を有する直線状または分枝状であり得る脂肪族炭化水素基を意味する。分枝状とは、1つまたは複数の低級アルキル基、たとえばメチル、エチル、またはプロピルが、線状アルキル鎖に結合していることを意味する。例示的なアルキル基としては、メチル、エチル、n-プロピル、およびi-プロピルが挙げられる。

20

【0077】

「ハロゲン」という用語は、フルオロ、クロロ、プロモ、またはヨードを意味する。一態様では、ハロゲンはフルオロである。

【0078】

「化合物」という用語および同義の表現は、本明細書に記載される化合物を意味し、この表現は、文脈が許容する場合、プロドラッグ、薬学的に許容される塩、酸化物、および溶媒和物、たとえば水和物を含む。

【0079】

本明細書に記載される化合物は、1つまたは複数の不斉中心を含有し得、したがってエナンチオマー、ジアステレオマー、および他の立体異性体の形態を生じ得る。各キラル中心は、絶対立体化学的に(R)-または(S)-と定義され得る。本発明は、そうした可能なすべての異性体、ならびにそれらの混合物を、ラセミ的および光学的に純粋な形態も含めて、包含するものとする。光学活性(R)-および(S)-、(-)-および(+)-、または(D)-および(L)-異性体を、キラルシントンまたはキラル試薬を用いて調製してもよいし、従来技法を用いて分解してもよい。あらゆる互変異性形態も包含するものとする。

30

【0080】

「化合物」の記述は、その化合物の塩、溶媒和物、酸化物、および包接複合体、ならびに任意の立体異性体形態、またはそのようなあらゆる形態の該化合物をあらゆる比率で含む混合物を含むものとする。したがって、いくつかの態様では、本明細書に記載される化合物は、薬学的組成物、治療方法、および化合物自体の文脈内も含め、塩の形態で提供される。

40

【0081】

「溶媒和物」という用語は、好適な溶媒の分子が結晶格子中に含まれている固体状態の化合物を指す。治療的投与に好適な溶媒は、投与される用量が、生理学的に許容される。治療的投与に好適な溶媒の例は、エタノールおよび水である。溶媒が水であれば、溶媒和物は水和物と呼ばれる。一般に、溶媒和物は、化合物を適切な溶媒に溶かし、そして冷却により、または抗溶媒を用いて、溶媒和物を単離することにより、形成される。溶媒和物は、典型的には、周囲条件下で乾燥されるか共沸混合される。

【0082】

50

包接複合体は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th E d. 1:176-177 (1995)に記載されており、参照により全文が本明細書に組み入れられる。最も広く用いられる包接複合体は、シクロデキストリンを含むものであり、天然および合成のあらゆるシクロデキストリン複合体が具体的に本発明に包含される。

【0083】

「薬学的に許容される塩」という用語は、無機酸および塩基ならびに有機酸および塩基を含め薬学的に許容される非毒性の酸または塩基から調製される塩を指す。

【0084】

「薬学的に許容される」という用語は、適切な医学的判断の範囲内で、ヒトおよびより下等な動物の細胞と接触させる使用に適し、著しい毒性、刺激作用、アレルギー反応などがなく、妥当な利益/リスク比に対応していることを意味する。

【0085】

好適なPERK阻害物質は、LY2、LY3、LY4、およびそれらの組み合わせから選択され得る（以下の表4参照）。PERK阻害物質は、LY2、LY3、および/またはLY4の薬学的に許容される塩であり得る。

【0086】

（表4）例示的PERK阻害物質

| 化合物 | 物質名 | 構造 |
|-----|---|----|
| LY2 | 3-アミノ-6-[4-[[[(2R)-2-(3,5-ジフルオロフェニル)-2-ヒドロキシ-アセチル]アミノ]-2-メチル-フェニル]-N-メチル-ピラジン-2-カルボキシアミド | |
| LY3 | (2R)-N-[4-(4-アミノ-7-メチル-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-5-イル)-3-メチル-フェニル]-2-(3-フルオロフェニル)-2-ヒドロキシ-アセトアミド | |
| LY4 | 2-アミノ-5-[4-[[[(2R)-2-(3,5-ジフルオロフェニル)-2-ヒドロキシ-アセチル]アミノ]-2-メチル-フェニル]-N-イソプロピル-ピリジン-3-カルボキシアミド | |

【0087】

いくつかの態様では、接触させる段階は、EIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しないPERK阻害物質を用いて実行される。

【0088】

一態様では、PERK阻害物質はAXLを阻害しない。この態様では、PERK阻害物質はL

Y3およびLY4から選択される。

【0089】

別の態様では、PERK阻害物質はFlt3もMNK2もNTRKも阻害しない。この態様では、PERK阻害物質はLY4である。

【0090】

一態様では、接触させる段階は、MEK阻害物質を対象に投与することにより実行される。例示的なMEK阻害物質は、当技術分野において周知であり、たとえばPD184352、PD318088、PD98059、PD334581、RDEA119/BAY 869766が挙げられる（たとえばIverson et al., "RDEA119/BAY 869766: A Potent, Selective, Allosteric Inhibitor of MEK1/2 for the Treatment of Cancer," *Cancer Res.* 69(17):6839-47 (2009)参照。参照により全文が本明細書に組み入れられる）。

【0091】

別の態様では、接触させる段階は、CDK4/6阻害物質を対象に投与することにより実行される。例示的なCDK4/6阻害物質は、当技術分野において周知であり、たとえばアベマシクリブ（LY2835219）、パルボシクリブ（PD0332991）、およびリボシクリブ（LEE011）が挙げられる。

【0092】

一態様では、方法は、前記接触させる段階の前に、疾患エビデンスのない対象を選択する段階をさらに含み得る。たとえば対象は、該接触させる段階の前に、がん寛解状態である場合がある。

【0093】

本明細書に記載される方法を実行する場合、対象内の微小残存がんが治療される。そのような治療には、限定ではないが、微小残存がんの治療を必要とする対象に、該対象の状態（すなわちがんまたは微小残存がん）の治療に有効な1種類または複数種類の化合物を投与する段階が含まれ得る。

【0094】

一態様では、本開示の治療法は、播種性腫瘍細胞（「DTC」）の休眠の誘導および/または休眠DTC死の誘導に有効な条件下で実行される。

【0095】

本開示の治療法を実行する場合、対象への化合物の投与は、化合物（すなわち本開示のBMP7誘導体タンパク質およびPERK阻害物質）を含有する薬学的組成物を治療有効量だけ投与することを含み得、治療有効量とは、対象内の記載の状態および/または障害の治療に有効な化合物の量を意味する。そのような量は一般に、当業者は熟知のいくつかの要因により異なる。そのような要因としては、限定ではないが、具体的な対象、ならびに対象の年齢、体重、身長、総合的な健康状態、および病歴、用いられる具体的な化合物、ならびにそれが製剤化される担体、および選択される投与ルート；治療の長さまたは期間；ならびに治療される状態の特性および重症度が挙げられる。

【0096】

投与することは、典型的には、薬学的に許容される剤形を投与することを含み、それは本明細書に記載される化合物の剤形を意味し、たとえば錠剤、ドラジェ、粉末、エリキシル、シロップ、懸濁剤などの液体調製物、スプレー、吸入錠剤、薬用ドロップ、乳剤、溶液、顆粒、カプセル、および坐剤、ならびに注射用液体調製物、たとえばリポソーム調製物が挙げられる。技法および製剤はRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest editionに広く記載されており、参照により全文が本明細書に組み入れられる。

【0097】

本開示の治療法を実行する場合、薬物（すなわち本開示のBMP7誘導体タンパク質およびPERK阻害物質）は、任意の好適な担体物質中に、任意の適量で含有され得る。薬物は、組成物の全重量に対し最大99重量%の量だけ存在し得る。組成物は、経口、非経口（たとえば、静脈内、筋内）、直腸、皮膚、鼻腔、膺、吸入、肌（パッチ）、または眼内の

投与ルートに好適な剤形で提供され得る。したがって、組成物は、たとえば錠剤、カプセル、丸薬、粉末、顆粒、懸濁剤、乳剤、溶液、ヒドロゲルなどのゲル、ペースト、軟膏、クリーム、プラスター、水薬、浸透圧的送達デバイス、坐剤、浣腸、注射液、インプラント、スプレー、またはエアロゾルの形態であり得る。

【0098】

本開示の薬学的組成物は、活性薬物を、実質的に投与直後に、または投与後任意の所定の時間もしくは期間で放出するように製剤化され得る。

【0099】

徐放性製剤としては、(i)長時間にわたり体内で実質的に一定の薬物濃度を作る製剤；(ii)所定の時間のずれの後、長時間にわたり体内で実質的に一定の薬物濃度を作る製剤；(iii)活性薬物の血漿中レベルの変動に伴う望ましくない副作用を最小限に抑えつつ、体内で比較的一定した有効な薬物レベルを維持することにより、所定の時間内の薬物の作用を持続させる製剤；(iv)たとえば空間的に罹患細胞、組織、または器官に隣接してまたはその中に徐放性組成物を配置することにより、薬物の作用を局在化させる製剤；および(v)薬物を特定の標的細胞種に送達するための担体または化学的誘導体を用いることにより、薬物の作用を標的に絞る製剤が挙げられる。

10

【0100】

徐放性製剤の形態での薬物投与は、薬物が(i)狭小な治療指数(すなわち、有害副作用または毒性反応をもたらす血漿中濃度と、治療効果をもたらす血漿中濃度との差が小さい；一般に治療指数(TI)は半致死量(LD₅₀)対半有効量(ED₅₀)の比として定義される)；(ii)胃腸管の狭小な吸収窓；または(iii)血漿中濃度を治療レベルに維持するために1日何度も投与しなくてはならない、非常に短い生物学的半減期、を有する場合に、好ましい場合がある。

20

【0101】

関心対象の薬物の代謝率を放出率が上回る徐放性を獲得するために、いくつもあるストラテジーをどれでも遂行することができる。徐放性は、さまざまな製剤パラメーターおよび成分、たとえば、さまざまなタイプの徐放性組成物およびコーティングの適切な選択により獲得することができる。したがって、薬物は、適切な賦形剤とともに製剤化されて薬学的組成物とされ、該組成物は、投与されると、制御された様式で該薬物を放出する(1つまたは複数の単位の錠剤またはカプセル組成物、油性溶液、懸濁剤、乳剤、マイクロカプセル、マイクロスフィア、ナノ粒子、パッチ、およびリポソーム)。

30

【0102】

したがって、本開示の方法にしたがい投与することは、経口的に、局所的に、経皮的に、非経口的に、皮下的に、静脈内、筋内、腹腔内、鼻腔内滴下、腔内もしくは膀胱内滴下、眼内、動脈内、病変内、または粘膜塗布により、実行され得る。化合物は、単独で、または好適な薬学的担体といっしょに投与することができ、錠剤、カプセル、粉末、溶液、懸濁剤、または乳剤など、固体形態であっても液体形態であってもよい。

【0103】

前記薬物(すなわち本開示のBMP7誘導体タンパク質およびPERK阻害物質)は、たとえば不活性希釈剤もしくは消化される可食担体を用いて経口投与してもよく、またはハードもしくはソフトシェルカプセルに封入してもよく、または圧縮して錠剤にしてもよく、または食事の食べ物と直接併せてもよい。治療的経口投与では、薬物を賦形剤と併せて、錠剤、カプセル、エリキシル、懸濁剤、シロップ等の形態で用いてもよい。そのような組成物および調製物は、活性化合物を少なくとも0.001%含有すべきである。これらの組成物中の化合物のパーセンテージは、当然さまざまであり得、その単位の重量の約0.01%~約10%を占めるのが好都合であり得る。そのような治療に役立つ組成物中の活性化合物の量は、好適な用量となるようにされる。一態様では、組成物は、経口用量単位が活性化合物を約1 μg~1 g含有するように調製される。

40

【0104】

錠剤、カプセル等はまた、結合剤、たとえばトラガカントガム、アカシア、コーンスタ

50

ーチ、またはゼラチン；賦形剤、たとえばリン酸二カルシウム；崩壊剤、たとえばコーンスターチ、ジャガイモデンプン、アルギン酸；潤滑剤、たとえばステアリン酸マグネシウム；および甘味料、たとえばスクロース、ラクトース、またはサッカリンを含有し得る。単位剤形がカプセルである場合、上記の種類の材料に加えて、液体担体、たとえば脂肪油を含有し得る。

【0105】

さまざまな他の材料が、コーティングとして、または用量単位の物理的形態を調節するために、存在し得る。たとえば、錠剤は、セラック、糖、またはその両方でコーティングされ得る。活性成分に加えて、シロップが、甘味料としてのスクロース、保存料としてのメチルパラベンおよびプロピルパラベン、色素、ならびにチェリーまたはオレンジ風味などの香料を含有し得る。

10

【0106】

前記治療用物質は、非経口的に投与される場合もある。水中でヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と適切に混合して、溶液または懸濁剤を調製することができる。油中グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中、分散剤を調製することもできる。例示的な油は、石油、動物、植物に由来する、または合成された油、たとえばピーナツ油、大豆油、または鉱物油である。一般に、水、食塩水、デキストロースおよび関連糖の水溶液、およびグリコール、たとえばプロピレングリコール、ヒアルロン酸およびその誘導体、カルボキシメチルセルロース、および他の可溶性ポリサッカライド誘導体、またはポリエチレングリコールが、特に注射溶液として、好ましい液体担体である。通常の保管および使用の条件下では、これらの調製物は、無菌的に生産されていない場合は微生物を増殖させないように、保存料を含有する。

20

【0107】

注射用に好適な薬学的形態としては、滅菌水溶液または分散液、および滅菌注射液または分散液を即席で調製するための滅菌粉末が挙げられる。この形態は、滅菌しなくてはならず、かつ容易にシリンジ吸引できる程度の流体でなくてはならない。製造および保管の条件下で安定している必要があり、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から保護する必要がある。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール）、それらの好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒であり得る。

30

【0108】

前記治療用物質は、エアロゾルの形態で直接気道に投与され得る。エアロゾルとして使用する場合、治療用物質の溶液または懸濁液を、好適な噴霧剤、たとえばプロパン、ブタン、またはイソブタンなどの炭化水素噴霧剤、および一般的なアジブアントとともにエアロゾル圧力容器に詰めることができる。治療用物質は、ネビュライザーまたはアトマイザーなどで非圧力式に投与することもできる。

【0109】

一態様では、投与することにより、対象内の検出可能な休眠DCCの量が、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、またはそれ以上増加し得る。

40

【0110】

別の態様では、投与することにより、対象内の検出可能なDCCの量が、少なくとも約1%、少なくとも約2%、少なくとも約3%、少なくとも約4%、少なくとも約5%、少なくとも約6%、少なくとも約7%、少なくとも約8%、少なくとも約9%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%、またはそれ以上減少し得る。

50

【0111】

本開示の文脈では、「治療すること」は、対象内に症候性疾患（たとえばがん）のエビデンスがない状態を維持することを意味する。

【0112】

一態様では、「治療すること」または「治療」という用語は、特に、対象内の微小残存がんの根絶を指す。治療という用語には、DCCの休眠の誘導が含まれる。治療という用語には、対象内の休眠DCCの根絶も含まれる。治療という用語には、対象内の検出可能な休眠DCCの量または数の減少も含まれる。

【0113】

本開示の別の局面は、対象内の微小残存がんを治療する方法に関する。この方法は、対象内の播種性がん細胞（DCC）を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ（PERK）阻害物質と接触させる段階であって、対象内のDCCを根絶して対象内の微小残存がんを治療する、段階を含む。 10

【0114】

上述したように、本開示の方法は、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マントル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、結腸直腸がん、および他のがんのいずれか1つまたは複数と診断されている対象内の微小残存がんを治療するのに好適である。

【0115】

がんは、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん（DCIS）、非浸潤性小葉がん（LCIS）、および炎症性乳がんから選択される乳がんであり得る。 20

【0116】

一態様では、乳がんはHER2⁺乳がんである。

【0117】

別の態様では、対象は、播種性腫瘍細胞および/または非転移性がんとして診断されている。

【0118】

上述したように、本開示の方法は、対象に、化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含み得る。 30

【0119】

化学療法剤が対象に投与される場合、化学療法剤は、トラスツズマブ（ハーセプチン（登録商標））およびラパチニブ（タイケルブ（登録商標））から選択される抗HER2化学療法剤であり得る。別の態様では、化学療法剤は、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択され得る。

【0120】

免疫療法剤が対象に投与される場合、免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択される。

【0121】

エピジェネティック作用物質が対象に投与される場合、エピジェネティック作用物質は、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコーム抑制複合体2サブユニット（「EZH2」）阻害物質、プロモドメイン（BRD）阻害物質、およびそれらの誘導體から選択され得る。 40

【0122】

接触させる段階は、PERK阻害物質を対象に投与することにより、実行され得る。好適なPERK阻害物質は上記で詳しく記載しており、限定ではないが、LY2、LY3、およびLY4が挙げられる。

【0123】

一態様では、方法は、前記接触させる段階の前に、対象内のDTCの存在を検出する段階をさらに含む。上記でより詳しく記載したように、DTCは、NR2F1⁺、ホスホ-PERK 50

活性、および/またはBMP7⁺であり得る。

【0124】

前記方法は、対象内のDCC/DTCをBMP7誘導体タンパク質と接触させる段階をさらに含み得る。一態様では、対象内のDCC/DTCをBMP7誘導体タンパク質と接触させる段階は、BMP7誘導体タンパク質を対象に投与することにより実行される。好適なBMP7誘導体タンパク質は上述されている。一態様では、BMP7誘導体タンパク質はBMP7-F9である。

【0125】

一態様では、PERK阻害物質はEIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しない。

【0126】

上述したように、対象は、哺乳類、好ましくはヒトであり得る。

【0127】

一態様では、方法は、前記接触させる段階の前に、疾患エビデンスのない対象を選択する段階をさらに含み得る。たとえば対象は、該接触させる段階の前に、がん寛解状態である場合がある。

【0128】

本開示のさらに別の局面は、対象内の後期がんを治療する方法に関する。この方法は、対象内の播種性がん細胞(DCC)を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質と接触させる段階であって、対象内のDTCを根絶して、対象内の微小残存がんを治療する、段階を含む。

【0129】

本明細書で使用する場合、「後期がん」という用語は、ステージIIのがん、ステージIIIのがん、および/またはステージIVのがん、あるいは転移した任意のがんを指す。がん疾患状態の「後期」性は、医師により決定され得ることが理解されよう。

【0130】

上記で詳述したように、対象は、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マンデル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、または結腸直腸がんと診断されている場合がある。

【0131】

一態様では、がんは、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん(DCIS)、非浸潤性小葉がん(LCIS)、および炎症性乳がんから選択される乳がんである。乳がんは、HER2⁺乳がんであり得る。

【0132】

前記方法は、対象に化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含み得る。一態様では、化学療法剤は、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))およびラパチニブ(タイケルブ(登録商標))から選択される抗HER2化学療法剤である。別の態様では、化学療法剤は、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択される。免疫療法剤は、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択され得る。エピジェネティック作用物質は、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコム抑制複合体2サブユニット(EZH2)阻害物質、プロモドメイン(BRD)阻害物質、およびそれらの誘導体から選択され得る。

【0133】

一態様では、接触させる段階は、PERK阻害物質を対象に投与することにより、実行される。

【0134】

前記方法は、前記接触させる段階の前に、対象内のDCC/DTCの存在を検出する段階をさらに含み得る。

10

20

30

40

50

【0135】

上述したように、DTCは、NR2F1+またはホスホ-PERK活性であり得る。

【実施例】

【0136】

実施例1 - 実施例2~6の材料および方法

試薬、細胞培養、および処置：PeproTech（ニュージャージー州ロッキーヒル）からEGFを入手し、100 ng/mlを用いた。Sigma（ミズーリ州セントルイス）からタプシガルジンを入手し、2 nM用いた。H2B-Dendra2プラスミドの安定トランスフェクションによりZR75.1-H2B-Dendra2細胞株を作った（Gurskaya et al., “Engineering of a Monomeric Green-to-Red Photoactivatable Fluorescent Protein Induced by Blue Light,” Nat. Biotechnol. 24:461-465 (2006)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。3D培養のために、MCF10A-HER2、SKBR3、およびZR75.1-H2B-Dendra2細胞を、先述のように増殖因子低減マトリゲル（NY州コーニング、Corning）に蒔き、増殖させた（Avivar-Valderas et al., “Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK,” Oncogene 32(41):4932-40 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。「低密度」に言及する場合、細胞3500個/8ウェルを播種し、「高密度」は細胞2万個/8ウェルを播種した。ビヒクル（DMSO）またはLY4（2 μM）での処置は、2Dの場合は24時間おきに、3D培養の場合は48時間おきに交換した。

【0137】

マウス、腫瘍増殖、および組織処理：Jackson Laboratories（カリフォルニア州サクラメント）からFVB/N-Tg（MMTVneu）マウス系統を入手した。これらのマウスは、マウス乳腺腫瘍ウイルスプロモーター/エンハンサーの転写制御下で、非活性化neu（HER2）型を発現する。実験に用いる前に、雌を1回妊娠させ、離乳後少なくとも2週間授乳させなかった。24~32週齢の雌にビヒクル（90%トウモロコシ油、10%エタノール）またはLY4（50 mpk）を2週間毎日腹腔内注射した。併用処置は、24~32週齢の雌に4週間毎日経口経管によってアベマシクリブ（50 mpk）を用いて処置し、その後上記のようにLY4での処置を開始した。腫瘍体積を式（ $D \times d^2$ ）/2により測定し、ここでDは最大直径、dは最小直径である。CTC計測のために、動物を麻酔して心穿刺により全血を抜いた。乳腺、肺、および腫瘍を収集し、10%緩衝ホルマリンで一晩固定してからパラフィン包埋した。2本の後肢の骨髄を26 G針でフラッシュし、Ficoll密度勾配遠心法でさらに処理した。CTCならびに骨髄のDTCを検出するために、組織の成熟造血細胞を抗マウス抗体標識磁気ビーズ分離（カリフォルニア州サンディエゴのMiltenyi Biotech）により枯渇させてから、ホルマリンで20分、4℃で固定した。

【0138】

乳腺ホルマリン染色：10%緩衝ホルマリンで固定した乳腺を、Carmine Alum染色剤（カルミン0.2%、硫酸アルミニウムカリウム0.5%）（ミズーリ州セントルイスのSigma）中2日間インキュベートした。次いで脱水し、サリチル酸メチル溶液中に移してから、立体顕微鏡で撮像した。

【0139】

IHCおよびIF：パラフィン包埋切片のIHCおよびIFを、先述のように実施したAvivar-Valderas et al., “Regulation of Autophagy during ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK,” Oncogene 32(41):4932-40 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる）。簡単に説明すると、スライドを脱蠟し、系列再水和した。熱誘導性抗原回収を、クエン酸バッファー（10 mM、pH 6）、EDTAバッファー（1 mM、pH 8）、またはトリス/EDTA（pH 9）で実施した。スライドを、0.1%トリトン（商標）-X100でさらに透過処理し、ブロックし、一次抗体とともに一晩4℃で1:50~1:200希釈でインキュベートした。IHCのために、さらなる工程として内部ペルオキシダーゼおよびアビジン/ビオチンのクエンチを実施してから、一次抗体のインキュベーションを行った。用いられた一次抗体は、抗サイト

ケラチン8/18 (独国ハイデルベルクのProgen)、平滑筋アクチン-Cy3 (ミズーリ州セントルイスのSigma)、P-PERK (T980) (Tenkerian et al., "mTORC2 Balance s AKT Activation and eIF2alpha Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival Under Stress," Mol. Cancer Res. 13:1377-1388 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、P-EIF2A、切断型カスパーゼ3、P-H3 (S10)、P-HER2 (Y1221/1222) (マサチューセッツ州ダンバースのCell signaling)、P-Rb (S249/T252) (テキサス州ダラスのSanta Cruz)、HER2 (マサチューセッツ州ケンブリッジのAbcam)、HER2 (独国ダルムスタットのMillipore)、Ki67 (e BioscienceおよびAbcam)、サイトケラチンカクテル (C11およびck7、Abcam; AE 1およびAE3、Millipore)、およびGADD34 (Santa Cruz) であった。次に、スライドを二次抗体 (コネチカット州ノーウォークのLife Technologies) 中でインキュベートし、封入した。IHCのために、切片をVectaStain ABC Eliteキット (カリフォルニア州バーリングゲームのVector Laboratories) およびペルオキシダーゼ標識用DAB基質キット (Vector Laboratories) で処理し、VectaMount培地 (Vector laboratories) 中で封入した。IFのために、切片をProLong Gold Antifade水性培地 (マサチューセッツ州ウォルサムのThermo Fisher) 中で封入した。

10

【0140】

免疫組織蛍光の場合、固定化細胞のサイトスピン (細胞10万~20万個/サイトスピン) を500 rpm、3分の細胞遠心法によりpoly-prepスライド上に調製し、透過処理以降、以下で説明するようにして染色プロトコールを実施した。3D培養の染色では、腺房を4%PFA中20分、4 で固定し、PBS中0.5%トリトン (商標) -X100を用いて20分、室温で透過処理し、PBS-グリシンで洗浄し、次に10%正常ヤギ血清を用いて1時間37 でブロックしてから、免疫蛍光染色を実施した。

20

【0141】

P-HER2レベルのスコア付けを図10Aに説明している。乳管のCK8/18およびSMAのスコア付けは、動物当たり20の低拡大野について、CK8/18発現を陰性(0)、低(1)、または高(2)として、またSMAも同様にして評価し、2種類のスコアの和を最終スコアとした(0~4)。

【0142】

顕微鏡法: 画像は、Nikon Eclipse TS100顕微鏡、Leica DM5500、または共焦点Leica SP5多光子励起顕微鏡により撮影した。

30

【0143】

TUNELインサイチュー細胞死検出: アポトーシスレベルをIn situ Cell Death DetectionキットAP (スイス国バーゼルのRoche) を用いて評価した。腫瘍のパラフィン切片を脱蠟し、再水和させ、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 0.2%トリトン (商標) -X100で8分透過処理した。次いでスライドを洗浄し、20%正常ヤギ血清中、1時間、37 でブロックした。次にTUNEL反応混合物を添加し、1時間、37 で放置した。反応を、Buffer I (0.3 M塩化ナトリウム、30 mMクエン酸ナトリウム) とのインキュベートにより停止させた。次に、スライドを抗フルオレセイン-AP抗体とともに30分、37 でインキュベートした。トリス緩衝食塩水 (TBS) で3回洗浄した後、スライドを0.1%TWEEN (商標) -20中アルカリホスファターゼ基質中で20分、室温でインキュベートした。最後に、水性封入培地を用いてスライドを封入した。TUNEL陽性細胞のパーセンテージをImage Jソフトウェア (NIH) を用いて計算した。

40

【0144】

免疫プロット分析: 細胞をRIPAバッファー中で溶解させ、先述のように免疫プロットによりタンパク質分析を行った (Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells," Cancer Res. 66:1702-1711 (2006)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。P-PERK (T982) (Tenkerian et al., "mTOR

50

C2 Balances AKT Activation and eIF2alpha Serine 51 Phosphorylation to Promote Survival Under Stress,” *Mol. Cancer Res.* 13:1377-1388 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、PERK (テキサス州ダラスのSanta Cruz)、P-EGFR (Y1148)、EGFR、P-AKT (S473)、P-S6 (S235/236) (マサチューセッツ州ダンバースのCell signaling)、GAPDH (独国ダルムスタットのMillipore)、および -チューブリン (マサチューセッツ州ケンブリッジのAbcam) といった追加抗体を用いて、膜をプロットした。ERストレスを誘導するために、MCF10A-HER2細胞を低接着プレートに24時間蒔いてから収集した。

【0145】

細胞表面ビオチン化およびエンドサイトーシスアッセイ：細胞表面ビオチン化のために、Pierce細胞表面タンパク質単離キットを、小さな変更を加えつつメーカーの指示通りに用いた。簡単に説明すると、MCF10A-HER2細胞を血清およびEGF不足にし、+/-LY4で24時間処理した後、+/-EGF (100 ng/ml) で20分刺激した。次いで、細胞を氷冷PBSで洗浄し、表面タンパク質を30分、4 でビオチン化させた。クエンチした後、細胞を収穫し、RIPAバッファーを用いて溶解させた。タンパク質ライセートをNeutrAvidinアガロースビーズとともにインキュベートし、DTT (50 mM) 含有SDS-PAGEサンプルバッファーとのインキュベーションにより結合タンパク質を放出させた。エンドサイトーシスアッセイ (Cihil et al., “The Cell-Based L-Glutathione Protection Assays to Study Endocytosis and Recycling of Plasma Membrane Proteins,” *J. Vis. Exp.* e50867 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる) のために、細胞を同様に処理したが、EGF処理の前に細胞表面タンパク質をビオチン化させた。37 で20分、+/-EGF (100 ng/ml) でインキュベーション (エンドサイトーシスを誘導) した後、細胞を氷冷PBSで洗浄し、剥離バッファーとともに30分インキュベートした (細胞表面ビオチン化除去のため: 75 mM NaCl、1 mM MgCl₂、0.1 mM CaCl₂、50 mM グルタチノン、および80 mM NaOH、pH 8.6)。剥離効率を制御するため、細胞を37 のインキュベーションなしで剥離した (t=0)。細胞ライセートを調製し、前述のように処理してビオチン化タンパク質を単離した。

【0146】

単一細胞の標的遺伝子発現分析：28~30週齢MMTV-neu雌の原発腫瘍をコラゲナーゼで消化して単一細胞懸濁物とした。15~30週齢MMTV-neu雌の肺をコラゲナーゼで消化して単一細胞懸濁物とし、FACSバッファーに再懸濁させた。次いで細胞を抗HER2-PE、抗CD45-APC、およびDAPIで染色し、BDFACSAriaソーターを用いてHER2+/CD45-細胞集団をソートした。ソートした細胞を、細胞31万2500個/mlの濃度で培地に再懸濁させ、80 μlを20 μlの懸濁試薬と混合させた (C1 Fluidigm)。C1 Single-cell Preamp IFC 10~17 μmを用いて単一細胞を分離した。前増幅は、Ambion Single Cell-to-CT qRT-PCRキットおよび20x TaqMan Gene発現FAM-MGBアッセイを用いて行った。得られたcDNAをさらにC1 DNA希釈試薬1/3に希釈し、96.96 IFC (Fluidigm)、ハイスループットqPCR用Juno SystemコントローラーおよびBioMark HDを用いての遺伝子発現分析に用いた。qPCR反応にはTaqMan Fast Advanced Master Mixを用いた。分析は、Fluidigm Real-Time PCR Analysis SoftwareおよびClustergrammerウェブベースツール (Fernandez et al., “Clustergrammer, A Web-Based Heatmap Visualization and Analysis Tool for High-Dimensional Biological Data,” *Sci. Data* 4:1-12 (2017)、参照により全文が本明細書に組み入れられる) を用いて実施し、階層的クラスタリングヒートマップを得た。

【0147】

生化学的アッセイ：組み換えヒトEIF2AK3 (PERK) 触媒ドメイン (アミノ酸536~1116; Cat# PV5107)、GFP-eIF2 (Cat# PV4809) 基質、およびテルビウム標識化ホスホ-eIF2 抗体 (Cat# PR8956B) をInvitrogen (カリフォルニア州カールスバッド) から購入した。HIS-SUMO-GCN2触媒ドメイン (アミノ酸584~1019) を大腸菌 (*E. coli*) で発現させ、精製した。TR-FRETキナーゼアッセイを、阻害物質の

存在下または非存在下、50 mM HEPES、pH 7.5、10 mM MgCl₂、1.0 mM EGTA、および0.01% Brij-35からなる反応バッファー、ならびに100~200 nM GFP-eIF2 基質中、実施した。PERKアッセイは、62.5 ng/mlの酵素および1.5 μMのATP (K_{m, app}約1.5 μM)を含有し、GCN2アッセイは、3 nMの酵素および90 μMのATP (K_{m, app}約200 μM)を含有した。被験化合物の添加後、酵素添加により反応を開始させ、室温で45分インキュベートした。最終濃度10 mMのEDTA添加により反応を停止させ、テルビウム標識化ホスホ-eIF2 抗体を最終濃度2 nMで添加し、90分インキュベートした。得られた蛍光をEnVison (登録商標) Multilabelリーダー (マサチューセッツ州ウォルサムのPerkinElmer) で観察した。TR-FRET比および結果のIC₅₀値を、近似阻害曲線から決定した。生化学的特異性プロファイリングは、Cerep (ワシントン州レドモンド) およびDiscoverX (カリフォルニア州サンディエゴ) で実施した。

10

【0148】

細胞ベースのTR-FRETアッセイ：簡単に説明すると、GFP-eIF2 を発現するGripTite (商標) 293細胞 (Invitrogen) を細胞1万個/ウェルで384ウェルプレートに播種し、一晚接着させた。細胞を被験化合物で1時間前処理した。ツニカマイシン (1 μM) を添加してPERK活性を誘導し、プレートを37 °Cで2時間インキュベートした。培養培地を除去し、細胞を20 mM トリス-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% NP-40、5 mM NaF、プロテアーゼ阻害物質 (Sigma Cat# P8340)、ホスファターゼ阻害物質 (Sigma Cat# P2850)、および2 nM テルビウム標識化抗ホスホ-eIF2 抗体 (Invitrogen Cat# PM43121) からなるバッファー中で溶解させた。細胞ライセートを暗所で2時間、室温でインキュベートし、EnVison (登録商標) Multilabelリーダー (マサチューセッツ州ウォルサムのPerkinElmer) で蛍光を観察した。非誘導 (100%阻害) および誘導 (0%阻害) ウェルを対照として用いて、TR-FRET比および結果のIC₅₀値を、近似阻害曲線から決定した。

20

【0149】

ATF4-lucアッセイ：293細胞に、ATF4-luc発現レンチウイルス (メリーランド州フレデリックのSABiosciences) で形質導入し、1 μg/mlのピュロマイシンを含有する増殖培地中で選択した。化合物がERストレス誘導性ATF4活性に及ぼす効果を決定するために、293-ATF4-luc細胞を細胞1万5000個/ウェルでポリ-D-リジン被覆96ウェルプレートに播種し、一晚接着させた。次いで細胞を被験化合物で30分前処理した。ツニカマイシン (2 μM) を添加してERストレスを誘導し、プレートを37 °Cで6時間インキュベートした。次いで培養培地を吸引し、細胞をプレートシェーカー上、パッシブ溶解バッファー (Promega Cat# E194A) で5分溶解させた。ルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼアッセイ試薬 (Promega Cat# E1501) を用いてWallac 1420 Victor2 (商標) Multilabel Counter (マサチューセッツ州ウォルサムのPerkinElmer) で観察し、非誘導 (100%阻害) および誘導 (0%阻害) ウェルを対照として用いて、得られた近似阻害曲線からIC₅₀値を決定した。

30

【0150】

細胞生存率アッセイ：Hela、HT-1080、およびBx-PC-3細胞の増殖を、96ウェルプレートで、PERK阻害物質の非存在下または存在下、それぞれ48、72、または96時間観察した。細胞生存率をCellTiter-Glo (登録商標) 試薬 (ウィスコンシン州マディソンのPromega) を用いて決定し、無処理 (0%阻害) および20 μMスタウロスポリン処理 (100%阻害) ウェルを対照として用いて、得られた近似阻害曲線からIC₅₀値を決定した。

40

【0151】

統計学的分析：全ポイントが独立した生物学的試料を表し、エラーバーは標準偏差を表し、統計学的有意性はGraph Pad Prism Softwareを用いてマン・ホイットニー検定により決定した。

【0152】

実施例2 - 無活動HER2⁺ DTCはERストレス応答を示す

50

PERK経路活性化は、UPR誘導性増殖停止、および休眠表現型と関連付けられる生存の重要なエフェクターであることがわかっている (Brewer et al., "PERK Mediates Cell-Cycle Exit During the Mammalian Unfolded Protein Response," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:12625-30 (2000); Ranganathan et al., "Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival," *Cancer Res.* 68:3260-3268 (2008); および Ranganathan et al., "Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells," *Cancer Res.* 66:1702-1711 (2006)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる) 10

。MMTV-HER2動物では、高パーセンテージのマウスが肺への転移を生じ、それは初期DCCまたは後期DCCにより開始し得る (Guy et al., "Expression of the Neu Protooncogene in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Induces Metastatic Disease," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10578-10582 (1992); Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer," *Cancer Cell* 13:58-68 (2008); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016); Hosseini et al., "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer," *Nature* 540:552-558 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。休眠DCCはE-カドヘリンの喪失およびTwist1の発現を示すが (Harper et al. 20, "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、膵臓がんモデルのE-カドヘリン陰性DCCも、無活動であり、かつPERK誘導遺伝子CHOPの上向き調節を示すことがわかっている (Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases," *Science* 360(6394):eaao4908 (2018)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。これと同じPERK経路活性化レベルと細胞周期停止との相関関係が、MMTV-HER2自然転移モデルにも存在するかどうかを評価するために、免疫蛍光 (IF) を用いる高解像度撮影、ならびにDCCおよび転移の単一細胞解像度の遺伝子発現分析、の2つの異なるアプローチを用いた。大きな腫瘍を有し、したがって休眠および増殖性DCCを有する動物の、MMTV-HER2肺組織切片のIFを実施した (Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。次に、組織を同時染色してHER2、Ki67 (増殖マーカーとして)、およびGADD34 (またはPPP1r15A) 陽性DCCを検出した。GADD34は、(eIF2 リン酸化による) 翻訳抑制からストレス誘導性遺伝子発現へのプログラムされたシフトを担うPERK誘導性ストレス遺伝子である (Novoa et al., "Stress-Induced Gene Expression Requires Programmed Recovery from Translational Repression," *EMBO J.* 22:1180-7 (2003)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。画像分析によると、低増殖性指数 (ki67^{low}) のHER2⁺転移病変またはDCCは、高レベルの 40 GADD34発現により示されるように、高レベルのERストレスを呈した (図1A、上パネルおよびグラフ)。他方で、高増殖性DCCまたは病変では、非常に低レベルのGADD34染色が示された (図1A、下パネルおよびグラフ)。2つのマーカー、Ki67とGADD34とは、100%の細胞で逆相関しており、GADD34検出が、UPR^{high}、無活動DCC、および転移病変の生物指標となり得ることを裏付けている。

【0153】

次に、これらの相関関係がヒト乳房転移病変にも当てはまるかどうかを、異なるサブタイプ及びソース (リンパ節、肺、肝臓) の17の乳がん転移を試験して評価した (表5)。乳がん転移は、サイトケラチンを染色して、転移病変、Ki67、およびGADD34を特定した。進行型ヒト転移病変は、マウスモデルと比べて、患者間で、および同一病変の別の 50

領域間で、両マーカーのより不均質な染色パターンを示した。しかし、転移タイプに関係なく、増殖レベル（Ki67）とERストレス活性化レベル（GADD34）との逆相関が観測された（図1B）。この分析は、マウスモデルでの知見、およびGADD34が転移部位のU^{PR^{high}}/無活動腫瘍細胞の特定に役立ち得ることを、立証している。

【0154】

（表5）ヒト乳がん転移試料

| 患者 患者 | 名前 | ER 状態 | PR 状態 | HER2 状態 | 病態 | 転移試料 | サイトケラチン | Ki67* | GADD34* |
|----------|-------|----------|----------|------------|------|------|---------|-------|---------|
| 5 | 14850 | - | - | + | 乳管がん | リンパ節 | + | H | L |
| 4 | 14851 | + | - | + | 乳管がん | リンパ節 | + | L | I |
| 7 | 14852 | - | - | + | 乳管がん | リンパ節 | + | H | L |
| 8 | 14853 | - | - | + | 乳管がん | リンパ節 | + | H | L |
| 6 | 14854 | + | + | + | 乳管がん | リンパ節 | + | I | L |
| 1 | 14855 | + | + | + | 乳管がん | リンパ節 | + | L | H |
| 3 | 14856 | + | + | + | 乳管がん | リンパ節 | + | L | H |
| 9 | 14857 | + | + | + | 乳管がん | リンパ節 | + | H | - |
| 10 | 14858 | - | - | + | 乳管がん | リンパ節 | + | I | - |
| 2 | 14859 | + | - | + | 乳管がん | リンパ節 | + | L | H |

10

20

30

40

50

| 患者 | 名前 | ER状態 | PR状態 | HER2状態 | 病態 | 転移試料 | サイトケラチン | Ki67* | GADD34* |
|----|----------|---------|------|--------|-------------------|------|---------|-------|---------|
| | 9876パートD | + | + | - | 浸潤性 低分化型 | リンパ節 | + | L | I |
| | 3603パートB | + | + | - | 乳管 中分化型 | 肝臓 | + | H | L |
| | 879パートC | - | - | - | 言及なし | 肝臓 | + | H | - |
| | 1645パートF | - | - | + | 乳管 中分化型 | 肝臓 | + | L | H |
| | 1415パートB | + | + | - | 乳管 中分化型 | 肝臓 | - | I | I |
| | 8852パートA | N/A | N/A | N/A | 悪性葉状腫瘍、 高度の肉腫様 | 胸壁 | + | L | L |
| | 943パートC | +, 弱 | - | - | 腺 低分化型 | 肺 | + | L | H |

10

20

30

*高（H）；低（L）；中間（I）。

【0155】

転移性細胞に存在する増殖、無活動、休眠、およびERストレスのマーカーを、MMTV-HER2マウス肺内のDCC、ミクロ転移、およびマクロ転移の単一細胞を標的とする遺伝子発現分析を実施することにより評価した。MMTV-HER2雌の肺を処理して単一細胞懸濁物とし、HER2⁺/CD45⁻細胞をソートした（図2A）。次いで、図2Aに示すように、C1（Fluidigm）技術を用いて、ソートした細胞の単一細胞分離、溶解、RT、および前増幅の処理を行った。このパイプラインは、高信頼度（HER2⁺単一細胞のIFおよび分子の確認）および高品質の、255個の単一DCCおよび90個の原発腫瘍細胞ならびにそれらに対応するプールの単離および処理を可能にした。次に、ハイスループットqPCRを用いて、ERストレス遺伝子、細胞周期遺伝子（アクチベーターおよび阻害物質の両方）、および休眠遺伝子の発現を分析した（Kim et al., “Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer,” *PLoS One* 7:e35569 (2012)、参照により全文が本明細書に組み入れられる；B'chir et al., “The eIF2 /ATF4 Pathway is Essential for Stress-Induced Autophagy Gene Expression,” *Nucleic Acids Res.* 41:7683-99 (2013)；Harper et al., “Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer,” *Nature* 540:588-592 (2016)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる）（図2B）。DCCの単一細胞解像度遺伝子発現は、Rb1およびTP53などの細胞増殖の負のレギュレーターならびにCDK阻害物質p21、p27、p16、およびp15（Cd

40

50

kn2a-Rb1を囲むボックス)とともに、検査した全ERストレス遺伝子(PERK自体を含む)の付随するかつ強力な上向き調節(Fam123b-Ddit3を囲むボックス)を示す細胞集団(図1C、グループ1、DTCのおよそ19%)の存在を明らかにした(図1C)。これらの細胞では、NR2F1、DEC2(Bhlhe41)、TWIST1、CDH5、STAT3、およびCOL4a5などの休眠遺伝子発現の増大も観測された(Kim et al., "Dormancy Signatures and Metastasis in Estrogen Receptor Positive and Negative Breast Cancer," *PloS One* 7:e35569 (2012)およびHarper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)(Nr2f1-Ccnd1を囲むボックス)。DCCの別のグループ、グループ2(22%)も、p21とともに高レベルのERストレス遺伝子発現を示した。グループ3(6%)は、より少ないERストレス、細胞周期阻害物質、および休眠遺伝子を示し、それらが休眠から移行しつつあるか緩徐な周期モードにある細胞であり得ることを示唆している。全部で約40%のDCCが、細胞周期阻害物質または休眠遺伝子と同時に、高~中レベルのERストレス遺伝子発現を示した。このことは、増悪が進行したMMTV-HER2動物でホスホ-ヒストンH3およびホスホ-Rb検出により検出された休眠DCCのパーセンテージと方向性を同じくする(Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2 Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。まとめると、このデータは、検出可能な転移を有する動物でも、およそ40%のDCCが細胞周期阻害物質の高発現を示すことを示している。重要なことに、このモデルでは、この休眠DCC下位集団が、PERK経路遺伝子の顕著な活性化を示すことを伴う未解決UPRを示す。

10

20

【0156】

実施例3 - PERK阻害により骨髄および肺の無活動DCCが根絶され、ひいては肺転移が抑制される

上記の結果を受け、選択的PERK阻害物質が休眠DCC運命および転移形成に及ぼす効果の評価を行った。LY2、LY3、およびLY4(LYシリーズの阻害物質)は、インビボの研究をサポートする、適切な薬物様の特性をもつ強力かつ選択的なPERK阻害物質とされている(Pytel et al., "PERK Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma," *PLoS Genet.* 12:1-22 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。LYシリーズの阻害物質をインビトロのキナーゼアッセイ(eIF2を基質として用いる)および細胞ベースのアッセイで試験し、eIF2リン酸化およびその下流のATF4出量を調べた(表6)。3種類の阻害物質すべてがGSK2656157と比べて同等または優れた効力を示し(Axten et al., "Discovery of GSK2656157: An Optimized PERK Inhibitor Selected for Preclinical Development," *ACS Med. Chem. Lett.* 4:964-968 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる); HER2発現MCF10A細胞でP-PERK(P-T980)レベルおよびその下流の標的ATF4を有効に減少させ(図2Cおよび図3A); これらの同じ細胞を低用量タブシガルジン処理に対し感受性とし、かくしてこれらのPERK阻害物質がいかに選択的にERストレス適応に影響するかを示した(図2D)。

30

40

【0157】

生化学的酵素アッセイ(図2E)によると、LY4が最も高い特異性を示し、15 μM未満の濃度で二次キナーゼ標的をいっさい示さなかったが、LY2、LY3、およびGSK2656157は、5 μM未満、また1 μMの濃度でも、いくつかの二次標的を示した。DicoveRx scanMAX(商標)キナーゼプロファイリング(表6)により、LY4は他の阻害物質よりも高い選択性を示すことが確認され、非常に高い濃度(20 μM)でも、全456のキナーゼうち、50%の阻害は、LY4は、GSK2656157の80と比べて20のみ、または60%の阻害は58と比べて8であった。これらの二次標的はどれも、他の既知のeIF2キナーゼ、EIF2AK1(HRIとしても知られる)、EIF2AK2(PKRとしても知られる)、お

50

よびEIF2AK4 (GCN2としても知られる)でなく(表7)、測定したeIF2 に対する活性は、PERK阻害に高度に特異的であったことが示された。

【0158】

(表6)異なるPERK阻害物質の酵素および細胞ベースのIC₅₀値およびキナーゼ選択性

| 化合物 | PERK ^a | PERK ^b | ATF4-luc ^c | GCN2 ^d | 阻害したキナーゼ数>50% ^e | | |
|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------|---------|
| | 酵素 IC ₅₀ (μM) | 細胞ベース IC ₅₀ (μM) | 細胞ベース IC ₅₀ (μM) | 酵素 IC ₅₀ (μM) | 0.2 μM | 2.0 μM | 20.0 μM |
| LY2 | 0.002 | 0.117 | 0.056 | 10.8 | 16 | 35 | 138 |
| LY3 | 0.002 | 0.026 | 0.016 | 16.4 | 27 | 85 | 229 |
| LY4 | 0.002 | 0.054 | 0.048 | 18.1 | 19 | 20 | 48 |
| GSK2656157 ^f | 0.008 | 0.036 | 0.021 | >200 | 34 | 80 | 183 |

10

^a 精製eIF2aを基質として用いたPERK生化学的アッセイ。

^b 293個の細胞におけるツニカマイシン誘導性eIF2aリン酸化の細胞ベースのアッセイ。

20

^c 293個の細胞におけるツニカマイシン誘導性ATF4-Luc活性の細胞ベースのアッセイ。

^d 精製eIF2aを基質として用いたGCN2生化学的アッセイ。

^e 活性部位プローブの置換を用いた結合データに基づくDiscover_x scanMAX (商標) キナーゼプロファイリング、456種類のキナーゼを試験。

^f Atkins et al., "Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity," Cancer Res. 73(6):1993-2002 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる。

【0159】

(表7)他のeIF2 キナーゼのインビトロ阻害の比較

| KINOMEscan 遺伝子記号 ^a | Entrez 遺伝子 記号 | LY4 | | | GSK-2656157 ^b | | |
|----------------------------------|---------------------|--------|------|-------|--------------------------|------|-------|
| | | 0.2 μM | 2 μM | 20 μM | 0.2 μM | 2 μM | 20 μM |
| EIF2AK1 | EIF2AK1 | 0 | 0 | 35 | 8 | 77 | 95 |
| PRKR | EIF2AK2 | 0 | 0 | 0 | 20 | 45 | 67 |
| GCN2(Kin.Dom.2,S808G) | EIF2AK4 | 0 | 0 | 28 | 7 | 13 | 79 |

30

^a 活性部位プローブの置換を用いた結合データに基づくDiscover_x scanMAX (商標) キナーゼプロファイリング、456種類のキナーゼを試験。

^b Atkins et al., "Characterization of a Novel PERK Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity," Cancer Res. 73(6):1993-2002 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる。

40

【0160】

24~32週齢の1回経産MMTV-HER2雌マウスを、2週間毎日i.p.でピヒクルまたはLY4 (50 mpk) で処置した。乳腺、肺、脾臓、骨髄、および腫瘍を収集してさらに分析した。LY4の耐容性は良好で、体重にも有意な変化がなく、このことは、血中グルコースレベルにも脾臓機能にも影響なしとする最近の研究と合致する (Pytel et al., "PERK

50

Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor: Gene Dose Determines Tumor-Suppressive Versus Tumor Promoting Properties of PERK in Melanoma,” *PLoS Genet.* 12:1-22 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。該阻害物質は、MMTV-HER2雌の全細胞数に影響がなかったことからわかるように、骨髄細胞のホメオスタシスにも末梢血液の白血球にも有意な影響がなかった(図2F)。

【0161】

PERK阻害は、乳管および膵臓組織においてP-PERKおよびP-eIF2 レベルの有意な減少をもたらした(ただし、特に膵臓では、部分的でしかなかった)(図3B)。LY4の全身送達は、PERK活性化およびeIF2 リン酸化を有効に阻害すると結論付けた。PERK阻害は、PERK活性を完全に枯渇させたわけではなく、したがってマウスは膵臓機能およびグルコースレベルを制御できた可能性がある(Yu et al., “Type I Interferons Mediate Pancreatic Toxicities of PERK Inhibition,” *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112:15420-15425 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【0162】

高パーセンテージのMMTV-HER2動物で肺への転移が生じ、それは増悪の初期に開始し得る(Guy et al., “Expression of the Neu Protooncogene in the Mammary Epithelium of Transgenic Mice Induces Metastatic Disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:10578-10582 (1992); Husemann et al., “Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer,” *Cancer Cell* 13:58-68 (2008); Harper et al., “Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her 2+ Mammary Cancer,” *Nature* 540:588-592 (2016), Hosseini et al., “Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer,” *Nature* 540:552-558 (2016); Linde et al., “Macrophages Orchestrate Breast Cancer Early Dissemination and Metastasis,” *Nat. Commun.* 9:21 (2018)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【0163】

したがって、LY4 PERK阻害物質が転移性疾患に及ぼす効果を、小さい腫瘍および/または触診可能な大きい腫瘍を有する動物で観察した。ビヒクル処置の動物はすべて、H&E染色した切片中、検出可能な転移を示した。100個超の細胞を示した病変は、一般に増殖マーカー陽性でもあり、マクロ転移として分類した(図1A)。動物当たり(5つの非連続的肺切片)のマクロ転移の定量化から、たった2週間の処置後、LY4はこうした転移の面積に影響を及ぼすことなく(図4A)、マクロ転移の数および発生率を低下させたことが明らかになった。(図3C)。このことは、PERK阻害が、既成のマクロ転移の縮小よりも、転移の初期段階に作用し得ることを示唆した。そこで次に、LY4処置が、原発部位からの腫瘍細胞の血管内侵入、または単独DCCからミクロ転移(2~100個の細胞を含有)への移行に影響を及ぼし得るかどうかを評価した。血液試料中のHER2+循環腫瘍細胞(CTC)を直接検出したところ、ビヒクル処置動物とLY4処置動物とに有意差はなく(図4B)、LY4は腫瘍細胞の血管内侵入に大きく影響しないことが示された。他方で、HER2検出によりIHCでミクロ転移および単一DCCを検出すると、LY4処置雌でミクロ転移数の有意な減少が明らかになった(図3D)。肺内の単一DCCの80%超がP-Rb陰性であり、それらはほぼ細胞周期にはなく、休眠していることが示された。この測定結果は、先行研究の測定結果を再現している(Harper et al., “Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2+ Mammary Cancer,” *Nature* 540:588-592 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。LY4が、P-Rb陽性単独DCCの数(図3E)またはミクロ転移(図4C)に影響することなく、肺切片において一般に血管と関連する非増殖性(P-Rb陰性)単一DCCの数を大きく低下させたことは、意義深い。重要なことに、LY4は、骨髄に見られるDCCの数を有意に減少させた(図3F)。骨髄では、転移は一切生じないが、DCCは高出現率で見られ、休眠している(Bragado et al., “TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-R111 and P38Alpha/Beta Signalling,” *Nat. Cell.* 50

Biol. 15:1351-1361 (2013); Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer," *Cancer Cell* 13:58-68 (2008); and Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2 Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)。これらの結果は、PERK阻害が、活性PERKおよびUPRシグナリングを示す非増殖性休眠DCCを選択的に標的化することを示している。

【0164】

LY4処理が細胞周期外のヒトDCCの生存を選択的に標的化できるかどうかをさらに試験するために、この生態を3D培養でモデル化した。ヒストンH2Bと融合した光変換型蛍光タンパク質(Dendra2)を安定発現するヒトZR75.1 HER2⁺細胞を用いて、無活動細胞内のH2B含有ヌクレオソームはターンオーバーが遅いため、長期標識保持アッセイを実施した(Wilson et al., "Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch From Dormancy to Self-Renewal During Homeostasis and Repair," *Cell* 135:1118-1129 (2008)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。405 nm光におよそ1分曝露すると、H2B-DENDRA2タンパク質は緑色から赤色蛍光に変換し、緑色および赤色の二重陽性となり、緑色に戻る細胞は分裂してH2B-DENDRA2-RED分子を希釈しているが、無活動の細胞はH2B-DENDRA2 GREEN and REDのままである(Gurskaya et al., "Engineering of a Monomeric Green-to-Red Photoactivatable Fluorescent Protein Induced by Blue Light," *Nat. Biotechnol.* 24:461-465 (2006)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。3Dマトリゲルマトリックスに高密度(クラスター)で播種されたマクロ転移模倣細胞、または低密度(単一細胞)で播種された単一DCC模倣細胞を、光変換させた(100%)(図4D)。8日後、H2B-DENDRA2-RED陽性だった高密度細胞は35%だけだった。これに対し、低密度ZR75.1 HER2⁺細胞の65%がH2B-DENDRA2-RED陽性であり(図4E)、単独DCCの無活動状態を模倣していた(Bragado et al., "TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-R111 and P38Alpha/Beta Signalling," *Nat. Cell. Biol.* 15:1351-1361 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。PERK阻害物質LY4での処理は、高密度で播種されたZR75.1 HER2⁺の生存率に有意な効果を及ぼさなかった(図4F)。ところが無活動単一ZR75.1 HER2⁺細胞は根絶し、インビボのDCCの結果と一致した(図3G)。これらのデータは、単独腫瘍細胞の文脈では内因性および/またはECM依存性シグナルがPERKシグナリングへの依存をもたらすこと、およびLY4は後に再活性化して転移を生じさせる緩徐な細胞周期をもつまたは非増殖性のDCCを確かに選択的に標的化していることを、示している。

【0165】

実施例4 - PERK阻害は初期および後期のHER2誘発性乳腺腫瘍増悪を妨害する

最も休眠と関連のある無活動UPR^{high} DCCにおいてPERK依存性が存在することを実証したの続き、腫瘍病変を評価した。HER2誘発性の増悪は、MMTV-HER2モデルでは遺伝子的にPERKキナーゼに依存することが見出されており(Bobrovnikova-Marjon et al., "PERK-Dependent Regulation of Lipogenesis During Mouse Mammary Gland Development and Adipocyte Differentiation," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 105:16314-16319 (2008)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、またHER2⁺腫瘍はタンパク質毒性に感受性であり、かつERAD依存性であることがわかっている(Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive," *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。さらに、cBioデータベース(Cerami et al., "The cBio Cancer Genomics Portal: An Open Platform for Exploring Multidimensional Cancer Genomics Data," *Cancer Discovery* 2:401-404 (2012)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)の分析によると、HER2増幅ヒト乳腺腫瘍のおよそ14%が、PERKに関するmRNAの上向き調節を

示すことがわかった(図5A)。したがって、過形成乳腺からDCISおよび浸潤性がんまで種々のステージの増悪が分析され得る原発病変において、LY4がHER2誘導性乳腺腫瘍増悪に影響したかどうかを調査した(Lu et al., "Mechanism of Inhibition of MMTV-neu and MMTV-wnt1 Induced Mammary Oncogenesis by RARalpha agonist AM580," *Oncogene* 29(25):3665-76 (2010); Muller et al., "Single-Step Induction of Mammary Adenocarcinoma in Transgenic Mice Bearing the Activated c-neu Oncogene," *Cell* 54(1):105-115 (1988); Harper et al., "Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2⁺ Mammary Cancer," *Nature* 540:588-592 (2016); Hosseini et al., "Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer," *Nature* 540:552-558 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【0166】

24週齢の1回経産雌の乳腺の分析によると、ビヒクル処置のMMTV-HER2動物は二次的および三次的に密な分枝を有する乳管を示し(図6A、左パネル)、組織学的分析では腺過形成病変の多発が示された(図6A、右パネル、黒矢印)。これに対し、LY4処置の動物は、非遺伝子組み換え正常FVBマウスの乳腺ツリーと似た、分枝の少ない「正常化」乳管構造を示した(図3B)。LY4処置動物はまた、中空の乳管数が全構造の60%超を占めており、対照雌の約20%と比べて大きな増加を示した(図6Bおよび図5C)。閉塞過形成およびDCIS様病変の数も、ビヒクル処置動物の半分未満に低下した。対照HER2⁺動物の過形成病変は、さまざまな程度の管腔の分化を示し、それは不均一なサイトケラチン8/18発現レベルにより査定した(図6C、上パネル)。正常FVB動物の乳管では均等に離間しているはずの筋上皮細胞(平滑筋アクチン、SMA、陽性として検出)が、ビヒクル処置のMMTV-HER2マウスの過形成では不均一に分布していた。これに対し、LY4処置のMMTV-HER2動物は、空の管腔を取り囲んでいることが多い管腔層、および外側の筋上皮細胞の連続層において、サイトケラチン8/18発現の増加を示した(図6C、下パネルおよびグラフ)。このデータは、LY4処置が、分化プログラムを回復させると考えられる機構によって、初期のがん病変の「正常化」をもたらすことを示す。

【0167】

動物は、体積30~200 mm³の腫瘍(2つの腫瘍は200 mm³であった)を示すと、LY4で2週間処置した。(図7A)。ビヒクル処置群では、腫瘍は着実に成長し(図8A)、2週間でもとの体積の10倍にも達した(図7B、上グラフ)。これに対し、LY4処置した腫瘍は、成長率の低下を示し(図8A)、一部の腫瘍は完全な細胞増殖停止状態が続き(腫瘍体積が2週間でようやく倍増するペースと定義され、LY4処置では43%に対し、対照では7%)(図7B、下グラフ)、一部の腫瘍(25%)は2週間の処置枠で退縮を示した(図7C)。これによって、最終腫瘍体積中央値が有意に下がった(図8B)。増殖レベル(P-ヒストンH3 IHC)は、ビヒクル処置腫瘍とLY4処置腫瘍とでは差がなかったが(図7D)、腫瘍切片のTUNEL染色は、LY4処置動物におけるDNA断片化レベルの有意な増加を示した(図8C)。このように、顕性原発病変ではLY4処置は既成HER2⁺腫瘍のアポトーシスを誘導し、増悪中にPERK機能を促進する文脈依存性の適応が示された。

【0168】

3Dマトリゲル腺房培養のHER2過剰発現(MCF10A-HER2またはZR75.1)またはHER2増幅(SKBR3)を有するヒトがん細胞の、LY4による処理(図8Dおよび図7E)は、ビヒクルまたはLY4(2 μM)での10日間の処理により、これらのオルガノイド、特にECMとの接触を断たれた内細胞塊において、アポトーシスレベル(切断型カスパーゼ-3)が有意に増加したことが示された(図8D)。インビボと同じく、ホスホ-ヒストンH3レベルによる検出では、増殖レベルの有意な変化は観測されなかった(図7F)。初期MMTV-HER2⁺病変は、乳管上皮構成のHER2誘発性変化のためにPERKを要すると結論付けた。HER2⁺ヒトがん細胞およびマウス腫瘍では、HER2は生存をPERKに依存している。

【0169】

10

20

30

40

50

実施例5 - 最適なHER2リン酸化、局在化、ならびにAKTおよびERK活性化はPERKシグナリングを要する

HER2⁺腫瘍はタンパク質毒性に対し感受性であるため (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive," *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、PERK阻害物質が、ERクライアントタンパク質負荷の増加により最適なHER2活性に影響し得るかどうかを評価した。腫瘍内の残基Y1221/1222のHER2リン酸化の検出は、他の研究で報告されているP-HER2陽性面積 (DiGiovanna et al., "Active Signaling by Neu in Transgenic Mice," *Oncogene* 17:1877-1884 (1998)、参照により全文が本明細書に組み入れられる) がP-PERKおよびP-eIF2 の染色と重なったことを示した (図9A)。この知見は、PERK経路およびHER2経路の活性化が同時局在することを示した。同様に、原発腫瘍細胞の単一細胞を標的とする遺伝子発現プロファイリングでも、高レベルのERストレス遺伝子発現を有する原発腫瘍細胞集団 (約25%) が示され (図9B)、これはP-HER2活性化を示す集団に対応した可能性がある。重要なことに、染色の面積および強度の両方を考慮して腫瘍のP-HER2レベルをスコア付けすると (図10A)、LY4処置腫瘍は対照動物よりも有意に低いレベルのP-HER2を示したことが見出された (図9C)。HER2は、EGFRおよびHER3とのホモ二量体またはヘテロ二量体としてシグナル伝達する (Moasser MM, "The Oncogene HER2: Its Signaling and Transforming Functions and its Role in Human Cancer Pathogenesis," *Oncogene* 26(45):6469-87 (2007) および Negro et al., "Essential Roles of Her2/erbB2 in Cardiac Development and Function," *Recent Prog. Horm. Res.* 59:1-12 (2014)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)。飢餓状態にし、そしてLY4 (2 μM) の存在下または非存在下でEGF (100 ng/ml、15分) で処理したMCF10A-HER2細胞のインビトロ処理は、PERK阻害物質が、基底およびEGFの両方が誘導するP-EGFRおよびP-HER2のレベルを減少させたこと、ならびに生存経路P-AKT、P-S6、およびP-ERK1/2レベルの下向き調節を明らかにした (図9Dおよびグラフ、ならびに図10B)。表面ビオチン化および同時免疫沈降を調べて決定したところ、これらの条件下では、全HER2レベルまたはEGFRとのヘテロ二量体化に対する明白な効果は観測されなかった。LY4は、どのHERファミリーメンバーの活性部位、AKTまたはS6キナーゼに対しても直接の阻害効果がないので (表8)、この効果はHER2シグナリングに対する間接的なPERK阻害効果によるものであろう。他のHERファミリーメンバーと違って、HER2は、リガンドとの結合および二量体化後も細胞膜に留まることが知られている (Hommelgaard et al., "Association with Membrane Protrusions Makes ErbB2 an Internalization-Resistant Receptor," *Mol Biol Cell.* 15(4):1557-67 (2004); Bertelsen et al., "The Mysterious Ways of ErbB2/HER2 Trafficking," *Membranes (Basel)* 4:424-446 (2014)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)。LY4がHER2受容体の活性化機構を妨害し得るかどうかを試験するために、表面ビオチン化アッセイを実施して、細胞表面の受容体の存在を測定し、かつ可逆的表面ビオチン化を測定して、受容体エンドサイトーシスを測定した (Cihil et al., "The Cell-Based L-Glutathione Protection Assays to Study Endocytosis and Recycling of Plasma Membrane Proteins," *J. Vis. Exp.* e50867 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。データは、LY4処理が、細胞表面のP-HER2および全HER2の量を減少させ (図9Eおよび図10C)、またそれに付随してホスホ-HER2および全HER2のエンドサイトーシスを増加させたことを示した (図9F)。このデータは、Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive," *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015) (参照により全文が本明細書に組み入れられる) のデータとともに、PERKシグナリングおよび適当なUPR機能が、最適な受容体局在化および活性化に影響することにより、適当なHER2下流シグナリングの維持に必要であることを示唆している。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 0 】

(表 8) HERファミリーシグナリング経路に対するLY4の直接的な阻害活性

| KINOMEscan 遺伝子記号 | Entrez 遺伝子記号 | LY4 | | | GSK-2656157 | | |
|---------------------|-----------------|-------------|-----------|------------|-------------|-----------|------------|
| | | 0.2 μ M | 2 μ M | 20 μ M | 0.2 μ M | 2 μ M | 20 μ M |
| AKT1 | AKT1 | 0 | 5 | 0 | 14 | 32 | 0 |
| AKT2 | AKT2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 8 |
| AKT3 | AKT3 | 0 | 0 | 13 | 24 | 3 | 0 |
| EGFR | EGFR | 30 | 23 | 16 | 18 | 16 | 50 |
| ERBB2 | ERBB2 | 0 | 0 | 0 | 57 | 64 | 97 |
| ERBB3 | ERBB3 | 0 | 0 | 0 | 40 | 22 | 53 |
| ERBB4 | ERBB4 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| ERK1 | MAPK3 | 2 | 18 | 0 | 0 | 17 | 0 |
| ERK2 | MAPK1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| ERK3 | MAPK6 | 0 | 32 | 3 | 0 | 16 | 0 |
| ERK4 | MAPK4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 35 | 0 |
| ERK5 | MAPK7 | 0 | 0 | 4 | 4 | 23 | 12 |
| ERK8 | MAPK15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 |
| S6K1 | RPS6KB1 | 31 | 0 | 24 | 0 | 30 | 56 |
| SRC | SRC | 0 | 1 | 11 | 10 | 45 | 69 |
| SYK | SYK | 0 | 0 | 0 | 0 | 12 | 23 |
| CSK | CSK | 31 | 0 | 14 | 0 | 33 | 64 |
| PIK3CA | PIK3CA | 9 | 0 | 8 | 0 | 8 | 0 |
| PIK3CB | PIK3CB | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| PIK3CG | PIK3CG | 24 | 0 | 26 | 36 | 47 | 50 |
| PIK3C2B | PIK3C2B | 40 | 39 | 94 | 0 | 9 | 22 |
| PYK2 | PTK2B | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 3 |

¹ 活性部位プローブの置換を用いた結合データに基づくDiscover_x scanMAX (商標) キナーゼプロファイリング、456種類のキナーゼを試験。

【 0 1 7 1 】

実施例6 - CDK阻害物質に続くPERK阻害の連続的な併用はLY4の抗転移効果を増強する原発病変に対する薬理的PERK阻害の効果が確立され、また、極めて重要なことに、LY4が休眠DCCの根絶により転移を阻害できることも確立された。この情報を踏まえ、休眠を模倣するような臨床的に利用可能な薬物を用いて、休眠性がん細胞をUPR^{high}およびLY4感受性にできるかどうかを評価した。この基本原理を裏付けるのは、UPR^{high}

10

20

30

40

50

DCCがより高いレベルのCDK阻害物質を発現したという知見である(図1C)。したがって次に、CDK4/6阻害物質アベマシクリブ(50 mpk、4週)で動物を前処置することにより、無活動DCCのプールを基底の50%よりも増加させること(図11A)によって、LY4の抗転移効果がさらに増強されるかどうかを問うた。実際、MMTV-HER2雌をアベマシクリブ単剤で前処置すると、本来(対照)はGADD34染色の非常に低い、かつ局在化したレベルを示す原発腫瘍切片において、GADD34⁺細胞が急増した(図11B)。原発腫瘍での測定を、アベマシクリブがもたらす無活動関連UPRの代用バイオマーカーとした。予想どおり、LY4での処置により、処置動物の原発腫瘍におけるGADD34の発現はなくなった(図11B)。アベマシクリブ(休眠様誘導フェーズ)に続きLY4(休眠DCC根絶フェーズ)でマウスを連続処置した結果、LY4単剤処置で観測されたのと同じマクロ転移負荷の減少が得られた(図11C)。しかし、併用によりミクロ転移の存在もほぼ完全に消え(図11D)、また、単剤でも見られたように、無活動の単一播種性がん細胞の数が大きく減少した(図11E)。まとめると、これらの結果は、再活性化してこれらの病変を播種する無活動DCCを標的とすることにより転移を防止する有望な治療ストラテジーとしての、CDK阻害物質などの細胞分裂阻害物質とそれに続くLY4の連続的併用の基本原理を裏付けている。

10

【0172】

実施例7 - 実施例2~6の考察

HER2⁺乳がんモデルの複数の研究が、HER2⁺乳がんの腫瘍発生は、PERKシグナリングに生存および適応を依存していると結論付けている(Bobrovnikova-Marjon et al., “PERK Promotes Cancer Cell Proliferation and Tumor Growth by Limiting Oxidative DNA Damage,” *Oncogene* 29(27):3881-95 (2010); Singh et al., “HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive,” *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015); Avivar-Valderas et al., “PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses to Promote Survival During Extracellular Matrix Detachment,” *Mol. Cell. Biol.* 31:3616-3629 (2011);およびAvivar-Valderas et al., “Regulation of Autophagy During ECM Detachment is Linked to a Selective Inhibition of mTORC1 by PERK,” *Oncogene* 32(41):4932-40 (2013)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)。興味深いことに、手術マージンに存在する、そして標的器官にも休眠播種性がん細胞として存在する無活動腫瘍細胞(Bragado et al., “TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling,” *Nat. Cell. Biol.* 15:1351-1361 (2013); Chery et al., “Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways,” *Oncotarget* 5(20):9939-51 (2014); Sosa et al., “Mechanisms of Disseminated Cancer Cell Dormancy: An Awakening Field,” *Nat. Rev. Cancer* 14:611-622 (2014);およびSosa et al., “NR2F1 Controls Tumour Cell Dormancy Via SOX9- and RARbeta-Driven Quiescence Programmes,” *Nat. Commun.* 6:6170 (2015)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)が、生存のために他のERストレス経路とともにPERKシグナリングを活性化したことも見出されている(Adomako et al., “Identification of Markers that Functionally Define a Quiescent Multiple Myeloma Cell Sub-Population Surviving Bortezomib Treatment,” *BMC Cancer* 15:444 (2015); Ranganathan et al., “Dual Function of Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase in Tumor Cell Growth Arrest and Survival,” *Cancer Res.* 68:3260-3268 (2008); Ranganathan et al., “Functional Coupling of p38-Induced Up-Regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells,” *Cancer Res.* 66:1702-1711 (2006); Schewe et al., “ATF

20

30

40

50

6alpha-Rheb-mTOR Signaling Promotes Survival of Dormant Tumor Cells In Vivo,” Proc. Nat’l. Acad. Sci. U.S.A. 105:10519-10524(2008); Schewe et al., “Inhibition of eIF2alpha Dephosphorylation Maximizes Bortezomib Efficiency and Eliminates Quiescent Multiple Myeloma Cells Surviving Proteasome Inhibitor Therapy,” Cancer Res. 69:1545-1552 (2009);および Chery et al., “Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways,” Oncotarget 5(20):9939-51 (2014)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)。最近、Pommier et al., “Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases,” Science 360(6394):eaao4908 (2018) (参照により全文が本明細書に組み入れられる)が、肝臓内の膵臓DCC(および他のモデル)が無活動中にUPRを活性化することを示して、本件を実証した。種々のがんおよびモデルに及ぶこの再現性レベルは、この生態の高度な生物学的妥当性を示唆している。

10

20

30

40

50

【0173】

本明細書の実施例は、PERK阻害物質LY4がDCCおよび原発病変におけるHER2の依存性を選択的に標的化できることを実証している。特に考察すべき知見は、LY4の転移阻害効果である。MMTV-HER2モデルでは、患者体内と同じく、転移は原発腫瘍と非同期的であり得、時には潜在性原発病変とともに生じ、顕性腫瘍の検出に先立ち開始する転移もある(Husemann et al., “Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer,” Cancer Cell 13:58-68 (2008); Pavlidis et al., “Cancer of Unknown Primary (CUP),” Crit. Rev. Oncol. Hematol. 54:243-250 (2005); Harper et al., “Mechanism of Early Dissemination and Metastasis in Her2 Mammmary Cancer,” Nature 540:588-592 (2016);およびHosseini et al., “Early Dissemination Seeds Metastasis in Breast Cancer,” Nature 540:552-558 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。LY4処置は、早期開始の(顕性腫瘍が明白になる前の)転移も、顕性原発腫瘍の増殖と同時の転移も、あらゆる転移を軽減した(図8)。このことが重要なのは、転移に対する効果が、単にLY4がもたらす原発腫瘍負荷の軽減に依拠しないことを示しているからである。驚くべきことに、LY4処置により、非増殖性単独または小クラスターのP-Rb陰性DTCが除去されて、転移負荷が軽減された。画像診断および単一細胞マルチプレックスqPCRにより、これらのDCCがより頻繁にGADD34(タンパク質)の上向き調節を、およびPERKそのものを含めたERストレス遺伝子のより大きなセットを示したこと、また、細胞増殖のいくつかの負のレギュレーターの上向き調節により明らかになった無活動表現型も示すことが明らかになった。PERK誘導性ERストレスプログラムの一部分は転写調節を引き起こし、別の部分はATF4およびGADD34などの上流のORFを含む遺伝子の優先的翻訳であることを考慮すべきである(Young et al., “Upstream Open Reading Frames Differentially Regulate Gene Specific Translation in the Integrated Stress Response,” J. Biol. Chem. 291:16927-16935 (2016)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。同様に、サイクリンD1の翻訳の阻害により、UPR誘導性G1停止がもたらされることがわかっている(Brewer et al., “Mammalian Unfolded Protein Response Inhibits Cyclin D1 Translation and Cell-Cycle Progression,” Proc. Natl. Acad. Sci. 96:8505-8510 (1999)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。ヒトHER2+がん細胞株を用いた3D器官形成実験により、LY4による無活動単一がん細胞の選択的殺滅が確認された。これらのデータは、無活動DCCがPERKシグナリングに生存を依存しがちであることを示す。同様に、乳がん患者由来のヒト転移性細胞の下位集団も、GADD34とKi67との負の相関関係を示し、マウスで見出した関係を実証した。これらのデータは、NR2F1とともに(Borgen et al., “NR2F1 Stratifies Dormant Disseminated Tumor Cells in Breast Cancer Patients,” Breast Cancer Research 20:120 (2018)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、GADD34単独また

はNR2F1との併用が、休眠/UPRhigh DCCのロバストなバイオマーカーセットとなり得、したがって治療のための患者を選択する指標となり得ることを示唆している。

【0174】

休眠DCCを根絶することができる標的および薬物の発見は、非常に意義深い。というのは、休眠DCCは能動的および受動的な機構により抗増殖療法をかわすことが知られているからである (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer," *Nat. Med.* 19:276-277 (2013); Naumov et al., "Ineffectiveness of Doxorubicin Treatment on Solitary Dormant Mammary Carcinoma Cells or Late-Developing Metastases," *Breast Cancer Res. Treat.* 82(3):199-206 (2003); Oshimori et al., "TGF-Beta Promotes Heterogeneity and Drug Resistance in Squamous Cell Carcinoma," *Cell* 160:963-976 (2015); および Fluegen et al., "Phenotypic Heterogeneity of Disseminated Tumour Cells is Preset by Primary Tumour Hypoxic Microenvironments," *Nat. Cell Biol.* 19(2):120-132 (2017)、それぞれ参照により全文が本明細書に組み入れられる)。一般に休眠性でもある骨髄内のDCCの根絶 (Bragado et al., "TGF-Beta2 Dictates Disseminated Tumour Cell Fate in Target Organs Through TGF-Beta-RIII and P38Alpha/Beta Signalling," *Nat. Cell Biol.* 15:1351-1361 (2013); Chery et al., "Characterization of Single Disseminated Prostate Cancer Cells Reveals Tumor Cell Heterogeneity and Identifies Dormancy Associated Pathways," *Oncotarget* 5(20):9939-51 (2014); Ghajar et al., "The Perivascular Niche Regulates Breast Tumour Dormancy," *Nat. Cell Biol.* 15:807-817 (2013); および Husemann et al., "Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer," *Cancer Cell* 13:58-68 (2008)、参照により全文が本明細書に組み入れられる) は、抗休眠DCC療法としてのPERK阻害の概念をさらに強化するものであり (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer," *Nat. Med.* 19:276-277 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)、休眠微小残存病変を取り除くためにアジュバントの設定で用いられ得る (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer," *Nat. Med.* 19:276-277 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【0175】

PERKキナーゼ阻害が腫瘍増殖を妨害する厳密な機構は不明である。タンパク質毒性により課せられたストレスへの適応の低下 (Singh et al., "HER2-mTOR Signaling-Driven Breast Cancer Cells Require ER-Associated Degradation to Survive," *Sci. Signal.* 8:ra52 (2015)、参照により全文が本明細書に組み入れられる) が機構となっている可能性がある。本明細書に記載される結果は、LY4がインピボのホスホ-HER2レベルを低下させたこと、およびLY4がエンドサイトーシスの増強により、膜内の活性受容体数を減少させたことを実証している。HER2タンパク質分解の変化は観測されなかった。PERKがHER2膜局在化またはエンドサイトーシスを厳密にどのように制御しているかについては、受容体の内部移行によって受容体の脱リン酸化がより良好もしくは高速になる、または受容体が活性化される機会が減少するため、下流のシグナリングが減少するという可能性が考えられる。受容体エンドサイトーシスは、細胞表面受容体の濃度を物理的に低下させることによって、細胞膜に局在する多くの受容体のシグナリング出量を低下させることができることがわかっている (Sorkin and Zastrow, "Endocytosis and Signaling: Intertwining Molecular Networks," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:609-22 (2009)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【0176】

本明細書の結果は、初期の病変においてLY4が分化表現型を誘導したことを、さらに実証している。しかし既成の腫瘍では、LY4は単剤として、腫瘍を静止状態または退縮に追い込んだ。このことは、早い段階では、HER2+初期病変におけるPERKシグナリン

グの調節解除は、未決定の機構を介する分化プログラムの喪失とより関連付けられることを示す。そして、腫瘍の生態が変化して高増殖性になっても、PERKへの依存度は、これらのHER2⁺腫瘍ではなおも高依存性である。このことは、HER2機能が増悪中にいかに変化するか、つまり初期には主として形態発生プログラムを調節解除してアノキス耐性および播種をもたらすが、後に主として増殖性および生存プログラムと係ることと関連付けられ得る。

【0177】

本明細書に記載される結果は、標準的な抗増殖療法をLY4と併用して、残存する無活動細胞を取り除くことの価値も指摘している。そのようなアプローチを、CDK4/6阻害物質アベマシクリブに続くLY4の併用を用いて試験し、改善された抗転移効果を明らかにした。心強いことに、用いたLY4の用量は、腫瘍またはがんをもたないマウスのグルコースレベル、骨髄または末梢血の細胞数、および飲食行動に有意に影響しなかった。このことは、用いた用量が、休眠DCCの根絶により腫瘍増殖および転移をしっかりと妨害する一方で、宿主の正常な器官機能には影響しなかったことを示す。休眠/UPR^{high}DCCがMHC-I表面発現を下向き調節することもわかったので (Pommier et al., "Unresolved Endoplasmic Reticulum Stress Engenders Immune-Resistant, Latent Pancreatic Cancer Metastases," *Science* 360(6394):eaao4908 (2018) (参照により全文が本明細書に組み入れられる)、LY4は、適応免疫応答がDCCを、そしておそらく既成腫瘍も標的化するのを、補助することもできる。本件が取り組んでいるのは、そのような可能性である。本明細書に記載される結果は、転移性疾患を標的とする新たな方法として、抗休眠DCC生存療法の使用への扉を開くものである。これによって、増殖性の、細胞周期の遅い、そして休眠性のDCCを含み得る、播種性疾患のあらゆる表現型多様性を標的とすることが可能になろう (Aguirre-Ghiso et al., "Metastasis Awakening: Targeting Dormant Cancer," *Nat. Med.* 19:276-277 (2013)、参照により全文が本明細書に組み入れられる)。

【0178】

実施例8 - メラノーマ細胞株におけるCDK4/6阻害物質アベマシクリブとPERK阻害物質LY4との併用

CDK4/6阻害物質は細胞周期停止を誘導することがわかっており、また、LY4は休眠性の細胞周期停止DTCの細胞死を誘導するので (図12A)、CDK4/6阻害物質とLY4の併用がインビトロ細胞株の細胞生存率を低下させるかどうかを、次に調査した。CDK4/6阻害物質アベマシクリブは、2Dおよび3Dインビトロ細胞培養のどちらでも、WM35メラノーマ細胞の増殖を阻害することがわかっている。1週間の50 nMのアベマシクリブの前処理に続くインビトロの2 μMのLY4での短時間処理 (48時間) (2D) により、Braf変異メラノーマWM35細胞の生存率は、2 μMのLY4単剤で処理した細胞よりも低下する (図12B)。インビトロ3D培養では、1週間のアベマシクリブ前処理に続く2 μMのLY4の添加が、細胞生存率の低下にさらなる効果を有した (図12C)。図12Cに示すこれらの結果は、3D細胞培養で、アベマシクリブ前処理が増殖停止および一部の細胞死を誘導し得ることを示唆している。そうであればLY4の添加は、その細胞死の効果を増強していると考えられる。このことは、アベマシクリブで停止させた細胞が、GADD34の上向き調節からわかるようにERストレス応答を上向き調節させ得 (図12G)、そしてLY4感受性となり得るといふ概念と合致する。

【0179】

メラノーマ細胞では、アベマシクリブ耐性表現型が連続処理の4~5週間後に生じる。LY4とアベマシクリブとで細胞を同時処理すると、2D細胞培養では生存アベマシクリブ耐性細胞の数が減少するが、これらの2D培養の実験の実施から予測されるほどの増強は示さない。ところが、アベマシクリブ耐性細胞では、LY4は、アベマシクリブでの持続的処理の後、3D細胞培養で、生存率低下のさらなる効果を有する (図12D~12E)。これらのデータは、メラノーマCDK4/6阻害物質耐性細胞が、PERKが媒介するERストレス応答になおも生存を依存していることを示す。インビトロ3D培養では、アベマシクリ

ブでの5週間の前処理後のLY4の添加が、細胞生存率の低下にさらなる効果を有し(図12F)、このことはDAPIを吸収する細胞のアポトーシスにより測定された。2D培養では耐性細胞が対照細胞と同じく増殖するが、3D培養ではアベマシクリブ前処理が細胞死を誘導すると考えられる(図12F)。

【0180】

実施例9 - BMP7-F9はDTC(HNSCC)の休眠を誘導しかつ維持する

BMP7-F9は、ERK/p38活性比を低下させ、かつ休眠シグネチャーのさまざまなmRNAを誘導する(図13A~13C)。図13Aは、2 ng/ml、5 ng/ml、および10 ng/mlのBMP7-F9処理(それぞれ2つめ、3つめ、および4つめのグレーのバー:対照は1つめの黒いバー)によりERK/p38活性比が対照よりも低下したことを示し、これはHEp3 HNSCC細胞のウェスタンブロットで決定した。ERK/p38活性比に対する効果は、2~6および24時間後に観測される(縦の2つめから4つめの群)。最初の30分で、ERK活性をBMP7により刺激する(縦1つめのセット)。図13Bは、BMP7-F9処理(10 ng/ml BMP7-F9、24時間)により、休眠シグネチャー遺伝子をコードするDEC2、p53、およびp27 mRNAが誘導されることを示す。図13Cは、同じ細胞のBMP7-F9処理により、強力な休眠誘導性転写因子NR2F1の核集積が誘導されることを示し、これは免疫蛍光により決定した(10 ng/ml、24時間)。図13Aおよび図13Bでは差はp 0.05であり、学生t検定により計算した。

10

【0181】

インビトロおよびインビボで、BMP7-F9はT-HEp3細胞の増殖停止を誘導する(図14A~14E)。図14Aは、T-HEp3細胞のBMP7-F9処理により、増殖がインビトロで48時間阻害されることを示し、これはcell titer blueアッセイで決定した(RFU、相対蛍光単位)。図14Bは、図14C~14Dで用いられるインビボの実験手順の概略図である。T-HEp3細胞をインビトロで24時間BMP7-F9で前処理してから、トリ胚絨毛尿膜(CAM)に接種し(図14C)、インビボで毎日ビヒクルまたはBMP7-F9(50 ng/ml)で処理した後、腫瘍を収集し、HEp3 HNSCC細胞/腫瘍の数を定量化し(図14D)、P-H3のレベルを定量化した(図14E)。

20

【0182】

図15AのプロトコールにしたがいNSGマウスを3週間および6週間処置した。これらの時点で、局所再発およびDTC出現のパーセンテージをスコア付けした。図15Bに対応する結果の表は、BMP7が腫瘍手術後の局所再発率(表9)および肺内DTC出現(表10)を制限することを示し、以下に示す(表11)。

30

【0183】

(表9)手術マージンにおける局所再発に対するアジュバント設定でのBMP7-F9の効果

| 処置(アジュバント処置のみ) | | n | +局所再発 | 局所再発率(%) |
|----------------|------|----|-------|----------|
| 3週間 | 対照 | 11 | 4 | 36.4 |
| | BMP7 | 11 | 1 | 9.1 |
| 6週間 | 対照 | 8 | 2 | 25.0 |
| | BMP7 | 7 | 0 | 0.0 |

40

【0184】

(表10)肺内DCC出現に対するBMP7-F9の効果

50

| 処置(アジュバント 処置のみ) | | n | +DCC 肺内 | DCC 出現率(%) |
|--------------------|------|----|---------|------------|
| 3週間 | 対照 | 11 | 9 | 81.8 |
| | BMP7 | 10 | 5 | 50.0 |
| 6週間 | 対照 | 8 | 6 | 75.0 |
| | BMP7 | 7 | 3 | 42.9 |

10

【0185】

(表11) 図15Aおよび15Bならびに表9および10に示す同じ実験におけるGFP⁺/ビメンチン⁺腫瘍細胞/肺の中央値

| 処置 (アジュバント 処置のみ) | | n | GFP ⁺ /ビメンチン ⁺ 腫瘍細胞/肺の 中央値 | 範囲 | p値 |
|------------------------|------|----|--|------------|--------|
| 3週間 | 対照 | 11 | 2.2E+04 | 0-1.14E+06 | 0.2294 |
| | BMP7 | 10 | 0.62E+04 | 0-333333 | |
| 6週間 | 対照 | 8 | 25.2E+04 | 0-1.05E+06 | 0.2859 |
| | BMP7 | 7 | 0 | 0-6.8E+06 | |

20

【0186】

HEp3-GFP HNSCC腫瘍をおよそ300 mm³になるまで成長させてから、50 μg/kgのBMP7-F9のネオアジュバント設定で、腫瘍がおよそ600 mm³になるまで処置した。次に腫瘍を手術により除去した。手術の1~2日後、BMP7-F9でのアジュバント処置をさらに4週間継続した。次に動物を安楽死させ、蛍光顕微鏡を用いて肺のDCC負荷をスコア付けした。BMP7が、腫瘍手術後の局所および遠隔の再発の発生を制限したことを観測した。図15AのプロトコールにしたがいNSGマウスを4週間処置した。それらの時点で、局所再発およびDCC出現のパーセンテージをスコア付けした。処置後、切除した肺のGFP陽性細胞の数をスコア付けした。これは肺のDCC負荷の大きさであり、BMP7-F9処置により有意に減少している。DCC負荷の中央値が1ログ小さいこと、およびBMP-7が7匹中3匹の動物をDCCから明らかに治癒していることに注目されたい。

30

【0187】

BMP7-F9の手術マージンにおける局所再発に対するネオアジュバント+アジュバント設定での効果(表12)および肺内DCC出現に対する効果(表13)を以下に示す。結果は、図15Cの結果を表にしたものであり、図15Aに示すようにマウスを処置しているが、アジュバント処置は4週間であった。処置後、切除した肺のGFP陽性細胞の数をスコア付けした。結果は、ネオアジュバントおよびアジュバント処置により、BMP7が、腫瘍手術後の局所再発率(表12)および肺内DCC出現(表13)を制限することを示す。表14は、肺内のDCC負荷の大きさを示し、BMP7-F9処置により有意に減少している。DCC負荷の中央値が1ログ小さいこと、およびBMP-7が7匹中3匹の動物をDCCから明らかに治癒していることに注目されたい。

40

【0188】

(表12) 手術マージンにおける局所再発に対するネオアジュバント+アジュバント設定でのBMP7-F9の効果

50

| 処置 (ネオアジュバント処置 およびアジュバント処置) | | n | +局所再発 | % |
|-----------------------------------|------|---|-------|------|
| 4週間 | 対照 | 8 | 5 | 62.5 |
| | BMP7 | 7 | 3 | 42.9 |

【0189】

(表13) 肺内DCCの出現

10

| 処置 (ネオアジュバント処置 およびアジュバント処置) | | n | +DCC 肺内 | % |
|-----------------------------------|------|---|---------|------|
| 4週間 | 対照 | 8 | 8 | 100 |
| | BMP7 | 7 | 4 | 57.1 |

20

【0190】

(表14) 表12および13で報告したマウスのGFP⁺/ビメンチン⁺腫瘍細胞/肺の中央値

| 処置 (ネオアジュバント 処置および アジュバント処置) | | n | GFP ⁺ /ビメンチン ⁺ 腫瘍細胞/肺の 中央値 | 範囲 | p値 |
|---------------------------------------|------|---|--|--------------|-------|
| 4週間 | 対照 | 8 | 5.4E+04 | 0.02-3.2E+05 | 0.046 |
| | BMP7 | 7 | 0.02E+04 | 0-2.4E+04 | |

30

【0191】

本明細書では好ましい態様を詳しく示し、記載してきたが、当業者には、本発明の趣旨から逸脱することなくさまざまな変更、付加、置換等を実施できることは明らかであり、したがってそれらも以下の請求項で定められる本発明の範囲内とみなされる。

【0192】

配列情報

40

SEQUENCE LISTING

110 ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
 120 METHODS OF TREATING MINIMAL RESIDUAL CANCER
 150 US 62/648,166
 151 2018-03-26
 160 16
 170 PatentIn version 3.5
 210 1
 211 431
 212 PRT

50

213 Homo sapiens
 400 1
 Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15
 Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30
 Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45
 Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60 10
 Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80
 Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95
 Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110
 Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125
 Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140 20
 Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175
 Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190
 Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205
 Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220 30
 Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240
 His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255
 Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270
 Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285
 Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser
 290 295 300 40
 Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
 305 310 315 320
 Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr
 325 330 335
 Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu
 340 345 350
 Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn
 355 360 365
 Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His
 370 375 380 50

Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln
385 390 395 400

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
405 410 415

Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
420 425 430

210 2

211 139

212 PRT

213 Homo sapiens

10

400 2

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80

20

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135

210 3

30

211 139

212 PRT

213 Homo sapiens

220

221 misc_feature

222 (33)..(33)

223 Xaa can be any naturally occurring amino acid

220

221 misc_feature

222 (37)..(37)

40

223 Xaa can be any naturally occurring amino acid

220

221 misc_feature

222 (60)..(60)

223 Xaa can be any naturally occurring amino acid

220

221 misc_feature

222 (65)..(65)

223 Xaa can be any naturally occurring amino acid

220

50

221 misc_feature
 222 (86)..(87)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (89)..(89)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (91)..(91)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (93)..(94)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (110)..(110)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (114)..(114)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (120)..(120)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (128)..(128)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (132)..(132)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 220

221 misc_feature
 222 (134)..(134)
 223 Xaa can be any naturally occurring amino acid
 400 3

10

20

30

40

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
 20 25 30
 Xaa Gln Arg Gln Xaa Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
 35 40 45
 Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Xaa Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Xaa Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
 65 70 75 80

50

Ala Thr Asn His Ala Xaa Xaa Gln Xaa Leu Xaa His Xaa Xaa Asn Pro
85 90 95
Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Xaa Ala Ile
100 105 110
Ser Xaa Leu Tyr Phe Asp Asp Xaa Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Xaa
115 120 125
Arg Asn Met Xaa Val Xaa Ala Cys Gly Cys His
130 135

210 4
211 139
212 PRT
213 Homo sapiens
400 4

10

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15
Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45

20

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60
Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80
Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Val Ile Asn Pro
85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile
100 105 110
Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
115 120 125
Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135

30

210 5
211 139
212 PRT
213 Homo sapiens
400 5

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15
Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45

40

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60
Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80
Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Ala Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile
100 105 110

50

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135

210 6
211 139
212 PRT
213 Homo sapiens
400 6

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys 10
1 5 10 15
Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45
Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60
Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80
Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro 20
85 90 95
Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile
100 105 110
Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Phe
115 120 125
Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135

210 7
211 139
212 PRT 30
213 Homo sapiens
400 7

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15
Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45
Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala 40
50 55 60
Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80
Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95
Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile
100 105 110
Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Trp
115 120 125
Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135 50

210 8

211 139

212 PRT

213 Homo sapiens

400 8

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys

1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser

20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg

35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala

50 55 60

Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn

65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Thr Leu Val His Val Ile Asn Pro

85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile

100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Trp

115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His

130 135

210 9

211 139

212 PRT

213 Homo sapiens

400 9

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys

1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser

20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg

35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala

50 55 60

Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn

65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Ala Leu Val His Phe Ile Asn Pro

85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile

100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Phe

115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His

130 135

210 10

211 139

212 PRT

213 Homo sapiens

400 10

10

20

30

40

50

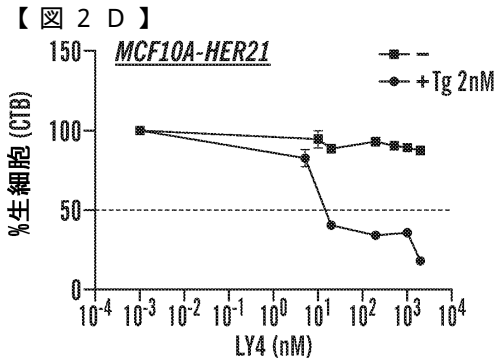
400 10
 Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
 35 40 45
 Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn 10
 65 70 75 80
 Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
 85 90 95
 Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile
 100 105 110
 Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 115 120 125
 Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 130 135
 210 11 20
 211 139
 212 PRT
 213 Homo sapiens
 400 11
 Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
 1 5 10 15
 Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
 20 25 30
 Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg 30
 35 40 45
 Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
 85 90 95
 Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
 100 105 110
 Ser Met Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr 40
 115 120 125
 Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 130 135
 210 12
 211 402
 212 PRT
 213 Homo sapiens
 400 12
 Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile 50

| | | | | |
|---|-----|-----|-----|----|
| | 20 | 25 | 30 | |
| Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn | | | | |
| | 35 | 40 | 45 | |
| Ser Ala Pro Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu | | | | |
| | 50 | 55 | 60 | |
| Glu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala | | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
| Val Phe Ser Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His | | | | |
| | 85 | 90 | 95 | |
| Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu | | | | 10 |
| | 100 | 105 | 110 | |
| His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg | | | | |
| | 115 | 120 | 125 | |
| Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu | | | | |
| | 130 | 135 | 140 | |
| Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr | | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 | |
| Phe Arg Ile Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu | | | | |
| | 165 | 170 | 175 | |
| Ser Asp Leu Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu | | | | 20 |
| | 180 | 185 | 190 | |
| Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val | | | | |
| | 195 | 200 | 205 | |
| Asn Pro Arg His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp | | | | |
| | 210 | 215 | 220 | |
| Gly Gln Ser Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly | | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 | |
| Pro Gln Asn Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | |
| Val His Phe Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln | | | | 30 |
| | 260 | 265 | 270 | |
| Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn | | | | |
| | 275 | 280 | 285 | |
| Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His | | | | |
| | 290 | 295 | 300 | |
| Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile | | | | |
| 305 | 310 | 315 | 320 | |
| Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe | | | | |
| | 325 | 330 | 335 | |
| Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr | | | | 40 |
| | 340 | 345 | 350 | |
| Leu Val His Val Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala | | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly | | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 | |
| Cys His | | | | |
| | 210 | 13 | | |
| | 211 | 402 | | 50 |

212 PRT
 213 Homo sapiens
 400 13

Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile
 20 25 30
 Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn
 35 40 45
 Ser Ala Pro Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu 10
 50 55 60
 Glu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala
 65 70 75 80
 Val Phe Ser Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His
 85 90 95
 Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu
 100 105 110
 His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg
 115 120 125
 Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu 20
 130 135 140
 Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr
 145 150 155 160
 Phe Arg Ile Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu
 165 170 175
 Ser Asp Leu Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu
 180 185 190
 Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val
 195 200 205
 Asn Pro Arg His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp 30
 210 215 220
 Gly Gln Ser Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly
 225 230 235 240
 Pro Gln Asn Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu
 245 250 255
 Val His Phe Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln
 260 265 270
 Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn
 275 280 285
 Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His 40
 290 295 300
 Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile
 305 310 315 320
 Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Gly Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe
 325 330 335
 Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Ala
 340 345 350
 Leu Val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala
 355 360 365
 Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser 50

| | | | | |
|---|--------------|-----|-----|----|
| | 325 | 330 | 335 | |
| Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Leu Val Gln Thr | | | | |
| | 340 | 345 | 350 | |
| Leu Val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala | | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| Pro Thr Gln Leu Gly Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| Asn Val Ile Leu Lys Lys Phe Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly | | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 | |
| Cys His | | | | 10 |
| 210 | 15 | | | |
| 211 | 402 | | | |
| 212 | PRT | | | |
| 213 | Homo sapiens | | | |
| 400 | 15 | | | |
| Asp Phe Ser Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg | | | | |
| 1 | 5 | 10 | 15 | |
| Leu Arg Ser Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile | | | | |
| | 20 | 25 | 30 | |
| Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn | | | | 20 |
| | 35 | 40 | 45 | |
| Ser Ala Pro Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu | | | | |
| | 50 | 55 | 60 | |
| Glu Gly Gly Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala | | | | |
| 65 | 70 | 75 | 80 | |
| Val Phe Ser Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His | | | | |
| | 85 | 90 | 95 | |
| Phe Leu Thr Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu | | | | |
| | 100 | 105 | 110 | |
| His Asp Lys Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg | | | | 30 |
| | 115 | 120 | 125 | |
| Phe Asp Leu Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu | | | | |
| | 130 | 135 | 140 | |
| Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr | | | | |
| 145 | 150 | 155 | 160 | |
| Phe Arg Ile Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu | | | | |
| | 165 | 170 | 175 | |
| Ser Asp Leu Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu | | | | |
| | 180 | 185 | 190 | |
| Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val | | | | 40 |
| | 195 | 200 | 205 | |
| Asn Pro Arg His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp | | | | |
| | 210 | 215 | 220 | |
| Gly Gln Ser Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly | | | | |
| 225 | 230 | 235 | 240 | |
| Pro Gln Asn Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu | | | | |
| | 245 | 250 | 255 | |
| Val His Phe Arg Ser Ile Arg Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln | | | | |
| | 260 | 265 | 270 | |
| Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn | | | | 50 |

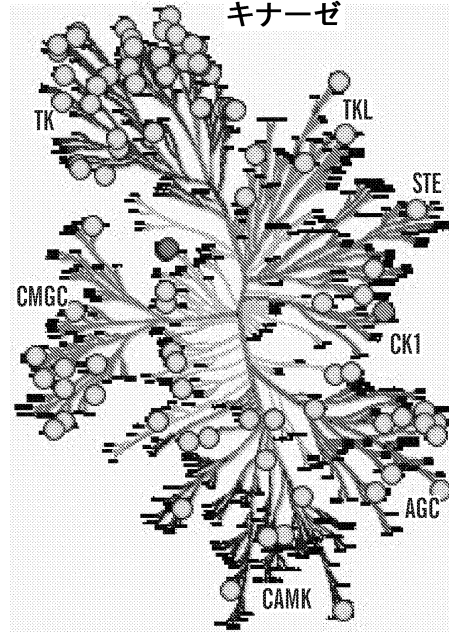


【 図 2 E - 1 】

LY4

PERK 細胞ベース

IC₅₀ = 0.054 μM



15 μM未満で他の活性なし

10

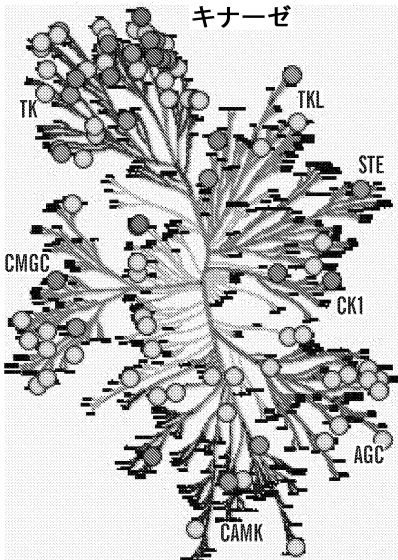
20

【 図 2 E - 2 】

LY2

PERK 細胞ベース

IC₅₀ = 0.117 μM



他の活性

FGFR3 IC₅₀ 0.088 μM
 IC₅₀ 1-5 μM (ALK, AXL, CDK7,
 CSNK1E, EPHA7, FLT1,3,4,
 GSK3β, HIPK2
 KDR, STK17A, WEE1)

30

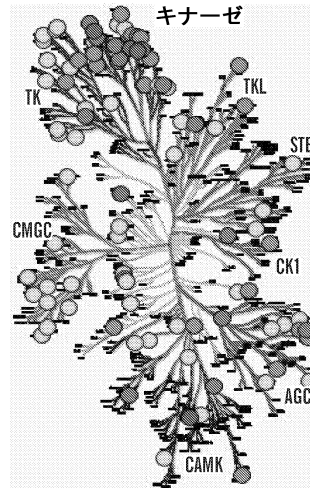
40

【 図 2 E - 3 】

LY3

PERK 細胞ベース

IC₅₀ = 0.026 μM



他の活性

Fit3 IC₅₀ 0.100 μM
 MNK2 IC₅₀ 0.230 μM
 NTRK IC₅₀ 0.63 μM
 IC₅₀ 1-5 μM (AKT1, AXL,
 FLT4, CHEK2, IKBKE,
 JAK1, LIMK1, MET,
 MST1R, MUSK, NTRK2,
 PDGFRα, PDPK1, PTK6,
 STK17A, WEE1)

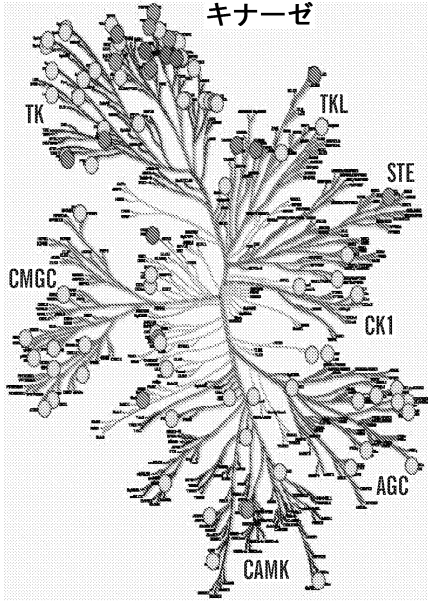
50

【 図 2 E - 4 】

GSK2656157

PERK 細胞ベース
IC₅₀ = 0.036 μM

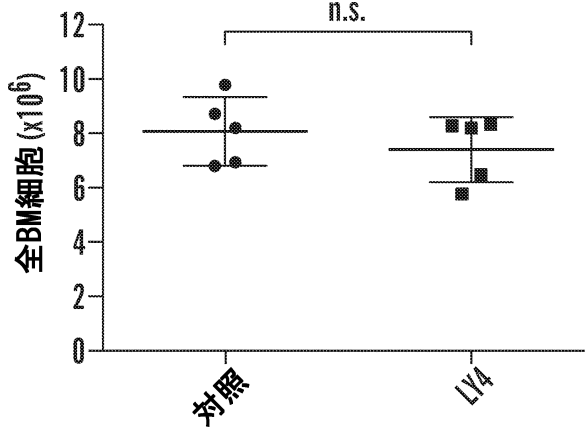
キナーゼ



他の活性

AXL IC₅₀ 0.480 μM
IC₅₀ 1-5 μM (ABL; BRK,
FLT3, FLT4, IRAK1, TRK-A)

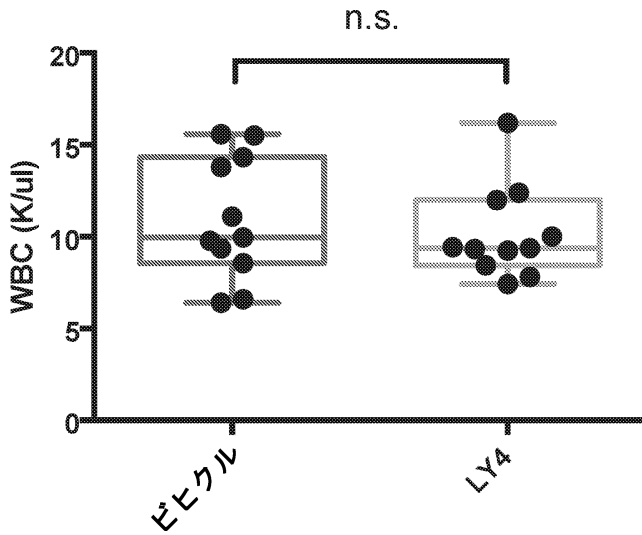
【 図 2 F 】



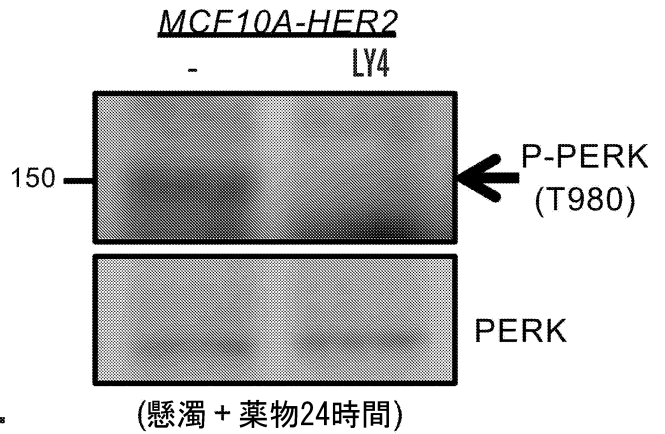
10

20

【 図 2 G 】



【 図 3 A 】

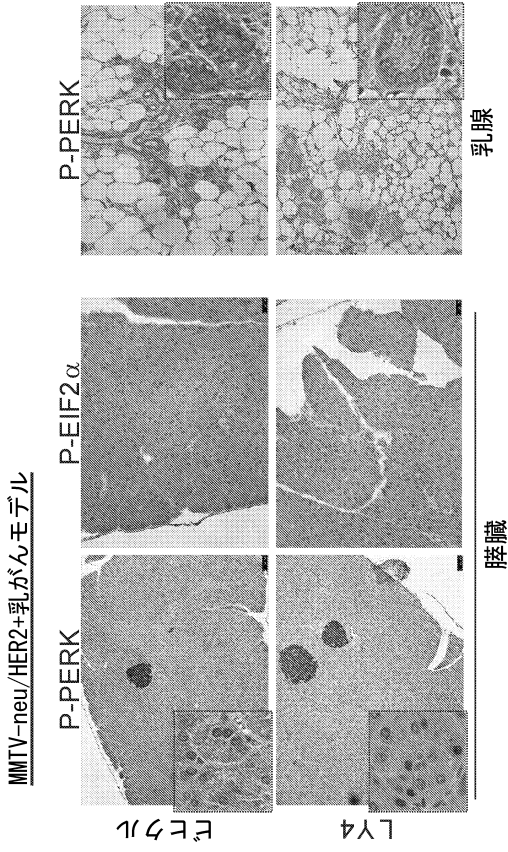


30

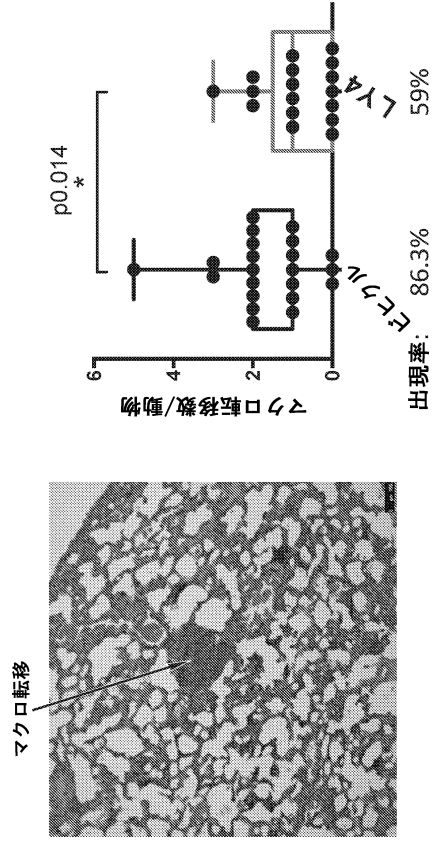
40

50

【 図 3 B 】



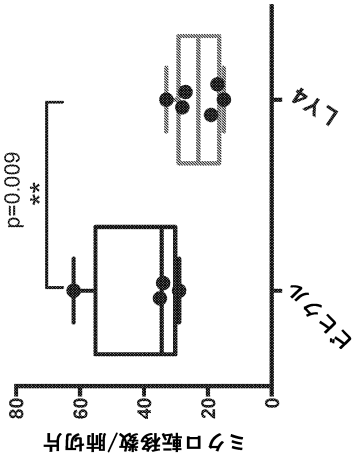
【 図 3 C 】



10

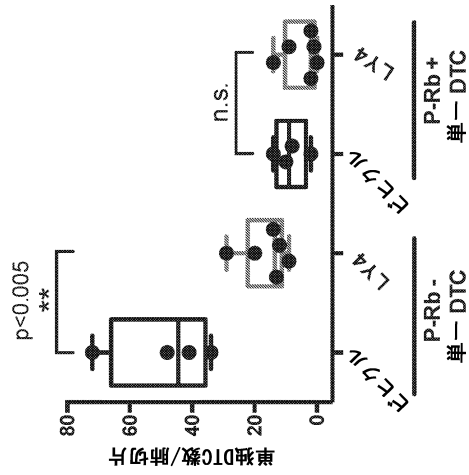
20

【 図 3 D 】

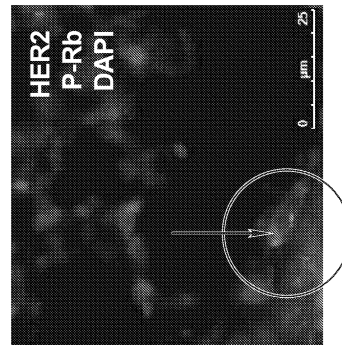
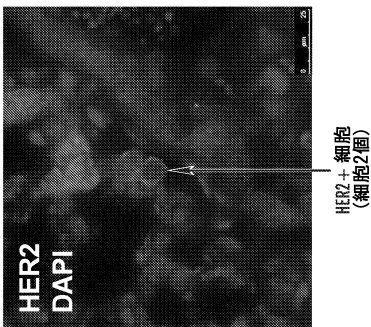


30

【 図 3 E 】

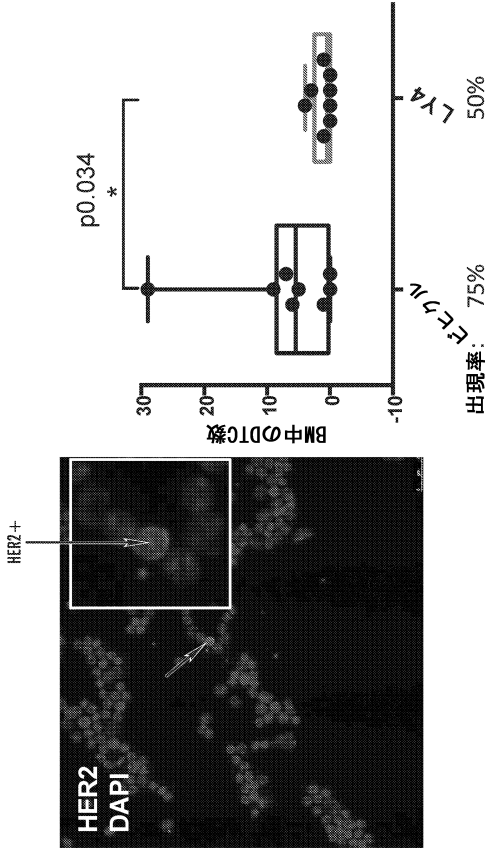


40

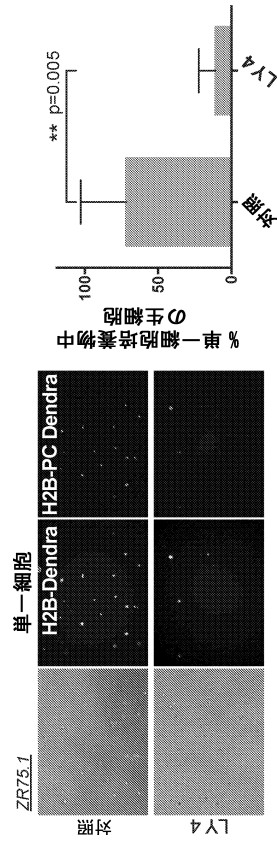


50

【 図 3 F 】



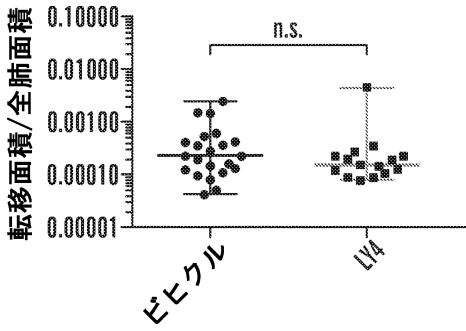
【 図 3 G 】



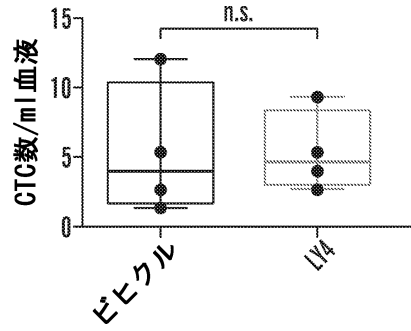
10

20

【 図 4 A 】



【 図 4 B 】

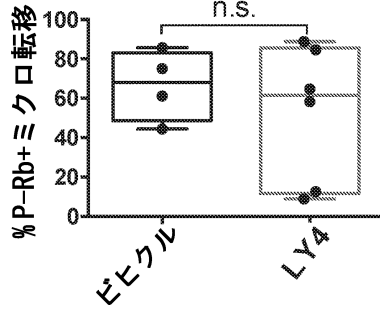
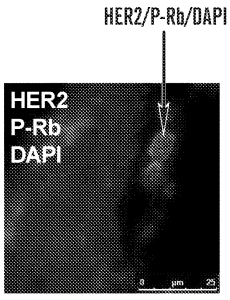


30

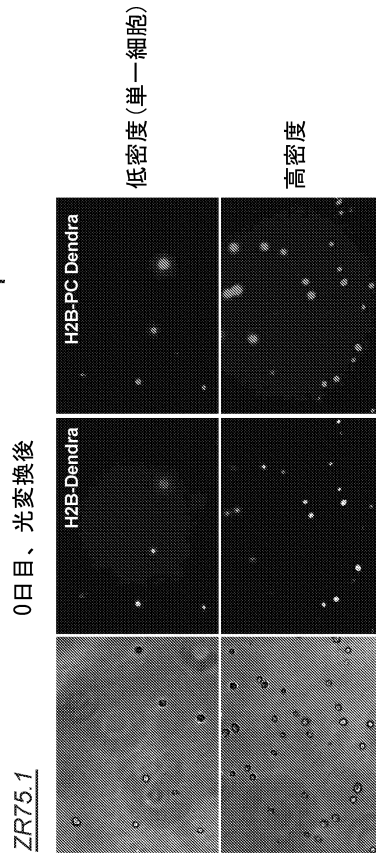
40

50

【 図 4 C 】



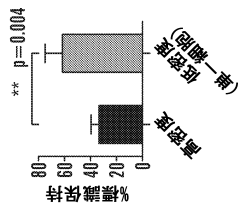
【 図 4 D 】



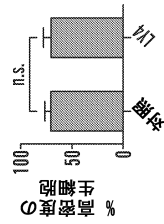
10

20

【 図 4 E 】



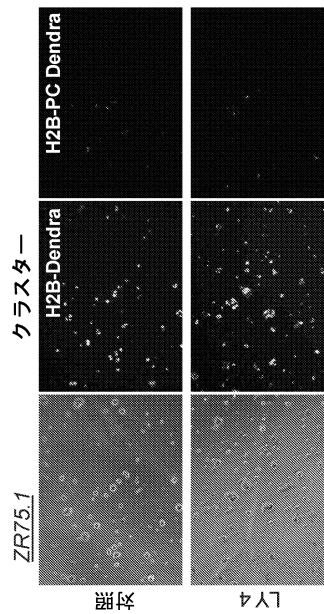
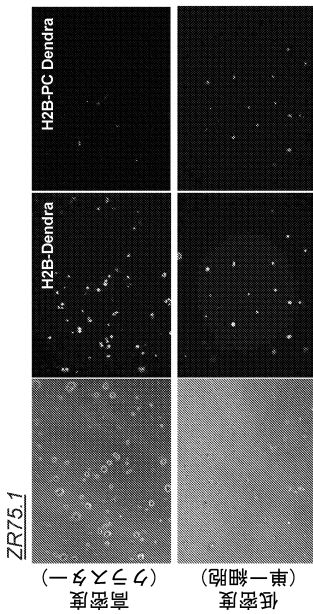
【 図 4 F 】



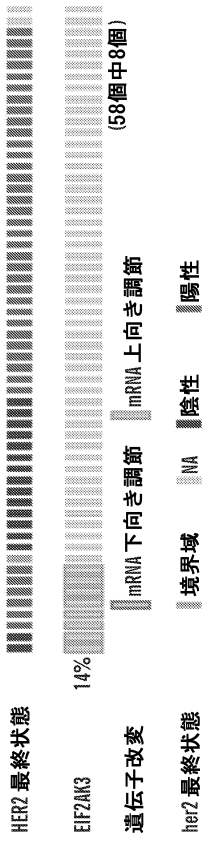
30

40

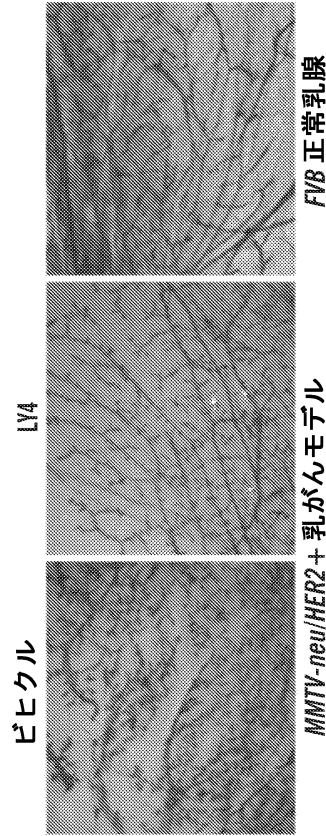
50



【 図 5 A 】



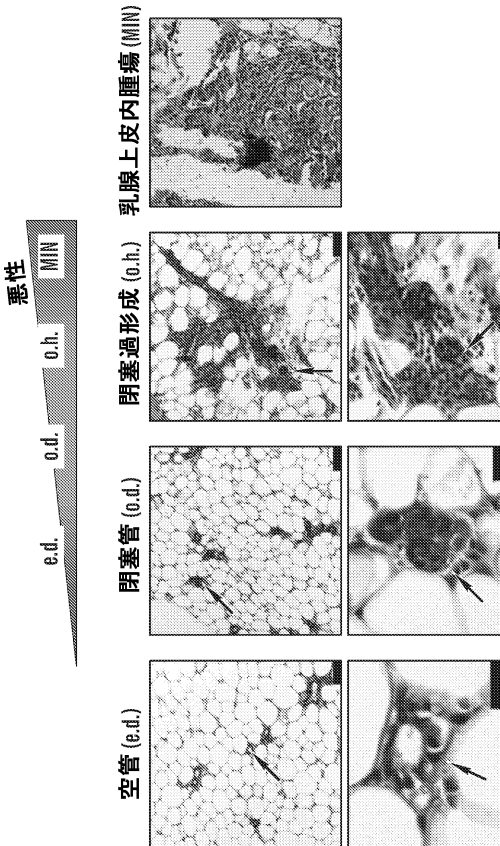
【 図 5 B 】



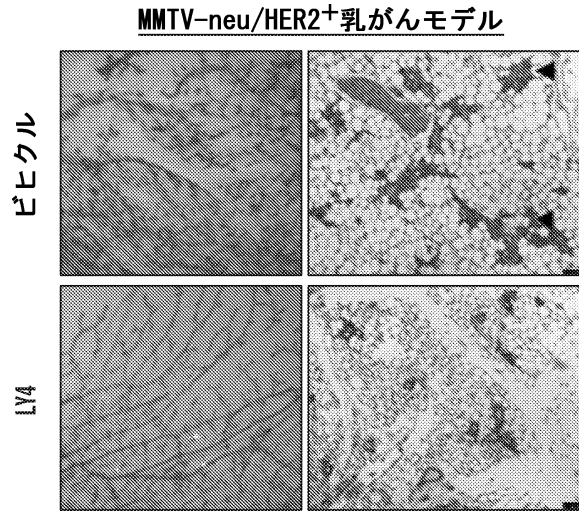
10

20

【 図 5 C 】



【 図 6 A 】

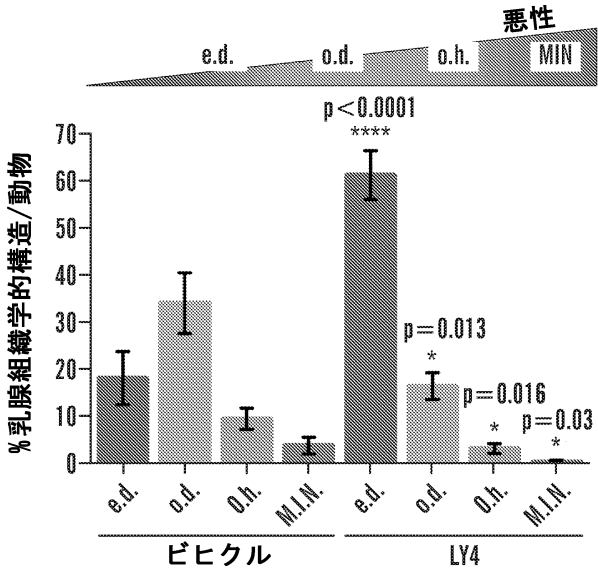


30

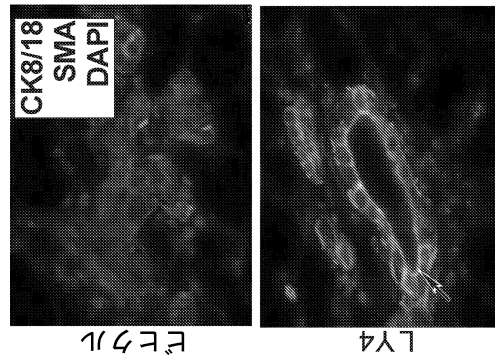
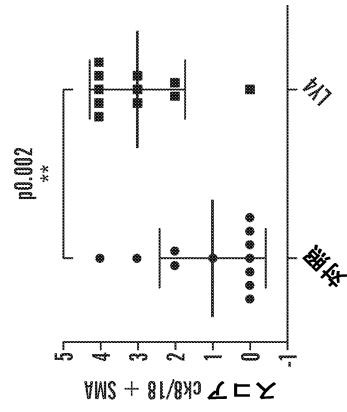
40

50

【 図 6 B 】



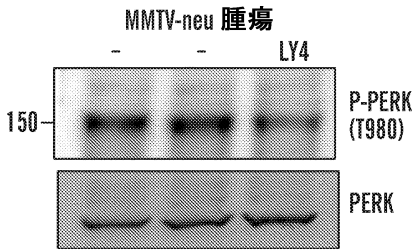
【 図 6 C 】



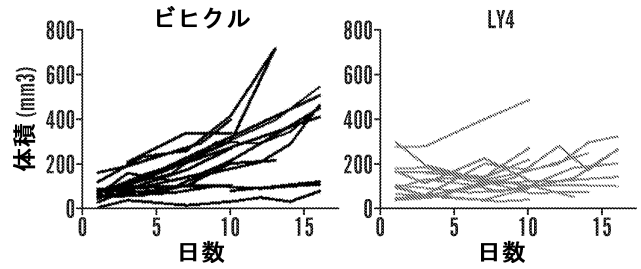
10

20

【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

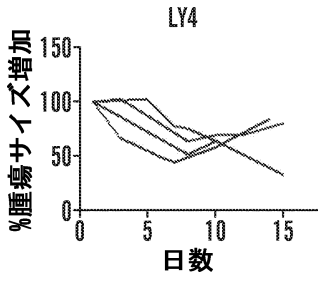


30

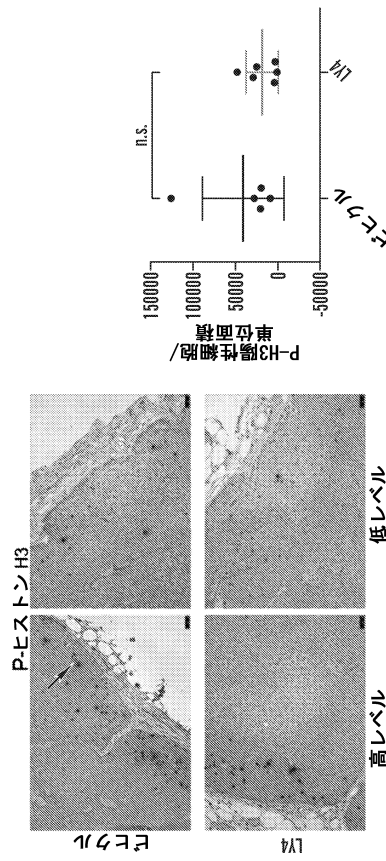
40

50

【 図 7 C 】



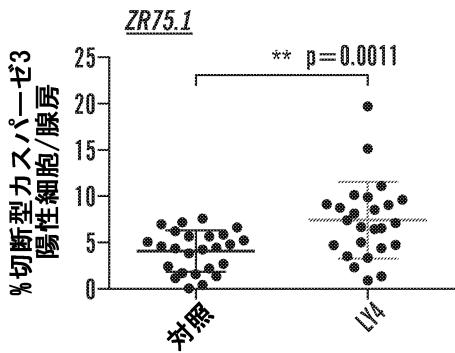
【 図 7 D 】



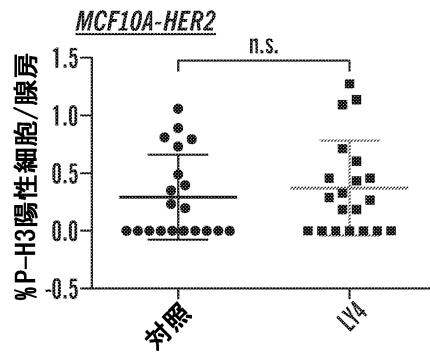
10

20

【 図 7 E 】



【 図 7 F 】

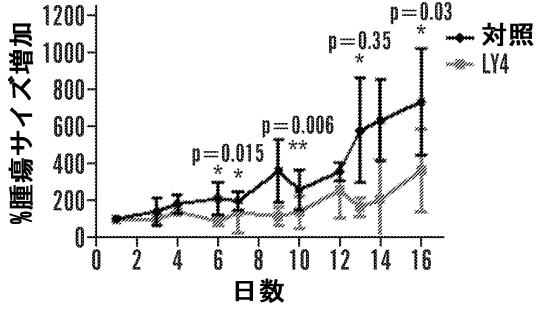


30

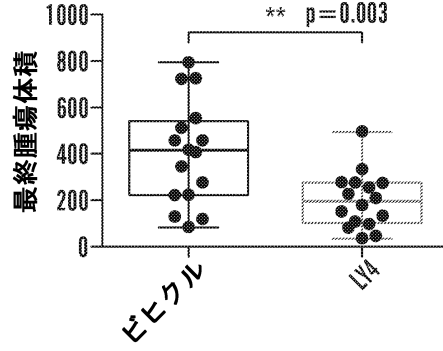
40

50

【図 8 A】

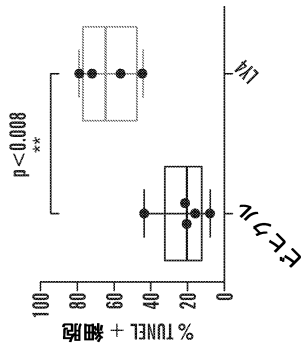


【図 8 B】



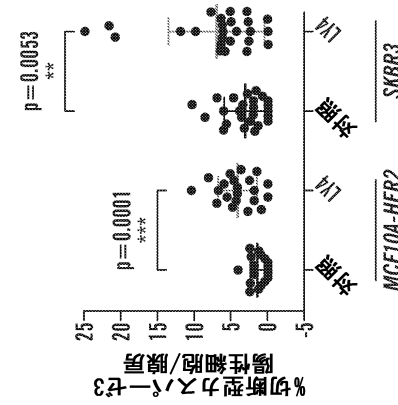
10

【図 8 C】

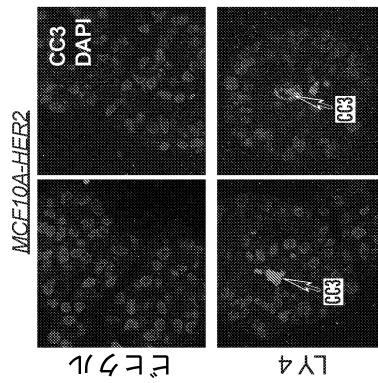
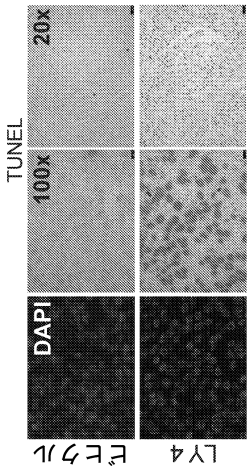


20

【図 8 D】



30



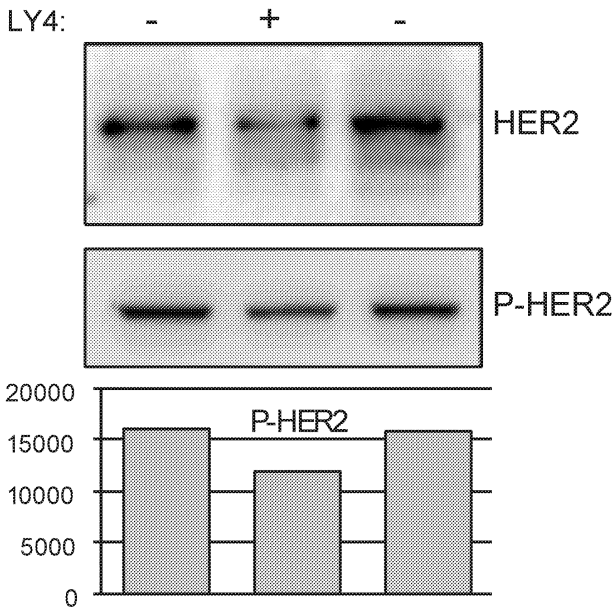
40

50

【図9E】

表面受容体

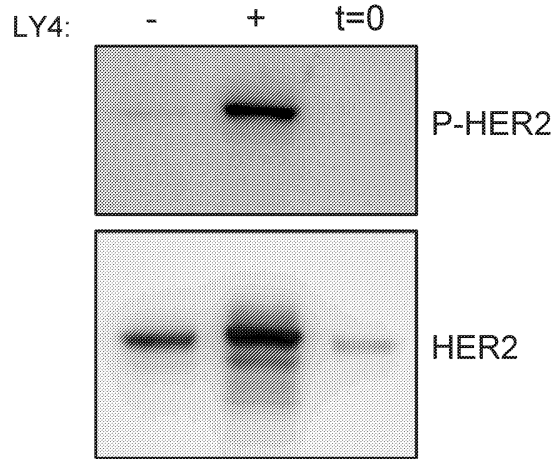
EGF 20'



【図9F】

エンドサイトーシス受容体

EGF 20'

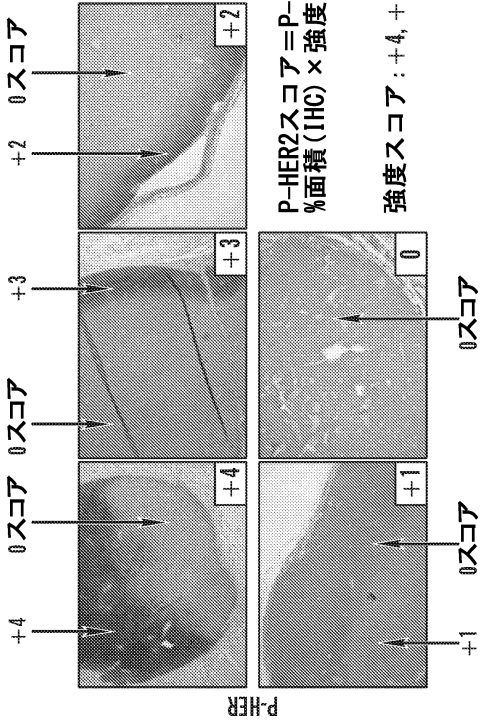


10

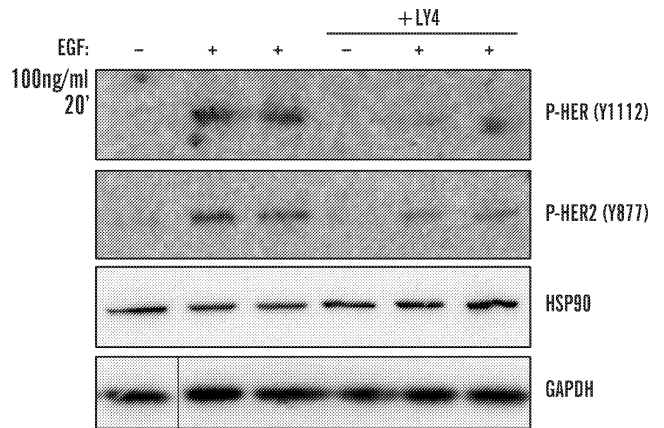
20

【図10A】

P-HER2スコア = P-HER2陽性の
%面積 (IHC) × 強度スコア
強度スコア: +4, +3, +2, +1, 0.



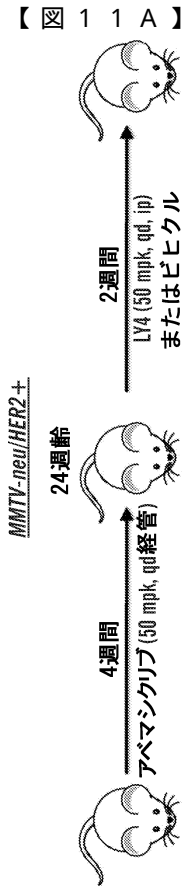
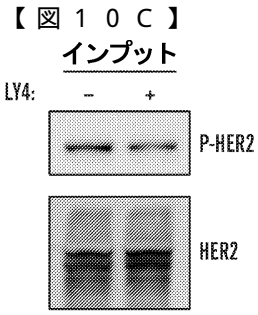
【図10B】



30

40

50



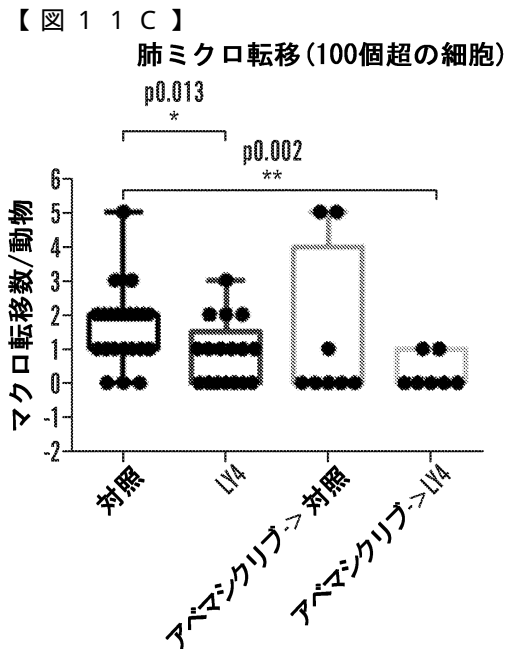
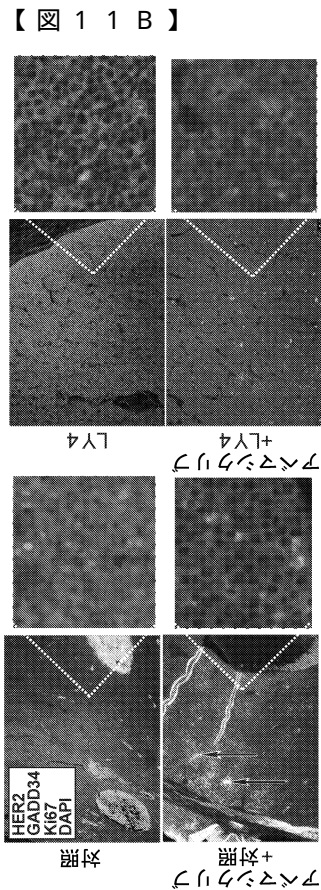
10

20

30

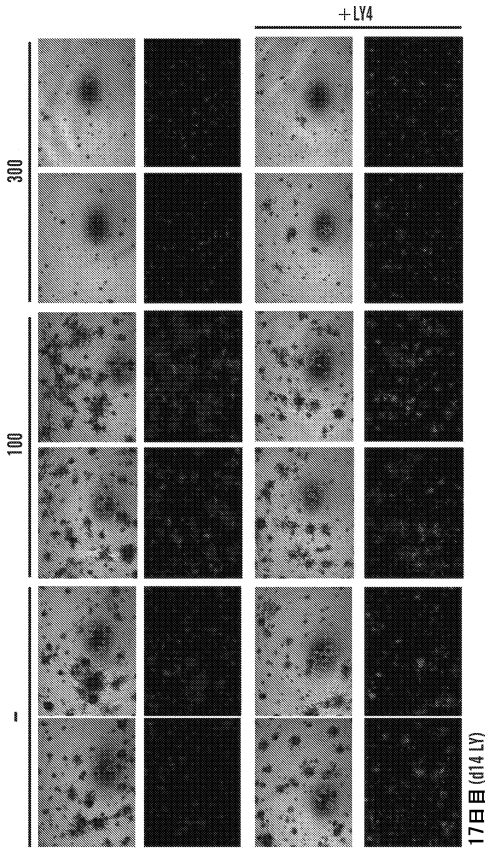
40

50

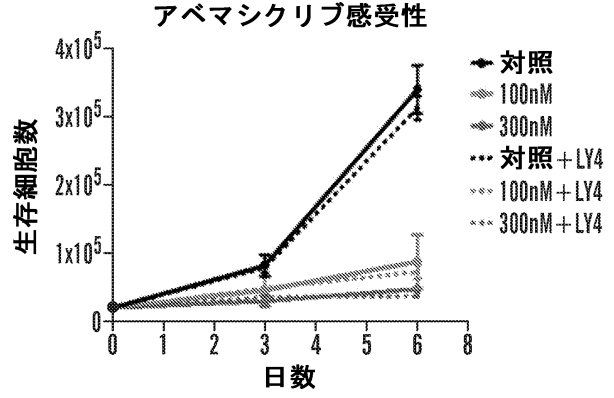


50

【 図 1 2 C 】



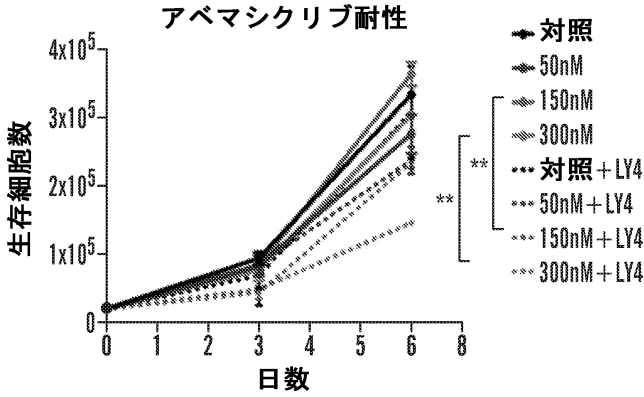
【 図 1 2 D 】



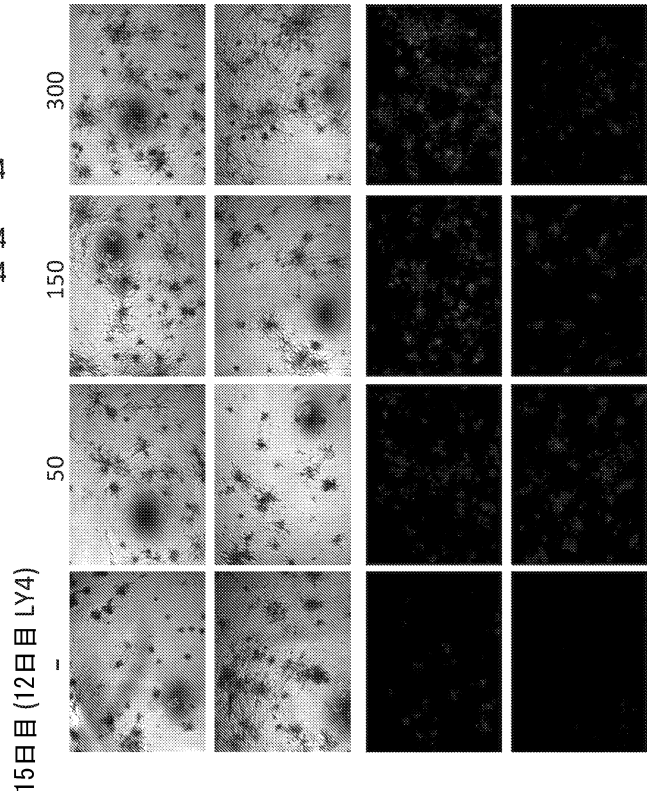
10

20

【 図 1 2 E 】



【 図 1 2 F - 1 】



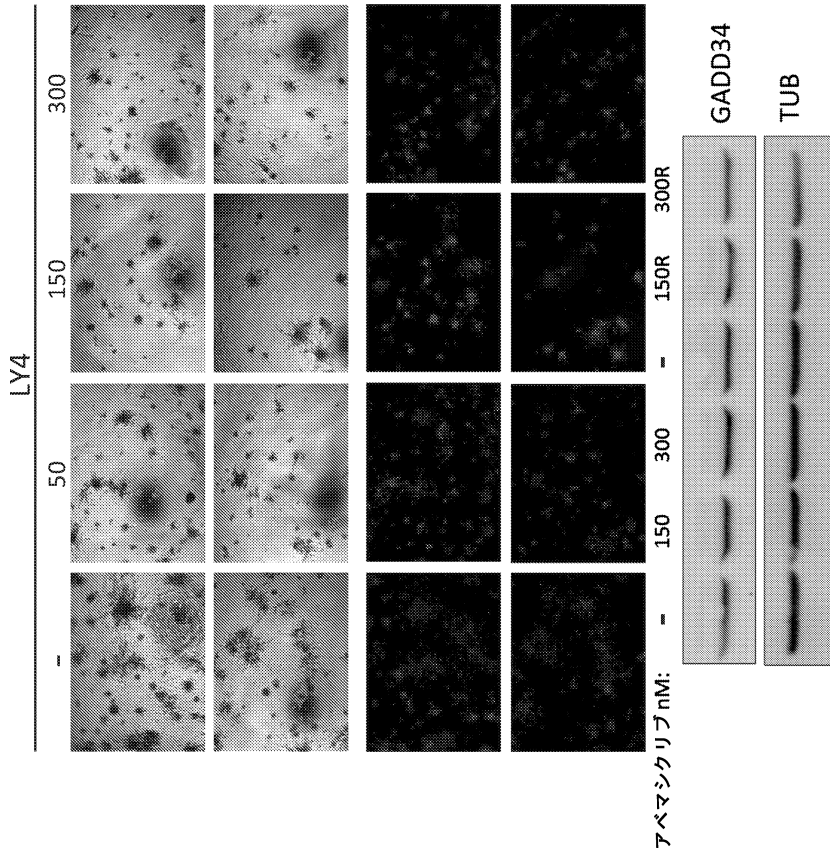
30

40

50

【 1 2 F - 2 】

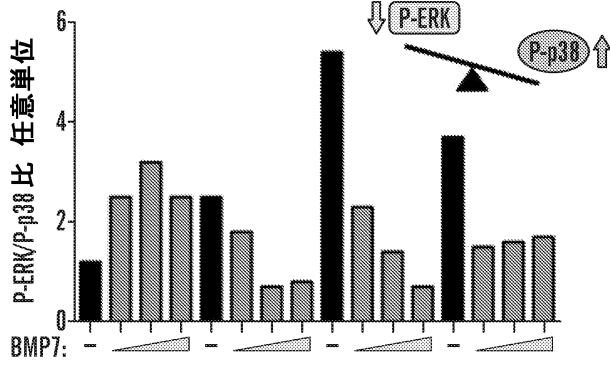
【 1 2 G 】



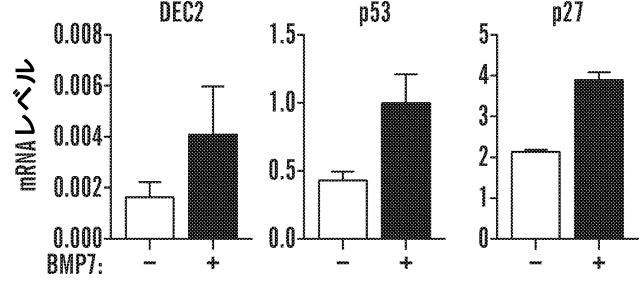
10

20

【 1 3 A 】



【 1 3 B 】

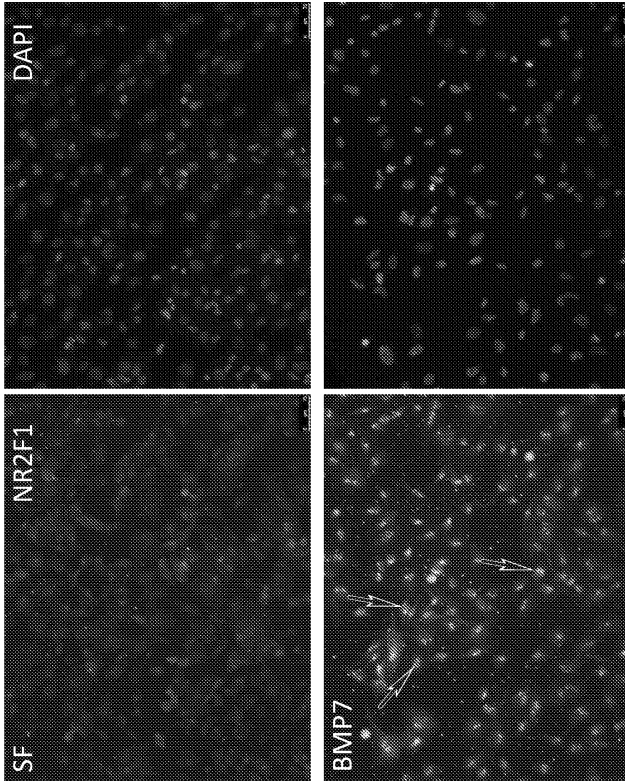


30

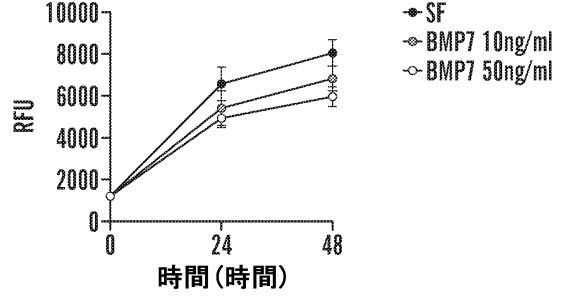
40

50

【 図 1 3 C 】



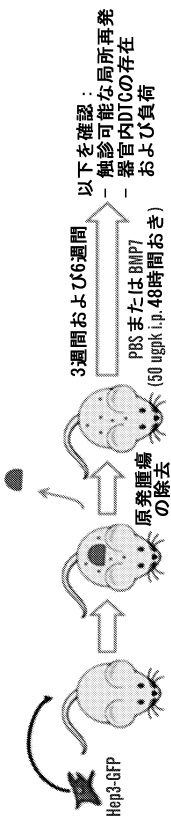
【 図 1 4 A 】



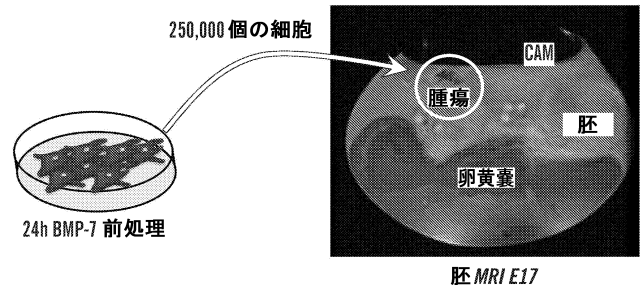
10

20

【 図 1 4 B 】



【 図 1 4 C 】

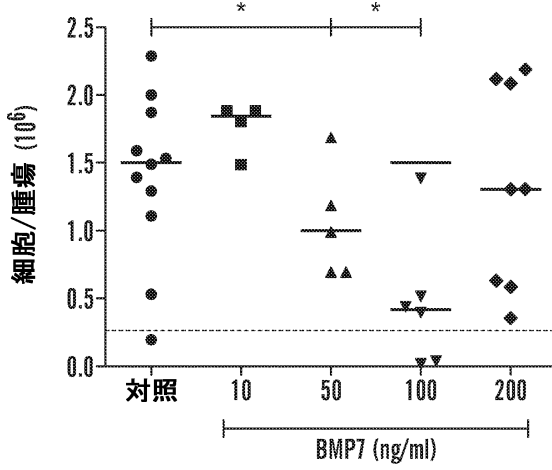


30

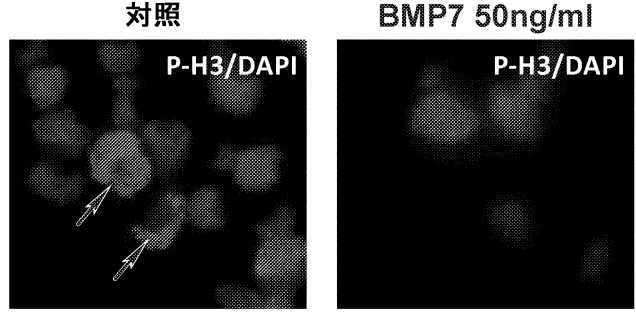
40

50

【図 1 4 D】

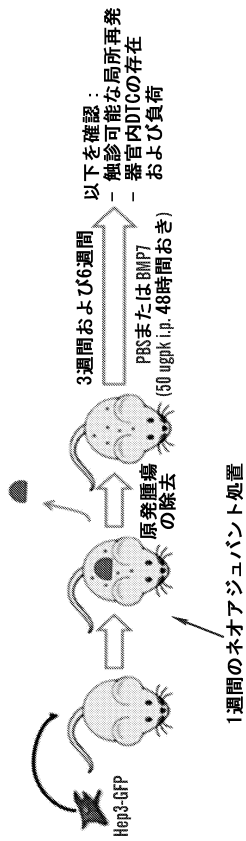


【図 1 4 E】

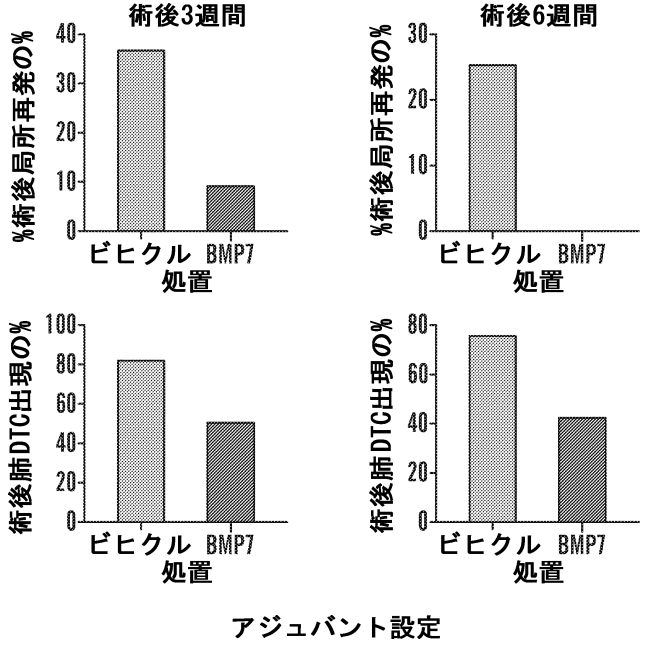


10

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



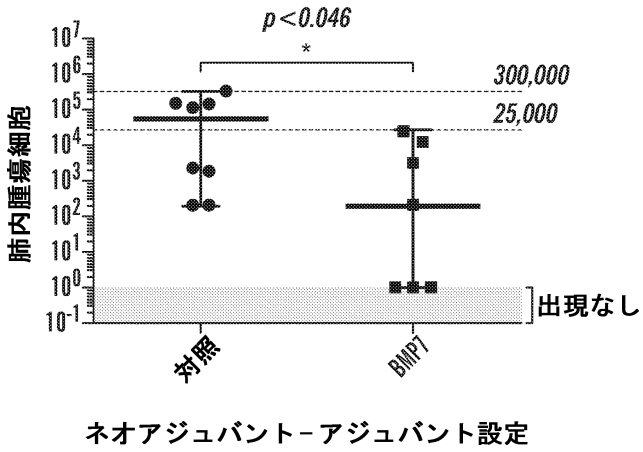
20

30

40

50

【 図 15 C 】



10

【 配列表 】

[2023175773000001.app](#)

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年10月5日(2023.10.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質を含む、対象内の微小残存がんを治療するための薬学的組成物であって、対象内の播種性がん細胞(DCC)が、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質と接触され、それによって、該対象内のDCCを根絶して該対象内の微小残存がんを治療する、前記薬学的組成物。

【請求項2】

前記対象が、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マンデル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、または結腸直腸がんとして診断されている、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項3】

前記がんが、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん(DCIS)、非浸潤性小葉がん(LCIS)、および炎症性乳がんから選択される乳がんである、請求項2に記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記乳がんがHER2⁺乳がんである、請求項3に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記対象が、播種性がん細胞および/または非転移性がんとして診断されている、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線とともに用いられる、請求項1~5のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項7】

化学療法剤が用いられ、かつ該化学療法剤が、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))およびラパチニブ(タイケルブ(登録商標))から選択される抗HER2化学療法剤である、請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項8】

化学療法剤が用いられ、かつ該化学療法剤が、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択される、請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項9】

免疫療法剤が用いられ、かつ該免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択される、請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項10】

エピジェネティック作用物質が用いられ、かつ該エピジェネティック作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコム抑制複合体2サブユニット(EZH2)阻害物質、プロモドメイン(「BRD」)阻害物質、およびそれらの誘導体から選択される、請求項6に記載の薬学的組成物。

【請求項11】

前記PERK阻害物質の対象への投与により、対象内の播種性がん細胞(DCC)がPERK阻害物質と接触される、請求項1~10のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 2】

前記対象がDCCを有すると診断されている、請求項1～11のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 3】

前記DCCがNR2F1+である、請求項12に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 4】

前記DCCがホスホ-PERK活性である、請求項12または請求項13に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 5】

前記DCCが骨形成タンパク質受容体陽性（「BMPR+」）である、請求項12～14のいずれか一項に記載の薬学的組成物。 10

【請求項 1 6】

骨形成タンパク質7（BMP7）誘導体タンパク質とともに用いられる、請求項15に記載の薬学的組成物であって、前記対象内のDCCが骨形成タンパク質7（BMP7）誘導体タンパク質と接触される、薬学的組成物。

【請求項 1 7】

前記BMP7誘導体タンパク質の対象への投与により、前記対象内の播種性がん細胞（DCC）がBMP7誘導体タンパク質と接触される、請求項16に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

前記BMP7誘導体タンパク質がBMP7-F9である、請求項16または請求項17に記載の薬学的組成物。 20

【請求項 1 9】

前記PERK阻害物質が、EIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しない、請求項1～18のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】

前記対象がヒトである、請求項1～19のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 1】

前記対象ががん寛解状態である、請求項1～20のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書 30

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

以下の記載では、特に、選択的かつ強力なPERK阻害物質であるLY4が、休眠DCCの根絶を特異的にもたす能力の結果としてHER2誘発性転移を妨害できることを実証する。本開示では、PERK阻害物質は、微小残存病変のステージにある単独休眠細胞を標的とする、単剤でも抗増殖性療法との併用でも致命的な転移の予防に役立つ、新たなストラテジーとなる。以下の記載ではまた、骨形成誘導体タンパク質が播種性腫瘍細胞の休眠を誘導できることを実証する。 40

[本発明1001]

対象内の播種性がん細胞（DCC）を骨形成タンパク質7（「BMP7」）誘導体タンパク質と接触させる段階であって、該対象の接触させた該DCCの休眠を誘導または維持して該対象内の微小残存がんを治療する、該段階を含む、対象内の微小残存がんを治療する方法。

[本発明1002]

前記対象が、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マンデル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、または結腸直腸がんとして診断されている、本発明1001の方法。 50

[本発明1003]

前記がんが、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん(DCIS)、非浸潤性小葉がん(LCIS)および炎症性乳がんから選択される乳がんである、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記乳がんがHER2⁺乳がんである、本発明1003の方法。

[本発明1005]

前記対象が、播種性腫瘍細胞および/または非転移性がんと診断されている、本発明1001~1004のいずれかの方法。

[本発明1006]

前記BMP7誘導体がBMP7-F9である、本発明1001~1005のいずれかの方法。

10

[本発明1007]

前記対象に化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含む、本発明1001~1006のいずれかの方法。

[本発明1008]

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))およびラパチニブ(タイケルブ(登録商標))から選択される抗HER2化学療法剤である、本発明1007の方法。

[本発明1009]

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択される、本発明1007の方法。

20

[本発明1010]

前記対象に免疫療法剤が投与され、かつ該免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択される、本発明1007の方法。

[本発明1011]

前記対象にエピジェネティック作用物質が投与され、かつ該エピジェネティック作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコーム抑制複合体2サブユニット(EZH2)阻害物質、プロモドメイン(BRD)阻害物質、およびそれらの誘導体から選択される、本発明1007の方法。

30

[本発明1012]

前記接触させる段階が、前記BMP7誘導体タンパク質を前記対象に投与することにより実行される、本発明1001~1011のいずれかの方法。

[本発明1013]

前記接触させる段階の前に、前記対象内のDCCの存在を検出する段階をさらに含む、本発明1001~1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

前記DCCがNR2F1[±]である、本発明1013の方法。

[本発明1015]

前記DCCが骨形成タンパク質受容体陽性(「BMPR[±]」)である、本発明1013または本発明1014の方法。

40

[本発明1016]

前記DCCがホスホ-PERK活性である、本発明1013~1015のいずれかの方法。

[本発明1017]

前記対象内のDCCを、プロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質、MEK阻害物質、CDK4/6阻害物質、またはそれらの任意の組み合わせと接触させる段階をさらに含む、本発明1001~1016のいずれかの方法。

[本発明1018]

前記接触させる段階が、PERK阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、

50

本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記接触させる段階が、LY2、LY3、LY4、およびそれらの組み合わせから選択されるPERK阻害物質を用いて実行される、本発明1017または本発明1018の方法。

[本発明1020]

前記接触させる段階が、EIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しないPERK阻害物質を用いて実行される、本発明1017～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

前記接触させる段階が、MEK阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、本発明1017の方法。

[本発明1022]

前記MEK阻害物質が、PD184352、PD318088、PD98059、PD334581、RDEA119/BAY 869766から選択される、本発明1021の方法。

[本発明1023]

前記接触させる段階が、CDK4/6阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、本発明1017の方法。

[本発明1024]

前記CDK4/6阻害物質が、アベマシクリブ(LY2835219)、パルボシクリブ(PD0332991)、およびリボシクリブ(LEE011)から選択される、本発明1023の方法。

[本発明1025]

前記対象がヒトである、本発明1001～1024のいずれかの方法。

[本発明1026]

前記接触させる段階の前に、がん寛解状態の対象を選択する段階をさらに含む、本発明1001～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

対象内の播種性がん細胞(DCC)を、LY2、LY3、およびLY4から選択されるプロテインキナーゼRNA様小胞体キナーゼ(PERK)阻害物質と接触させる段階であって、該対象内のDCCを根絶して該対象内の微小残存がんを治療する、該段階を含む、対象内の微小残存がんを治療する方法。

[本発明1028]

前記対象が、乳がん、多発性骨髄腫、肺がん、非小細胞肺がん、脳がん、子宮頸がん、マントル細胞リンパ腫、白血病、肝細胞がん、前立腺がん、メラノーマ、皮膚がん、頭頸部がん、甲状腺がん、グリオブラストーマ、ニューロブラストーマ、または結腸直腸がんと診断されている、本発明1027の方法。

[本発明1029]

前記がんが、浸潤性乳がん、乳管内上皮内がん(DCIS)、非浸潤性小葉がん(LCIS)、および炎症性乳がんから選択される乳がんである、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記乳がんがHER2⁺乳がんである、本発明1029の方法。

[本発明1031]

前記対象が、播種性腫瘍細胞および/または非転移性がんと診断されている、本発明1027の方法。

[本発明1032]

前記対象に化学療法剤、免疫療法剤、エピジェネティック作用物質、または電離放射線を投与する段階をさらに含む、本発明1027～1031のいずれかの方法。

[本発明1033]

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))およびラパチニブ(タイケルブ(登録商標))から選択される抗HER2化学療法剤である、本発明1032の方法。

10

20

30

40

50

[本発明1034]

前記対象に化学療法剤が投与され、かつ該化学療法剤が、アントラサイクリン、タキサン、キナーゼ阻害物質、抗体、フルオロピリミジン、および白金薬物から選択される、本発明1032の方法。

[本発明1035]

前記対象に免疫療法剤が投与され、かつ該免疫療法剤が、免疫チェックポイント阻害物質、インターフェロン、または腫瘍ワクチンから選択される、本発明1032の方法。

[本発明1036]

前記対象にエピジェネティック作用物質が投与され、かつ該エピジェネティック作用物質が、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害物質、5-アザシチジン、レチノイン酸、三酸化ヒ素、Zeste2エンハンサーポリコーム抑制複合体2サブユニット(EZH2)阻害物質、プロモドメイン(「BRD」)阻害物質、およびそれらの誘導体から選択される、本発明1032の方法。

10

[本発明1037]

前記接触させる段階が、前記PERK阻害物質を前記対象に投与することにより実行される、本発明1027~1036のいずれかの方法。

[本発明1038]

前記接触させる段階の前に、前記対象内のDCCの存在を検出する段階をさらに含む、本発明1027~1037のいずれかの方法。

[本発明1039]

前記DCCがNR2F1[±]である、本発明1038の方法。

20

[本発明1040]

前記DCCがホスホ-PERK活性である、本発明1038または本発明1039の方法。

[本発明1041]

前記DCCが骨形成タンパク質受容体陽性(「BMPR[±]」)である、本発明1038~1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

前記対象内のDCCを骨形成タンパク質7(BMP7)誘導体タンパク質と接触させる段階をさらに含む、本発明1041の方法。

[本発明1043]

前記対象内のDCCをBMP7誘導体タンパク質と接触させる段階が、該BMP7誘導体タンパク質を該対象に投与することにより実行される、本発明1042の方法。

30

[本発明1044]

前記BMP7誘導体タンパク質がBMP7-F9である、本発明1042または本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記PERK阻害物質が、EIF2AK1もEIF2AK2もEIF2AK4も阻害しない、本発明1027~1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

前記対象がヒトである、本発明1027~1045のいずれかの方法。

40

[本発明1047]

前記接触させる段階の前に、がん寛解状態の対象を選択する段階をさらに含む、本発明1027~1046のいずれかの方法。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

50

【配列表】

2023175773000001.xml

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 31/4965(2006.01)
A 6 1 K 31/519(2006.01)
A 6 1 K 31/455(2006.01)
A 6 1 K 31/506(2006.01)
A 6 1 K 31/517(2006.01)
A 6 1 K 39/395(2006.01)
A 6 1 K 38/21 (2006.01)
A 6 1 K 33/36 (2006.01)
A 6 1 K 31/203(2006.01)
A 6 1 K 31/706(2006.01)
A 6 1 K 31/166(2006.01)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)
A 6 1 K 31/513 (2006.01)
A 6 1 K 31/337 (2006.01)
A 6 1 K 33/243 (2019.01)
A 6 1 K 31/282 (2006.01)
A 6 1 K 31/352 (2006.01)
A 6 1 K 31/5377(2006.01)
A 6 1 K 31/145 (2006.01)
C 0 7 K 14/51 (2006.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)

F I

A 6 1 K 45/00
 A 6 1 K 31/4965
 A 6 1 K 31/519
 A 6 1 K 31/455
 A 6 1 K 31/506
 A 6 1 K 31/517
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 38/21
 A 6 1 K 33/36
 A 6 1 K 31/203
 A 6 1 K 31/706
 A 6 1 K 31/166
 A 6 1 K 31/704
 A 6 1 K 31/513
 A 6 1 K 31/337
 A 6 1 K 33/243
 A 6 1 K 31/282
 A 6 1 K 31/352
 A 6 1 K 31/5377
 A 6 1 K 31/145
 C 0 7 K 14/51
 C 0 7 K 16/28

T

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アギーレ - ギゾー ジュリオ エー .

アメリカ合衆国 1 0 0 2 9 ニューヨーク州 ニューヨーク ワン グスタフ エル . レビー プレイス